



**HAL**  
open science

# Etude préliminaire sur l'apport du galactomannane, du $\beta$ -D-glucane, du 3-hydroxybutyrate et de l'électrophorèse des protéines sériques dans le diagnostic de l'aspergillose des oiseaux

Emilie Jeannès

## ► To cite this version:

Emilie Jeannès. Etude préliminaire sur l'apport du galactomannane, du  $\beta$ -D-glucane, du 3-hydroxybutyrate et de l'électrophorèse des protéines sériques dans le diagnostic de l'aspergillose des oiseaux. Sciences du Vivant [q-bio]. 2024. dumas-04919626

**HAL Id: dumas-04919626**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04919626v1>**

Submitted on 29 Jan 2025

**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.

**ÉTUDE PRÉLIMINAIRE SUR L'APPORT DU  
GALACTOMANNANE, DU  $\beta$ -D-GLUCANE, DU 3-  
HYDROXYBUTYRATE ET DE L'ÉLECTROPHORÈSE  
DES PROTÉINES SÉRIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE  
L'ASPERGILLOSE DES OISEAUX**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de

Nantes le jeudi 05 décembre 2024

par

**Emilie Claudie Mathilde JEANNÈS**

Sous la direction de

**Sabrina VIEU**

Président du jury : Monsieur Jacques GUILLOT, *Professeur à ONIRIS – VetAgroBio Nantes*

Membres du jury : Monsieur Aurélien MADOUASSE, *MC HDR à ONIRIS – VetAgroBio Nantes*

Madame Sabrina VIEU, *AERC à ONIRIS – VetAgroBio Nantes*

Membre invité : Monsieur Guillaume DESOUBEAUX, *PUPH au CHRU de Tours*



**ÉTUDE PRÉLIMINAIRE SUR L'APPORT DU  
GALACTOMANNANE, DU  $\beta$ -D-GLUCANE, DU 3-  
HYDROXYBUTYRATE ET DE L'ÉLECTROPHORÈSE  
DES PROTÉINES SÉRIQUES DANS LE DIAGNOSTIC DE  
L'ASPERGILLOSE DES OISEAUX**

**THÈSE**

pour l'obtention du diplôme d'État de

**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de

Nantes le jeudi 05 décembre 2024

par

**Emilie Claudie Mathilde JEANNÈS**

Sous la direction de

**Sabrina VIEU**

Président du jury : Monsieur Jacques GUILLOT, *Professeur à ONIRIS – VetAgroBio Nantes*

Membres du jury : Monsieur Aurélien MADOUASSE, *MC HDR à ONIRIS – VetAgroBio Nantes*

Madame Sabrina VIEU, *AERC à ONIRIS – VetAgroBio Nantes*

Membre invité : Monsieur Guillaume DESOUBEAUX, *PUPH au CHRU de Tours*



<b>Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment</b>		
Responsable : Emmanuel JAFFRES – Adjointe : Frédérique NGUYEN		
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr)	Antoine ROSTANG (MC) Meg-Anne MORICEAU (MC Stagiaire) Martine KAMMERER (Pr émérite) Marc GOGNY (Pr émérite)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Lionel MARTIGNAT (Pr)	Julie HERVE (Pr) Grégoire MIGNOT (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Marie-Anne COLLE (Pr) Jérôme ABADIE (MC) Florian CHOCTEAU (MC stagiaire)	Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC) Pierre CORDIER (CERC)
Biochimie alimentaire industrielle	Carole PROST (Pr) Joëlle GRUA (MC)	Clément CATANEO (MC) Alix KHALIL (MC) Laurent LE THUAUT (MC)
Microbiotech	Hervé PREVOST (Pr) Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC HDR) Emmanuel JAFFRES (MC HDR)	Mathilde MOSSER (MC) Boris MISERY (MC) Raouf TAREB (MC) Judith LORANT (MC stagiaire)
PACENV = VET1	Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG)	Charlotte MOCQUARD (PRAG) Aurore CALVEL (PRAG)
<b>Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique</b>		
Responsable : Raphaël GUATTEO – Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER		
Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Christine FOURICHON (Pr)	Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Ségolène CALVEZ (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC HDR) Nora NAVARRO-GONZALES (MC)
Infectiologie	Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC)	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC HDR) Léa LOISEL (AERC) Kenny OBERLE (MC) Nadine RAVINET (MC)
Médecine des animaux d'élevage	Catherine BELLOC (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Anne RELUN (MC) Aurore BOISHARDY (CERC)	Sébastien ASSIE (MC) Isabelle BREYTON (MC) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Maud ROUAULT (AERC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (MC) Bruno LE BIZEC (Pr)	Sofia STRUBBIA (MC) Marie-France PILET (Pr)

<b>Département DSC Sciences cliniques</b>		
Responsable : <b>Olivier GAUTHIER</b> – Adjoint : <b>Marion FUSELLIER</b>		
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC)	
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (Pr)	Pierre MAITRE (MC) Caroline TESSIER (MC) Claire DEFOURMSTRAUX (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Jacques GUILLOT (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass) Vincent BRUET (MC)	Sabrina VIEU (AERC) Maria Dolores SANCHEZ (CERC)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Françoise ROUX (Pr) Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Nora BOUHSINA (MC)	Nicolas CHOUIN (MC) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) Catherine IBISCH (MC HDR) Aurélia LEROUX (MC) Odile SENECAAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Jean-François BRUYAS (Pr) François FIENI (Pr)	Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND (Pr)
<b>Département GPA Génie des procédés alimentaires</b>		
Responsable : <b>Vanessa JURY</b> – Adjointe : <b>Cyril TOUBLANC</b>		
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET-PLOQUIN (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Michel HAVET (Pr)	Alain LEBAIL (Pr) Olivier ROUAUD (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC)	Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)
PAC-ING	Cyril Gaillard (PCEA)	
<b>Département MSC Management, statistiques et communication</b>		
Responsable : <b>Jean-Michel GALIHARRET</b> – Adjointe : <b>Sibylle DUCHAINE</b>		
Mathématiques, statistiques, informatique	Chantal THORIN (Pr Ag) Evelyne VIGNEAU (Pr) Jean-Michel GALIHARRET (MC)	Véronique CARIOU (Pr) Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC)
Economie, gestion, législation	Jean-Marc FERRANDI (Pr) Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Franck INSGNARES (IE)	Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia MAHJOUB (MC) Samira ROUSSELIERE (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. Cont.)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. Cont.) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) Patricia JOSSE (Ens. Cont.)	Shaun MEEHAN (Ens. Cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (ENS. Cont.)

## Formations Techniciens supérieurs

Responsable : Laurence FRERET

Laurence FRERET  
(PCEA) Françoise  
BRICHET (IAE)  
Christophe CARON  
(PLPA) Virginie MAGIN  
(Ens.cont.)

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel, PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole, HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens. Cont. : Enseignant Contractuel.



La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : Emilie Jeannès
- Année de soutenance : 2024.
- Titre de la thèse : Étude préliminaire sur l'apport au galactomanne, du  $\beta$ -D-glucane, du 3-hydroxybutyrate et de l'électrophorèse des protéines sériques dans le diagnostic de l'aspergillose des oiseaux.
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes.
- Ecole de soutenance : Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique

Nombre de pages : 208 p

## Remerciements

### **A M. Jacques GUILLOT, Professeur, et Président du jury,**

Pour m'avoir accordé l'honneur de présider mon jury de soutenance de thèse. Mais également pour avoir consacré du temps à ce projet ; je tiens à vous remercier pour votre enthousiasme et vos encouragements qui m'ont permis de garder confiance lors de la finalisation de ma thèse.

Mes hommages sincères et respectueux.

### **A M. Aurélien MADOUASSE, Maître de conférences habilité à diriger des recherches, et Assesseur du jury,**

Pour avoir accepté d'évaluer mon travail en tant qu'assesseur de mon jury de thèse. Pour votre écoute, votre gentillesse et votre disponibilité inconditionnelle, pour le temps que vous m'avez accordé aux différentes étapes de ce projet.

Mes remerciements les plus sincères.

### **A Mme Sabrina VIEU, Assistance d'Enseignement et de Recherche Contractuelle, Directrice de thèse,**

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse, et pour la confiance que tu m'as témoignée depuis ce moment. Pour ton encadrement précieux, ton accompagnement sans faille à chaque étape malgré tes autres engagements. Pour ta patience et ta bonne humeur, pour m'avoir toujours rassurée et permis de garder confiance.

Je n'aurais pas osé rêver meilleure directrice de thèse, pour tout cela je t'adresse mes plus chaleureux remerciements.

### **A M. Guillaume DESOUBEAUX, Professeur d'Université et Praticien Hospitalier au CHU de Tours, Membre invité du jury,**

Pour nous avoir fait l'honneur d'accepter notre invitation à ma soutenance de thèse. Pour votre accueil chaleureux à chacune de nos visites dans votre service, pour votre sollicitude et vos précieux conseils.

Sincères remerciements.

### **A Nadine Brisseau et Anne Lehébel, Ingénieures de Recherches à l'UMR BIOEPAR,**

Pour la formation à laquelle j'ai eu l'immense chance d'assister. Pour votre disponibilité et votre aide précieuse concernant toutes les analyses statistiques de ma thèse, en particulier l'analyse multivariée que vous avez réalisée. Vous m'avez permis à chaque fois d'approfondir mon travail, votre participation a grandement amélioré la qualité de ma thèse.

Mes remerciements les plus sincères.

**Aux Drs Vétérinaires Cordier Pierre et Soetart Nicolas**, pour votre temps, pour avoir apporté votre expertise dans l'interprétation des examens réalisés dans le cadre de cette étude.

**A tous les vétérinaires** qui ont contribué à l'élaboration de la base de données de l'étude, et en particulier au Dr. Vétérinaire LAMGLAIT Benjamin pour votre accueil chaleureux lors de notre visite au zoo de Beauval.

**A Pascale**, technicienne au laboratoire de l'unité de parasitologie, mycologie et médecine tropicale du CHU de Tours, pour votre aide technique et vos précieux conseils.

**A toutes les techniciennes du LabOniris** pour votre participation au projet, et en particulier à Léa Urffer pour ta disponibilité et tes explications.

# Table des matières

## Table des annexes

## Table des illustrations

Table des figures

Table des tableaux

## Table des abréviations

## Introduction

## Contexte bibliographique

I.	Rappels concernant l'appareil respiratoire des oiseaux .....	25
A.	Eléments d'anatomie du système respiratoire .....	25
1.	Cavités nasales.....	25
2.	Sinus infraorbitaires.....	26
3.	Larynx .....	26
4.	Trachée .....	27
5.	Syrinx .....	27
6.	Bronches primaires.....	28
7.	Bronches secondaires.....	28
8.	Bronches tertiaires .....	29
9.	Poumons.....	30
10.	Sacs aériens .....	30
11.	Bilan .....	32
B.	Histologie.....	32
C.	Modalités d'échanges des gaz.....	33
1.	Circulation de l'air dans le système respiratoire .....	33
a)	Particularités liées à l'anatomie des oiseaux.....	33
b)	Les cycles respiratoires .....	33
c)	Circulation de l'air au niveau de la surface d'échanges .....	34
2.	Lieu d'échanges gazeux .....	34
D.	Moyens de défense de l'appareil respiratoire .....	35
1.	Moyens de défenses non spécifiques.....	35
a)	Eléments physiques .....	35
b)	Eléments cellulaires : les phagocytes respiratoires aviaires (FARM).....	35
(1)	Les hétérophiles.....	35
(2)	Les macrophages .....	36

(a)	Les macrophages résidents .....	36
(b)	Les macrophages sous-épithéliaux et intravasculaires .....	36
2.	Moyens de défenses spécifiques.....	36
a)	Tissu lymphoïde associé aux cavités nasales (NALT) et aux bronches (BALT).....	36
b)	Immunité à médiation cellulaire .....	36
c)	Immunité à médiation humorale .....	36
II.	Le genre <i>Aspergillus</i> .....	40
A.	Biologie et écologie .....	40
1.	Classification .....	40
2.	Morphologie macroscopique .....	40
3.	Morphologie microscopique .....	41
4.	Identification .....	42
a)	Aspect macroscopique des colonies.....	42
b)	Observation microscopique des produits de culture .....	42
c)	Méthodes moléculaires.....	43
5.	Cycle de vie.....	43
B.	Pouvoir pathogène .....	43
1.	La paroi fongique, un mécanisme de défense.....	43
a)	Structure classique de la paroi d' <i>Aspergillus</i> .....	43
b)	Particularités de la paroi des conidies.....	44
2.	Mécanismes pathogéniques généraux.....	44
a)	Production de facteurs de virulence .....	45
b)	Pouvoirs pathogènes des mycotoxines .....	45
c)	La sporulation .....	45
d)	Formation de biofilms .....	46
(1)	Formation du biofilm.....	46
(2)	Résistance du biofilm aux traitements antifongiques.....	47
3.	Cas particuliers au sein des organismes aviaires.....	47
a)	Particularités anatomiques.....	47
b)	Particularités métaboliques.....	48
c)	Particularités immunitaires .....	48
III.	L'aspergillose aviaire .....	49
A.	Éléments d'épidémiologie .....	49
1.	Espèces concernées.....	49
2.	Matières virulentes.....	49
3.	Réceptivité et sensibilité .....	49

a)	Liées aux facteurs de risques environnementaux .....	49
b)	Liées aux facteurs prédisposants de l'individu .....	50
4.	Epidémiologie synthétique .....	50
B.	Importance économique actuelle .....	50
C.	Diagnostic clinique de l'aspergillose aviaire .....	51
1.	Signes cliniques occasionnés .....	51
a)	Classification des atteintes .....	51
(1)	Forme aiguë .....	51
(2)	Forme chronique .....	52
b)	Atteinte respiratoire .....	52
c)	Atteinte oculaire .....	52
d)	Atteinte neurologique .....	52
e)	Autres atteintes .....	52
2.	Diagnostic différentiel .....	53
D.	Examens complémentaires réalisables en clinique .....	54
1.	Hématologie .....	54
2.	Biochimie .....	54
3.	Radiographie .....	54
4.	Tomodensitométrie et IRM .....	56
5.	Endoscopie .....	57
a)	Visualisation des voies respiratoires .....	57
b)	Obtention de prélèvements pour les examens ultérieurs .....	57
E.	Méthodes diagnostiques de laboratoire actuelles .....	57
1.	Introduction .....	57
2.	Electrophorèse des protéines sériques .....	58
a)	Principe général .....	58
b)	Variations pathologiques .....	59
(1)	Rapport albuminémie/globulinémie (rapport A/G) .....	59
(2)	Pré-albumine .....	60
(3)	$\alpha$ 1-globulines .....	60
(4)	$\alpha$ 2-globulines .....	60
(a)	Haptoglobine .....	60
(b)	Céruleoplasmine et autres marqueurs inflammatoires .....	61
(5)	$\beta$ -globulines et $\gamma$ -globulines .....	61
3.	Histopathologie .....	62
a)	Méthodologie .....	62

b)	Classification des lésions .....	62
c)	Aspect microscopique des lésions.....	62
4.	Culture mycologique .....	63
5.	Dosage du 3-hydroxybutyrate .....	64
6.	Sérologie.....	64
a)	Anticorps anti- <i>Aspergillus</i> .....	65
b)	Antigènes <i>Aspergillus</i> .....	66
(1)	Détection du galactomannane .....	66
(a)	Eléments de physiologie.....	66
(b)	Le test « Platelia <i>Aspergillus</i> Ag™ » en médecine humaine .....	66
(c)	Le test « Platelia™ » en médecine aviaire .....	67
(2)	Dosage du β-D-glucane.....	67
(a)	Principe du test.....	67
(b)	Le manque de spécificité du test.....	68
(c)	Variations inter-espèces .....	68
(d)	Amélioration de la sensibilité du test chez les individus touchés sévèrement .....	68
(3)	Détection de la gliotoxine.....	69
(4)	Détection de la mannoprotéine .....	69
(a)	Principe général.....	69
(b)	En médecine humaine .....	69
(c)	En médecine aviaire.....	70
7.	PCR.....	70
8.	Spectrométrie de masse.....	71
9.	Immunohistochimie.....	72
10.	Autopsie.....	72
a)	Types lésionnels.....	72
(1)	Appareil respiratoire.....	72
(2)	Sacs aériens .....	72
(3)	Poumons.....	72
(4)	Autres organes.....	73
b)	Analyse cytologique.....	73
11.	Bilan .....	74
IV.	Objectifs et cadre de l'étude .....	78
A.	Objectifs de l'étude .....	78
B.	Cadre de l'étude .....	78
V.	Matériels et méthodes .....	80

A.	Constitution de la cohorte d'étude .....	80
1.	Inclusion des individus.....	80
2.	Affectation des individus dans les groupes « témoins » et « malades ».....	80
B.	Réalisation des expériences .....	81
1.	Culture fongique.....	81
2.	Histopathologie .....	81
3.	Dosage du 3-hydroxybutyrate .....	81
4.	Dosage des protéines totales .....	81
5.	Electrophorèse des protéines sériques .....	82
6.	Détection de la mannoprotéine fongique à l'aide du test Asp-LFD .....	82
7.	Détection du galactomannane à l'aide du test Platelia™ .....	83
8.	Dosage du $\beta$ -D-glucane à l'aide du test Fungitell™ .....	84
C.	Analyses statistiques .....	84
1.	Analyses univariées .....	84
a)	Description des tests quantitatifs (galactomannane, $\beta$ -D-glucane, 3-hydroxybutyrate, électrophorèse des protéines sériques, protéines totales) .....	84
(1)	Obtention des paramètres statistiques.....	84
(2)	Etude des moyennes .....	84
(3)	Etude des seuils .....	85
b)	Description des tests qualitatifs (analyse histopathologique, culture fongique, détection de la mannoprotéine).....	85
2.	Analyses bivariées .....	85
a)	Comparaison des tests diagnostiques .....	85
(1)	Comparaison des tests quantitatifs.....	85
(2)	Comparaison des tests qualitatifs .....	86
(3)	Combinaison des tests diagnostiques .....	86
3.	Analyse multivariée .....	86
VI.	Résultats .....	87
A.	Recrutement des oiseaux .....	87
B.	Prélèvements reçus .....	87
C.	Groupes .....	88
D.	Description des tests quantitatifs.....	89
1.	Détection du galactomannane .....	89
a)	Précisions concernant les manipulations en laboratoire .....	89
b)	Résultats de la détection du galactomannane .....	89
c)	Etude des seuils du test Platelia™ appliquée à la cohorte .....	91



d)	Courbe ROC .....	92
2.	$\beta$ -D-glucane .....	94
a)	Dosage du $\beta$ -D-glucane.....	94
b)	Etude des seuils du test Fungitell™ au sein de la cohorte.....	95
c)	Courbe ROC .....	97
3.	3-hydroxybutyrate.....	98
a)	Dosage du 3-hydroxybutyrate .....	98
b)	Courbe ROC .....	99
4.	Electrophorèse des protéines sériques .....	101
a)	Dosage de l'albumine .....	102
b)	$\alpha$ 2-globulines .....	103
(1)	Dosage des $\alpha$ 2-globulines.....	103
(2)	Courbe ROC .....	105
c)	Rapport A/G.....	106
(1)	Mesure du rapport A/G .....	106
(2)	Courbe ROC .....	108
5.	Protéines totales.....	109
a)	Dosage des protéines totales .....	109
b)	Courbe ROC .....	111
E.	Résumé de la partie descriptive des tests quantitatifs .....	112
F.	Description des tests qualitatifs .....	114
1.	Description des résultats de la culture fongique.....	114
2.	Description des résultats de l'analyse histologique .....	114
3.	Description des résultats de la détection de la mannoprotéine .....	115
a)	Tables de contingence et test de Fisher .....	115
b)	Calcul des sensibilités et spécificités .....	116
G.	Résumé de la partie descriptive des tests qualitatifs .....	116
H.	Comparaison des tests quantitatifs.....	116
I.	Comparaison des tests qualitatifs .....	117
J.	Combinaison des tests diagnostiques .....	117
1.	Détermination des seuils utilisés pour chacun des tests .....	117
2.	Tableau synthétique des combinaisons des différents tests diagnostiques .....	117
K.	Analyse multivariée .....	119
VII.	Discussion .....	120
A.	Discussion autour de la constitution de la base de données .....	120
B.	Discussion autour des échantillons de sang .....	120

1.	Concernant la quantité prélevée .....	120
2.	Concernant la conservation des échantillons.....	120
3.	Concernant la manipulation des échantillons .....	121
4.	Concernant la qualité des échantillons .....	121
C.	Discussion autour de l'analyse du $\beta$ -D-glucane.....	121
D.	Discussion autour des résultats.....	122
1.	Analyse descriptive des résultats quantitatifs.....	122
a)	Le dosage du 3-hydroxybutyrate.....	122
b)	L'électrophorèse des protéines sériques .....	122
c)	La détection du galactomannane .....	123
d)	Le dosage du $\beta$ -D-glucane .....	123
2.	La détection de la mannoprotéine .....	124
a)	Analyse univariée.....	124
b)	La comparaison de la culture fongique et du test Asp-LFD.....	124
3.	La combinaison des tests.....	125
4.	Analyse multivariée .....	125
E.	Discussion autour des effectifs de la présente étude .....	126
F.	Discussion autour des outils diagnostiques à choisir selon la forme clinique de l'aspergillose .....	126
	<b>Identification.....</b>	<b>135</b>

## Conclusion

## Références bibliographiques

## Table des annexes

Annexe 1 : présentation de la base de données anonymisée et du dictionnaire de données associé.....	130
Annexe 2 : résultats complémentaires concernant la détection du galactomannane.....	140
Annexe 3 : résultats complémentaires concernant le dosage du $\beta$ -D-glucane.....	141
Annexe 4 : résultats complémentaires concernant le dosage du 3-hydroxybutyrate.....	142
Annexe 5 : résultats complémentaires concernant le dosage de la fraction en albumine dans le cadre de l'électrophorèse des protéines sériques.....	143
Annexe 6 : résultats complémentaires concernant le dosage de la fraction en $\alpha$ 2-globulines dans le cadre de l'électrophorèse des protéines sériques.....	144
Annexe 7 : résultats complémentaires concernant la mesure du rapport A/G dans le cadre de l'électrophorèse des protéines sériques.....	145
Annexe 8 : résultats complémentaires concernant la mesure des protéines totales.....	146
Annexe 9 : histogrammes de distribution et tableaux récapitulatifs des paramètres descriptifs des mesures de pré-albumine, des $\alpha$ 1-globulines, des $\beta$ -globulines et des $\gamma$ -globulines (non exploités dans la partie « Résultats »).....	147
Annexe 10 : comparaisons des tests quantitatifs qui ne présentent pas de lien de corrélation forte, représentées sous forme de nuages de points, avec le calcul du coefficient de Spearman associé.....	159
Annexe 11 : arbre décisionnel concernant le choix des tests statistiques utilisés dans le traitement des données.....	171
Annexe 12 : mode opératoire illustré de la réalisation en laboratoire du test Fungitel <sup>TM</sup> .....	172
Annexe 13 : mode opératoire illustré de la réalisation en laboratoire du test Platelia <sup>TM</sup> .....	175
Annexe 14 : échelle de condition corporelle des oiseaux utilisée pour scorer l'état d'embonpoint des individus de l'étude.....	178
Annexe 15 : exemples de scripts réalisés sur le logiciel R pour l'analyse statistique des données obtenues lors de l'étude.....	179

## Table des illustrations

### Table des figures

<b>Figure 1</b> : photographie d'une coupe transversale des cavités nasales au niveau de la conque nasale rostrale, chez un poulet, d'après (König et al. 2016). .....	25
<b>Figure 2</b> : dessin représentant la localisation du diverticule rostral du sinus infraorbitaire chez un cacaotès blanc, d'après (Ritchie, Harisson, Harisson 1994). .....	26
<b>Figure 3</b> : schéma des éléments anatomiques du syrinx, configuration de ces éléments lors de la respiration seule, et fonctionnement lors de la phonation, d'après (Schmidt, Wild 2014). .....	28
<b>Figure 4</b> : schéma illustrant la disposition des bronches primaires et secondaires au sein d'un poumon gauche chez un cygne tuberculé ( <i>Cygnus olor</i> ), modifié d'après (Duncker 1974). .....	29
<b>Figure 5</b> : photographie caudo-ventrale des organes abdominaux d'un jeune poulet, illustrant la proximité entre les sacs aériens caudaux et ces organes, modifié d'après (Casteleyn et al. 2018).....	31
<b>Figure 6</b> : schéma des voies respiratoires supérieures et inférieures chez la poule, modifié d'après (Fedde 1998).....	32
<b>Figure 7</b> : Représentation schématique de la circulation du flux d'air au sein des voies respiratoires inférieures aviaires, modifié d'après (Scanes, Dridi 2022). .....	34
<b>Figure 8</b> : photographie d'une culture d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (photographie réalisée le 16/11/2023 par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina). .....	41
<b>Figure 9</b> : Observation microscopique (x400, coloration au coton bleu lactophénol) d'un frottis de culture d' <i>Aspergillus fumigatus</i> obtenu à partir de l'autopsie d'un paon ( <i>Pavo cristatus</i> ) présentant des granulomes aspergillaires (modifiée d'après (Mariappan et al. 2022)).....	42
<b>Figure 10</b> : représentation schématique de la paroi cellulaire d' <i>Aspergillus fumigatus</i> , d'après (Abad et al. 2010).....	44
<b>Figure 11</b> : image radiographique de face d'un aigle atteint d'aspergillose ; sont visibles des nodules, et un épaississement du sac aérien thoracique caudal caractérisé par une opacité tissulaire, d'après (Greenberg, Secrest 2016). .....	55
<b>Figure 12</b> : image de tomodensitométrie illustrant l'occlusion luminale de la bronche secondaire latéro-ventrale gauche liée à la présence de tissu inflammatoire développé à partir d'une infection fongique chez une grue blanche de 50 jours d'âge, d'après (Schwarz et al. 2016). .....	56
<b>Figure 13</b> : profil de l'électrophorèse des protéines sériques d'un patient du groupe témoin (CVF039), réalisé dans le cadre de l'étude (le 18/01/2024). .....	58
<b>Figure 14</b> : photographie microscopique de granulomes multifocaux issus d'une coupe de poumon de vautour (coloration H&E, observation x100). Ces granulomes présentent en leur centre de la nécrose caséuse, d'après (Mariappan et al. 2022). .....	63
<b>Figure 15</b> : photographie de l'appareil respiratoire d'un coq domestique ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) atteint d'aspergillose, réalisée le 25/10/2023 lors de son autopsie (par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina). .....	73
<b>Figure 16</b> : résumé des étapes de l'infection par <i>Aspergillus</i> spp. sous forme d'un schéma, et présentation des analyses de laboratoires associées .....	74
<b>Figure 17</b> : photographies de quatre snap-test Asp-LFD illustrant les différents scores attribués selon l'intensité de la ligne de la zone test, clichés réalisés le 17/06/2024 par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina.....	83
<b>Figure 18</b> : histogramme de distribution des résultats au test Platelia™ au sein de la cohorte. ....	90

<b>Figure 19</b> : boxplot des résultats au test Platelia™ au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	91
<b>Figure 20</b> : graphique descriptif des résultats au test Platelia™ en fonction des résultats de l'analyse histologique. ....	93
<b>Figure 21</b> : courbe ROC du test Platelia™, avec l'analyse histologique comme <i>gold standard</i> . ....	93
<b>Figure 22</b> : histogramme de distribution des résultats au test Fungitell™ au sein de la cohorte. ....	94
<b>Figure 23</b> : boxplot des résultats au test Fungitell™ au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	95
<b>Figure 24</b> : graphique descriptif des résultats au test Fungitell™ en fonction des résultats de l'analyse histologique. ....	97
<b>Figure 25</b> : courbe ROC du test Fungitell™ avec l'analyse histologique comme <i>gold standard</i> . ....	98
<b>Figure 26</b> : histogramme de distribution des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate au sein de la cohorte. ....	98
<b>Figure 27</b> : boxplot des résultats au dosage du 3-hydroxybutyrate au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	99
<b>Figure 28</b> : graphique descriptif des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate en fonction des résultats de l'analyse histologique. ....	100
<b>Figure 29</b> : courbe ROC du dosage du 3-hydroxybutyrate avec l'analyse histologique comme <i>gold standard</i> . ....	100
<b>Figure 30</b> : histogramme de distribution des résultats du dosage de l'albumine au sein de la cohorte. ....	102
<b>Figure 31</b> : boxplot des résultats à la mesure de la fraction en albumine au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	103
<b>Figure 32</b> : histogramme de distribution des résultats du dosage des $\alpha$ 2-globulines au sein de la cohorte. ....	104
<b>Figure 33</b> : boxplot des résultats à la mesure de la fraction en $\alpha$ 2-globulines au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	105
<b>Figure 34</b> : graphique descriptif des résultats du dosage des $\alpha$ 2-globulines en fonction des résultats de l'analyse histologique. ....	105
<b>Figure 35</b> : courbe ROC du dosage des $\alpha$ 2-globulines avec l'analyse histologique comme <i>gold standard</i> . .	106
<b>Figure 36</b> : histogramme de distribution des résultats de la mesure du rapport A/G au sein de la cohorte. ....	106
<b>Figure 37</b> : boxplot des résultats du rapport A/G au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	107
<b>Figure 38</b> : graphiques QQplot du rapport A/G dans le groupe des malades (38.a) et dans le groupe témoin (38.b). ....	108
<b>Figure 39</b> : graphique descriptif des résultats de la mesure du rapport A/G en fonction des résultats de l'analyse histologique. ....	108
<b>Figure 40</b> : courbe ROC de la mesure du rapport A/G avec l'analyse histologique comme <i>gold standard</i> . ....	109
<b>Figure 41</b> : histogramme de distribution des résultats du dosage des protéines totales au sein de la cohorte. ....	110
<b>Figure 42</b> : boxplot des résultats de la mesure des protéines totales au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux. ....	111
<b>Figure 43</b> : graphiques QQplot des protéines totales dans le groupe de malades (43.a) et dans le groupe témoin (43.b). ....	111
<b>Figure 44</b> : graphique descriptif des résultats du dosage des protéines totales en fonction des résultats de l'analyse histologique. ....	112

<b>Figure 45</b> : courbe ROC des résultats du dosage des protéines totales avec l'analyse histologique comme <i>gold standard</i> .....	112
<b>Figure 46</b> : graphique de corrélation des variables obtenu par l'ACP des quatre variables suivantes : détection du galactomannane, dosage du $\beta$ -D-glucane, dosage du 3-hydroxybutyrate et dosage des $\alpha$ 2- globulines .....	119

## Table des tableaux

<b>Tableau I</b> : Récapitulatif des différents épithéliums rencontrés dans le système respiratoire aviaire, d'après (König et al. 2016), (Casteleyn et al. 2018), (Orosz, Lichtenberger 2011), (Reese, Dalamani, Kaspers 2006), (Crosta 2021), (Smith et al. 1986).....	33
<b>Tableau II</b> : résumé des principaux mécanismes de défenses immunitaires du tractus respiratoire aviaire et leurs rôles respectifs, d'après (Reese, Dalamani, Kaspers 2006), (Harmon, Glisson 1990), (Maina 2017), (Maina 2002), (Van Waeyenberghe et al. 2012), (Ohshima, Hiramatsu 2000), (Van Alstine, Arp 1988), (Suzan H. M. Jeurissen et al. 1989), (Fagerland, Arp 1993), (Lam, Lin 1984), (Smiatek et al. 2011).....	38
<b>Tableau III</b> : résumé des signes cliniques observables lors de l'examen clinique d'un individu atteint d'aspergillose (forme chronique et forme aigüe). .....	53
<b>Tableau IV</b> : les différentes fractions protéiques et les principales circonstances induisant des modifications de ces fractions protéiques dans le sang, d'après (Le Carrer 1994).....	59
<b>Tableau V</b> : récapitulatif des scores de sensibilité et de spécificité des différents tests basés sur la détection d'antigènes fongiques en médecine humaine et en médecine aviaire, d'après les manuels opératoires des tests, (Cabana et al. 2019), (Burco et al. 2012), (Pan et al. 2015), (Mota et al. 2023). .....	75
<b>Tableau VI</b> : récapitulatif des différents examens complémentaires et de laboratoire réalisables dans le cadre de l'aspergillose aviaire, et leurs principales caractéristiques. ....	76
<b>Tableau VII</b> : résumé des signes cliniques ayant motivé l'inclusion des oiseaux recrutés dans le groupe des « animaux suspects d'être atteints d'aspergillose ». ....	80
<b>Tableau VIII</b> : récapitulatif de la répartition des individus par espèces, dans chacun des deux groupes de l'étude.....	89
<b>Tableau IX</b> : paramètres descriptifs du test Platelia™ chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.....	90
<b>Tableau X</b> : Table de contingence obtenue à partir des résultats au test Platelia™ avec un seuil à 0,5 et 1	92
<b>Tableau XI</b> : Table de contingence obtenue à partir des résultats au test Platelia™ avec un seuil à 2. ....	92
<b>Tableau XII</b> : paramètres descriptifs du test Fungitell™ chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.....	94
<b>Tableau XIII</b> : Table de contingence obtenue à partir des résultats du test Fungitell™ avec un seuil à 60 pg/mL.....	96
<b>Tableau XIV</b> : Table de contingence obtenue à partir des résultats du test Fungitell™ avec un seuil à 80 pg/mL.....	96
<b>Tableau XV</b> : Table de contingence obtenue à partir des résultats du test Fungitell™ avec un seuil à 461 pg/mL.....	97
<b>Tableau XVI</b> : paramètres descriptifs du dosage du 3-hydroxybutyrate chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.....	99
<b>Tableau XVII</b> : paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction de l'albumine) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades. ....	102
<b>Tableau XVIII</b> : paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction des $\alpha$ 2-globulines) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades. ....	104
<b>Tableau XIX</b> : paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (rapport A/G) chez l'ensemble des individus, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades. ....	107

<b>Tableau XX</b> : paramètres descriptifs de la mesure des protéines totales chez l'ensemble des individus, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades. ....	110
<b>Tableau XXI</b> : tableau synthétique des sensibilités et spécificités obtenues lors de l'analyse univariée des différents tests diagnostics quantitatifs. L'origine des seuils est soit l'analyse de la courbe ROC établie dans cette étude, soit le seuil préconisé par les fabricants du test.....	113
<b>Tableau XXII</b> : table de contingence des résultats obtenus à la culture fongique.....	114
<b>Tableau XXIII</b> : table de contingence des résultats obtenus à l'analyse histologique. ....	114
<b>Tableau XXIV</b> : table de contingence des résultats obtenus au test de l'Asp-LFD.....	115
<b>Tableau XXV</b> : table de contingence des résultats au test de l'Asp-LFD lorsqu'un résultat « 0 » est considéré comme négatif.....	115
<b>Tableau XXVI</b> : table de contingence des résultats au test de l'Asp-LFD lorsque les résultats « 0 » et « 1 » sont considérés comme négatifs.....	115
<b>Tableau XXVII</b> : tableau synthétique des calculs de sensibilités et spécificités obtenues à partir des tests qualitatifs appliqués à la cohorte d'étude.....	116
<b>Tableau XXVIII</b> : table de contingence des résultats de la culture fongique et du test de l'Asp-LFD.....	117
<b>Tableau XXIX</b> : synthèse des spécificités et sensibilités obtenues lors de la combinaison en parallèle et en série des tests diagnostics. ....	118



## Table des abréviations

**ACP** : Analyse en composantes principales

**AUC** : Area under the curve.

**AVP** : Accident de la voie publique.

**CVFSE** : Centre Vétérinaire de la Faune Sauvage et des Ecosystèmes (Oniris VetAgroBio).

**FDA** : Food and Drug Administration.

**LBA** : Lavage broncho-alvéolaire.

**Max** : Maximum.

**Min** : Minimum.

**PuPd** : Polyuro-polydipsie.

**Rapport A/G** : Rapport albumine/globulines.

**UFC** : Unité formant colonie.

**VPN** : Valeur prédictive négative.

**VPP** : Valeur prédictive positive.

**Q1** : 1<sup>er</sup> quartile.

**Q3** : 3<sup>ème</sup> quartile.

## Introduction

L'aspergillose aviaire est une maladie fongique ubiquiste, dont l'agent principal est *Aspergillus fumigatus*. Cette maladie se développe chez les oiseaux à travers le monde et peut entraîner des mortalités élevées en élevage ou chez des espèces en voie de disparition. Son développement est favorisé par des conditions environnementales inadaptées, telles que des milieux peu ventilés ou de la nourriture stagnante, ainsi qu'une immunodépression consécutive à des comorbidités. En outre, l'anatomie des oiseaux permet au champignon de se développer facilement dans leur arbre respiratoire. Ces différents éléments peuvent expliquer une plus grande sensibilité des oiseaux à l'aspergillose par rapport aux mammifères.

Lorsque la maladie est avancée, elle entraîne une atteinte sévère de l'état général des oiseaux, et la rétrocession des lésions et des signes cliniques à l'aide des traitements antifongiques est complexe. Une détection précoce de l'aspergillose aviaire permettrait une meilleure prise en charge et limiterait également l'utilisation des molécules antifongiques, réduisant ainsi le risque de résistances. Un diagnostic précoce constitue donc l'un des principaux défis dans la gestion de cette maladie.

De nombreux examens complémentaires et de laboratoire sont disponibles dans le cadre du diagnostic de l'aspergillose aviaire. Le *gold standard* actuel est la culture mycologique et l'analyse histopathologique des prélèvements obtenus à partir des lésions suspectes. Or, ces examens peuvent être risqués à réaliser lorsque l'état de santé de l'oiseau est compromis. Les autres examens, moins invasifs, présentent des performances limitées. Il est donc difficile d'obtenir un diagnostic de certitude à partir de ces méthodes.

La présente étude s'inscrit dans le cadre d'une thèse d'Université menée par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina, portant sur le diagnostic et les biomarqueurs protéomiques de l'aspergillose chez les oiseaux.

La première partie de ce travail est un état des lieux concernant l'aspergillose aviaire et les particularités de l'appareil respiratoire des oiseaux. Le premier objectif expérimental est de décrire les résultats obtenus par plusieurs tests pour le diagnostic de l'aspergillose aviaire sur une cohorte d'oiseaux : la mesure des taux sériques du  $\beta$ -D-glucane, du 3-hydroxybutyrate, des protéines totales, la détection du galactomannane et d'une mannoprotéine, l'électrophorèse des protéines sériques, la réalisation de cultures fongiques et d'analyses anatomohistopathologiques. Le deuxième objectif expérimental consiste à évaluer les sensibilités et spécificités des différents tests au sein de la cohorte, avec une étude sur leurs combinaisons pour déterminer si elles offrent un meilleur outil diagnostique que les tests seuls.

## Contexte bibliographique

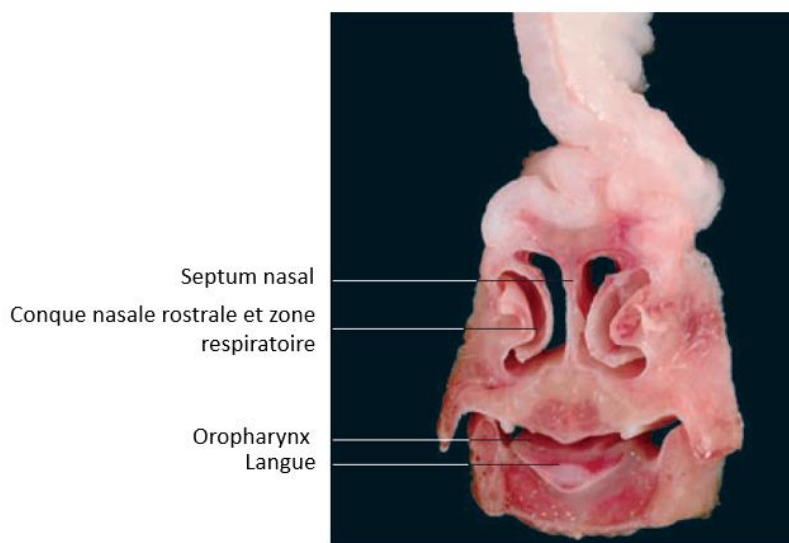
# I. Rappels concernant l'appareil respiratoire des oiseaux

## A. Éléments d'anatomie du système respiratoire

### 1. Cavités nasales

Comme chez les mammifères, le premier élément de l'appareil respiratoire aviaire, c'est-à-dire le plus crânial, ce sont les cavités nasales. Au nombre de deux, elles s'ouvrent dorsalement ou latéralement à la base du bec. L'ouverture des cavités nasales peut être recouverte par une cire, également appelée opercule, qui est une membrane kératinisée, renflée et molle, ou bien par des plumes selon les espèces. Chez certaines espèces aviaires comme le perroquet, l'opercule est présent dans les cavités nasales au lieu de les recouvrir ; dans ce cas il se situe dans la partie la plus rostrale des cavités nasales (Orosz, Lichtenberger 2011).

En termes de structures à l'intérieur des cavités nasales, des éléments ossifiées, appelés septum et conques sont présents. Le septum se trouve entre les deux cavités nasales ; il peut être complet ou présenter une ouverture rostrale permettant la communication entre les deux cavités nasales (Crosta 2021). Les conques, également appelées cornets nasaux, sont chez la plupart des oiseaux au nombre de trois : la conque nasale rostrale (visualisable dans la Figure 1), la conque nasale moyenne et la conque nasale caudale. Les conques sont des structures développées à partir de la paroi dorsale des cavités nasales, et qui font saillie à l'intérieur, participant ainsi à la filtration de l'air inspiré. La conque nasale moyenne est la plus développée (Orosz, Lichtenberger 2011).



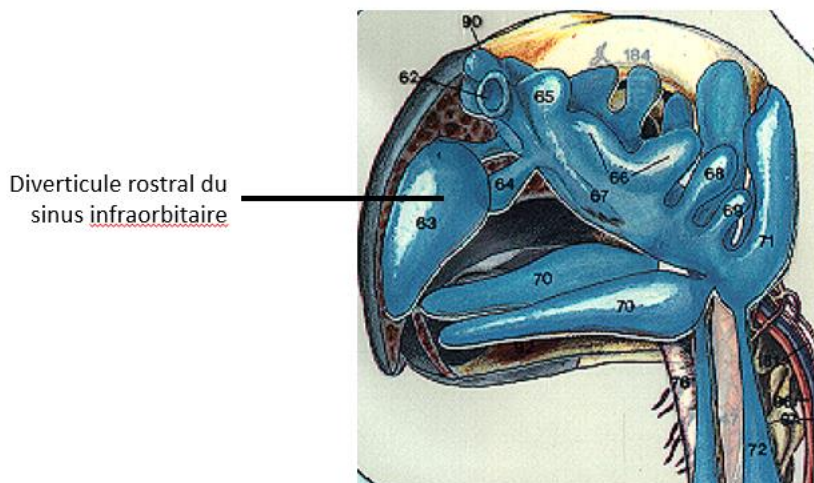
*Figure 1 : photographie d'une coupe transversale des cavités nasales au niveau de la conque nasale rostrale, chez un poulet, d'après (König et al. 2016).*

## 2. Sinus infraorbitaires

Les sinus infraorbitaires constituent les seuls sinus paranasaux aviaires. Ce sont des cavités triangulaires situées rostro-ventralement à l'orbite et latéralement aux cavités nasales. Selon les espèces aviaires, ces sinus peuvent communiquer ou être totalement séparés (Crosta 2021).

Composés de tissus mous, ils possèdent plusieurs diverticules. Le diverticule rostral, schématisé dans la Figure 2, s'étend dans le bec maxillaire, et le diverticule pré-orbitaire rostralement à l'orbite. Le diverticule post-orbitaire, quant à lui, est divisé en deux : une partie s'étend autour de l'ouverture du conduit auditif, et l'autre partie dans le rostre mandibulaire (Orosz, Lichtenberger 2011).

En termes de rapports anatomiques, les sinus infraorbitaires communiquent dorsalement avec les conques nasales moyenne et caudale. De plus, ils s'ouvrent caudalement sur le sac aérien cervico céphalique. A noter que ce sac aérien ne communique pas avec les autres sacs aériens, il ne possède donc pas de rôle dans la circulation de l'air. Il est plus développé chez les oiseaux possédant un vol puissant, alors qu'il est absent chez les oiseaux plongeurs (Orosz, Lichtenberger 2011).



*Figure 2: dessin représentant la localisation du diverticule rostral du sinus infraorbitaire chez un cacaotès blanc, d'après (Ritchie, Harisson, Harisson 1994).*

## 3. Larynx

Le larynx est formé par quatre cartilages majoritairement ossifiés. Au contraire des mammifères, la rima glottis, qui représente l'ouverture du larynx sur la trachée, n'est pas recouverte par l'épiglotte (Orosz, Lichtenberger 2011).

A noter que le diamètre du larynx, tout comme celui de la trachée, est proportionnellement supérieur par rapport à celui des mammifères (Orosz, Lichtenberger 2011). Cela induit une augmentation de l'espace mort, nécessitant des mouvements respiratoires plus amples afin d'amener suffisamment d'air au niveau de la surface d'échange des gaz.

#### 4. Trachée

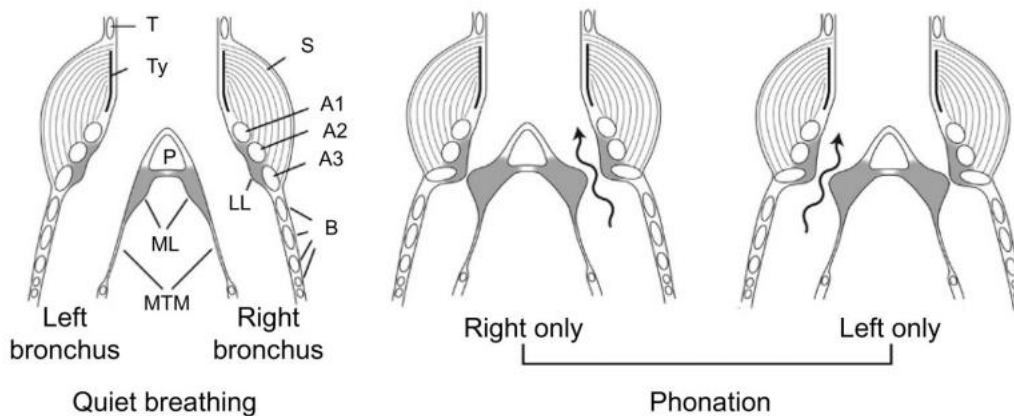
La trachée s'étend du larynx au syrinx. Anatomiquement, elle se trouve sur la ligne médiane du cou puis du thorax. Elle se situe ventralement à l'œsophage, puis elle entre en relation avec le sac aérien claviculaire qui l'entoure dans le thorax (*Crosta 2021*).

Elle est composée d'anneaux trachéaux cartilagineux complets, ce qui confère une plus grande solidité à la trachée aviaire qu'à celle des mammifères. Il existe cependant des exceptions à la structure classique de la trachée. Par exemple, les manchots présentent un septum médial à l'intérieur de la trachée, divisant celle-ci en deux tubes (*McLelland 1989a*).

#### 5. Syrinx

Cet organe, en plus d'appartenir à l'appareil respiratoire des oiseaux, permet la vocalisation. En termes d'évolution, le syrinx est une structure comparable au larynx des mammifères (*Brackenbury 1980*). Généralement trachéobronchique, il peut également avoir une nature uniquement trachéale ou bronchique selon les espèces. Ainsi, l'aspect du syrinx peut varier entre les espèces, au même titre que la trachée.

Le syrinx comporte des éléments anatomiques de différentes natures : cartilagineux et musculaires. L'ensemble cartilagineux, illustré dans la Figure 3, est composé d'anneaux trachéobronchiques, du tympanum, des lèvres latérales et médiale, cette dernière s'attachant au niveau du pessulus (*Schmidt, Wild 2014*). Les muscles sont au nombre de deux paires de muscles extrinsèques, et chez les oiseaux chanteurs quatre à six paires de muscles intrinsèques sont également présentes (*Düring et al. 2013*). Ces muscles sont impliqués dans l'adduction des lèvres latérales et médiale au sein de la lumière du syrinx qui intervient lors du phénomène de phonation. Les lèvres entrent alors en vibration à cause du passage du flux d'air dans la lumière ; ce mécanisme est à l'origine du son du chant des oiseaux (*Goller, Larsen 1997*).



*Figure 3 : schéma des éléments anatomiques du syrinx, configuration de ces éléments lors de la respiration seule (à gauche) et fonctionnement lors de la phonation (à droite), d'après (Schmidt, Wild 2014) [T : trachée, Ty : tympanum, A1/A2/A3 : anneaux trachéaux-bronchiques, B : bronches, P : pessulus, ML : lèvre médiale, LL : lèvre latérale, MTM : membrane tympaniforme médiale].*

#### 6. Bronches primaires

Les deux bronches primaires naissent juste caudalement au syrinx, par une division de la trachée.

Chacune d'elle perce la surface ventrale du poumon, dans sa partie médiane, pour y pénétrer et former une bronche primaire intra-pulmonaire. Elles s'ouvrent à l'extrémité du poumon, au niveau de l'ostium du sac aérien abdominal (Orosz, Lichtenberger 2011).

#### 7. Bronches secondaires

De chaque bronche primaire naissent quatre séries fonctionnelles de bronches secondaires. Chaque série porte un nom selon sa localisation anatomique : médio-ventrale (au nombre de quatre à cinq bronches), médio-dorsale (entre six et dix bronches), latéro-dorsale, et enfin latéro-ventrale.

Ainsi, les bronches secondaires médio-ventrales, médio-dorsales et latéro-dorsales forment trois éventails qui se déploient sur des surfaces distinctes du poumon (respectivement médio-ventrale, médio-dorsale, et latéro-dorsales). Cette disposition est illustrée dans la Figure 4. Les deux premiers types de bronches secondaires émergent de la partie crâniale de la bronche primaire intra-pulmonaire, alors que les bronches secondaires latéro-dorsales émergent de la partie caudale de la bronche primaire intra-pulmonaire.

La série fonctionnelle des bronches latéroventrales représente un cas particulier car ces bronches ne sont pas disposées en éventail ; elles pénètrent la partie latéroventrale du poumon de

manière moins régulière. Comme les bronches secondaires latéro-dorsales, elles émergent de la partie caudale de la bronche primaire intra-pulmonaire (Duncker 1974).

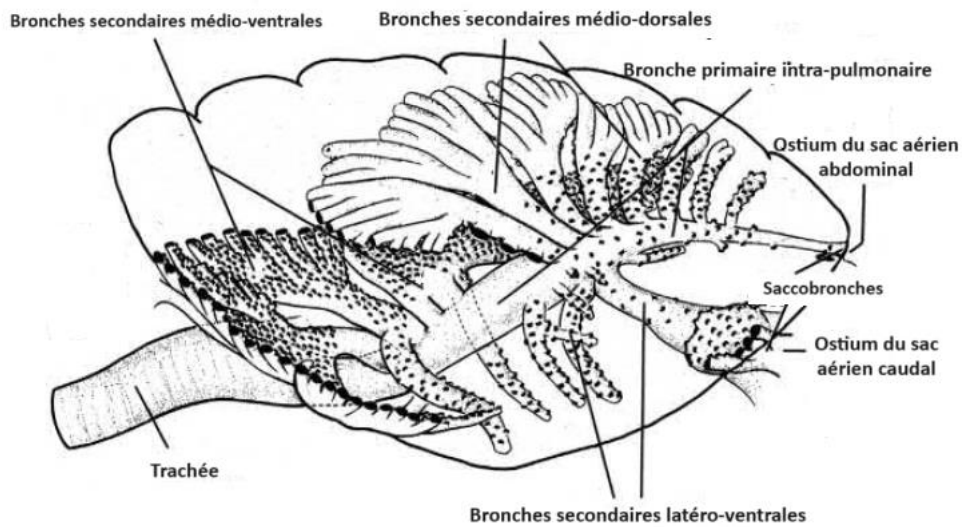


Figure 4 : schéma illustrant la disposition des bronches primaires et secondaires au sein d'un poumon gauche chez un cygne tuberculé (*Cygnus olor*), modifié d'après (Duncker 1974).

#### 8. Bronches tertiaires

Les parabronches, qui présentent un aspect de minuscules tubes, sont assemblées par centaines en série. Ces agencements en série sont parallèles entre eux. Chaque parabronche est séparée des parabronches adjacentes par un septa interparabronchique. Ces septa sont des structures formées de tissu conjonctif au sein duquel circulent des vaisseaux sanguins (artérioles et veinules).

L'ensemble formé par les bronches secondaires et les parabronches représente l'unité fonctionnelle du poumon (Duncker 1974). En effet, c'est au sein des parois de ces parabronches qu'ont lieu les échanges de gaz entre l'air inspiré et le sang, plus précisément dans les « oreillettes » formées par l'expansion des ces parois.

Fonctionnellement, ces parabronches appartiennent à deux catégories. Tout d'abord, le système paléopulmique, qui existe chez tous les oiseaux, regroupe les bronches secondaires médioventrales et médiadorsales, et les parabronches qu'elles portent (Duncker 1974). Au sein de ces parabronches, le flux d'air est unidirectionnel, dans le sens crânio-caudal (Scheid, Piiper 1989). Les parabronches néopulmoniques, qui n'existent que chez certaines espèces, proviennent des bronches secondaires latérodorsales (Duncker 1974). Le flux d'air au sein de ces parabronches varie avec le cycle respiratoire (Scheid, Piiper 1989).



## 9. Poumons

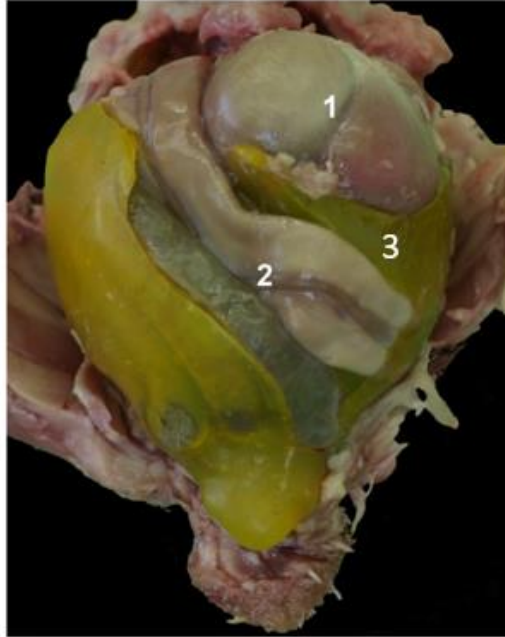
Au nombre de deux, un poumon droit et un poumon gauche, ils sont appariés et localisés crânio-dorsalement dans la cavité coelomique. Les oiseaux ne possédant pas de diaphragme, la cavité thoracique et la cavité abdominale ne sont pas séparées, et forment une unique cavité coelomique. Ventralement, les poumons sont connectés aux muscles costo-septaux par l'intermédiaire d'une membrane de tissu conjonctif appelé septum horizontal (*Crosta 2021*).

Les poumons aviaires ne sont pas lobés, en revanche comme les côtes s'enfoncent assez profondément dans la partie dorso-médiane des poumons, ceux-ci portent des empreintes costales (*Crosta 2021*). Le volume pulmonaire, dont plus de la moitié est occupé par les parabronches, n'est pas expansible ; ainsi, les poumons aviaires, contrairement aux poumons des mammifères, ne sont pas associée à de la plèvre. La circulation de l'air se fait grâce au transfert de l'air entre les différents sacs aériens (*Duncker 1974*).

## 10. Sacs aériens

La plupart des oiseaux possèdent neuf sacs aériens qui constituent des structures membraneuses reliées aux bronches primaires ou secondaires au moyen des ostia. Ces neuf sacs aériens sont répartis en une paire de sacs aériens cervicaux, une paire de sacs aériens thoraciques crâniens, une paire de sacs thoraciques caudaux, une paire de sacs abdominaux, et un unique sac aérien claviculaire. Les sacs aériens cervicaux, claviculaire, thoraciques crâniens correspondent aux sacs aériens dits « pulmonaires crâniens », alors que les sacs aériens thoraciques caudaux et abdominaux sont appelés « pulmonaires caudaux ».

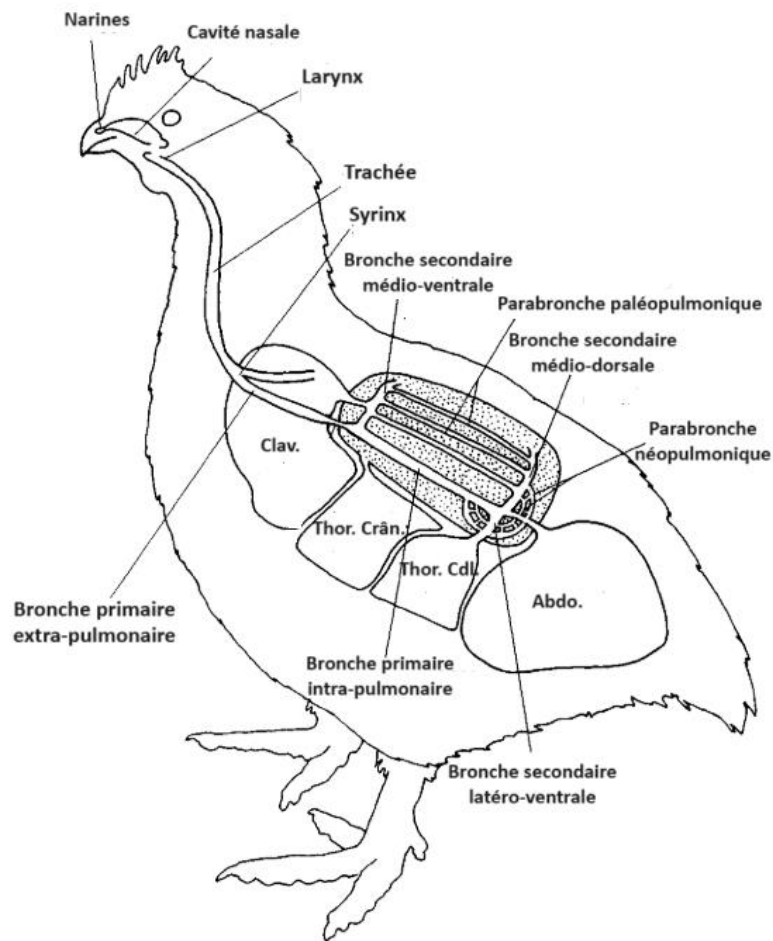
Ces sacs aériens représentent le seul élément compliant du système respiratoire aviaire. En effet, ils ont pour fonction la circulation de l'air, mais n'ont pas de rôle dans les échanges de gaz sensu stricto, puisque ce rôle est assuré exclusivement par les parabronches. A noter que les sacs aériens pulmonaires caudaux sont ceux qui observent la plus grande variation de volume au cours des mouvements respiratoires (*Duncker 1974*). De plus, ils sont extrêmement proches des organes abdominaux comme l'illustre la Figure 5, ce qui peut induire des aspergillooses viscérales dont le point de départ sont les sacs aériens caudaux.



*Figure 5: photographie caudo-ventrale des organes abdominaux d'un jeune poulet, illustrant la proximité entre les sacs aériens caudaux et ces organes, modifié d'après (Casteleyn et al. 2018) [1 : gésier, 2 : intestins, 3 : sac aérien abdominal]*

## 11. Bilan

La Figure 6 présente un bilan des principaux organes de l'appareil respiratoire aviaire.



*Figure 6 : schéma des voies respiratoires supérieures et inférieures chez la poule, modifié d'après (Fedde 1998) [Clav : sac aérien claviculaire ; Thor. Crân. : sac aérien thoracique crânial ; Thor. Cdl. : sac aérien thoracique caudal, Abdo : sac aérien abdominal]*

### B. Histologie

L'épithélium de l'appareil respiratoire des oiseaux possède des points communs avec celui des mammifères. Des éléments structuraux importants dans la lutte contre les agents pathogènes (cils, cellules caliciformes à mucus) sont notamment présents. Les différents types histologiques selon la localisation anatomique sont présentés dans le Tableau I.

		Epithéliums stratifiés			Epithéliums simples
		Pavimenteux	Pseudostratifié	Cylindrique	Squameux
Sans éléments de spécialisation		Vestibule nasal <sup>(1)</sup> Sac aérien			Parabronches <sup>(5)</sup> Capillaire aériens <sup>(6)</sup>
Avec éléments de spécialisation	Cellules caliciformes		Cavités nasales <sup>(3)</sup> Trachée Bronches primaires <sup>(3)</sup>		
	Cils		Cavités nasales Trachée <sup>(2)</sup> Bronches primaires <sup>(4)</sup>	Sac aérien dans la zone d'abouchement des parabronches <sup>(3)</sup>	

*Tableau 1: Récapitulatif des différents épithéliums rencontrés dans le système respiratoire aviaire, d'après (1) (König et al. 2016), (2) (Casteleyn et al. 2018), (3) (Orosz, Lichtenberger 2011), (4) (Reese, Dalamani, Kaspers 2006), (5) (Crosta 2021), (6) (Smith et al. 1986).*

### C. Modalités d'échanges des gaz

#### 1. Circulation de l'air dans le système respiratoire

##### a) Particularités liées à l'anatomie des oiseaux

Lors du phénomène de respiration chez l'oiseau, l'air passe successivement dans la trachée, les bronches puis les parabronches ; deux cycles respiratoires sont généralement nécessaires pour que l'air inspiré soit expiré (Maina 2017). Les oiseaux ne possèdent pas de diaphragme, ainsi seul le mouvement des côtes est responsable de la variation de volume de la cavité coelomique, et donc des variations de pression de l'air au sein des sacs aériens (Orosz, Lichtenberger 2011).

A l'inspiration, les côtes se déplacent crânialement et ventralement, augmentant le volume de la cavité coelomique, ce qui entraîne une diminution de la pression au sein des sacs aériens. De cette manière, le différentiel entre la pression atmosphérique et la pression régnant dans les sacs aériens augmente, créant un appel d'air vers les sacs aériens. Lors de l'expiration, à laquelle participent également les muscles squelettiques, le volume de la cavité coelomique diminue, augmentant la pression de l'air dans les sacs aériens, à l'origine de l'expulsion de l'air hors des sacs aériens.

##### b) Les cycles respiratoires

Environ la moitié de l'air inspiré circule jusque dans les sacs aériens crâniiaux. L'autre moitié afflue directement dans les sacs aériens caudaux et les bronches secondaires caudales en contournant les ostia des bronches secondaires crâniiales (Scheid, Slama, Willmer 1974). Lors de la première expiration, l'air circule depuis les sacs aériens caudaux vers les parabronches paléopulmoniques via les bronches secondaires médio-dorsales. Le flux aérien suit donc la direction caudo-crâniale lors du passage dans les parabronches paléopulmoniques, là où ont lieu les échanges gazeux (Maina 2017).

A la deuxième inspiration l'air expiré quitte le système paléopulmonique par les bronches secondaires crânielles pour rejoindre les sacs aériens crâniels. Enfin, à l'expiration du deuxième cycle respiratoire, le flux d'air suit les bronches primaires et la trachée pour être expulsé à l'extérieur du système respiratoire (Maina 2017). Cette circulation de l'air au cours du cycle respiratoire est illustrée à la Figure 7.

### c) Circulation de l'air au niveau de la surface d'échanges

Au sein des parabronches paléopulmoniques, l'air circule de manière unidirectionnelle, dans le sens caudo-crânial, au contraire des parabronches néopulmoniques dans lesquelles la direction du flux varie en fonction des cycles respiratoires. En effet, les parabronches néopulmoniques sont anatomiquement disposées en série par rapport aux sacs aériens caudaux. Ainsi, lors de l'inspiration le flux d'air suit une direction crânio-caudale alors qu'à l'expiration il suit une direction caudo-crâniale (Scheid, Slama, Willmer 1974).

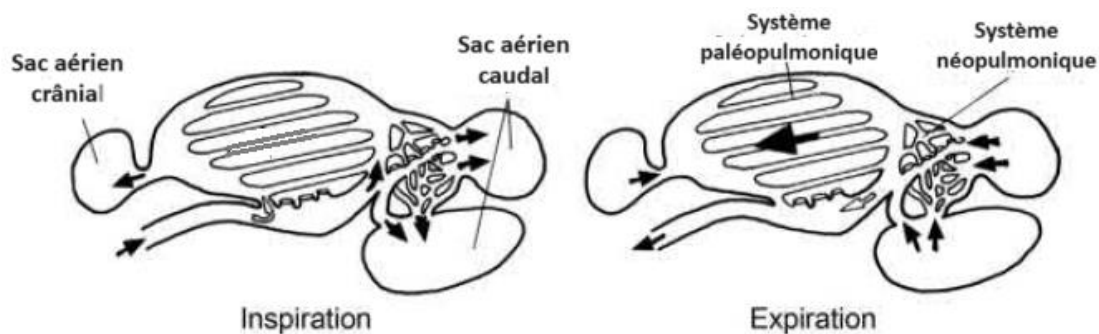


Figure 7: Représentation schématique de la circulation du flux d'air au sein des voies respiratoires inférieures aviaires, modifié d'après (Scanes, Dridi 2022).

### 2. Lieu d'échanges gazeux

La barrière gaz-sang, située au sein de la paroi des parabronches, est beaucoup plus fine chez les oiseaux comparée à celle des mammifères. Elle est composée des cellules endothéliales des capillaires sanguins, de la fusion des membranes basales des capillaires sanguins et aériens, et enfin de l'épithélium des capillaires aériens (Crosta 2021). A partir de la lumière des parabronches de petites sacculations sont formées successivement grâce à des fibres de collagène. A la base de la lumière naissent les atria qui sont suivis par les infundibula, et enfin les capillaires aériens dont le diamètre est compris entre 2 et 10  $\mu\text{m}$  (Smith et al. 1986). Au total, le parenchyme dédié aux échanges gazeux occupe 50 à 60% du volume total des parabronches (Powell, Mazzone 1983).

Anatomiquement, les capillaires aériens s'entrelacent étroitement aux capillaires sanguins, mais il n'existe pas de structure à proprement parler qui soutient cette association, comme c'est le cas des septa interalvéolaires chez les mammifères. Les capillaires sanguins et aériens sont comme suspendus entre des piliers de collagène (Casteleyn et al. 2018).

La modalité d'échanges gazeux entre le sang et l'air suit un parcours de courants croisés. Le flux d'air présent dans les parabronches est essentiellement perpendiculaire au flux du sang

désoxygéné présent dans les tissus périparabronchiques, c'est-à-dire là où ont lieu les échanges gazeux (*Scheid, Piiper 1972*).

#### D. Moyens de défense de l'appareil respiratoire

De nombreux auteurs ont mis en évidence différents facteurs qui pourraient expliquer la plus grande sensibilité des oiseaux par rapport aux affections respiratoires. Parmi ces facteurs, il est possible de retrouver une surface respiratoire plus importante, une barrière gaz-sang plus fine, un volume courant plus important, une carence enzymatique dans le métabolisme oxydatif des cellules phagocytaires et un nombre moins élevé de ces types cellulaires à la surface libre des muqueuses respiratoires (*Maina 2017*).

Ce postulat de plus grande sensibilité a conduit les chercheurs à approfondir le sujet ; mais il semblerait que les défenses du système respiratoire aviaire ne soient pas en cause car elles seraient bien plus efficaces a priori que celles des mammifères. Les conditions d'élevage stressantes seraient plus probablement responsables de cette sensibilité accrue (*Beernaert et al. 2010*).

Tous les moyens de défense présentés par la suite sont résumés avec leurs rôles respectifs dans le Tableau II.

#### 1. Moyens de défenses non spécifiques

##### a) Éléments physiques

Comme chez les mammifères, l'épithélium cilié et l'appareil muco-ciliaire constituent les premières barrières physiques à l'entrée des agents pathogènes.

##### b) Éléments cellulaires : les phagocytes respiratoires aviaires (FARM)

Les « phagocytes respiratoires aviaires » désignent l'ensemble des macrophages, des hétérophiles et des autres polynucléaires recrutés dans le tractus respiratoire lors d'une agression de ce système. Ils représentent la première ligne de défense du système respiratoire aviaire (*Toth 2000*).

Le recrutement de ces cellules intervient lors de l'entrée d'agents pathogènes par voie respiratoire, et seulement dans une moindre mesure par voie parentérale (*Toth 2000*). Cependant, il semblerait qu'une répllication bactérienne assez importante soit nécessaire pour déclencher ce recrutement. Au contraire, les virus, selon les circonstances, diminuent ou stimulent les capacités défensives des phagocytes respiratoires aviaires.

##### (1) Les hétérophiles

Les hétérophiles constituent l'équivalent des granulocytes neutrophiles chez les mammifères ; ils sont recrutés lors de la mise en place de la réaction immunitaire du système respiratoire aviaire. Ainsi, ils représentent la population de cellules immunitaires majoritaire dans l'air des sacs aériens en cas d'agression (*Crespo, Yamashiro, Hunter 1998*).

(2) Les macrophages

(a) Les macrophages résidents

Les macrophages résidents sont situés à des endroits stratégiques du passage du flux d'air, permettant de capter les agents pathogènes avant que ceux-ci n'arrivent dans les capillaires aériens, qui sont le lieu d'échanges entre le sang et le gaz (*Reese, Dalamani, Kaspers 2006*).

(b) Les macrophages sous-épithéliaux et intravasculaires

Cependant, il faut noter qu'il y a proportionnellement moins de macrophages résidents que dans les voies respiratoires des mammifères. Les oiseaux seraient donc très dépendants pour la défense de leur tractus respiratoire de l'afflux de ces cellules phagocytaires, les macrophages résidents n'étant pas suffisants (*Toth 2000*).

Le fait que la défense du tractus respiratoire repose sur le recrutement des cellules immunitaires permettrait d'éviter des réactions inflammatoires exagérées (*Klasing 1991*). Les oiseaux possèdent une trachée assez courte, les flux d'airs sont unidirectionnels et chez certaines espèces, leur petite taille induit l'inhalation d'air proche du sol, donc chargé de particules (*Fedde 1998*). Tous ces éléments favorisent l'arrivée de nombreux agents pathogènes et de particules aux poumons et aux sacs aériens.

Les macrophages sous-épithéliaux et intravasculaires sont alors recrutés et migrent notamment vers les sacs aériens et les poumons, de manière rapide et précoce, avant même la mise en place des premiers signes cliniques ; le terme « d'activation préventive » est donc utilisé. L'activation préventive est également présente chez les mammifères, et de manière plus importante quantitativement (*Mutua et al. 2011*).

2. Moyens de défenses spécifiques

a) Tissu lymphoïde associé aux cavités nasales (NALT) et aux bronches (BALT)

Ces tissus sont constitués par des nodules contenant généralement des centres germinaux, entourés d'une couche de cellules CD4+. Les cellules B différenciées au sein des centres germinaux sont les IgY, et dans une bien moindre mesure les IgA et les IgM (*Ohshima, Hiramatsu 2000*). Les IgY sont les équivalents fonctionnels des IgG des mammifères, bien qu'ils présentent une structure légèrement différente du fait de leur longueur plus importante (*Sharma 1997*).

b) Immunité à médiation cellulaire

En plus des tissus NALT et BALT, des lymphocytes sont produits et/ou maturés dans la glande de Harder et dans le thymus.

c) Immunité à médiation humorale

La bourse de Fabricius est l'organe central dans lequel ont lieu la maturation et la différenciation des cellules B (*Lam, Lin 1984*). La glande de Harder joue cependant également un rôle dans la différenciation des cellules B en plasmocytes. Après leur production par les cellules B,

les anticorps sont mis en suspension dans l'excrétat de la glande et sont transportés via le canal naso-lacrymal jusqu'à la muqueuse des cavités nasales (*Smiatek et al. 2011*).

La réponse immunitaire adaptative humorale à la surface des muqueuses est en premier lieu assurée par les IgA sécrétoires. Les cellules B qui produisent des IgA sont retrouvées sous l'épithélium trachéal (*S. H. Jeurissen et al. 1989*) et dans l'épithélium pulmonaire (*Fagerland, Arp 1993*). Ces cellules IgA+ présentes dans les tissus sont les principales sources des IgA sécrétoires pulmonaires (*Reese, Dalamani, Kaspers 2006*).



Élément de défense	Localisation	Rôles		
		Défense non spécifique	Défense spécifique	
			Médiation humorale	Médiation cellulaire
<b>Épithélium cilié</b>	Portion caudale des cavités nasales jusqu'aux bronches secondaires	Favorise l'expulsion de particules inhalées		
<b>Cellules résidentes (phagocytaires, dendritiques...)</b>	Au sein de l'épithélium cilié	Élimination des particules inspirées		
<b>Appareil muco-ciliaire</b>	Zone adjacente aux ouvertures bronchiques dans les sacs aériens <sup>(1)</sup>	Piégeage de particules inhalées au sein du mucus		
<b>Macrophages résidents</b>	Surface des poumons et des sacs aériens <sup>(3)(4)</sup>	Phagocytose puis nécrose et apoptose <sup>(5)</sup>		Cellules présentatrices d'antigènes aux cellules T
<b>Macrophages recrutés</b>	Sous les épithéliums et intra-vasculaire	Inhibition de la germination intracellulaire du champignon <sup>(5)</sup>  Sécrétion de prostaglandines et cytokines		
<b>Hétérophiles<sup>(2)</sup></b>		Chimiotaxie Phagocytose Métabolisme oxydatif		
<b>NALT</b>	Cavités nasales		Production d'IgY, IgA, IgM <sup>(6)</sup>	
<b>BALT</b>	Bronches (jonction entre la bronche primaire et la bronche secondaire caudale <sup>(7)</sup> )  Ostia des sacs aériens <sup>(8)</sup>		Production IgY, IgA, IgM <sup>(9)</sup> .	Production lymphocytes T <sup>(9)</sup> .
<b>Glande de Harder</b>	Membrane nictitante		Différenciation des cellules B en plasmocytes <sup>(11)</sup>	
<b>Thymus</b>				Maturation cellules T
<b>Bourse de Fabricius</b>			Maturation et différenciation cellules B <sup>(10)</sup>	

Tableau II: résumé des principaux mécanismes de défenses immunitaires du tractus respiratoire aviaire et leurs rôles respectifs, d'après (1) (Reese, Dalamani, Kaspers 2006) ; (2) (Harmon, Glisson 1990) ; (3) (Maina

2017); (4) (Maina 2002); (5) (Van Waeyenberghe et al. 2012); (6) (Ohshima, Hiramatsu 2000); (7) (Van Alstine, Arp 1988); (8) (Suzan H. M. Jeurissen et al. 1989); (9) (Fagerland, Arp 1993); (10) (Lam, Lin 1984); (11) (Smiatek et al. 2011).

## II. Le genre *Aspergillus*

### A. Biologie et écologie

#### 1. Classification

Le genre *Aspergillus* appartient à une famille de champignons ascomycètes, les Trichocomaceae. Les champignons ascomycètes sont les champignons dont les spores sont contenues dans des asques. Cette famille est placée dans l'ordre des Eurotiales appartenant à la classe des Plectinomyces de l'embranchement des Ascomycota.

Environ 180 espèces appartenant au genre *Aspergillus* ont été recensées. Ces espèces peuvent être classées parmi des sections appartenant à des sous-genres. Vingt-deux sections ont été définies et les espèces pathogènes d'*Aspergillus* sont retrouvées dans les sections Fumigati, Circumdati, Terrei, Nidulantes, Ornati, Warcupi, Candidi, Restricti, Usti, Flavipedes et Versicolores (Gugnani 2003).

L'espèce principalement incriminée dans les maladies respiratoires aviaires est *Aspergillus fumigatus*, même si *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. glaucus* et *A. terreus* peuvent également être impliquées. *Aspergillus fumigatus* a été identifié pour la première fois en 1863 par Frenesius (Mariappan et al. 2022), et aujourd'hui il serait responsable de 95% des cas d'aspergillose aviaire (Olias et al. 2010). *Aspergillus flavus*, quant à lui, est le deuxième agent en termes de fréquence mis en cause dans le cadre d'aspergillose aviaire (Tell 2005).

#### 2. Morphologie macroscopique

Les colonies formées par les champignons du genre *Aspergillus* présentent une croissance rapide et sont de couleur blanc, jaune verdâtre, brun ou noir, comme l'illustre la Figure 8 (Gugnani 2003).

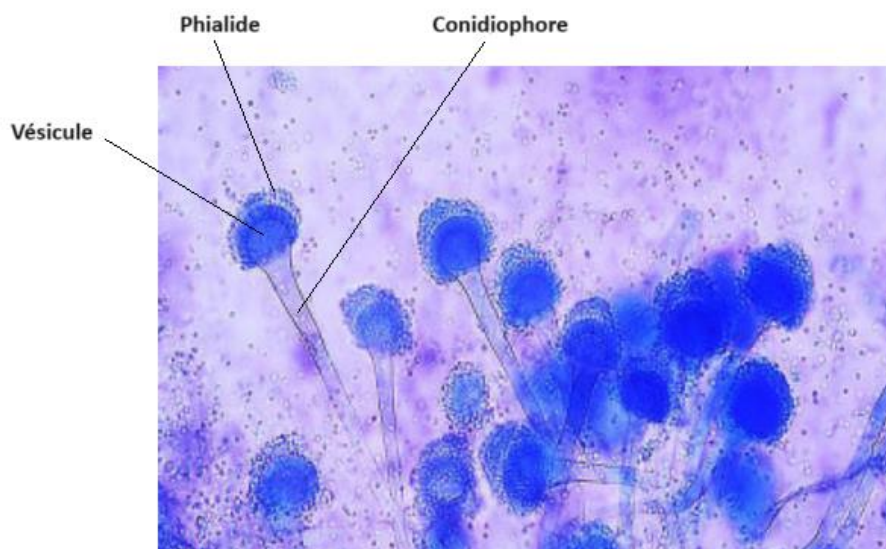


*Figure 8 : photographie d'une culture d'Aspergillus fumigatus (boîte de pétri ensemencée le 14/11/2023 dans un milieu de Sabouraud et chloramphénicol, puis placée à 35°C ; photographie réalisée le 16/11/2023 par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina).*

### 3. Morphologie microscopique

Un élément discriminant pour l'identification du champignon à partir de l'observation au microscope est l'aspect des phialides. Les phialides, portées par le conidiophore, sont les cellules qui produisent une succession de conidies. Les conidies sont arrangées en chaînes colonnaires ou radiées qui mesurent entre 6 et 8  $\mu\text{m}$ . Chaque conidie présente un diamètre compris entre 2 et 3  $\mu\text{m}$ , et elles sont reliées entre elles par un pont de connexion (Agut 2000). Leur croissance est basipète ; ainsi les plus jeunes conidies sont portées à la base de la structure (Gugnani 2003). L'ensemble composé par les phialides et les conidies est de couleur verdâtre (Agut 2000).

Les champignons appartenant au genre *Aspergillus* se caractérisent par la présence de phialides arrangées en une ou deux séries. Dans le cas particulier d'*Aspergillus fumigatus*, il n'y a qu'une seule rangée de phialides (Mariappan et al. 2022) qui sont portées par le conidiophore. Ce dernier est court, lisse et présente un renflement en forme de flacon à son extrémité, appelé vésicule, comme illustré à la Figure 9.



*Figure 9: Observation microscopique (x400, coloration au coton bleu lactophénol) d'un frottis de culture d'Aspergillus fumigatus obtenu à partir de l'autopsie d'un paon (Pavo cristatus) présentant des granulomes aspergillaires (modifiée d'après (Mariappan et al. 2022)).*

Dans le cas des espèces du genre *Aspergillus* à reproduction sexuée, le téléomorphe, c'est-à-dire l'état sexué, se présente sous la forme d'une structure ronde, appelée cléistothèce dont l'aspect diffère selon l'espèce concernée (Gugnani 2003). Le cléistothèce renferme les ascques qui elle-mêmes contiennent les ascospores, généralement au nombre de huit.

#### 4. Identification

Il existe peu d'espèces d'*Aspergillus* sexuées. L'identification repose donc majoritairement sur d'autres critères. Dans le cas cependant où il existe un stade sexué, la couleur, la forme, la dimension et la structure du cléistothèce peuvent être utilisées, ainsi que le modèle des ascospores, en plus de leur couleur et de leur dimension (Gugnani 2003).

##### a) Aspect macroscopique des colonies

Lorsque l'espèce à identifier est asexuée, l'identification peut se faire par l'étude macroscopique des colonies, et notamment des éléments suivants : vitesse de croissance, pigmentation du mycélium aérien, aspect des marges des colonies, aspect de la surface (Gugnani 2003).

##### b) Observation microscopique des produits de culture

Les éléments de morphologie microscopique utiles à l'identification sont les caractéristiques des différents éléments anatomiques. Ainsi, des critères concernant la tête asexuée portant les spores (couleur, taille, distribution des chaînes de conidies), le conidiophore (longueur, diamètre, caractéristiques de la paroi), la vésicule (taille, dimension, couleur, surface fertile) sont retrouvés.

L'aspect des phialides (unisériée ou bisériée), et des conidies (dimension, caractéristiques de la paroi, couleur) peuvent également être utilisés. (Gugnani 2003).

#### c) Méthodes moléculaires

L'identification et la classification taxonomique peut reposer aussi sur des critères moléculaires. Les deux principaux critères retenus sont d'une part l'homologie au sein des séquences ADNr des gènes 18S, 5.8 S et 28S, et d'autre part les divergences de séquence dans les régions d'espacement transcrites internes ITS1 et ITS2 (Gugnani 2003).

La détermination de l'espèce peut ainsi être réalisée parmi les cinq principales espèces impliquées. A noter que dans le cadre d'infections humaines nosocomiales, l'identification a été investiguée jusqu'au niveau des souches d'*Aspergillus fumigatus* (Gugnani 2003).

#### 5. Cycle de vie

L'immense majorité des espèces d'*Aspergillus* sont exclusivement saprophytes, se nourrissant notamment de matières en décomposition au sol ; ainsi *Aspergillus* est retrouvé dans ces matières, mais également dans les graines et les céréales.

Les conidies sont les éléments infectants, obtenues par reproduction asexuée, et dispersées dans l'air de manière très efficace. Elles sont extrêmement résistantes, notamment grâce à la mélanine présente dans la paroi qui les entoure et les protège des rayonnements UV (Brakhage, Liebmann 2005). De plus, *Aspergillus* présente une thermotolérance importante.

#### B. Pouvoir pathogène

Chez les oiseaux, *Aspergillus* provoque majoritairement deux types de maladies : des pneumonies chez les jeunes, et des maladies pulmonaires et viscérales chroniques chez les animaux plus âgés (Ainsworth, Austwick, Health 1973). Nous y reviendrons plus en détails par la suite.

#### 1. La paroi fongique, un mécanisme de défense

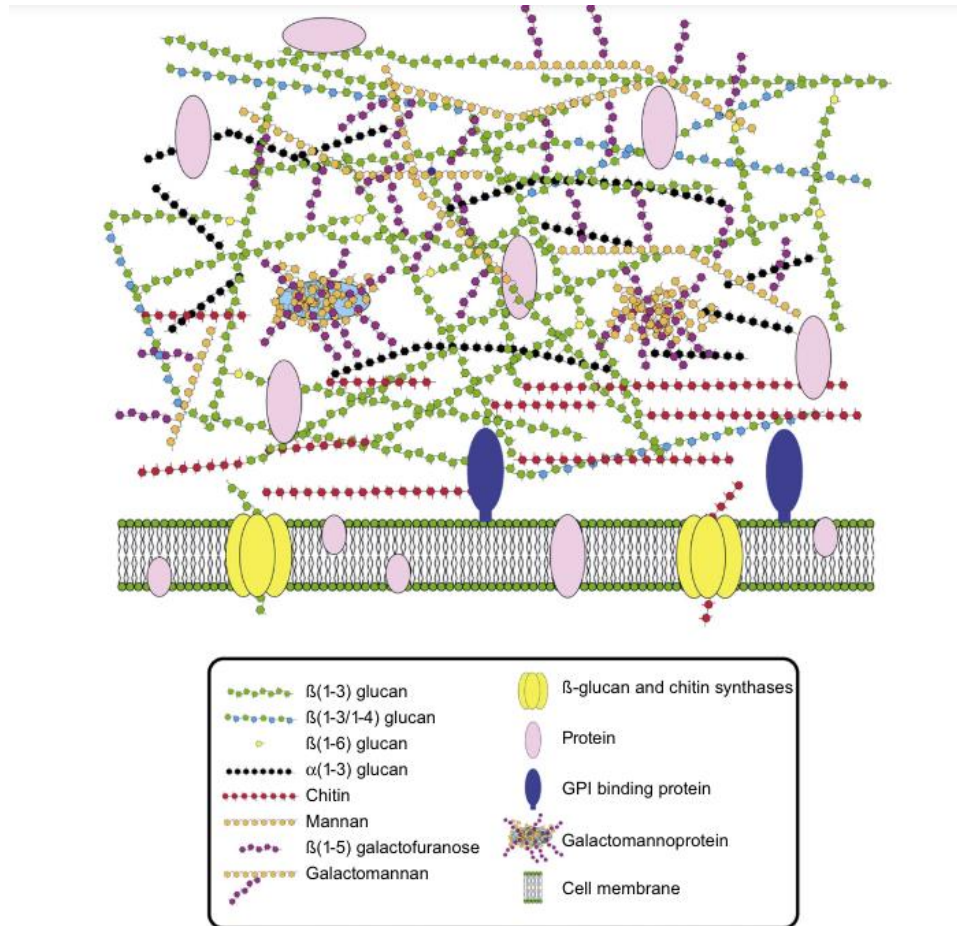
Différents éléments peuvent expliquer la pathogénicité plus importante d'*Aspergillus fumigatus* parmi les Aspergilli. Outre le fait que ses spores présentent une taille plus petite (Richard et al. 1983), leur permettant d'atteindre plus facilement les poumons et les sacs aériens, certaines propriétés de la paroi de ce champignon interviennent dans sa résistance face au système immunitaire de l'hôte.

#### a) Structure classique de la paroi d'*Aspergillus*

La paroi fongique est un élément essentiel au maintien de l'intégrité du champignon. Composée de polysaccharides et de protéines, elle joue à la fois un rôle de protection physique vis-à-vis des éléments extérieurs, mais elle intervient également dans les interactions avec l'organisme de l'hôte (Abad et al. 2010). La structure de cette paroi est schématisée à la Figure 10.

Les polysaccharides constituent au moins 90% de la paroi ; le  $\beta(1-3)$ -glucane et le galactomannane font partie de ces polysaccharides. Ils représentent quantitativement les deuxième

et troisième composants de la paroi d'*Aspergillus* (Abad et al. 2010). Ils revêtent une importance particulière car ils correspondent à des cibles moléculaires dans le cadre de tests diagnostiques de l'aspergillose aviaire. Cet aspect sera développé dans la suite de l'étude.



*Figure 10: représentation schématique de la paroi cellulaire d'Aspergillus fumigatus, d'après (Abad et al. 2010).*

### b) Particularités de la paroi des conidies

Certaines propriétés de la paroi des conidies les protègent des défenses de l'hôte jusqu'à leur arrivée dans la partie la plus distale du tractus respiratoire. Parmi ces propriétés la présence de mélanine au sein de la paroi, ainsi que des résidus d'acide sialique chargeant négativement cette paroi sont des éléments déterminants (Wasylnka, Simmer, Moore 2001).

### 2. Mécanismes pathogéniques généraux

Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont à l'origine de nombreux problèmes de santé : mycotoxicose, allergie, asthme, aspergillose allergique bronchopulmonaire, aspergillome, aspergillose nécrotique, aspergillose pulmonaire invasive (Dudakova et al. 2017).

Le système immunitaire permet normalement l'élimination des conidies d'*Aspergillus fumigatus* inhalées (Gugnani 2003). Mais en cas de réponse immunitaire inadaptée ou insuffisante, ou d'exposition sur une longue durée ou de pression d'infection élevée, la maladie peut se développer.

a) Production de facteurs de virulence

Il est reconnu que lorsqu'*Aspergillus fumigatus* passe d'un statut d'organisme libre vivant dans la matière organique de l'environnement à un organisme pathogène opportuniste, des modifications métaboliques ont lieu (Gugnani 2003). Des facteurs de virulence, permettant notamment l'adhésion à la matrice extra-cellulaire, la colonisation et l'invasion des tissus hôtes, sont synthétisés (Muhlschlegel et al. 1998). Les ligands auxquels se lient les conidies au niveau de la matrice extra-cellulaire des tissus hôtes semblent être le fibrinogène, la laminine, la fibrinectine et le collagène de type I (Mendes-Giannini et al. 2000).

b) Pouvoirs pathogènes des mycotoxines

Même si le pouvoir pathogène d'*Aspergillus* réside principalement dans l'infestation des tissus hôtes et les modifications qui y sont apportés, il produit également des toxines et des enzymes qui lui permettent de dégrader les molécules et donc d'obtenir des éléments essentiels à sa croissance.

En plus de porter atteinte aux tissus de l'hôte, ces mycotoxines comme l'aflatoxine, l'ochratoxine ou la gliotoxine ont des pouvoirs pathogènes spécifiques. Cette dernière toxine, qui est probablement la plus étudiée, est un peptide cyclique appartenant aux molécules d'épipolythiodioxopipérazine qui présentent un pont disulfure régulant leur activité biologique (Gardiner, Waring, Howlett 2005). La gliotoxine inhibe la clairance mucociliaire de l'hôte (Müllbacher, Waring, Eichner 1985), ce qui permet au champignon d'atteindre plus facilement la surface épithéliale, majorant l'invasion et l'atteinte tissulaires (Amitani et al. 1995).

La gliotoxine modifie également le fonctionnement du système immunitaire par deux aspects. Elle est tout d'abord responsable d'une certaine toxicité vis-à-vis des lymphocytes T (Mariappan et al. 2022). D'autre part, elle inhibe le protéasome de l'hôte, empêchant le traitement des antigènes et par conséquent l'activation des cellules B (Kroll et al. 1999). De plus, même après l'activation des cellules B et T, la gliotoxine est capable de les inhiber (Beaver, Waring 1994).

Enfin, la gliotoxine présente des effets pathogènes envers les macrophages, induisant leur apoptose et leur nécrose ; ce phénomène serait médié par un afflux d'ions calcium dans la cellule après la liaison de la gliotoxine sur un résidu thiol de la membrane plasmique au niveau d'un canal calcique (Hurne et al. 2002). L'aflatoxine quant à elle inhibe la phagocytose. Cet impact sur le système immunitaire induit bien sûr une immunodépression, mais majore également la nécrose tissulaire (Mariappan et al. 2022).

c) La sporulation

De par sa nature fongique, *Aspergillus fumigatus* présente un pouvoir pathogène spécifique qui est la sporulation, absente par exemple lors des infections bactériennes.



La sporulation est à l'origine de la production de conidies d'environ 2 à 3 µm de diamètre. Cette petite taille permet aux conidies d'atteindre facilement les petites bronchioles ; ce phénomène est responsable de l'invasion tissulaire nécessaire au développement de l'« aspergillose pulmonaire invasive » (*Patterson, Strek 2014*). L'aspergillose invasive peut également être liée à l'angioinvasion d'éléments fongiques et non pas seulement à la pénétration directe des conidies dans les poumons.

A noter que l'« aspergillome simple » correspond quant à lui à la seule colonisation des cavités pulmonaires alors que la maladie est appelée « aspergillose pulmonaire cavitaires chronique » lorsqu'il y a germination fongique (*Patterson, Strek 2014*).

#### d) Formation de biofilms

La croissance d'*Aspergillus fumigatus* se fait sous la forme de cellules filamenteuses multinucléées, appelées hyphes. Ces hyphes s'organisent sous forme entrelacée, voire interconnectée, sous le nom de mycélium.

Le mycélium peut s'intégrer ou adhérer à une surface et se recouvrir d'une matrice extracellulaire ; il revêt alors des caractéristiques similaires à celles des biofilms bactériens. Il possède notamment la propriété de résister aux traitements antifongiques grâce à la formation d'un microenvironnement au sein du biofilm (*Kowalski et al. 2020*). Les traitements antifongiques sont testés *in vitro* sur les conidies, qui est la forme nécessaire pour la colonisation du milieu, mais qui ne sont généralement plus présentes aux sites d'infection lorsque celle-ci est avancée. Cet aspect est à prendre en compte lors de la mise en place du traitement contre l'aspergillose, au même titre que la résistance acquise aux azolés.

##### (1) Formation du biofilm

Il est démontré que la densité en conidies initiale a un impact sur la formation du biofilm, sans que le mécanisme précis n'ait été détecté. Il est probable cependant, comme c'est le cas du biofilm produit par les bactéries ou par d'autres champignons, que ce phénomène repose sur le quorum, c'est-à-dire la communication intercellulaire (*Morelli, Kerkaert, Cramer 2021*).

La première étape de la formation du biofilm est l'initiation qui compte le gonflement et la germination des conidies. Cette première phase dure environ 12 heures, et elle est dépendante de l'apport en nutriments et en oxygène, et de la température (*Hall, Denning 1994*). Lors de la phase de gonflement, les gènes impliqués le métabolisme des protéines et des acides aminés sont activés avec la transcription en ARNm (*Morelli, Kerkaert, Cramer 2021*). Ensuite interviennent la croissance des hyphes, polarisée selon la surface sur laquelle se forme le biofilm, et l'émergence d'un tube germinatif qui sont les dernières étapes de la germination (*González-Ramírez et al. 2016*).

L'adhésion au support serait médiée par des adhésines et des hydrophobines de la paroi cellulaire. Lors de la levée de dormance des conidies, la couche hydrophobe externe à la paroi cellulaire est détruite, découvrant les adhésines et les hydrophobines (*Morelli, Kerkaert, Cramer 2021*). Les α-glucanes seraient, quant à elles, plutôt impliquées dans les liaisons entre conidies, même si ces aspects sont encore à explorer. Du côté d'*Aspergillus*, le galactosaminogalactane (GAG) serait l'élément principal impliqué dans l'adhésion aux cellules de l'hôte (*Gravelat et al. 2013*).

A l'étape suivante, celle du biofilm immature, une matrice extra-cellulaire, composée majoritairement de glycanes et de protéines, est déjà produite dans des quantités modérées (Zarnowski *et al.* 2018). Vingt-quatre heures après le début du développement *in vitro*, le biofilm est qualifié de mature ; bien que les mécanismes métaboliques soient encore à définir, ce type de biofilm présente une matrice extra-cellulaire développée, et une résistance déjà très importante aux molécules antifongiques (Morelli, Kerkaert, Cramer 2021).

## (2) Résistance du biofilm aux traitements antifongiques

Différents éléments sont responsables de cette résistance aux molécules antifongiques au sein du biofilm. Elle est médiée notamment par l'ADNe, un composé libéré lors de l'autolyse qui se produit pendant la croissance fongique au sein du biofilm (Rajendran *et al.* 2013). De plus, au cours du développement du biofilm, le microenvironnement s'appauvrit en oxygène, ce qui a pour effet de stimuler les gènes responsables de la synthèse d'ergostérol (Blatzer *et al.* 2011). Or, le voriconazole par exemple possède une activité moindre envers les ergostérols (Morelli, Kerkaert, Cramer 2021).

Au fur et à mesure de la formation du biofilm, la concentration minimale inhibitrice du voriconazole augmente significativement (Rajendran *et al.* 2011). En plus des éléments mentionnés ci-dessus, cela pourrait s'expliquer par l'activité de pompes d'efflux de résistance multidrogues. Ces pompes sont des transporteurs dépendants de l'ATP, médiés par le gène *mdr4* (Omote, Al-Shawi 2002) ; elles ont probablement à l'origine un rôle plus étendu de purification du microenvironnement vis-à-vis des molécules toxiques, parmi lesquelles les substances médicamenteuses antifongiques.

Le rôle de la matrice extracellulaire, notamment des GAG, et de la paroi fongique en elle-même doit également être mentionné dans le cadre de la résistance aux antifongiques, comme c'est le cas chez *C. albicans* par exemple (Nett *et al.* 2010). A noter que chez d'autres espèces fongiques, le biofilm joue un rôle dans le blocage des cellules immunitaires de l'hôte, mais cela reste encore à déterminer concernant *Aspergillus fumigatus* (Morelli, Kerkaert, Cramer 2021).

## 3. Cas particuliers au sein des organismes aviaires

### a) Particularités anatomiques

La pénétration d'*Aspergillus fumigatus* au sein du tractus respiratoire des oiseaux se fait plus facilement que chez les mammifères. En effet, les sacs aériens fonctionnent comme un soufflet permettant la circulation de l'air en permanence au niveau du parenchyme pulmonaire (Seyedmousavi *et al.* 2015) ; à ce premier facteur de risque s'ajoute l'absence d'épiglotte (Tell 2005). Ces deux éléments augmentent la probabilité de contamination des oiseaux par les conidies d'*Aspergillus*, en particulier d'*Aspergillus fumigatus*, les conidies de cette espèce étant de taille plus faible. De plus, l'absence de diaphragme empêche les oiseaux de tousser, et donc d'expulser d'éventuelles particules inhalées.

### b) Particularités métaboliques

Une fois la pénétration effective, le développement des spores est favorisé dans les organismes aviaires. Tout d'abord, *Aspergillus fumigatus* est thermophile ; il se développe très bien à la température interne des oiseaux qui se situe entre 4°C et 42°C (Neumann 2016). D'autre part, *Aspergillus* spp a la capacité de se reproduire au sein des tissus aviaires notamment grâce à la sensibilité des oiseaux vis-à-vis de la gliotoxine ; cette dernière est responsable de la nécrose des tissus qui fournit de potentiels nutriments pour le champignon. Cette reproduction est de deux types : asexuée ou sexuée. Alors qu'*Aspergillus nidulans* subit une reproduction sexuée et asexuée, *Aspergillus fumigatus* n'est concerné que par la reproduction asexuée qui est la sporulation (Richard et al. 1981).

### c) Particularités immunitaires

La sporulation aboutit ensuite au développement d'hyphes si les conditions sont optimales. Lors de leur croissance au sein des sacs aériens, les hyphes provoquent une destruction tissulaire, caractérisée par des lésions inflammatoires au sein desquelles prédominent les hétérophiles et les lymphocytes (Mariappan et al. 2022). Si les mécanismes immunitaires de l'oiseau sont débordés, des débris nécrotiques sont produits, envahissant la trachée, les bronches, voire les sacs aériens. Outre la sérite et la nécrose des organes adjacents évoquées, une dissémination par voie hématogène grâce aux hyphes eux-mêmes et aux macrophages respiratoires de l'hôte peut se produire.

Cependant, il faut garder en tête que les mécanismes pathogéniques sont différents selon l'espèce aviaire atteinte. En effet, des études ont montré par exemple que chez la caille, les lésions occasionnées sont des lésions hémorragiques au niveau des voies respiratoires qui deviennent ensuite des nodules. Au contraire, chez les dindes, la diffusion hématogène des conidies se produit rapidement dans le cas d'une infection par *A. fumigatus* et *A. flavus* (Richard et al. 1983).

### III. L'aspergillose aviaire

#### A. Éléments d'épidémiologie

##### 1. Espèces concernées

L'aspergillose représente toujours une cause majeure de mortalité parmi les espèces aviaires captives. Des cas d'aspergillose sont détectés partout dans le monde, excepté en Antarctique (*O'Meara, Witter 1971*).

Certaines espèces d'oiseaux comme les dindes, les perroquets, les rapaces, les anatidés et les manchots semblent plus particulièrement touchées (*Hauck, Cray, França 2020*). Parmi une même espèce, la réceptivité et la sensibilité à l'aspergillose aviaire peuvent être différentes. Ainsi, des expériences menées sur des animaux contaminés à six jours d'âge permettent de mettre en évidence que les dindes sont plus sensibles à la maladie que les poulets, et qu'il existe des races de poulets plus sensibles que d'autres (*Ghori, Edgar 1979*), (*Chaudhary, Singh 1983*).

Cependant, il n'a pas encore été mis en évidence si cette différence est exclusivement liée à une sensibilité accrue à l'aspergillose chez ces espèces, ou si elle s'explique également par une exposition aux moisissures plus importantes ou par des détections plus faciles et fréquentes (*Converse 2007*).

##### 2. Matières virulentes

Les matières virulentes sont les conidies présentes dans l'environnement. Les conidies sont des spores asexuées. Leur quantité augmente dans l'air en cas de fortes chaleurs et de taux d'humidité élevé.

Les aliments moisiss (*Converse 2007*) et la litière représentent les sources majeures de conidies. Les individus infectés constituent également des sources à partir desquelles les conidies disséminent. Ils peuvent en effet exhaler des conidies dans l'air extérieur (*Tell 2005*), et les cadavres en décomposition sont parfois à l'origine de cette dissémination (*Melo et al. 2020*). Dans le cas des oiseaux migrateurs, les souches d'*Aspergillus* sont étrangères ; les oiseaux autochtones sont donc complètement naïfs vis-à-vis de ces souches (*Melo et al. 2020*).

Il faut également être très vigilant car la manipulation d'œufs contaminés par des spores d'*Aspergillus* peut induire une contamination de l'air du couvoir via la dispersion, même si cette source est moins fréquente (*Hamet, Seigle-Murandi, Steiman 1991*).

##### 3. Réceptivité et sensibilité

###### a) Liées aux facteurs de risques environnementaux

Outre la sensibilité spécifique à chaque espèce, différents facteurs de risque environnementaux interviennent dans l'émergence de la maladie. Ces facteurs ne sont pas responsables de la maladie, mais ils favorisent l'infection chez les oiseaux car ils entraînent une augmentation du nombre de spores d'*Aspergillus* dans l'air (*Beernaert et al. 2010*). Parmi ces

facteurs de risque sont retrouvés un défaut de ventilation, un entretien de la litière insuffisant, un stockage à long terme de la nourriture.

b) Liées aux facteurs prédisposants de l'individu

En parallèle, des facteurs prédisposants entraînant une immunodépression sont responsables du développement de la maladie chez un individu donné (*Hauck, Cray, França 2020*). Tout élément à l'origine d'un stress organique représente un facteur prédisposant. Cela explique donc l'importance que peut revêtir cette maladie dans les centres de soins à la faune sauvage dans lesquels sont admis généralement des animaux malades chroniquement, affaiblis, âgés, mazoutés *ect...* (*Seyedmousavi et al. 2015*).

D'autres facteurs comme la vaccination (*Barton et al. 1992*), l'hypovitaminose A (*McMillan, Petrak 1989*), l'administration d'oxytétracyclines (*Beernaert et al. 2010*) ou de stéroïdes au long cours (*Verstappen, Dorresteijn 2005*) peuvent être à l'origine de ce stress organique. A noter que les toxines produites par *Aspergillus* lui-même peuvent avoir un effet également ; des études ont montré que la gliotoxine, ajoutée à l'aliment, entraîne une plus grande réceptivité des individus car elle induit une immunodépression (*Richard, Peden, Williams 1994*).

4. Epidémiologie synthétique

L'infection primaire se fait par inhalation de spores d'*Aspergillus*, elle a donc lieu d'abord dans le tissu pulmonaire et les sacs aériens. Dans un espace confiné, ou présentant une charge infectieuse importante, l'infection est donc plus fréquente.

Dans le cas des maladies respiratoires épizootiques aiguës, la source d'infection serait la litière. Pour rappel, *Aspergillus fumigatus* survit et se développe sur de nombreux substrats ; ses spores sont extrêmement résistantes (*Neumann 2016*).

Une dissémination hématogène après l'infection primaire est ensuite fréquente, induisant des lésions dans d'autres tissus.

En termes de risques zoonotiques, la contamination par les spores d'*Aspergillus* dans les exploitations avicoles représente un danger pour les ouvriers (*Cafarchia et al. 2014*). Cependant, les conidies qui représentent ce risque sont celles libérées lors de la croissance d'*Aspergillus* dans l'environnement extérieur. Les animaux développant de l'aspergillose libèrent dans l'environnement un faible nombre de conidies, ils ne représentent donc pas un risque zoonotique (*Seyedmousavi et al. 2015*).

B. Importance économique actuelle

L'aspergillose aviaire entraîne des coûts vétérinaires, et des pertes de production. Par exemple, l'aspergillose parmi les dindes seulement coûterait 11 millions de dollars annuellement aux Etats-Unis (*Dykstra et al. 2013*). Les pertes économiques sont particulièrement importantes dans cette filière car la maladie touche les individus reproducteurs et ceux en fin de croissance. Au

sein des pertes économiques, les composantes de retard de croissance, de mortalité et de saisie à l'abattoir sont retrouvées.

L'aspergillose représente en effet un coût parmi la faune sauvage (prise en charge par les services, analyses de laboratoire sur les cadavres...), cependant ce coût est difficilement évaluable du fait du peu de connaissances disponibles concernant la prévalence de la maladie parmi la faune sauvage. En effet, la maladie n'est pas systématiquement recherchée lors de la prise en charge d'individus malades en centre de soins. (*Melo et al. 2020*).

L'aspergillose est responsable de nombreuses conséquences socio-économiques en médecine humaine également. En cas d'atteinte d'aspergillose invasive chez les patients humains immunodéprimés, la mortalité peut atteindre 90%. En plus du personnel soignant nécessaire, le coût pour traiter une telle atteinte serait d'environ 69 000 dollars US, sans compter les années de vie perdues d'un point de vue sociétal (*Drgona et al. 2014*).

### C. Diagnostic clinique de l'aspergillose aviaire

La maladie peut se manifester sous plusieurs formes : l'aspergillome focale, une forme multifocale, une infection disséminée (*Tell 2005*). Des organes peuvent être spécifiquement touchés par une aspergillose locale, induisant par exemple une rhinite, une sinusite, une kératite, une encéphalite ou une méningoencéphalite. Une forme plus anecdotique a déjà été décrite avec la formation de kystes épidermiques (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

#### 1. Signes cliniques occasionnés

##### a) Classification des atteintes

Les signes cliniques varient selon l'espèce de l'individu atteint, la localisation de l'infection, la dose infectieuse, le statut immunitaire de l'animal. Les signes cliniques rencontrés sont résumés dans le Tableau III.

Deux formes sont traditionnellement distinguées : la forme aiguë et la forme chronique (*Beernaert et al. 2010*). Il semblerait que la forme aiguë soit liée à l'inhalation d'un grand nombre de spores, alors que la forme chronique serait en cause en cas de suppression immunitaire, notamment dans le cadre de mauvaises conditions d'élevage.

##### (1) Forme aiguë

La forme aiguë de l'aspergillose aviaire touche principalement les jeunes volailles. L'aspergillose aiguë se caractérise épidémiologiquement par une mortalité et une morbidité élevées, particulièrement lors des dix premiers jours de vie au cours desquels la mortalité en particulier est extrêmement importante (*Seyedmousavi et al. 2015*). Lors de la contamination *in ovo* ou au moment de l'éclosion, la maladie prend le nom de « pneumonie des couveuses ».

Ces individus sont affectés par des signes cliniques respiratoires (polypnée, hyperpnée, respiration bec ouvert, respiration sifflante, toux) et neurologiques (ataxie, opisthotonos, torticolis, parésie des membres), en plus de symptômes généraux sévères comme de l'anorexie, de la léthargie, de la polyuro-polydipsie (*Seyedmousavi et al. 2015*).

(2) Forme chronique

Cette forme chronique concerne principalement les individus plus âgés et les oiseaux captifs. Elle est par exemple rencontrée chez les dindonneaux entre 13 et 18 semaines d'âge (*Femenia et al. 2007*). Epidémiologiquement, elle se caractérise par des cas sporadiques et une mortalité moins élevée que l'aspergillose aigüe.

Ici aussi les signes cliniques généraux sont peu spécifiques : léthargie, perte de poids, intolérance à l'effort.

b) Atteinte respiratoire

L'atteinte respiratoire est caractérisée par des difficultés respiratoires qui se manifestent cliniquement par des modifications du rythme et/ou de l'amplitude respiratoires (dyspnée, tachypnée), voire dans les cas les plus critiques par une respiration bec ouvert. Parfois, une aphonie ou un changement sonore des vocalises peut être relevé (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

Lorsque l'aspergillose concerne les cavités nasales, elle est responsable d'une rhinite exsudative, accompagnée parfois de malformations de ces cavités ou du bec (*Tsai et al. 1992*).

Il faut cependant rester vigilant, car une atteinte des sacs aériens peut se manifester par des vomissements, un port anormal de l'aile ou un comportement altéré, sans aucune modification respiratoire (*Forbes, Simpson, Goudswaard 1992*).

c) Atteinte oculaire

L'aspergillose peut être responsable de conjonctivites, ou de kératites qui engendrent un blépharospasme, une photophobie, et des modifications morphologiques (gonflement périorbitaire et des paupières, cornée trouble). Des écoulements jaunâtres peuvent être mis en évidence dans le sac conjonctival (*Beckman et al. 1994*).

d) Atteinte neurologique

Des signes neurologiques peuvent également survenir, avec un affaissement de l'aile ou une incapacité à voler ou à se tenir debout. La peau peut être pour sa part touchée par des kystes épidermiques, notamment au niveau de la crête (*Abrams et al. 2001*). Ces signes sont liés à une méningoencéphalite.

e) Autres atteintes

D'autres atteintes concernant les articulations (spondylarthrite, aspergillose articulaire) et l'ombilic (omphalite) liées à *Aspergillus* ont également été décrites (*Olias et al. 2010*).

	<b>Signes cliniques frustrés</b>	<b>Signes cliniques spécifiques</b>
<b>Signes cliniques fréquents</b>	Léthargie Anorexie Intolérance à l'effort	Dyspnée, tachypnée Respiration sifflante, parfois bec ouvert
<b>Signes cliniques occasionnels</b>	Vomissements, PuPd Port anormal de l'aile, incapacité à voler ou à maintenir la station debout Ataxie, opisthotonos, parésie des membres Conjonctivite, kératite Kystes épidermiques	Toux Aphonie, variation sonore des vocalises Rhinite exsudative Malformation du bec, des cavités nasales

*Tableau III : résumé des signes cliniques observables lors de l'examen clinique d'un individu atteint d'aspergillose (forme chronique et forme aiguë).*

## 2. Diagnostic différentiel

Il n'existe pas de signe clinique ni de test pathognomonique de l'aspergillose aviaire (Beernaert et al. 2010). La suspicion est donc basée sur la présentation clinique et les résultats aux différents examens complémentaires.

L'objectif de ce diagnostic différentiel n'est pas d'être exhaustif, mais de regrouper les principales maladies compatibles avec les signes cliniques de l'aspergillose aviaire précédemment évoqués. Le diagnostic différentiel doit s'intéresser tout d'abord aux autres maladies responsables de signes systémiques peu spécifiques comme la léthargie, l'anorexie, les vomissements ou la PuPd. Les maladies à envisager face à ces signes cliniques sont la chlamydie, la cryptosporidiose, la rétention d'œufs, la grippe aviaire, la maladie de Newcastle, une affection rénale, une mycobactériose, une intoxication. Si l'on ajoute à ces signes des écoulements nasaux, le diagnostic différentiel s'élargit avec une sinusite infectieuse ou traumatique, la maladie de Marek, la paramyxovirose, une obstruction des voies aériennes supérieures par des graines par exemple, ou encore une acariose des sacs aériens ou de la trachée.

Les difficultés respiratoires et la toux peuvent évoquer une infection par *Bordetella avium*, une herpèsvirose, la grippe aviaire, une bronchite infectieuse liée à un coronavirus, une mycoplasmosse, une laryngotrachéite infectieuse.

La malformation du bec ou des cavités nasales peut être compatible avec un processus néoplasique, une ostéomyélite, une (poly)arthrite, une sinusite. Si cela concerne un psittacidé l'infection au circovirus doit être envisagée. Enfin, des carences en phosphore, en calcium ou en vitamine D peuvent entraîner ce type de signes cliniques.

Enfin, les signes neurologiques comme l'ataxie et l'opisthotonos peuvent être évocateurs de la chlamydie, une mycoplasmosse, la maladie de Newcastle ou de Marek, la listériose, la toxoplasmose, la salmonellose, la grippe aviaire ou encore un AVP.



#### D. Examens complémentaires réalisables en clinique

Ces examens complémentaires sont plutôt considérés comme des examens d'orientation que comme de vrais outils diagnostiques. Actuellement, le diagnostic de l'aspergillose aviaire repose sur la mise en évidence de lésions évocatrices, couplée à l'isolement et l'identification d'une souche d'*Aspergillus* à partir de ces lésions.

##### 1. Hématologie

Dans les cas avérés d'aspergillose, l'examen hématologique met généralement en évidence une leucocytose (dont les valeurs sont comprises entre 20 000 et plus de 100 000 globules blancs/ $\mu$ L), une monocytose et une lymphopénie (*Forbes, Simpson, Goudswaard 1992*).

Une hétérophilie peut également être observée. Il faut cependant rester vigilant car dans certains cas cliniques la quantité d'hétérophiles est diminuée, ce qui induit un comptage des globules blancs totaux normal voire lui-même diminué (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

Une anémie non régénérative est parfois notée en cas d'aspergillose (*Beernaert et al. 2010*).

##### 2. Biochimie

Comme pour l'hématologie, la biochimie sanguine ne présente pas une sensibilité ni une spécificité suffisantes pour infirmer ou confirmer une infection à *Aspergillus* spp en cas de taux normaux ou augmentés (*Jones, Orosz 2000*). Cependant, si les résultats sont inclus dans un contexte clinique, la biochimie présente plusieurs indications.

Elle peut permettre d'identifier les organes lésés et la gravité de l'atteinte selon l'augmentation des paramètres concernés. La cinétique des différents paramètres peut également donner une indication sur l'efficacité du traitement ; en effet les taux se normalisent généralement en cas de guérison (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

Classiquement, les paramètres évalués sont l'aspartate aminotransférase (AST), le lactate déshydrogénase (LDH), l'alanine transaminase (ALT), et le glutamate déshydrogénase (GLDH) pour la fonction hépatique, la gamma-glutamyltransférase (GGT) et la phosphatase alcaline (ALP) pour l'évaluation de l'atteinte des voies biliaires. Enfin, la mesure des électrolytes (ionogramme) peut indiquer une insuffisance rénale (*Fischer, Lierz 2015*).

Les protéines totales sont généralement augmentées chez les oiseaux atteints d'aspergillose. Il faut cependant rester vigilant, car dans le cas d'animaux fortement immunodéprimés, les protéines totales peuvent être dans les normes, voire même diminuées (*Cray, Watson, et al. 2009*).

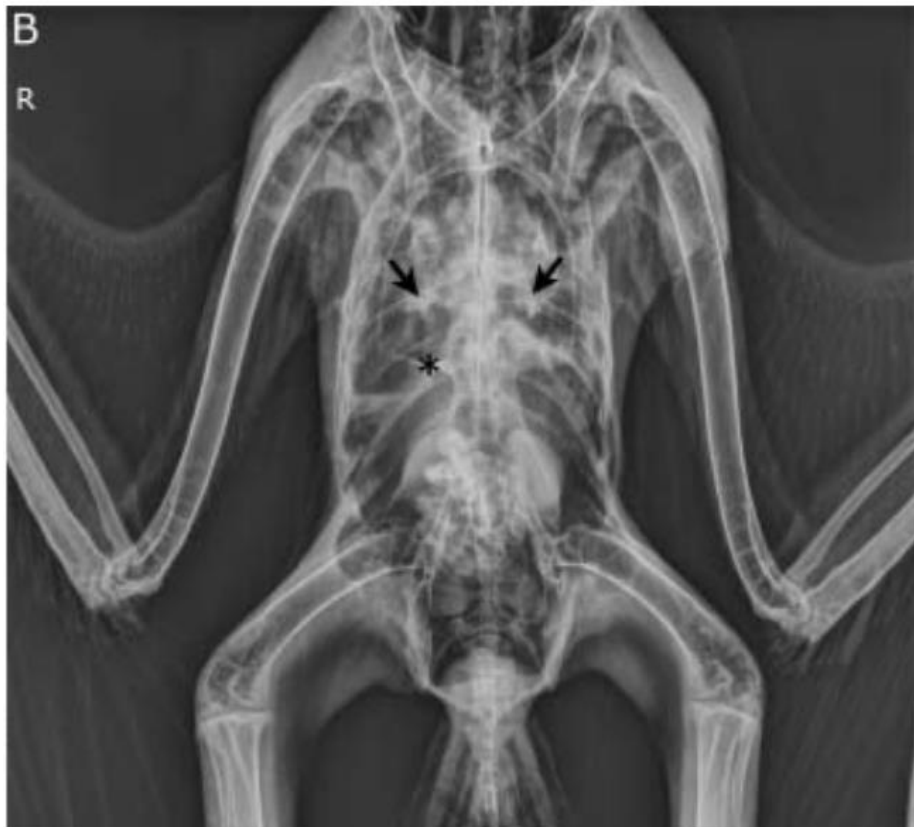
##### 3. Radiographie

La radiographie permet de mettre en évidence des lésions parfois présentes en cas d'aspergillose aviaire comme la pneumonie ou l'aérosacculite. Cependant, c'est une méthode d'imagerie assez peu sensible, donc les lésions sont souvent détectables lors d'une atteinte tardive et sévère. De plus, la pneumonie et l'aérosacculite ne sont pas pathognomoniques ; un écouvillonnage ou une biopsie sont nécessaires pour établir un diagnostic de certitude (*Phalen*

2000). Mais la radiographie demeure un examen complémentaire rapide, peu onéreux, et couramment utilisé en pratique aviaire.

Les prises de vues latérales et ventro-dorsales sont les plus pertinentes, mais l'observation des lésions sur des vues dorso-ventrales est tout de même possible en cas d'anesthésie trop risquée (Jones, Orosz 2000) .

Les signes radiographiques à rechercher, visibles en cas d'aspergillose, sont la présence de granulomes au niveau de l'oropharynx, du syrinx, de la trachée, des poumons ou des sacs aériens. La pneumonie et l'aérosacculite peuvent se manifester par une perte de la définition de la silhouette cardiaque, et une modification de la densité des poumons. Par exemple, il est possible de retrouver en cas de pneumonie une augmentation de la radiodensité en forme de lignes au niveau du bord caudal des poumons. L'aérosacculite induit en images radiographiques des images d'hyperinflation ou d'asymétrie des sacs aériens, et un épaissement des membranes des sacs aériens comme illustré sur la Figure 11 (McMillan, Petrak 1989), (Vorbrüggen, Bailey, Krautwald-Junghanns 2013).



*Figure 11: image radiographique de face d'un aigle atteint d'aspergillose ; sont visibles des nodules [flèches noires], et un épaissement du sac aérien thoracique caudal caractérisé par une opacité tissulaire [astéris], d'après (Greenbarg, Secrest 2016).*

#### 4. Tomodensitométrie et IRM

La tomodensitométrie, tout comme l'IRM, présente une résolution bien supérieure à la radiographie. Elle permet donc de mettre en évidence des lésions trop discrètes pour être vues en radiographie, ou encore des zones non visibles en endoscopie comme par exemple les poumons.

Cependant, ces deux méthodes nécessitent une anesthésie, ce qui peut s'avérer risqué chez les patients critiques, et elles sont beaucoup plus onéreuses. L'IRM nécessite une durée d'examen, et donc d'anesthésie, supérieure à celle du scanner.

De plus, une étude qui confronte la tomodensitométrie à l'autopsie chez des grues blanches met en évidence une proportion importante de faux négatifs dans la détection d'aérosacculité légère, d'opacification des membranes et de plaques. La Figure 12 présente l'une des images de tomodensitométrie incluses dans cette étude (Schwarz et al. 2016).



*Figure 12: image de tomodensitométrie illustrant l'occlusion luminale de la bronche secondaire latéro-ventrale gauche liée à la présence de tissu inflammatoire développé à partir d'une infection fongique chez une grue blanche de 50 jours d'âge (tête de flèche blanche). La bronche secondaire latéro-ventrale droite, d'aspect physiologique, est désigné par la flèche blanche, d'après (Schwarz et al. 2016).*

Ainsi, au vu de leur coût par rapport à la radiographie et l'impossibilité de diagnostiquer ou d'exclure de manière sûre l'aspergillose aviaire, leur utilisation est plutôt limitée dans cette indication (Schwarz et al. 2016).

## 5. Endoscopie

L'endoscopie nécessite une anesthésie et c'est une méthode onéreuse. Elle présente, en plus du risque anesthésique, un risque chirurgical. En effet, dans des cas avancés, des granulomes peuvent s'être formés, modifiant l'anatomie de certains sacs aériens. L'insertion de l'endoscope peut donc provoquer une hémorragie à ce niveau, entraînant parfois le décès de l'oiseau (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

### a) Visualisation des voies respiratoires

Cet outil permet une visualisation de l'ensemble des voies respiratoires. L'exploration des voies respiratoires inférieures est meilleure sous laparoscopie exploratrice ; cependant l'endoscopie demeure moins invasive.

La visualisation directe des voies respiratoires présente deux avantages majeurs : elle permet de se rendre compte facilement de l'étendue des lésions, et de leur aspect. Dans le cas d'une aspergillose aviaire, il est possible d'observer une plaque ou un écoulement blanc épais, voire jaunâtre dans les sacs aériens, parfois accompagnés d'une néovascularisation (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*). Ces plaques peuvent présenter un aspect vert-gris lorsqu'il y a sporulation.

### b) Obtention de prélèvements pour les examens ultérieurs

De plus, l'endoscopie s'avère utile dans le prélèvement d'échantillons au niveau des lésions (écouvillonnage pour culture fongique, biopsie pour histopathologie), ainsi que dans la mise en place de certains traitements comme le retrait des granulomes ou l'irrigation chirurgicale des sacs aériens. Cela en fait l'examen d'imagerie le plus intéressant dans le cadre de l'aspergillose aviaire. En effet, la culture fongique, suivie d'une analyse histopathologique, est considérée actuellement comme le « *gold standard* » pour le diagnostic de cette maladie. L'endoscopie permet d'obtenir les échantillons à partir desquels seront menés ces analyses (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

→ Ainsi, de même que la présentation clinique de l'animal, les méthodes d'imagerie ne suffisent pas pour conclure à une aspergillose, mais elles permettent dans certains cas la mise en évidence d'une infection, l'estimation de l'étendue des lésions, voire même la réalisation d'un suivi.

## E. Méthodes diagnostiques de laboratoire actuelles

### 1. Introduction

De nombreuses méthodes de laboratoire peuvent être utilisées dans le cadre du diagnostic de l'aspergillose aviaire. Afin de maximiser la détection des cas d'aspergillose, les analyses doivent être menées à des étapes spécifiques de l'infection.

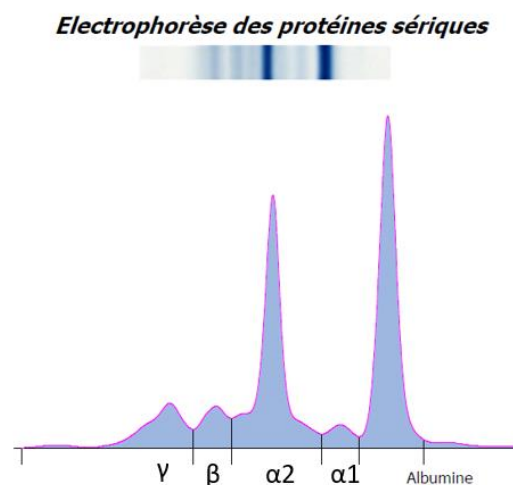
## 2. Electrophorèse des protéines sériques

### a) Principe général

L'électrophorèse des protéines sériques permet de mettre en évidence une inflammation aigüe et/ou une stimulation de l'immunité humorale chez les oiseaux (*Cray, Rodriguez, Zaias 2007*) ; en effet ce type de situation modifie les proportions des protéines présentes dans le sang. Pour interpréter des spectres d'électrophorèse, il est nécessaire d'établir des références propres à chaque espèce ; des recherches doivent donc être poursuivies en ce sens, et notamment dans la mise en place de méthodes standardisées. Un exemple de spectre d'électrophorèse est présenté à la Figure 13.

Les systèmes étudiés pour le moment chez les oiseaux utilisent du gel d'agarose ; quelques études pilotes concernent le système capillaire. Cette dernière technique nécessite de connaître les valeurs de référence d'animaux sains, elle est donc pour le moment informative seulement pour les espèces d'oiseaux les plus documentées (*Fischer, Lierz 2015*). Cette technique s'avère présenter une meilleure résolution, avec la présence de deux pics pour les fractions des  $\beta$ -globulines et des  $\gamma$ -globulines dans une étude portant sur les pyrargues à tête blanche (*da Fonseca et al. 2023*). Concernant une étude sur la cigogne blanche, c'est cette fois la pré-albumine qui présente une fraction supplémentaire (*Thorel, Roman, Leclerc 2024*). Ainsi, le système capillaire semble supérieur à la technique du gel d'agarose, mais pour l'utiliser convenablement l'établissement d'intervalles de référence robustes est nécessaire (*da Fonseca et al. 2023*).

L'électrophorèse des protéines sériques n'est pas spécifique. En effet, les infections ne sont pas les seules circonstances qui mènent à la variation des fractions protéiques ; cela peut également être le cas en période de ponte, de migration, selon la saison ou l'âge de l'individu (*Kummrow et al. 2012*). Cet outil peut être utilisé pour augmenter la sensibilité des tests sérologiques (*Jones, Orosz 2000*), ou bien pour évaluer la progression de la maladie, notamment en cas de traitement (*Cray, Watson, et al. 2009*). Le Tableau IV présente les différentes fractions protéiques présentes dans le sang, et les protéines appartenant à chacune de ces fractions, ainsi que les principales circonstances responsables de la modification de leur concentration dans le sang.



*Figure 13: profil de l'électrophorèse des protéines sériques d'un patient du groupe témoin (CVF039), réalisé dans le cadre de l'étude (le 18/01/2024).*

Fractions protéiques	Exemples de protéines	Circonstances de modifications de leur concentration dans le sang
Pré-albumine	Pré-albumine	
Albumine	Albumine	<u>Diminution</u> : fuites digestives/urinaires/cutanées ; insuffisance hépatique ; syndrome paranéoplasique. <u>Augmentation</u> : déshydratation.
$\alpha$ 1-globulines	$\alpha$ 1-antitrypsine	<u>Diminution</u> : insuffisance hépatique ; syndrome néphrotique ; déshydratation. <u>Augmentation</u> : syndrome inflammatoire.
$\alpha$ 2-globulines	Céruleoplasmine, haptoglobine, $\alpha$ -lipoprotéines	<u>Diminution</u> : insuffisance hépatique ; fuites digestives/urinaires ; dénutrition. <u>Augmentation</u> : syndrome inflammatoire ; syndrome néphrotique.
$\beta$ 1-globulines	Transferrine, $\beta$ -lipoprotéines	<u>Diminution</u> : insuffisance hépatique ; fuites digestives/urinaires. <u>Augmentation</u> : anémies ferriprives.
$\beta$ 2-globulines	Complément C3, IgA	<u>Augmentation</u> : syndrome inflammatoire, cholestase biliaires.
$\gamma$ -globulines	IgA, IgY, IgM	<u>Diminution</u> : déficits immunitaires. <u>Augmentation</u> : pathologies infectieuses/auto-immunes/hépatiques.

*Tableau IV: les différentes fractions protéiques et les principales circonstances induisant des modifications de ces fractions protéiques dans le sang, d'après (Le Carrer 1994).*

#### b) Variations pathologiques

##### (1) Rapport albuminémie/globulinémie (rapport A/G)

Les taux de globulines sériques, en particulier ceux des  $\alpha$ 2-globulines et du sérum amyloïde A, augmentent en cas d'infection aiguë. Au contraire, dans les mêmes circonstances, l'albuminémie a tendance à diminuer (Fischer et al. 2014).

Ainsi, en termes d'indicateurs, il est plus pertinent de s'intéresser à la variation du rapport A/G (qui correspond à l'albuminémie rapportée aux concentrations sériques en globulines) qu'à la seule valeur des protéines totales. En effet, la diminution de l'albuminémie peut compenser l'augmentation des taux de globulines sériques. La valeur du taux de protéines totales peut dans ce cas rester inchangée même en cas stimulation immunitaire intense ; une diminution du rapport A/G reflète alors de manière plus sensible les variations dans les fractions de protéines qui s'opèrent lors d'une infection aiguë.

(2) Pré-albumine

Cette protéine, assez négligeable chez les mammifères, est importante chez les oiseaux. En effet, elle peut constituer jusqu'à 75% de la fraction totale d'albumine (*Spagnolo et al. 2006*) ; le taux sérique de la pré-albumine varie selon l'espèce aviaire et le statut physiologique de l'individu. En plus de ces variations importantes, l'interprétation de la concentration sérique en pré-albumine peut être compliquée par le fait que cette protéine possède un rôle de transporteur vis-à-vis des autres protéines sanguines (*Melillo 2013*), ce qui peut rendre sa détection difficile avec les méthodes de laboratoire actuelles.

Dans une étude portant sur les faucons (*Kummrow et al. 2012*), les individus atteints d'aspergillose présentent une diminution de la concentration sérique en pré-albumine. Le rapport A/G chez ces individus est donc diminué par rapport à celui des oiseaux cliniquement normaux, à l'instar de ce qui est retrouvé classiquement en cas d'infection aigüe.

Dans une autre étude concernant les manchots et comparant trois groupes (individus témoins, individus atteints d'aspergillose et individus touchés par un autre processus pathologique) les fractions entre les différents types de protéines ne sont pas significativement différentes entre les deux groupes d'individus malades. Les taux de pré-albumine, comme ceux des autres fractions protéiques, sont significativement différents seulement entre les oiseaux malades d'une part, atteints d'aspergillose ou d'une autre affection, et les oiseaux sains d'autre part (*Desoubeaux et al. 2018*).

(3)  $\alpha$ 1-globulines

La production en  $\alpha$ 1-globulines chez les oiseaux est peu étudiée, quelque soit le statut clinique des individus. Il semblerait cependant qu'une diminution du taux sérique en  $\alpha$ 1-globulines est observée chez les manchots atteints d'aspergillose, alors que les autres globulines ( $\alpha$ 2-globulines,  $\beta$ -globulines,  $\gamma$ -globulines) voient leurs concentrations augmenter classiquement (*Desoubeaux et al. 2018*).

(4)  $\alpha$ 2-globulines

Comme évoqué précédemment, les  $\alpha$ 2-globulines constituent globalement, comme les autres types de globulines, des protéines positives de l'inflammation. Cela signifie que leurs concentrations sériques augmentent en cas de processus inflammatoire, et notamment d'infection à *Aspergillus* spp.

(a) Haptoglobine

Alors que chez les mammifères l'haptoglobine représente toujours une protéine positive de l'inflammation, chez les oiseaux le taux sérique en haptoglobine augmente significativement en cas d'infection par une bactérie ou un protozoaire (*Georgieva et al. 2010*), mais diminue en cas d'infection par un virus ou un champignon (*Mazur-Gonkowska, Koncicki, Krasnodębska-Depta 2004*).

Au-delà de l'agent étiologique en cause, la concentration sérique de l'haptoglobine, tout comme celle du sérum amyloïde A, peut diminuer ou augmenter en cas d'infection selon l'espèce

et l'âge de l'individu atteint (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*). Ainsi, d'autres études doivent être menées pour approfondir l'étude du comportement de ces protéines sériques avant de les utiliser comme marqueurs pour le diagnostic de l'aspergillose aviaire.

(b) Céruleoplasmine et autres marqueurs inflammatoires

Parmi les marqueurs inflammatoires étudiés dans le cadre de l'aspergillose aviaire, la capacité de fixation de fer non saturé et la concentration en fer plasmatique total peuvent être évoqués. Leurs variations dans le cadre de l'aspergillose aviaire sont étudiées au côté de la céruléoplasmine (*Piercy 1979*).

En tant que protéine positive de l'inflammation, la céruléoplasmine, qui appartient aux  $\alpha_2$ -globulines, augmente en cas d'infection par *Aspergillus fumigatus* ; la capacité de fixation de fer non saturé augmente conjointement. L'augmentation du taux sérique de la céruléoplasmine et de la capacité de fixation de fer non saturé est d'autant plus importante que les cultures fongiques menées à partir des poumons présentent des UFC élevées (*Goetting et al. 2013*).

Le fer plasmatique total appartient plutôt aux protéines négatives de l'inflammation chez les oiseaux, or il suit le comportement de la céruléoplasmine dans le cadre d'une étude (*Goetting et al. 2013*), ce qui est plutôt surprenant.

L'utilisation de deux marqueurs parmi la capacité de fixation de fer non saturé, la céruléoplasmine et le fer plasmatique total offre une plutôt bonne sensibilité concernant l'infection, notamment par *Aspergillus fumigatus* ; l'ajout d'un troisième marqueur permettrait d'augmenter la sensibilité mais ferait chuter la spécificité. De plus, une augmentation de ces marqueurs permet de mettre en évidence une infection, mais pas nécessairement une infection à *Aspergillus fumigatus* ; la diminution conjointe de l'haptoglobine permettrait au mieux d'envisager une infection virale ou fongique (*Goetting et al. 2013*).

(5)  $\beta$ -globulines et  $\gamma$ -globulines

Chez les Psittacidés, les  $\beta$ -globulines représentent la fraction dominante parmi les protéines sériques des individus sains (*Cray, Reavill, et al. 2009*). Les manchots présentent, quant à eux, un niveau significatif en  $\alpha_2$ -globulines, en plus des concentrations importantes en  $\beta$ -globulines sériques (*Desoubeaux et al. 2018*).

En tant que protéines positives de l'inflammation, les taux sériques des  $\beta$ -globulines augmentent généralement en cas de forme aiguë d'aspergillose aviaire. La forme chronique de l'aspergillose aviaire est fréquemment responsable d'une augmentation des concentrations sériques en  $\gamma$ -globulines, en plus de celle des taux sériques en  $\beta$ -globulines (*Beernaert et al. 2010*). En effet, les  $\gamma$ -globulines comptent notamment les immunoglobulines (IgA, IgG et IgY), leur augmentation est donc le signe de la stimulation de l'immunité humorale.

→ L'électrophorèse des protéines sériques ne présente pas le même intérêt pour toutes les espèces aviaires, et la comparaison entre espèces peut être délicate. En effet, parfois seules les fractions d'albumine, d' $\alpha$ -globulines, de  $\beta$ -globulines et de  $\gamma$ -globulines ressortent sous forme de



pics électrophorétiques, alors que dans d'autres cas différents pics au sein de ces mêmes fractions peuvent permettre de déterminer les  $\alpha$ 1-globulines, les  $\alpha$ 2-globulines, les  $\beta$ 1-globulines, les  $\beta$ 2-globulines, la pré-albumine. Une standardisation est nécessaire pour interpréter de manière plus sûre les électrophorèses obtenues.

### 3. Histopathologie

#### a) Méthodologie

L'histopathologie permet seulement de rendre compte d'une infection mycologique grâce à la présence d'hyphes. Les hyphes développés *in vivo* par les différents champignons filamenteux hyalins sont similaires. De plus, des structures hyphales ramifiées et cloisonnées peuvent se développer à partir d'organismes comme *Fusarium* et *Penicillium* (Bengoa et al. 1994). L'identification par culture est donc nécessaire pour rendre compte d'une infection à *Aspergillus* spp en particulier (Cray, Reavill, et al. 2009).

Les tissus prélevés pour l'histopathologie, après obtention des coupes, peuvent être colorés grâce à différentes méthodes : l'hématoxyline-éosine, la coloration de Grocott ou l'acide périodique Schiff (PAS). Les colorations de Grocott et PAS sont les plus efficaces ; elles colorent les hyphes respectivement en noir et en rouge. La coloration PAS présente l'avantage de colorer également le tissu hôte (Ozmen, Dorrestein 2004).

#### b) Classification des lésions

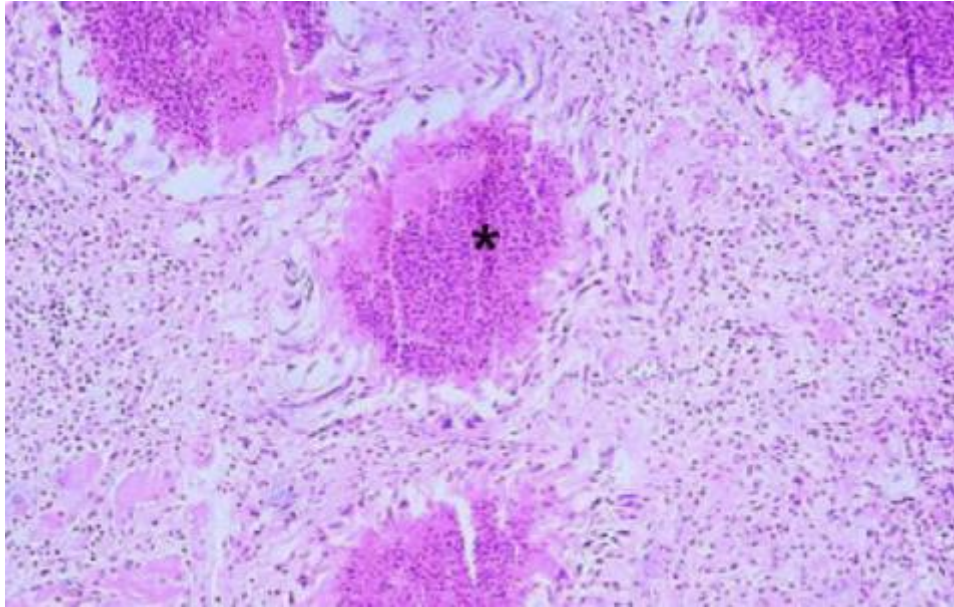
Il existe deux types de réactions tissulaires en cas de mycose liée à *Aspergillus* spp ; ces deux types peuvent coexister au sein d'un même tissu (Atasever, Gümüşsoy 2004).

Le premier type est une réaction granulomateuse dite « nodulaire profonde ». Cette réaction se caractérise par la présence d'une capsule, et l'absence d'exsudation ou de lésions vasculaires dans les tissus adjacents. Elle est surtout présente dans les organes à parenchyme non aéré.

L'autre type de réaction est une réaction infiltrante, dite « diffuse superficielle ». Dans cette forme, les vaisseaux sanguins sont souvent atteints. Les hyphes peuvent se développer dans les organes aérés, ils portent alors un grand nombre de conidiophores (Beernaert et al. 2010).

#### c) Aspect microscopique des lésions

Les granulomes mycotiques prennent l'aspect de noyaux nécrotiques : ils présentent en leur centre de la nécrose caséeuse (représentée en Figure 14), entourée par des hyphes fongiques (Ozmen, Dorrestein 2004). Les hyphes d'*Aspergillus* spp possèdent une épaisseur de 5 à 10  $\mu$ m, ils ont un aspect droit, sont parallèles et séparés en plusieurs septa, avec une ramification dichotomique angulaire (Hope, Walsh, Denning 2005).



*Figure 14: photographie microscopique de granulomes multifocaux issus d'une coupe de poumon de vautour (coloration H&E, observation x100). Ces granulomes présentent en leur centre de la nécrose caséuse [astérix], d'après (Mariappan et al. 2022).*

Des cellules épithélioïdes et des cellules géantes à corps étrangers multinucléées, des lymphocytes, des hétérophiles, des macrophages et des plasmocytes sont disposés autour de ces noyaux nécrotiques (Ozmen, Dorrestein 2004).

L'aspect lésionnel peut varier de manière importante selon les espèces aviaires en cause. Une grille de notation a cependant été proposée dans l'espoir de mieux comprendre la maladie via des enquêtes systématiques et donc des prises en charge méthodiques de l'atteinte (Mariappan et al. 2022).

#### 4. Culture mycologique

Les prélèvements utilisés pour la culture mycologique peuvent être obtenus grâce à une pince à biopsie dans le cadre d'une endoscopie, ou via un lavage des sacs aériens. La culture se fait ensuite sur des milieux spécifiques, généralement la gélose de Sabouraud (Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018).

Elle est nécessaire pour l'identification du champignon en cause dans l'infection. En effet, comme évoqué précédemment, l'aspect des hyphes décrit dans le paragraphe précédent est similaire entre les champignons filamenteux ; ainsi même si l'identification des genres est théoriquement possible à partir de l'aspect en histologie des erreurs sont toujours possibles. Pour pallier à cela, de nouvelles colorations immunohistochimiques sont mises au point (Hope, Walsh, Denning 2005). Cependant, ce sont des techniques qui nécessitent beaucoup de temps, ce qui peut retarder le diagnostic et donc assombrir le pronostic.

Une culture négative ne peut exclure l'infection à *Aspergillus* spp. De même, l'isolement d'une souche d'*Aspergillus* ne permet pas de conclure à l'infection car l'organisme est omniprésent dans l'environnement et peut donc contaminer l'oiseau sans infection. Ainsi, seule une culture

abondante à partir d'un prélèvement obtenu de manière stérile à partir d'une lésion évocatrice d'aspergillose, suivie d'une caractérisation phénotypique, représente un diagnostic de certitude de l'aspergillose aviaire.

#### 5. Dosage du 3-hydroxybutyrate

Le 3-hydroxybutyrate est un sous-produit du métabolisme aviaire. Les hypothèses actuelles font état d'une production lors de processus métaboliques aviaires visant à économiser de l'énergie et des protéines, notamment en cas d'infection (*Pappalardo et al. 2014*).

Une étude portant sur les manchots a mis en évidence une augmentation significative du taux du 3-hydroxybutyrate chez des oiseaux atteints d'aspergillose, notamment au moment où les signes cliniques sont les plus sévères. Au contraire, lorsque les oiseaux guérissent, le taux de 3-hydroxybutyrate diminue (*Desoubeaux et al. 2018*).

Il faut cependant rester vigilant car des études montrent que le taux de 3-hydroxybutyrate varie avec l'alimentation (notamment l'apport en glucose et en acides gras) et les périodes de jeûne chez les moineaux à gorge blanche (*Pagano, Mcwilliams, Guglielmo 2007*) et chez les pinsons (*Bech, Reinertsen 1989*).

Chez l'humain, il a été démontré *in vitro* que l'activité phagocytaire des neutrophiles diminue en cas d'augmentation du 3-hydroxybutyrate. L'état d'acidose lié à l'aspergillose engendre donc probablement une altération de la réponse anti-*Aspergillus* (*Wilson, Reeves 1986*).

Il serait envisageable chez les manchots d'associer la mesure de 3-hydroxybutyrate avec l'électrophorèse des protéines sériques, en s'intéressant tout particulièrement à la fraction des  $\alpha$ 2-globulines qui présente la meilleure spécificité par rapport à l'aspergillose chez cette espèce. Cette combinaison de tests permettrait d'atteindre une spécificité de 98,4% en associant le dosage des  $\alpha$ 2-globulines avec la valeur seuil la plus haute du 3-hydroxybutyrate (*Mennink-Kersten, Donnelly, Verweij 2004*).

#### 6. Sérologie

La sérologie emploie différentes méthodes chez les oiseaux, comme la contre-immunoelectrophorèse, l'immunodiffusion et les tests immuno-enzymatiques (*Beernaert et al. 2010*). Ces méthodes sont basées sur la détection dans le sérum des oiseaux d'éléments du métabolisme fongique, appelés antigènes, ou des anticorps aviaires produits en réponse à l'infection.

Ce sont des outils d'orientation ; en effet, comme dans le cas des autres examens complémentaires déjà présentés, un résultat négatif ne peut pas exclure l'aspergillose, et un résultat positif ne peut pas permettre seul le diagnostic de l'aspergillose aviaire.

a) Anticorps anti-*Aspergillus*

Les méthodes actuelles utilisant le dosage immuno-enzymatique ne sont ni sensibles, ni spécifiques, et les résultats divergent entre les espèces d'oiseaux testées (*Cray, Watson, Arheart 2009*). En effet, d'après une étude menée parmi plusieurs taxons aviaires, les titres en anticorps sont les plus élevés chez les manchots, alors que les psittacidés présentent une faible réactivité. Cette réponse diminuée peut s'expliquer par une moindre exposition aux spores dans l'environnement, et/ou par une réponse immunitaire moins efficace consécutive à une immunodépression de l'animal (*Cray, Watson, Arheart 2009*).

L'hémagglutination indirecte, l'immunodiffusion sur gel d'agar et des tests ELISA ont été utilisées dans différentes études. Alors qu'elles ont été concluantes chez les pigeons (*Martinez-Quesada, Nieto-Cadenazzi, Torres-Rodriguez 1993*), elles n'ont pas montré de corrélation positive entre l'infection par *Aspergillus* spp et le taux d'anticorps chez les faucons mesuré par hémagglutination indirecte (*Morishita et al. 1998*), de même que par ELISA chez les manchots et les psittacidés (*Cray, Watson, Arheart 2009*).

A l'inverse, la présence constante de spores d'*Aspergillus* dans l'environnement entraîne des taux augmentés, « en bruits de fonds », chez les individus sains (*Fischer et al. 2014*), ce qui induit des difficultés dans l'élaboration de témoins négatifs lors de la mise en œuvre de techniques de laboratoire, comme par exemple des ELISA (*German et al. 2002*).

La détection d'anticorps ne permet pas de déterminer s'il s'agit d'une maladie active ou d'une simple exposition aux spores environnementales. La production d'anticorps traduit seulement le fait que l'individu produit une réponse immunitaire compétente face à l'inhalation de spores. Deux alternatives peuvent être envisagées face à cette limite. Tout d'abord, réaliser une cinétique du taux d'anticorps avec deux prélèvements à quelques jours d'intervalle permettrait de renforcer ou au contraire de diminuer la suspicion d'une maladie active. (*German et al. 2002*). D'autre part, la technique d'immunodiffusion sur gel d'agar présente une meilleure valeur prédictive positive car les anticorps sont détectés seulement s'ils présentent une concentration forte dans le sérum, ce qui reflète généralement une maladie active. Cependant, ce test ne présente aucune standardisation chez les espèces aviaires pour le moment, et son coût demeure élevé (*Cabana et al. 2015*).

De plus, le titrage en anticorps semble être lié au stade de la maladie ; en effet, la gliotoxine qui est produite lors des phases intenses de la croissance fongique est immunosuppressive, ce qui peut être à l'origine d'un niveau de réactivité diminué (*Cray, Watson, Arheart 2009*).

Au-delà de la faible sensibilité intrinsèque aux tests, les anticorps sont produits 10 à 14 jours après l'exposition aux antigènes dans le cas de la forme aiguë de l'aspergillose aviaire. Cet aspect est responsable de nombreux faux négatifs lorsque les tests sont réalisés précocement. De même, les individus immunodéprimés génèrent des résultats faussement négatifs puisque la production d'anticorps est moindre, voire absente (*Beernaert et al. 2010*).

## b) Antigènes *Aspergillus*

Les méthodes de détection d'antigènes utilisent des techniques immuno-enzymatiques. Les éléments ciblés sont le galactomannane et le  $\beta$ -D-glucane, qui sont deux composants de la paroi cellulaire d'*Aspergillus*. Un nouveau test diagnostique en médecine aviaire sera également présenté.

### (1) Détection du galactomannane

#### (a) Eléments de physiologie

Le galactomannane est un galactofuranose, c'est-à-dire un polysaccharide soluble, spécifique de la paroi d'*Aspergillus*. Il est libéré lors de la phase de croissance des hyphes fongiques (*Mennink-Kersten, Donnelly, Verweij 2004*). La détection de cet antigène est donc considérée comme pathognomonique de la présence d'*Aspergillus*.

Certaines espèces d'oiseaux, comme les dindes et les poulets, présentent des niveaux élevés de galactomannane en cas d'infection liée à *Aspergillus*. Au contraire, aucune augmentation lors de la mesure de la densité optique n'est relevée chez les faucons (*Fischer et al. 2014*) et les manchots (*Desoubeaux et al. 2018*).

#### (b) Le test « Platelia *Aspergillus* Ag™ » en médecine humaine

Pour les espèces dont on sait qu'elles présentent un taux élevé en cas d'infection, un kit ELISA employant un anticorps monoclonal de rat peut être utilisé. Ce test, « Platelia™ », a été approuvé par la FDA, et il est mis en œuvre dans la détection de l'aspergillose invasive humaine, avec une spécificité et une sensibilité approchant les 100% (*Marr et al. 2004*). Il consiste en un test immuno-enzymatique semi-quantitatif de type sandwich sur microplaque. Sa lecture repose sur la mesure de la densité optique, qui correspond à l'intensité de la lumière absorbée par le complexe antigène-anticorps.

En médecine humaine, « Platelia *Aspergillus* Ag™ » s'est avéré concluant sur le sérum sanguin, et sur les produits de lavage broncho-alvéolaires, les résultats sur ce dernier type d'échantillon sont d'ailleurs plus sensibles. Cependant, les résultats du test peuvent être faussés par l'administration d'antifongiques et d'antibiotiques par voie systémique (*Guo et al. 2010*).

De plus, chez les patients présentant une réponse immunitaire convenable, les anticorps semblent se fixer au galactomannane, entraînant son élimination de la circulation sanguine. Ainsi, la sensibilité du test est moins importante s'il est employé avec des patients qui ne sont pas immunodéprimés (*Herbrecht et al. 2002*). Des séquences de trois tests négatifs sont donc parfois mises en œuvre avant de conclure à l'absence d'infection chez le patient (*Aquino, Goldani, Pasqualotto 2007*).

Des axes de recherche concernant la cinétique du taux de galactomannane et notamment les concentrations plasmatiques selon le degré d'infection restent toutefois à développer (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

(c) Le test « Platelia™ » en médecine aviaire

La sensibilité et la spécificité en médecine aviaire varient selon les études menées. Le seuil utilisé et le fait que les oiseaux soient effectivement infectés ou seulement suspectés d'être infectés sont les facteurs influençant le plus la sensibilité et la spécificité (Cray, Watson, et al. 2009).

Cependant, d'autres caractéristiques comme l'espèce aviaire ont un impact sur le résultat du test Platelia™. En effet, les psittacidés présentant des signes cliniques sévères ont deux fois plus de chance de présenter un test ELISA positif (Le Loc'h et al. 2005), alors que la sensibilité du test chez les faucons est très faible (Arca-Ruibal et al. 2006)). Chez les manchots, une étude menée sur une cohorte de vingt-neuf individus n'a montré aucune différence significative concernant la concentration sérique en galactomannane entre les individus témoins et les individus atteints d'aspergillose (Cabana et al. 2019).

La circulation sanguine du galactomannane, et donc sa détection, semblent être altérées par des facteurs divers comme le site d'infection, la chronicité de la maladie, le degré d'angioinvasion (Herbrecht et al. 2002), l'encapsulation du champignon (Verweij et al. 2000), la quantité d'anticorps anti-*Aspergillus* (Herbrecht et al. 2002), l'administration d'antifongiques (Cabana et al. 2019).

Des faux positifs sont cependant toujours envisageables, par colonisation sans développement de la maladie, ou par réactions croisées avec d'autres antigènes qui n'ont pas encore été mis en évidence (Mennink-Kersten, Donnelly, Verweij 2004).

→ Il est donc préconisé de réaliser deux tests consécutifs pour chaque prélèvement afin d'éviter les faux positifs (Verweij et al. 1995). L'utilisation combinée de « Platelia™ » avec l'électrophorèse des protéines sériques permet d'augmenter la sensibilité, donc d'être meilleur dans la détection des cas réellement positifs. En revanche, la spécificité diminue car les deux techniques possèdent des risques d'erreurs indépendants (Cray, Watson, et al. 2009).

(2) Dosage du  $\beta$ -D-glucane

Au contraire du galactomannane, le  $\beta$ -D-glucane n'est pas spécifique du genre *Aspergillus* ; c'est un composant présent dans la plupart des membranes cellulaires fongiques. Ainsi, l'obtention d'un résultat positif à un autre test spécifique d'*Aspergillus* est nécessaire pour fournir un diagnostic d'aspergillose (Obayashi et al. 1995).

Certains dosages de  $\beta$ -D-glucane menés sur des oiseaux cliniquement sains ont montré des niveaux élevés, ce qui questionne la sensibilité de cette méthode. Un test a tout de même été mis au point et approuvé par la FDA, le « Fungitell™ ». Il présente une sensibilité assez faible, comprise entre 56 et 77% selon les études (White et al. 2015). Il faut également noter la présence de faux positifs dans ces études, liés à une réaction croisée avec la cellulose (Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018). La spécificité du test est meilleure, située entre 81 et 97% (White et al. 2015).

(a) Principe du test

Le test « Fungitell™ » est basé sur une coagulation enzymatique ; il produit un résultat colorimétrique, le  $\beta$ -D-glucane n'étant pas immunogène (Obayashi et al. 1995). Ce test, tout comme

le « Platelia™ », est utilisé pour la détection de l'aspergillose invasive en médecine humaine. Le seuil du test est alors défini pour donner une VPN élevée (*Obayashi et al. 2008*).

(b) Le manque de spécificité du test

Ce seuil utilisé en médecine humaine ne peut pas être transposé en médecine aviaire. En effet, les oiseaux sans infection présentent un titre sérique en  $\beta$ -D-glucane moyen plus élevé que le seuil utilisé chez les humains ; cela peut s'expliquer par le fait que la concentration en  $\beta$ -D-glucane semble varier selon le niveau de spores fongiques dans l'environnement. Or, les humains sont classiquement moins exposés aux spores d'*Aspergillus* dans leur environnement par rapport aux oiseaux qui, eux, vivent souvent en claustration, dans des milieux humides et moins bien ventilés. Un argument en faveur de cette hypothèse est le fait que les oiseaux SPF présentent une concentration sérique en  $\beta$ -D-glucane moins élevée que les individus vivant en conditions classiques (*Burco et al. 2012*). Le manuel opératoire du test Fungitell™ souligne également cet aspect.

De plus, le test Fungitell™ est sensible aux interférences provenant de divers facteurs. Par exemple, certains matériaux comme les bandages en gaze, les papiers, les pipettes en verre avec filtre en coton, ou même l'air ambiant peuvent introduire de la contamination avec du  $\beta$ -D-glucane.

(c) Variations inter-espèces

Les résultats du « Fungitell™ », au même titre que ceux du test « Platelia™ » varient selon l'espèce aviaire concernée. Lors d'une étude, des concentrations plus élevées sont trouvées chez les oiseaux marins par rapport à celles des cailles japonaises. Viennent ensuite les espèces aviaires domestiques comme les psittacidés, et enfin les rapaces sont les oiseaux présentant la concentration moyenne la plus faible (*Burco et al. 2012*). Ainsi, alors que les résultats sont plutôt prometteurs chez les psittacidés et les oiseaux marins, ils sont moins fiables chez les rapaces, même si le test Fungitell™ demeure le meilleur test antigénique (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

Des seuils ont pu être mis en place lors de cette étude sur le test Fungitell™ chez ces espèces. Avec des seuils de 461 pg/dl chez les oiseaux marins, 669 pg/dl chez les cailles japonaises et 461 pg/dl chez les autres espèces aviaires (*Burco et al. 2012*), la spécificité est plutôt bonne (92,7%), au contraire de la sensibilité qui n'atteint que 60%. Avec ces seuils, la VPP est plutôt bonne ; ainsi un résultat positif peut être interprété avec une confiance relative, ou bien ce test peut représenter un outil supplémentaire pour confirmer une aspergillose aviaire.

(d) Amélioration de la sensibilité du test chez les individus touchés sévèrement

La sévérité de la maladie semble être un facteur induisant des concentrations sériques en  $\beta$ -D-glucane plus élevées. Des résultats non significatifs à cause d'un échantillon trop faible, mais plutôt intuitifs, ont été mis en évidence chez des oiseaux marins (*Burco et al. 2012*). Les individus touchés par une infection disséminée présentent des niveaux sériques en  $\beta$ -D-glucane supérieurs à ceux des oiseaux avec une infection localisée, et la progression de la maladie induit également des concentrations sériques en  $\beta$ -D-glucane supérieures. Par conséquent, la sensibilité du test devrait

être plus élevée lorsque les oiseaux présentent une maladie en fin d'évolution ou lorsque celle-ci se généralise.

Les seuils définis, et donc les résultats positifs ou négatifs, doivent être interprétés avec prudence, notamment selon le contexte. La prophylaxie, un traitement antifongique ou une infection bactérienne ou fongique peuvent être à l'origine d'une augmentation des valeurs en  $\beta$ -D-glucane dans le sang (Albert *et al.* 2011). De plus, il existe des réactions croisées avec des molécules des traitements antimicrobiens ou d'autres champignons comme *Candida* (Burco *et al.* 2012).

### (3) Détection de la gliotoxine

Face aux limites de la détection du galactomannane et du dosage du  $\beta$ -D-glucane, des recherches se sont intéressées à la détection d'un marqueur libéré lors de la croissance des hyphes d'*Aspergillus* spp, la gliotoxine, ainsi que l'un de ses métabolites, la bisméthyl-gliotoxine (Waring, Eichner, Müllbacher 1988) (Reidy *et al.* 2022). Au cours d'une étude portant sur une cohorte de manchots, il est démontré que les taux de détection de la gliotoxine par spectrométrie de masse sont supérieurs parmi les individus confirmés d'être atteints d'aspergillose par rapport aux individus probablement atteints d'aspergillose (Reidy *et al.* 2022). Cependant, la bisméthyl-gliotoxine n'est pas détectée au cours de cette étude.

De plus, cette méthode présente des limites, y compris en ce qui concerne les espèces chez lesquelles elle est validée. En effet, des variations importantes sont rapportées selon le stade d'infection notamment ; la production et donc la détection de la gliotoxine sont diminuées lorsque la maladie évolue à cause du ralentissement de la croissance des hyphes fongiques (Reidy *et al.* 2022).

### (4) Détection de la mannoprotéine

#### (a) Principe général

Le test Asp-LFD est un test rapide « au chevet du patient » en médecine humaine. Il est basé sur une méthode d'immunochromatographie et utilise un anticorps monoclonal qui complexe une mannoprotéine produite par *Aspergillus* lors de la phase de croissance hyphale (Thornton 2008).

Ce test présente l'avantage de pouvoir être réalisé rapidement, permettant la mise en place d'un traitement le plus précocément possible, ce qui n'est pas envisageable avec les tests Platelia™ et Fungitell™.

#### (b) En médecine humaine

Employé en premier lieu en médecine humaine, le test Asp-LFD montre une sensibilité correcte concernant la détection de l'aspergillose invasive, d'environ 68% sur le sérum et 86% sur les échantillons obtenus par lavage broncho-alvéolaire (Pan *et al.* 2015).

Cependant, la sensibilité est bien moins élevée dans le cadre de l'aspergillose chronique pulmonaire (inférieure à 10% à partir des échantillons de lavage broncho-alvéolaire) (Salzer *et al.* 2018). En effet, l'aspergillose invasive est notamment caractérisée par l'angioinvasion de produits fongiques, ce qui augmenterait la détection de ces produits à partir de prélèvements sanguins (Mota *et al.* 2023).



(c) En médecine aviaire

Une étude couplant une phase prospective et une phase rétrospective est menée sur une cohorte de manchots (*Mota et al. 2023*). Chez les oiseaux, le test Asp-LFD est évalué sur du sérum et sur des écouvillons trachéaux. Chez les manchots, du mucus en excès peut se déposer au niveau de la glotte en cas d'infection respiratoire ; il est alors possible d'en prélever par écouvillonnage, permettant d'éviter une anesthésie générale. L'analyse seule du plasma permet d'obtenir une sensibilité de 33%, ce qui représente un résultat intermédiaire par rapport à différentes études portant sur le galactomannane en médecine aviaire et pour lesquelles la sensibilité est de 12% ou 67% selon le seuil utilisé (respectivement 1 et 0,5) (*Arca-Ruibal et al. 2006*), (*Cray, Watson, et al. 2009*).

En revanche, la combinaison de l'analyse du plasma et du prélèvement par écouvillonnage de la trachée augmente cette sensibilité à 75% ; dans ce cas de figure un individu est considéré malade si au moins l'un des deux tests est positif. Cette sensibilité de 75% est bien supérieure à celle des tests au galactomannane rapportés dans la littérature. A noter qu'au cours de cette étude aucun faux positif n'est détecté.

Ainsi, cette étude prouve que le test d'Asp-LFD fonctionne à partir des prélèvements obtenus par écouvillonnage de la trachée. Ce constat revêt une certaine importance chez les manchots ; en effet, les individus de cette espèce ont tendance à présenter des taux d'anticorps plus élevés (*Cray, Watson, Arheart 2009*). Or, comme les tests basés sur l'analyse du galactomannane, l'Asp-LFD pourrait être faussé par l'interférence entre les anticorps et la mannoprotéine ciblée. Utiliser les échantillons issus de l'écouvillonnage permettrait d'éviter cette interférence, au contraire des échantillons sanguins.

D'autres aspects restent à investiguer, comme par exemple l'impact d'un traitement antifongique passé ou présent sur les résultats du test, comme cela a pu être prouvé chez le cochon d'inde (*Wiederhold et al. 2013*). En effet, le faible effectif concerné par cette étude n'a pas permis d'établir une tendance.

7. PCR

Cette méthode est encore peu utilisée en pratique dans le cadre du diagnostic de l'aspergillose, cependant il a été récemment proposé d'inclure la PCR dans le consensus de l'EORT/MSG. En effet, cette méthode présente plusieurs avantages. Grâce à l'identification du gène de l'ARN 18S, elle permet de déterminer précisément l'espèce d'*Aspergillus* en cause (*Mengoli et al. 2009*). De plus, d'éventuelles résistances liées aux gènes peuvent être mises en évidence. Ces deux éléments permettent de mieux cibler le traitement à mettre en place (*van der Linden et al. 2010*).

La PCR est une méthode rapide à mettre en œuvre, particulièrement en médecine humaine car l'ADN utilisé pour la PCR est directement extrait du prélèvement réalisé sur le patient. Cependant, dans le cadre de l'aspergillose aviaire le prélèvement réalisé sur l'oiseau est d'abord placé en milieu de culture (*Van Waeyenberghe et al. 2011*). Ces prélèvements peuvent être du sang, du sérum, du plasma, du liquide obtenu par LBA, des biopsies tissulaires, notamment des biopsies pulmonaires. Il est nécessaire d'attendre la réalisation de la culture fongique pour analyser le

produit de cette culture en PCR, ce qui allonge considérablement la durée de la procédure compte tenu du temps de croissance assez long d'*Aspergillus*.

Un test, basé sur la RT-qPCR, nommé MycAssay™, a été mis au point (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*). Cependant, ce type de tests, employant la PCR, est utilisé seulement dans le domaine de la recherche. Des pistes intéressantes sont à explorer ; par exemple la PCR pourrait permettre, grâce à l'aspect quantitatif, d'évaluer la charge fongique et donc d'estimer le risque d'aspergillose invasive (*Hope, Walsh, Denning 2005*).

Le principal obstacle pour le moment à l'utilisation de la PCR est le manque de standardisation entre les différents laboratoires, au contraire du test de détection du galactomannane qui dispose d'un contrôle interne fourni par le fabricant (*White et al. 2015*). De plus, cette technique comporte plusieurs étapes, notamment le traitement et l'ajout des réactifs, au cours desquelles le risque de contamination par des spores exogènes d'*Aspergillus* est élevé, ce qui peut amener des résultats faussement positifs. Des réactions croisées avec d'autres espèces fongiques peuvent également être à l'origine de faux positifs (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

→ Les recherches ont permis de mettre en évidence des sensibilités et spécificités différentes entre les différentes méthodes diagnostiques selon les types d'échantillon. Ainsi, la PCR présente une meilleure sensibilité par rapport à la technique de détection du galactomannane et de dosage du  $\beta$ -D-glucane à partir des échantillons de sérum, mais sa spécificité est alors moins bonne que celle du test Platelia™. Au contraire, si l'on considère des échantillons issus de LBA, la sensibilité des méthodes PCR est moindre, alors que la spécificité est meilleure par rapport à celle du dosage du galactomannane (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

#### 8. Spectrométrie de masse

Cette partie ne sera abordée que pour l'intérêt qu'elle suscite dans le monde de la recherche, car elle n'est pour le moment pas utilisée en pratique. La technique qui a été expérimentalement testée est le MALDI-TOF MS (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*). Le but est d'analyser les protéines et les fragments de protéines présents dans un échantillon, afin d'obtenir « l'empreinte » de chaque pathogène sous forme d'un spectre constitué de « pics ».

Cette méthode présente plusieurs avantages : en plus d'être sensible et spécifique, elle permet d'obtenir l'espèce, voire même la souche de champignon en cause si celles-ci sont présentes dans la base de données (*Hettick et al. 2008*). De plus, elle permet de mettre en éventuel autre agent pathogène en évidence, qui pourrait être responsable de l'immunodépression à l'origine du développement de l'aspergillose. Plusieurs recherches ont déjà permis de commencer à construire la base de données, avec le genre *Aspergillus*, mais également d'autres genres fongiques (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*).

Pour le moment, les inconvénients que présente cette méthode sont le manque de standardisation notamment aux étapes de culture fongique et d'extraction, ce qui modifie les spectres obtenus et pourrait donc fausser les résultats (*Savelieff, Pappalardo, Azmanis 2018*). Un autre inconvénient réside dans le fait que pour le moment, l'échantillon nécessaire pour le MALDI-TOF est obtenu à partir des cultures fongiques, tout comme pour les méthodes de PCR. Comme évoqué précédemment, cela allonge donc le temps nécessaire au diagnostic, et ces différentes étapes augmentent le risque de contamination.

#### 9. Immunohistochimie

L'identification par immunohistochimie pourrait représenter l'examen de choix pour confirmer le diagnostic étiologique de l'aspergillose aviaire. Cependant, peu de papiers font état de cette technique utilisant des anticorps monoclonaux ou polyclonaux (*Beernaert et al. 2010*).

#### 10. Autopsie

##### a) Types lésionnels

L'aspergillose aviaire revêt plusieurs aspects lésionnels ; ces aspects dépendent du tissu affecté et de l'évolution de la maladie.

Dans le cas d'aspergillose aigüe, de nombreux foyers granulomateux miliaires peuvent être mis en évidence à l'autopsie dans différents tissus (*McMillan, Petrak 1989*). Les oiseaux atteints d'aspergillose sous sa forme chronique présentent généralement des foyers granulomateux jaunes ou blancs (*Beernaert et al. 2010*), sous forme de nodules caséeux (*Hauck, Cray, França 2020*). Les foyers granulomateux peuvent également être de couleur verte au niveau des membranes aérées. Ces granulomes semblent apparaître environ deux jours après l'infection (*Femenia et al. 2007*).

##### (1) Appareil respiratoire

En ce qui concerne l'appareil respiratoire sensu stricto, l'aspergillose aviaire se caractérise par la présence de plaques d'écoulements blanc épais, voire jaunâtres. Ces plaques peuvent présenter un aspect vert-gris en cas de sporulation (*Mariappan et al. 2022*). La Figure 15 illustre la présence de colonies fongiques parfois visualisables lors d'autopsie de patients atteints d'aspergillose.

##### (2) Sacs aériens

Lorsque la maladie apparaît, les modifications pathologiques des sacs aériens sont les plus précoces, dès 24h post-infection. Ils présentent alors une paroi épaissie et rugueuse.

Un exsudat inflammatoire peut également être observé au sein des sacs aériens ; il est alors majoritairement constitué d'hétérophiles et de macrophages (*Femenia et al. 2007*).

##### (3) Poumons

Des nodules fermes sont parfois présents, ils donnent alors un aspect consolidé aux poumons. L'atteinte pulmonaire peut également engendrer des zones de nécrose, comme il est mis en évidence sur la carcasse d'un pigeon mort d'aspergillose dans le cadre d'une étude (*Mariappan et al. 2022*).

Les poumons peuvent présenter un tableau lésionnel différent et développer alors un aspect de pneumonie mycotique nécrotique aigüe, mais sans granulome typique ; cet aspect est observé dans cette même étude chez le pigeon et le paon (*Mariappan et al. 2022*).



*Figure 15: photographie de l'appareil respiratoire d'un coq domestique (Gallus gallus domesticus) atteint d'aspergillose, réalisée le 25/10/2023 lors de son autopsie (par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina). [1 → colonie fongique d'Aspergillus au niveau d'un sac aérien ; 2 → fibrine au niveau de la surface des poumons].*

#### (4) Autres organes

D'autres organes peuvent être atteints par ces nodules ou ces zones de nécrose comme l'œsophage, le proventricule, le gésier, l'intestin grêle, le foie, le rein, la peau, la trachée, la rate, le péritoine, le cerveau, les yeux, les muscles, la séreuse des gros vaisseaux sanguins, ainsi que le cœur et notamment l'épicarde.

Les vaisseaux sanguins de manière plus générale peuvent être affectés par un périvasculite, avec un envahissement de la paroi, voire même parfois de la lumière à l'origine d'une thrombose (*Mariappan et al. 2022*).

#### b) Analyse cytologique

Les poumons, la paroi des sacs aériens, et la plèvre s'épaississent au cours du développement des lésions d'aspergillose aviaire. Ces épaississements sont liés à des infiltrations dont la nature cytologique peut varier selon la localisation.

Les hétérophiles sont toujours impliqués en premier lieu dans le cadre de cette infiltration. Dans le cas des poumons et des sacs aériens l'infiltrat s'enrichit ensuite en macrophages, en lymphocytes et en cellules géantes multinucléées, alors que dans le cas de la plèvre les lymphocytes et les cellules plasmiques sont les types cellulaires secondairement impliqués (Femenia et al. 2007).

## 11. Bilan

En conclusion de cette partie, le diagnostic d'aspergillose aviaire peut reposer seulement sur l'analyse histopathologique suivie de l'isolement et de l'identification d'*Aspergillus* basée sur les caractéristiques de la croissance et de la morphologie microscopique. Cette procédure constitue le *gold standard* concernant le diagnostic de la maladie. Il faut cependant être vigilant car l'invasion d'*Aspergillus* n'est pas nécessairement pathogène ; la suspicion doit donc être corroborée par la présence d'éléments fongiques invasifs à proximité ou dans des lésions typiques, ou bien dans des vaisseaux sanguins ou lymphatiques.

De plus, cette procédure nécessite une anesthésie au moment du prélèvement des échantillons ; cette anesthésie n'est pas toujours compatible avec l'état de santé de l'oiseau. Ainsi, les autres méthodes de laboratoire et les examens complémentaires représentent des outils intéressants, mais il faut garder en tête qu'aucun de ces outils n'est pathognomonique de l'aspergillose aviaire. Choisir la méthode de laboratoire idéale selon la phase de l'affection permet d'améliorer la sensibilité de la détection de l'aspergillose aviaire. Les étapes de la maladie et les analyses associées sont résumées à la Figure 16. Le Tableau V résume pour certaines méthodes de laboratoire les spécificités et sensibilités associées aux seuils identifiés lors de l'étude bibliographique.

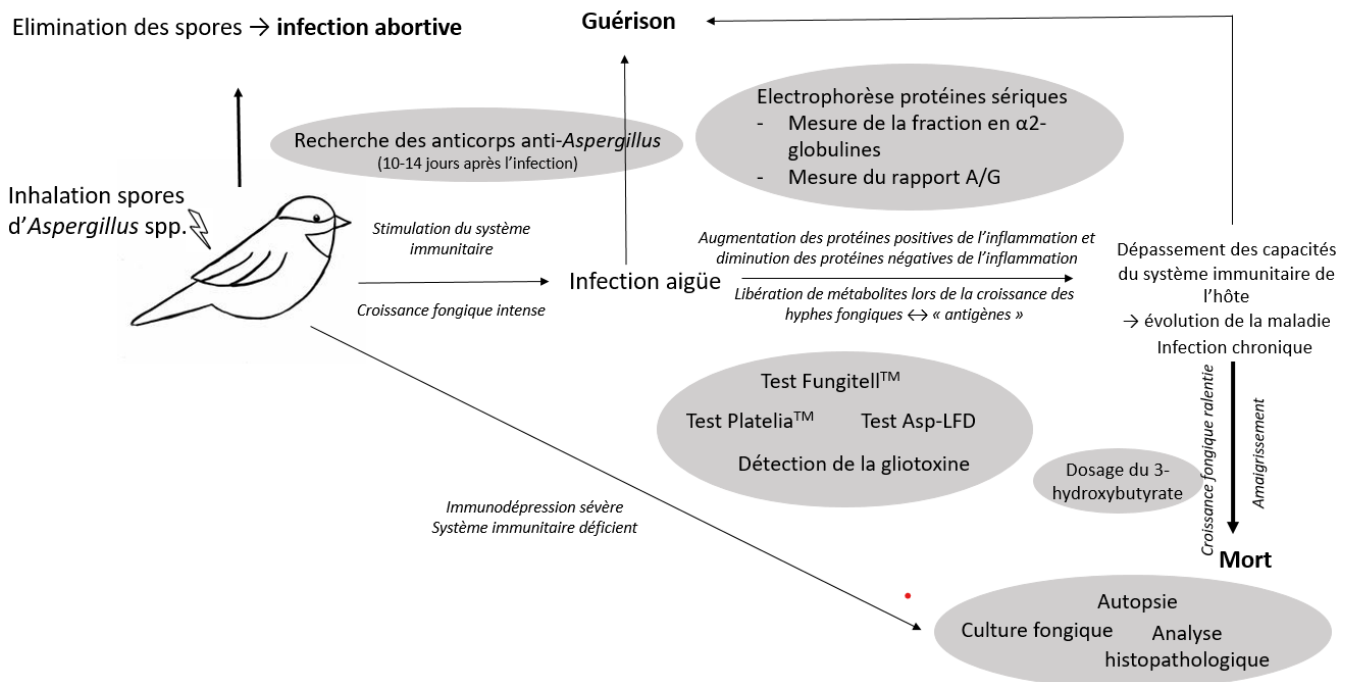


Figure 16: résumé des étapes de l'infection par *Aspergillus* spp. sous forme d'un schéma, et présentation des analyses de laboratoires associées

Des considérations économiques sont également à prendre en compte. L'ensemble de ces éléments est récapitulé dans le Tableau VI. Alors que chez les espèces d'oiseaux exotiques la radiographie, l'endoscopie, les bilans sanguins peuvent servir au diagnostic clinique, ces méthodes sont difficilement réalisables chez les oiseaux de production. Chez ces derniers les méthodes employées seront plus fréquemment la PCR, l'histopathologie, ou l'immunohistochimie.

	Médecine humaine			Médecine aviaire		
	Seuil	Sensibilité	Spécificité	Seuil	Sensibilité	Spécificité
<b>Platelia Aspergillus Ag™</b>	0,5	81,8% <sup>(1)</sup>	89,5% <sup>(1)</sup>	0,5-2 <i>(selon les études)</i>	34,5- 86,2% <sup>(2)</sup> <i>(Chez les manchots)</i>	26,1- 91,3% <sup>(2)</sup> <i>(Chez les manchots)</i>
<b>Fungitell™</b>	80 pg/mL	65% <sup>(1)</sup>	81,1% <sup>(1)</sup>	461 pg/dl <i>(chez les oiseaux marins)</i>	60% <sup>(3)</sup> <i>(chez les oiseaux marins)</i>	92,7% <sup>(3)</sup> <i>(chez les oiseaux marins)</i>
<b>Asp-LFD</b>	/	68% <sup>(4)</sup>	/	/	33% <sup>(5)</sup>	/

*Tableau V: récapitulatif des scores de sensibilité et de spécificité des différents tests basés sur la détection d'antigènes fongiques en médecine humaine et en médecine aviaire. [(1) d'après les manuels opératoires des tests ; (2) d'après (Cabana et al. 2019) ; (3) d'après (Burco et al. 2012) ; (4) d'après (Pan et al. 2015) ; (5) d'après (Mota et al. 2023)].*

	Coût	Facilité de mise en œuvre	Délai avant le résultat	Résultats attendus en cas d'aspergillose	Sensibilité/ Spécificité	Intérêt supplémentaire
<b>Hématologie</b>	Faible	Facile	Court	Leucocytose [20 000 – 100 000 globules blancs/ $\mu$ L] Monocytose Lymphopénie	Faible / Faible	
<b>Biochimie</b>	Faible	Facile	Court	Augmentation des protéines totales	Faible / Faible	Caractérisation des atteintes organiques, Suivi du traitement
<b>Radiographie</b>	Faible	Moyenne	Court	Granulome Perte silhouette cardiaque Modification densité poumons Asymétrie des sacs aériens	Faible / Faible	
<b>Scanner, IRM</b>	Elevé	Difficile	Court	Plaque Opacification membranes	Moyenne / Bonne	
<b>Endoscopie</b>	Elevé	Difficile	Court	Plaque ou écoulement dans le tractus respiratoire	Elevée / Elevée	Réalisation de prélèvements pour culture et/ou histopathologie
<b>Electrophorèse des protéines sériques</b>	Moyen	Moyenne	Court	Diminution A/G Diminution pré-albumine Augmentation $\alpha_2$ , $\beta$ , $\gamma$ -globulines	Faible / Faible	
<b>Histopathologie →Coloration H&amp;E, de Grocott, PAS</b>	Moyen	Difficile	Elevé	Granulomes fongiques	Elevée / Elevée	
<b>Culture →Milieu de Sabouraud</b>	Moyen	Difficile	Elevé	Colonies (blanc, jaune/verdâtre, noires) à croissance rapide	Moyenne / Moyenne	Identification du champignon
<b>3-<math>\beta</math>-hydroxybutyrate</b>	Faible	Facile	Court	Augmentation (chez les manchots)	Faible / Faible	
<b>Examens sérologiques</b>	Moyen	Facile	Moyen	Détection d'antigènes fongiques ou d'anticorps	Variable	

Tableau VI: récapitulatif des différents examens complémentaires et de laboratoire réalisables dans le cadre de l'aspergillose aviaire, et leurs principales caractéristiques.

## Partie expérimentale



## IV. Objectifs et cadre de l'étude

### A. Objectifs de l'étude

L'objectif de cette étude est de caractériser plusieurs tests diagnostiques actuellement utilisés dans le cadre de l'aspergillose aviaire. Ce travail s'inscrit dans une étude plus large menée par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina réalisant une thèse universitaire sur le diagnostic de l'aspergillose aviaire, ainsi que sur les biomarqueurs protéomiques retrouvés chez les oiseaux marins, les perroquets et les rapaces atteints de cette maladie.

Les tests diagnostiques qualitatifs étudiés sont la culture fongique, l'analyse histopathologique et la détection d'une mannoprotéine libérée lors de la croissance d'*Aspergillus* grâce au test Asp-LFD. Les tests quantitatifs sont le calcul de l'index du galactomannane (test Platelia™), le dosage sérique du  $\beta$ -D-glucane (test Fungitell™), le dosage sérique du 3-hydroxybutyrate, le dosage sérique des protéines totales et l'électrophorèse des protéines sériques.

En premier lieu, chaque expérience est analysée indépendamment afin de décrire la distribution des résultats selon l'appartenance des individus au groupe témoin ou au groupe des individus atteints d'aspergillose. Les données quantitatives sont décrites à l'aide des outils statistiques classiques (médiane, quartiles, moyenne....) et représentées graphiquement à l'aide d'histogrammes de distribution. Des tests statistiques non paramétriques sont menés afin de déterminer si les moyennes obtenues sont significativement différentes entre les individus sains et les individus malades.

Les données qualitatives sont résumées dans des tables de contingence et l'indépendance des résultats entre les groupes témoin et malade est étudiée à l'aide du test statistique non paramétrique de Fisher.

A partir de ces premiers résultats, les tests qui présentent des résultats significativement différents entre les deux groupes, autrement dit qui présentent un probable intérêt diagnostique au sein de la cohorte étudiée, sont intégrés dans une analyse statistique bivariée. L'objectif de cette étape est de déterminer d'une part s'il existe une relation statistique entre les résultats des différents tests, et d'autre part s'il est intéressant de les combiner afin d'obtenir de meilleures sensibilités tout en conservant de bonnes spécificités. En effet, les probabilités de guérison en cas d'aspergillose aviaire augmentent lorsque le traitement est administré précocément ; il est donc important de détecter au maximum les animaux atteints. Cela se traduit par une sensibilité élevée concernant les tests diagnostiques.

### B. Cadre de l'étude

Les étapes préliminaires de l'étude sont réalisées par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina, avec l'aide des membres de son comité de pilotage de thèse universitaire : la préparation du dossier à présenter au comité d'éthique, l'élaboration de la base de données, la prise de contact avec les vétérinaires praticiens et le CVFSE qui ont recruté les individus de l'étude.

Le comité d'éthique a approuvé le protocole (CERVO-2023-12-V). Les expériences sont menées sur des échantillons sanguins obtenus sur des oiseaux de manière prospective et rétrospective. La quantité minimale de sérum validée par le comité est de 0.3 mL pour réaliser les analyses.

Certaines analyses sont réalisées par les techniciens de laboratoire du LabOniris, fédération des laboratoires de diagnostic d'Oniris, à savoir le dosage des protéines totales, le dosage du 3-hydroxybutyrate, la mise en culture des prélèvements. Les électrophorèses des protéines sont effectuées dans les locaux de LabOniris, mais en autonomie, et l'interprétation des résultats est confiée au Dr. Vétérinaire SOETART Nicolas.

Les analyses histopathologiques sont menées dans le laboratoire d'histopathologie animale (LHA) du LabOniris, et les interprétations sont réalisées par le Dr. Vétérinaire CORDIER Pierre.

Les dosages du galactomannane et du  $\beta$ -D-glucan sont effectués au CHRU de Tours avec l'aide des techniciens de l'unité de parasitologie, mycologie et médecine tropicale du Pr. DESOUBEAUX Guillaumeau.

Enfin, les tests rapides Asp-LFD sont réalisés en autonomie, sous la direction du Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina.

Tous les échantillons obtenus ne sont pas utilisés pour l'ensemble des analyses. En effet, une quantité de sérum suffisante n'a pas pu être prélevée chez chaque individu. De plus, peu de prélèvements tissulaires post-mortem ont pu être réalisés chez les patients suspects d'être atteints d'aspergillose, ainsi un faible nombre de culture fongique et d'analyse histologique ont été menées.

## V. Matériels et méthodes

### A. Constitution de la cohorte d'étude

#### 1. Inclusion des individus

Un réseau vétérinaire a été créé afin de recevoir le plus grand nombre possible de prélèvements en France métropolitaine, notamment auprès de vétérinaires praticiens possédant une clientèle aviaire. À cet effet, les vétérinaires de parcs zoologiques (AFVPZ) ont été contactés, ainsi que des vétérinaires exerçant une pratique auprès des NAC et des vétérinaires travaillant au sein de centres de soins de la faune sauvage non captive.

#### 2. Affectation des individus dans les groupes « témoins » et « malades »

Quatre groupes d'animaux différents ont été définis : les animaux « témoins », les animaux « traumatiques », les animaux « suspects d'être atteints d'aspergillose » et les animaux « confirmés d'être atteints d'aspergillose ».

Les animaux « témoins » sont ceux présentant un état de santé correct, une maladie qui n'est pas compatible avec une aspergillose en termes de tableau clinique, ainsi que les animaux autopsiés chez qui aucune lésion compatible avec une aspergillose n'a été retrouvée.

Les animaux du groupe « traumatique » sont les individus présentant un traumatisme objectivé par l'examen clinique ou une radiographie, et dont l'hypothèse de l'atteinte par une aspergillose a été exclue.

Les animaux « suspects d'être atteints d'aspergillose » sont les animaux pour lesquels les signes respiratoires et/ou d'une atteinte de l'état général ont été observés et sont compatibles avec l'atteinte par l'aspergillose aviaire. Les signes cliniques retenus sont les signes présentés dans le Tableau VII.

<b>Atteinte respiratoire</b>	<b>Atteinte de l'état général</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- Conjonctivite bilatérale</li><li>- Jetage nasal, éternuements, rhinite</li><li>- Sinusite</li><li>- Râles respiratoires</li><li>- Bruits respiratoires augmentés</li><li>- Respiration bec ouvert</li><li>- Perte / modification de la voix (perroquet)</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Abattement</li><li>- Anorexie/Dysorexie</li><li>- Régurgitations</li><li>- Stase du jabot</li><li>- Amaigrissement. <i>L'échelle utilisée pour la notation de l'état corporel est présentée à l'Annexe 14.</i></li><li>- Muqueuses cyanosées</li><li>- Muqueuses pâles</li><li>- Polyuro-polydipsie</li><li>- Polypnée</li><li>- Biliverdinurie</li></ul>

*Tableau VII: résumé des signes cliniques ayant motivé l'inclusion des oiseaux recrutés dans le groupe des « animaux suspects d'être atteints d'aspergillose ».*

Différentes lésions observées à partir d'examens d'imagerie médicale (scanner et radiographies) ont été catégorisées en faveur d'une aspergillose aviaire. Les lésions en faveur d'une aspergillose sont, pour la radiographie, un épaissement, une densité focale ou une asymétrie des sacs aériens, et en ce qui concerne les poumons, une densité focale ou une consolidation pulmonaire.

Les critères pour l'examen tomodensitométrique comprennent des modifications de la trachée (épaississement et accumulation de liquide luminal, minéralisation de la paroi), des bronches et du syrinx (occlusion, distorsion, minéralisation et épaissement de la paroi), des poumons (anomalie de densité pulmonaire parenchymateuse, consolidation focale) et des sacs aériens (épaississement de la paroi, présence de liquide luminal ou de tissus mous, consolidation focale).

Enfin, les animaux sont affectés dans le groupe « atteints d'une aspergillose confirmée » lorsque l'analyse histopathologique est positive à partir de prélèvements de lésions évocatrices de lésions aspergillaires.

#### B. Réalisation des expériences

Pour les expériences portant sur les prélèvements sanguins, des aliquots sont préparés sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à partir de chaque prélèvement.

##### 1. Culture fongique

La culture fongique est réalisée sur une gélose de Sabouraud coulée en boîte de Pétri. A la gélose de Sabouraud est ajouté un antibiotique afin d'empêcher la croissance des bactéries. Dans notre cas, le chloramphénicol est l'antibiotique ajouté à la gélose.

Les boîtes de pétri sont incubées pendant trois à cinq jours à 35°C. La lecture est classiquement réalisée après quelques jours d'incubation.

##### 2. Histopathologie

Les prélèvements sont préparés pour l'analyse histopathologique avant d'être colorés à l'aide de trois colorations différentes : Hématoxyline-Eosine-Safran (HES), Periodic-Acid-Schiff (PAS), et l'imprégnation argentique (GMS).

Les lames sont ensuite numérisées puis interprétées par un anatomopathologiste, le Dr. Vétérinaire CORDIER Pierre.

##### 3. Dosage du 3-hydroxybutyrate

La mesure du 3-hydroxybutyrate est réalisée sur un analyseur RX Daytona plus RX,. Pour l'analyse, 10 µL de sérum sont prélevés. Le dosage est réalisé conformément aux recommandations du fabricant. Les résultats obtenus en sortie d'analyseur sont exprimés en mmol/L.

##### 4. Dosage des protéines totales

Pour tous les prélèvements, l'analyseur RX Daytona plus RX, avec le réactif biuret « Protéine totale 2 », est utilisé. Le dosage est réalisé selon les recommandations du fabricant. Pour l'analyse, 10 µL de sérum sont prélevés. Les résultats obtenus en sortie d'analyseur sont exprimés en g/L.

#### 5. Electrophorèse des protéines sériques

Un gel d'agarose « Hydragel 7 Protein » est utilisé pour l'électrophorèse des protéines sériques. Après avoir préparé la solution de coloration à l'aide du colorant *AmidoBlack*, et la solution de décoloration, les autres cuves sont remplies avec les derniers réactifs (solution de lavage, solution d'*Acid Violet*).

Les échantillons sont ensuite préparés. Pour chaque prélèvement, 70 µL de sérum sont pipetés et placés dans un puits de l'applicateur. L'applicateur est ensuite positionné dans une chambre humide pendant 5 minutes, durée pendant laquelle les échantillons diffusent dans les dents de l'applicateur.

Le module de migration est préparé en positionnant les mèches tamponnées sur le chariot porte-électrode. Ensuite, 120 µL d'eau distillée sont déposées sur le plateau de migration, sur lequel est déroulé le gel. Enfin, l'applicateur est placé sur le chariot, après le retrait des protections des dents.

A la fin de la phase de migration, le gel est positionné dans le porte-film, lequel est placé dans le compartiment de coloration. A l'issue de cette phase, le gel est lu à l'aide du Gelscan S de L'HYDRASIS 2.

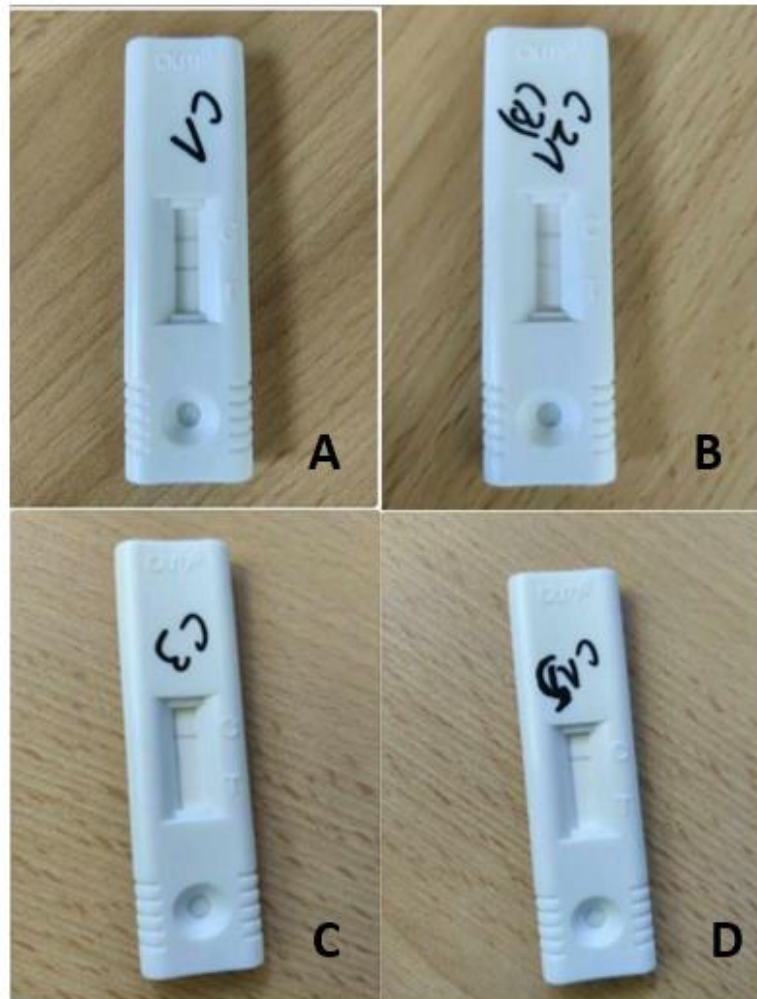
Les différentes fractions protéiques sont déterminées sur le logiciel : pré-albumine, albumine,  $\alpha$ 1-Igobulines,  $\alpha$ 2-globulines,  $\beta$ -globulines et  $\gamma$ -globulines. Les fractions sont découpées à l'aide des intervalles de référence des espèces quand elles sont disponibles. Les résultats sont exprimés en g/L.

Une relecture des gels est réalisée ensuite par le Dr. Vétérinaire SOETART Nicolas.

#### 6. Détection de la mannoprotéine fongique à l'aide du test Asp-LFD

Avant la réalisation du test rapide, les échantillons de sérum subissent un pré-traitement selon les préconisations du fabricant. Après centrifugation des tubes à 14 000 g/min pendant 1 minute, 75 µL de chaque échantillon de sérum est prélevé à l'aide d'une micropipette et placé dans un tube à essai avec bouchon à vis. Dans chaque tube à essai sont ajoutés 150 µL de *Sample Buffer* (échantillon tampon) à l'aide d'une micropipette également. Les tubes à essai contenant la solution composée de sérum et du tampon sont placés dans un bloc thermique à 120°C pendant 3 minutes. Enfin, les tubes sont placés une nouvelle fois en centrifugeuse pendant 5 minutes, à 14 000 g/min.

Le test rapide est ensuite réalisé en déposant 70 µL de la solution dans le puits d'échantillon à l'aide d'une micropipette également, en évitant l'introduction de bulles d'air. La lecture du *snap-test* est réalisée 30 minutes après l'ajout de la solution dans le puits d'échantillon. A la lecture, un score entre 0 et 3 est donné à chaque *snap-test*, selon l'intensité de la ligne de la zone test, comme indiqué à la Figure 17.



*Figure 17: photographies de quatre snap-test Asp-LFD illustrant les différents scores attribués selon l'intensité de la ligne de la zone test, clichés réalisés le 17/06/2024 par le Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina. [A : score 3 ; B : score 2 ; C : score 1 ; D : score 0]*

A noter que lors de la première manipulation, pendant la phase du pré-traitement, le sérum et le tampon ont été ajoutés dans des tubes Eppendorf, qui ont été placés dans un bain-marie à 100°C. Lors d'un premier essai, et malgré une bonne fermeture des tubes, ceux-ci n'ont pas résisté à la chaleur et le contenu s'est déversé dans la cuve du bain-marie, ce qui nous a amené à changer de matériel et à opter pour des tubes à bouchon à vis dans un bloc thermique chauffé à 120°C.

#### 7. Détection du galactomannane à l'aide du test Platelia™

Le test Platelia™ *Aspergillus* repose sur le principe décrit au point III.E.b.1. Le mode opératoire est présenté à l'Annexe 13. La première étape est la distillation des échantillons. Elle est réalisée en prélevant 150 µL de sérum auquel sont ajoutés 50 µL de solution de traitement. Après agitation, les tubes sont plongés au bain-marie à 100°C pendant 3 minutes puis sont centrifugés pendant 10 minutes à 10 min<sup>-1</sup>xg.

L'ajout de 50 µL de conjugué dans chaque puits de la microplaque est effectué, auquel sont ajoutés 50 µL de sérum précédemment traité. La microplaque est ensuite incubée 90 minutes à

37°C. A la fin de l'incubation, le contenu des puits est vidé puis la microplaque est lavée selon une procédure répétée cinq fois. La solution chromogène (200 µL) est ensuite ajoutée dans chaque puits, puis la microplaque est à nouveau incubée pendant 30 minutes, avant d'appliquer 100 µL de la solution d'arrêt dans chaque puits également. La lecture, réalisée par un automate, est effectuée immédiatement après l'ajout de la solution d'arrêt.

#### 8. Dosage du $\beta$ -D-glucane à l'aide du test Fungitell™

Le mode opératoire du test Fungitell™ est présenté à l'Annexe 12. Après réalisation d'une gamme étalon de glucane, les échantillons sont pré-traités. Pour cela, 5 µL de sérum sont déposés dans chaque puits de la microplaque. Pour un même échantillon de sérum deux puits sont utilisés ; ainsi, il est nécessaire d'avoir au moins 10 µL de sérum par patient pour réaliser l'analyse. La solution de pré-traitement, qui est une solution alcaline, est ajoutée dans chaque puits à hauteur de 20 µL. La plaque est ensuite agitée puis incubée à 37°C pendant 10 minutes.

La microplaque est complétée avec 25 µL des solutions étalons et dans les puits de contrôle négatifs par 25 µL de la solution LWR. Enfin, 100 µL du réactif Fungitell™, après reconstitution, est ajouté dans chacun des puits.

Pour chaque échantillon de sérum, les concentrations obtenues dans les deux puits sont présentées à l'issue du test, ainsi que la valeur moyenne. Cette valeur moyenne est celle utilisée pour l'analyse statistique.

#### C. Analyses statistiques

L'ensemble des analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R® version 4.3.3, et de son interface graphique RStudio®. Une sélection des scripts élaborés pour cette étude statistique sont disponibles à l'Annexe 15.

##### 1. Analyses univariées

###### a) Description des tests quantitatifs (galactomannane, $\beta$ -D-glucane, 3-hydroxybutyrate, électrophorèse des protéines sériques, protéines totales)

###### (1) Obtention des paramètres statistiques

Les résultats d'expériences obtenus sous forme quantitative sont décrits à l'aide des paramètres suivants : moyenne, écart-type, médiane, quartiles, valeurs minimale et maximale. Ces différents paramètres sont calculés dans la cohorte, dans le groupe témoin et dans le groupe malade. Les résultats sont représentés graphiquement à l'aide d'histogrammes de distribution.

La distribution des résultats selon l'appartenance au groupe « témoins » ou au groupe « malades » est représentée graphiquement à l'aide de boxplots.

###### (2) Etude des moyennes

Une étude des moyennes obtenues entre le groupe des animaux témoins et des animaux malades est ensuite menée. Les échantillons sont indépendants car ils proviennent d'animaux issus de structures différentes. Cependant, les effectifs dans chaque groupe ne sont pas suffisamment

élevés pour utiliser dans tous les cas un test paramétrique ; le critère pour choisir entre un test paramétrique et un test non paramétrique est donc la distribution de la variable dans chaque groupe. La distribution est déterminée grâce au test de Shapiro-Wilk. Si la variable suit une loi gaussienne, un test paramétrique est choisi (test de Student) ; dans le cas contraire nous avons recours à un test non paramétrique (test de Wilcoxon). Cela permet alors de déterminer si les moyennes obtenues parmi les individus témoins sont significativement différentes des moyennes obtenues parmi les individus malades.

L'arbre décisionnel utilisé pour le choix des tests statistiques est présenté à l'Annexe 11.

### (3) Etude des seuils

Une recherche du seuil permettant d'obtenir la meilleure sensibilité pour chaque test est ensuite menée. Pour cela, une courbe ROC est établie pour chaque dosage, avec pour *gold standard* l'analyse histopathologique. L'indice de Youden et/ou l'indice de vraisemblance sont maximisés, et pour chaque seuil ainsi obtenu la sensibilité et la spécificité associées sont calculées.

A noter que pour les tests Platelia™ et Fungitell™ d'autres seuils sont étudiés : ceux utilisés en médecine humaine, fixés par les fabricants des tests, et des seuils intéressants pour les oiseaux marins d'après certaines sources bibliographiques. Les calculs de sensibilité et de spécificité sont obtenus à partir des tables de contingence réalisées à partir de ces seuils étudiés.

### b) Description des tests qualitatifs (analyse histopathologique, culture fongique, détection de la mannoprotéine)

Une table de contingence est établie pour chacun des tests qualitatifs appliqués au sein de notre cohorte. Tous les effectifs théoriques dans chaque table de contingence ne sont pas supérieurs à 5, ce qui empêche l'application du test du Chi-2. Un test de Fisher est donc réalisé pour chaque table afin de déterminer si les résultats aux tests sont indépendants ou non par rapport à l'appartenance des individus au groupe témoin ou au groupe malade.

Ensuite, la spécificité et la sensibilité du test appliqué à notre cohorte d'étude sont calculées pour chaque test qualitatif à partir des tables de contingence.

Pour le test de l'Asp-LFD, deux situations sont étudiées. Dans le premier cas, le test est considéré comme négatif lorsque le score est de 0. Dans le deuxième cas, les scores 0 et 1 représentent tous deux un résultat négatif. La même analyse est menée, à savoir la réalisation du test de Fisher et les calculs de la sensibilité et de la spécificité associées.

## 2. Analyses bivariées

### a) Comparaison des tests diagnostiques

#### (1) Comparaison des tests quantitatifs

Afin de déterminer si les résultats de deux tests diagnostiques suivent la même tendance, un nuage de point est représenté. Si le graphique semble indiquer une relation linéaire entre les



résultats des deux tests diagnostiques, le coefficient de Spearman est calculé. En effet, les variables ne suivent pas une distribution normale, le calcul du coefficient de Pearson ne peut pas être utilisé.

Lorsque le coefficient de Spearman est compris dans les intervalles  $[-1 ; -0,7]$  ou  $[0,7 ; 1]$  cela indique une relation de corrélation forte voire très forte. Dans ce cas, la significativité du coefficient de Spearman est calculée ; si la p-value est inférieure à 0,05 alors le coefficient de corrélation entre les résultats des deux tests diagnostiques est significativement différent de 0, ce qui indique effectivement qu'il existe une relation entre ces deux tests.

### (2) Comparaison des tests qualitatifs

Une table de contingence permettant de croiser les résultats aux deux tests qualitatifs est réalisée. Tous les effectifs théoriques dans chaque table de contingence ne sont pas supérieurs à 5, ce qui empêche l'application du test du Chi-2. Un test de Fisher est donc réalisé afin de valider ou d'invalider l'hypothèse d'indépendance concernant les résultats de l'un des tests par rapport aux résultats de l'autre test.

### (3) Combinaison des tests diagnostiques

Dans une dernière partie, l'objectif est de déterminer s'il existe un intérêt à combiner les tests diagnostiques. L'objectif est de conserver une bonne sensibilité.

Dans le cadre de cette étude, les tests diagnostiques sont combinés deux à deux. Pour chaque test, le seuil utilisé est celui qui est associé à la meilleure sensibilité lors de l'étude statistique univariée. Nous considérons à chaque fois deux types de combinaisons : la combinaison en série selon laquelle le résultat de la combinaison est positif lorsque les deux tests présentent un résultat positif, et la combinaison en parallèle selon laquelle un examen positif confirme le diagnostic d'aspergillose.

Le rapport A/G n'est pas inclus dans cette analyse car il présente lors de l'analyse statistique univariée une sensibilité et une spécificité faibles. Le test de l'Asp-LFD, malgré la faible sensibilité obtenue lors de son application au sein de la cohorte, est intégré dans cette partie de l'étude car la spécificité obtenue est élevée.

## 3. Analyse multivariée

Une analyse multivariée est finalement réalisée sur quatre variables quantitatives : le dosage du  $\beta$ -D-glucane, la détection du galactomannane, le dosage des  $\alpha$ 2-globulines et le dosage du 3-hydroxybutyrate. Cette analyse est menée sur un échantillon réduit d'individus ; en effet, pour être inclus dans cette analyse, les quatre examens doivent être réalisés sur le prélèvement du patient. Ainsi, 23 individus témoins et 5 individus malades sont inclus dans l'étude multivariée.

Une analyse en composantes principales (ACP) est menée afin d'établir des liens entre les variables. Une classification ascendante hiérarchique est également réalisée, dans le but de déterminer des profils homogènes à l'échelle des individus.

## VI. Résultats

### A. Recrutement des oiseaux

Les oiseaux dont les prélèvements sanguins ont servi à l'étude proviennent de parcs zoologiques, de particuliers ou ont reçu des soins en centre de soins pour la faune sauvage. Une dizaine de vétérinaires ont fournis des prélèvements, et ce à travers toute la France. Le plus grand nombre de prélèvements provient du CVFSE d'Oniris.

Parmi ces individus, trente espèces sont représentées : la chouette effraie des clochers (*Tyto alba*, n = 1), l'épervier d'Europe (*Accipiter nisus*, n = 1), le fou de Bassan (*Morus bassanus*, n = 25), le canard de Barbarie (*Cairina moschata*, n = 3), le coq domestique (*Gallus gallus domesticus*, n = 1), le guillemot de Troïl (*Uria aalge*, n = 23), le plongeon imbrin (*Gavia immer*, n = 3), le manchot de Humboldt (*Spheniscus humboldti*, n = 15) le ara chloroptère (*Ara chloropterus*, n=1), le faucon pèlerin (*Falco peregrinus*, n = 1), le pingouin Torda (*Alca torda*, n = 1), le ara Macao (*Ara macao*, n = 1), le canard à bosse (*Sarkidiornis melanotos*, n = 2), le canard à crinière (*Chenonetta jubata*, n = 1), le pygargue à tête blanche (*Haliaeetus leucocephalus*, n = 2), le gypaète barbu (*Gypaetus barbatus*, n = 1), le milan noir (*Milvus migrans*, n = 2), le caïque à tête noire (*Pionites melanocephalus*, n = 1), le cygne à cou noir (*Cygnus melancoryphus*, n = 1), la buse rouilleuse (*Buteo regalis*, n = 1), le cacatoès rosablin (*Eolophus roseicapilla*, n = 1), la chouette lapone (*Strix nebulosa*, n = 1), le vautour fauve (*Gyps fulvus*, n = 2), le vautour de l'Himalaya (*Gyps himalayensis*, n = 1), le cacatoès banksien (*Calyptorhynchus banksii*, n = 2), le harfang des neiges (*Bubo scandiacus*, n = 1), le pyrargue empereur (*Haliaeetus pelagicus*, n = 1), le gris du Gabon (*Psittacus erithacus erithacus*, n = 2), le cacatoès blanc (*Cacatua alba*, n = 1), la buse variable (*Buteo buteo*, n = 2), et un goéland (*Larus* sp, n = 1).

Excepté le coq domestique, les vingt-neuf autres espèces sont réparties en trois taxons : oiseaux aquatiques (n = 74), perroquets (n = 9) et rapaces (n = 18).

### B. Prélèvements reçus

Initialement, 102 prélèvements provenant de 100 individus sont inclus dans l'étude ; en effet, deux prélèvements proviennent du même manchot de Humboldt, et deux autres prélèvements du même guillemot de Troïl. La base de données et le dictionnaire des données associé sont présentés à l'Annexe 1.

La bibliographie fait état pour plusieurs méthodes diagnostiques de l'aspergillose aviaire de variations inter-espèces. A titre d'exemple, le taux sérique de galactomannane n'augmente pas chez les faucons atteints par l'aspergillose aviaire ; ainsi le test Platelia™ n'est pas utilisable chez ces espèces (Arca-Ruibal et al. 2006).

Afin d'éviter des biais de cet ordre dans nos analyses statistiques, nous avons décidé de comparer les résultats des individus au sein d'un même taxon. Compte tenu des effectifs réduits dans les taxons des perroquets et des rapaces, l'étude est menée parmi les oiseaux aquatiques seulement. Finalement, la base de données utilisée dans cette étude comprend 74 prélèvements provenant de 72 individus appartenant au taxon des oiseaux aquatiques.

### C. Groupes

Afin d'augmenter les effectifs dans chaque groupe dans le but d'obtenir des résultats statistiques interprétables, les animaux initialement inclus dans les groupes « témoins » et « traumatiques » ont été réunis dans le groupe définitif des « individus témoins ».

D'autre part, le groupe des animaux « suspects d'être atteints d'aspergillose » compte cinq individus dont les examens complémentaires ont été réalisés en parc zoologique. A l'issue de ces examens, la suspicion d'aspergillose aviaire est forte, ainsi malgré l'absence d'analyse histologique confirmant la maladie, nous avons décidé d'intégrer ces animaux au groupe des « individus malades », conjointement aux animaux initialement catégorisés dans « animaux confirmés d'être atteints d'aspergillose ».

Finalement, le groupe témoin compte 55 prélèvements et le groupe des individus malades est constitué de 19 échantillons. Le Tableau VIII présente les effectifs des prélèvements par espèce et selon leur appartenance au groupe des individus témoins ou malades.

	Groupe définitif des animaux « malades »	Groupe définitif des animaux « témoins »
Fou de Bassan	1	24
Canard de Barbarie	3	0
Guillemot de Troïl	1	22
Plongeon imbrin	0	3
Manchot de Humboldt	14	1
Pingouin Torda	0	1
Canard à bosse	0	2
Canard à crinière	0	1
Cygne à cou noi	0	1
Goéland	1	0
Totaux	<b>19</b>	<b>55</b>

*Tableau VIII: récapitulatif de la répartition des individus par espèces, dans chacun des deux groupes de l'étude.*

D. Description des tests quantitatifs

1. Détection du galactomannane

a) Précisions concernant les manipulations en laboratoire

Certains tubes de prélèvement ne contenant pas suffisamment de sérum, la distillation est effectuée en ajoutant 70 µL de sérum à 23 µL de solution de traitement afin de conserver le même rapport ; cela concerne les patients ONI001, PZP004 et CVF012.

b) Résultats de la détection du galactomannane

Les résultats au test Platelia™ sont présentés sous la forme d'un histogramme de distribution à la Figure 18. Les histogrammes de distribution concernant les individus témoins d'une part et les individus malades d'autre part se trouvent à l'Annexe 2.

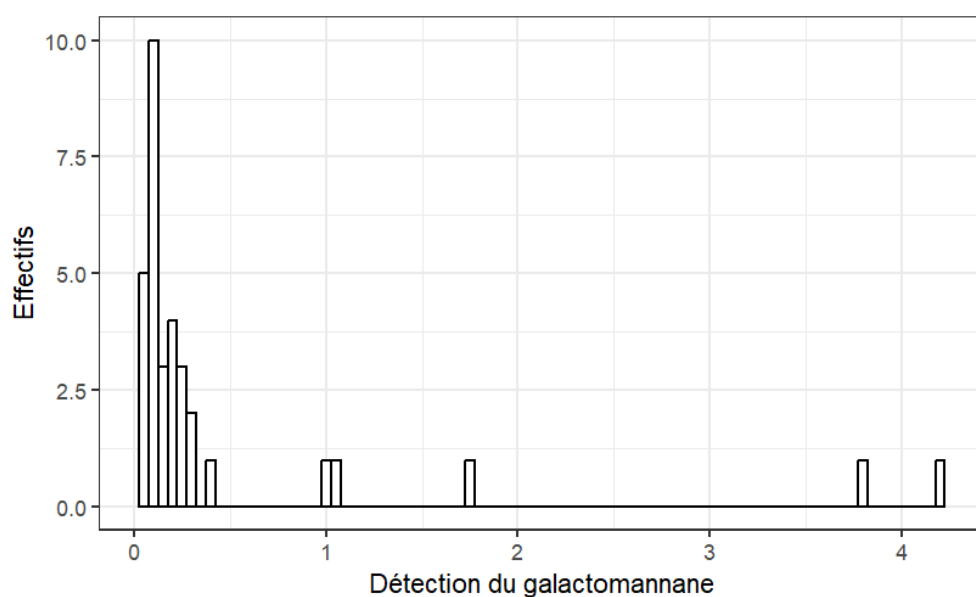


Figure 18: histogramme de distribution des résultats au test Platelia™ au sein de la cohorte.

	Tous individus (n=33)	Groupe malade (n=7)	Groupe témoin (n=26)
<b>Moyenne</b>	0,48	0,84	0,39
<b>Min</b>	0,03	0,09	0,03
<b>Max</b>	4,22	4,22	3,8
<b>Q1</b>	0,09	0,13	0,08
<b>Médiane</b>	0,14	0,14	0,15
<b>Q3</b>	0,26	0,6	0,26
<b>Ecart-type</b>	1,0	1,53	0,78

Tableau IX: paramètres descriptifs du test Platelia™ chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.

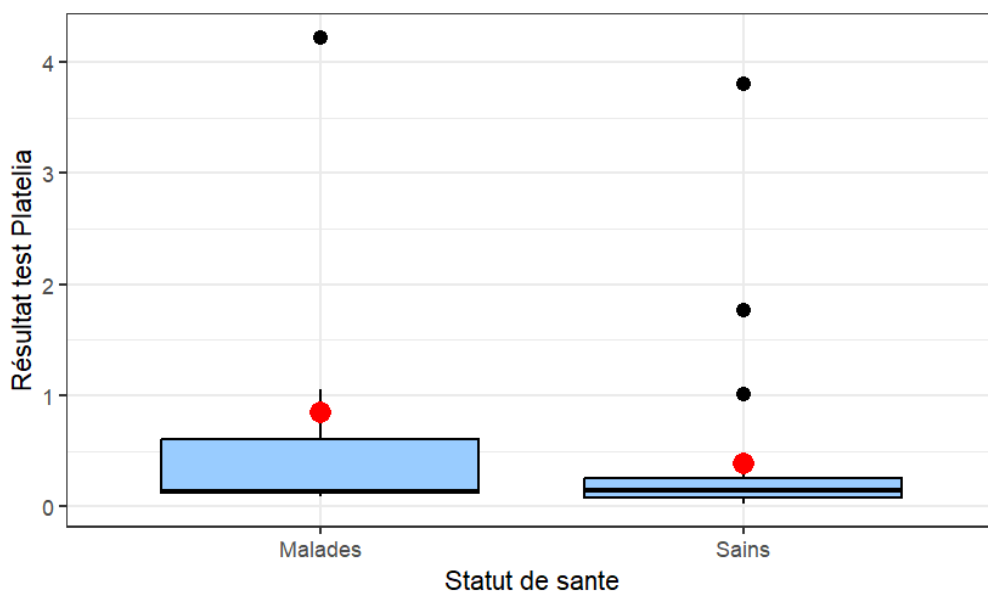


Figure 19: boxplot des résultats au test Platelia™ au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.

Les résultats résumés dans le Tableau IX et la représentation graphique de la Figure 19 indiquent que la moyenne obtenue lors de la détection du galactomannane sérique est plus élevée au sein du groupe des malades (index = 0,84) par rapport au groupe témoin (index = 0,39). La valeur maximale de l'index appartient à un individu du groupe des malades (index = 4,22).

La p-value obtenue au test de Shapiro-wilk est de **8,68e-09** ; elle est inférieure à 0,05, ce qui indique que la distribution ne suit pas une loi normale.

Le test de Wilcoxon est donc réalisé sous l'hypothèse nulle H0 « les moyennes entre les deux groupes ne sont pas significativement différentes ». La p-value obtenue de **5,39e-07** est inférieure à 0,05, l'hypothèse H0 est rejetée. La moyenne entre les deux groupes est significativement différente ; les individus appartenant au groupe des malades possèdent un index au test Platelia™ supérieur aux individus du groupe témoin.

### c) Etude des seuils du test Platelia™ appliquée à la cohorte

Dans la bibliographie, plusieurs seuils ont été utilisés dans le cadre du test Platelia™ appliqué à des patients aviaires. Ces seuils sont ceux des fabricants (utilisés en médecine humaine) ou bien ont été testés par les auteurs des études.

Les résultats obtenus au test Platelia™ au sein de la cohorte sont considérés comme négatifs ou positifs selon plusieurs de ces seuils.

Résultats au test Platelia™ (seuil = 0.5)(seuil = 1)	Statut de santé		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	5	23	28
Positif	2	3	5
<b>Total lignes</b>	7	26	33

Tableau X: Table de contingence obtenue à partir des résultats au test Platelia™ avec un seuil à 0,5 et 1

Les seuils utilisés en médecine humaine sont 0,5 et 1. La table de contingence est identique dans ces deux situations ; elle est présentée dans le Tableau X. Avec ces seuils, le test de Fisher appliqué est associé à une p-value de **0,28**. Cette p-value étant supérieure à 0,05, l'hypothèse H0 selon laquelle les deux groupes sont indépendants vis-à-vis des résultats au test est acceptée. Cela signifie qu'avec ce seuil le test ne permet pas de discriminer suffisamment bien les animaux témoins des animaux malades.

Résultats au test Platelia™ (seuil = 2)	Statut de santé		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	6	25	31
Positif	1	1	2
<b>Total lignes</b>	7	26	33

Tableau XI: Table de contingence obtenue à partir des résultats au test Platelia™ avec un seuil à 2.

Dans la bibliographie, le seuil de 2 est utilisé en médecine aviaire (Cabana et al. 2019). La table de contingence obtenue avec ce seuil dans la cohorte de l'étude est présentée dans le Tableau XI. La p-value du test de Fisher associé est de **0,38**. De la même manière que pour les seuils de 0,5 et 1, la p-value est supérieure à 0,05, ce qui indique qu'avec cet index de 2 l'hypothèse H0 est acceptée ; le test ne permet alors pas de discriminer suffisamment bien les animaux témoins et les animaux malades.

#### d) Courbe ROC

Le graphique présenté à la Figure 20 résume les résultats conjoints du test Platelia™ et de l'analyse histologique qui est le *gold standard* utilisé pour l'établissement de la courbe ROC. La courbe ROC obtenue est représentée à la Figure 21.

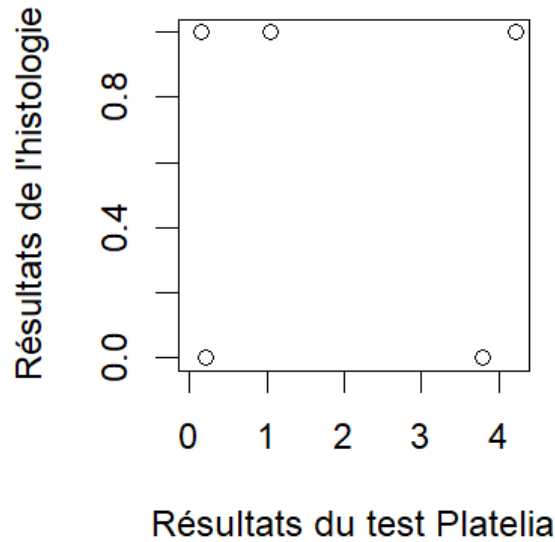


Figure 20: graphique descriptif des résultats au test Platelia™ en fonction des résultats de l'analyse histologique.

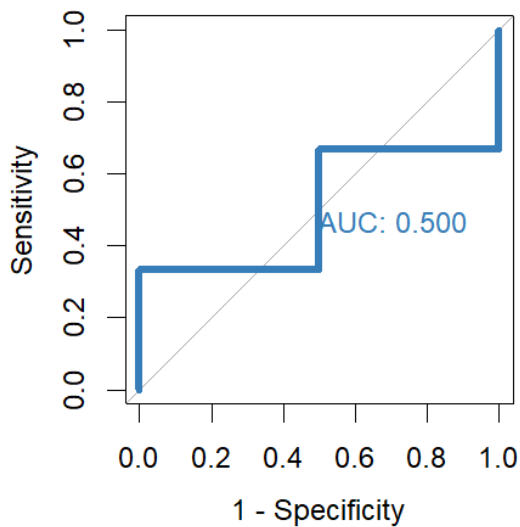


Figure 21: courbe ROC du test Platelia™, avec l'analyse histologique comme gold standard.

L'analyse de la courbe ROC permet de déterminer différents seuils pour lesquels l'indice de vraisemblance et l'indice de Youden sont maximisés. Le seuil de 2,43 appliqué au test Platelia™ permet alors d'obtenir une sensibilité de 66,7% et une spécificité de 50% au sein de notre cohorte. Une spécificité de 100% est atteinte avec le seuil de 0,18 pour lequel l'indice de Youden est maximisé ; cependant la sensibilité chute alors à 33,3%.



## 2. $\beta$ -D-glucane

### a) Dosage du $\beta$ -D-glucane

Les résultats au test Fungitell™ sont présentés sous forme d'un histogramme de distribution à la Figure 22. Les histogrammes concernant le groupe témoin d'une part et les individus malades d'autre part sont disponibles à l'Annexe 3. Certains sérums n'ont pas pu être analysés en raison d'un volume insuffisant de prélèvement.

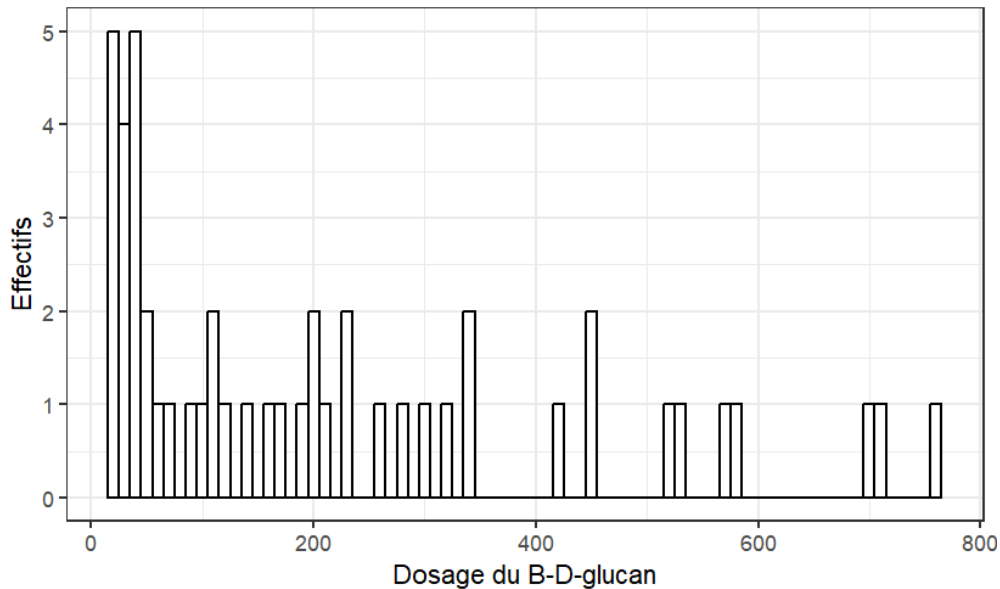
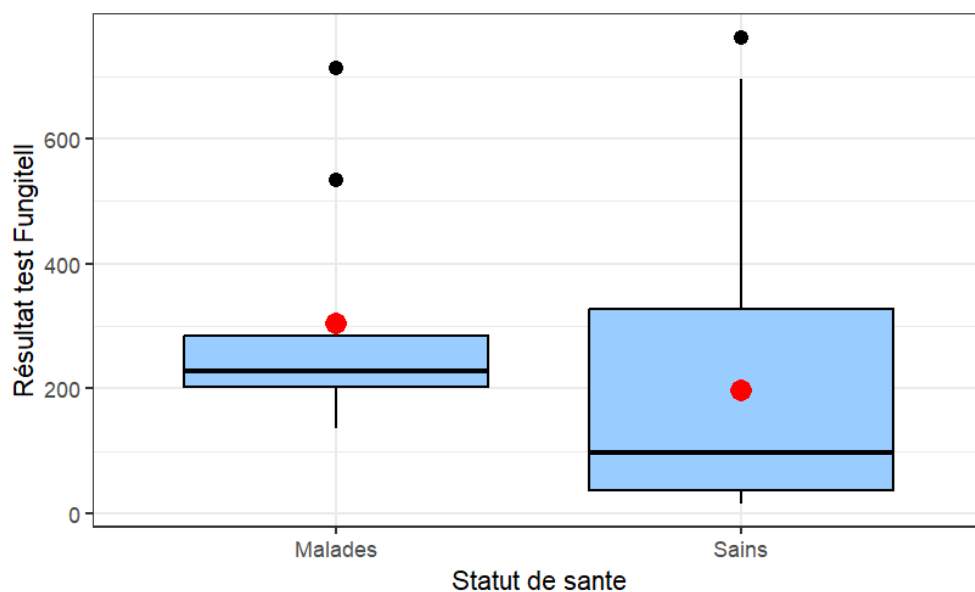


Figure 22: histogramme de distribution des résultats au test Fungitell™ au sein de la cohorte.

	Tous individus (n = 48)	Groupe malade (n = 9)	Groupe témoin (n = 39)
<b>Moyenne</b>	217,2	303,6	197,2
<b>Min</b>	15,32	135,9	15,3
<b>Max</b>	762,18	713,48	762,18
<b>Q1</b>	40	202,5	36,5
<b>Médiane</b>	148,8	228,2	96,7
<b>Q3</b>	321,6	283,7	326,6
<b>Ecart-type</b>	211,84	192,5	213,4

Tableau XII: paramètres descriptifs du test Fungitell™ chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.



*Figure 23: boxplot des résultats au test Fungitell™ au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.*

De la même manière que pour le test du galactomannane, la moyenne obtenue dans le groupe des individus malades (303,6 pg/mL) est plus élevée que dans le groupe témoin (197,2 pg/mL) d'après le Tableau XII et la Figure 23. Cependant, la valeur maximale observée appartient à un individu du groupe témoin (762,18 pg/mL).

Le test de Shapiro-wilk (p-value = **1,2e-05**) suivi d'un test non paramétrique de Wilcoxon sont réalisés. La p-value du test de Wilcoxon est inférieure à **2,2e-16**, donc inférieure à 0,05. Les moyennes obtenues dans chacun des deux groupes sont significativement différentes ; les individus atteints d'aspergillose aviaire présentent en moyenne des résultats supérieurs au test Fungitell™ par rapport aux autres oiseaux au sein de notre cohorte.

#### b) Etude des seuils du test Fungitell™ au sein de la cohorte

Les seuils étudiés au sein de notre cohorte pour le test Fungitell™ sont ceux de la médecine humaine : celui de 60 pg/mL qui indique un résultat douteux, et celui de 80 pg/mL qui indique un résultat positif.

Résultats au test Fungitell™ (seuil = 60)	Statut de santé		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	0	16	16
Positif	9	23	32
<b>Total lignes</b>	9	39	48

*Tableau XIII: Table de contingence obtenue à partir des résultats du test Fungitell™ avec un seuil à 60 pg/mL*

La table de contingence correspondant au seuil de 60 pg/mL est présentée au Tableau XIII ; la p-value associée lors de l'application du test de Fisher est de **0,02**.

Résultats au test Fungitell™ (seuil = 80)	Statut de santé		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	0	18	18
Positif	9	21	30
<b>Total lignes</b>	9	39	48

*Tableau XIV: Table de contingence obtenue à partir des résultats du test Fungitell™ avec un seuil à 80 pg/mL*

La table de contingence reflétant la répartition des effectifs pour le seuil de 80 pg/mL est présentée au Tableau XIV. Le test de Fisher associé à cette table de contingence renvoie une p-value de **0,018**.

Ainsi, pour les deux seuils étudiés, les p-value sont inférieures à 0,05. L'hypothèse H0 selon laquelle les résultats au test Fungitell™ sont indépendants du statut de santé des individus est donc rejetée. La sensibilité du test Fungitell™ est égale à 100% pour les deux seuils étudiés ; la spécificité est de 41% pour le seuil de 60 pg/mL, et de 46% pour le seuil de 80 pg/mL.

Enfin, le seuil de 461 pg/mL est utilisé au sein de la cohorte. Il s'agit d'un seuil déterminé au cours d'une étude concernant les oiseaux marins (*Burco et al. 2012*).

Résultats au test Fungitell™ ( <i>cut-off</i> = 461 pg/mL)	Statut de santé		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	7	34	41
Positif	2	5	7
<b>Total lignes</b>	9	39	48

Tableau XV: Table de contingence obtenue à partir des résultats du test Fungitell™ avec un seuil à 461 pg/mL

La table de contingence correspondant au seuil de 461 pg/mL est présentée au Tableau XV. La p-value associée au test de Fisher est de **0,6**. Ainsi, pour ce seuil la p-value est supérieure à 0,05 ; cela signifie que les deux groupes d'individus sont considérés comme indépendants vis-à-vis du résultat au test Fungitell™ avec ce seuil.

c) Courbe ROC

Les résultats combinés du test Fungitell™ et de l'analyse histologique sont présentés à la Figure 24.

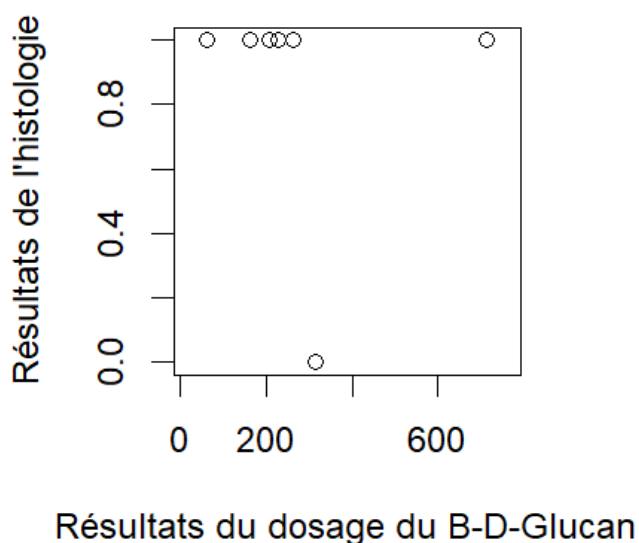
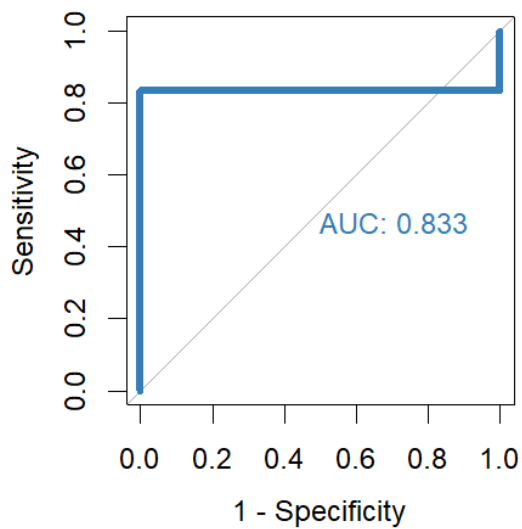


Figure 24: graphique descriptif des résultats au test Fungitell™ en fonction des résultats de l'analyse histologique.

La courbe ROC obtenue à partir de ces résultats est représentée à la Figure 25.



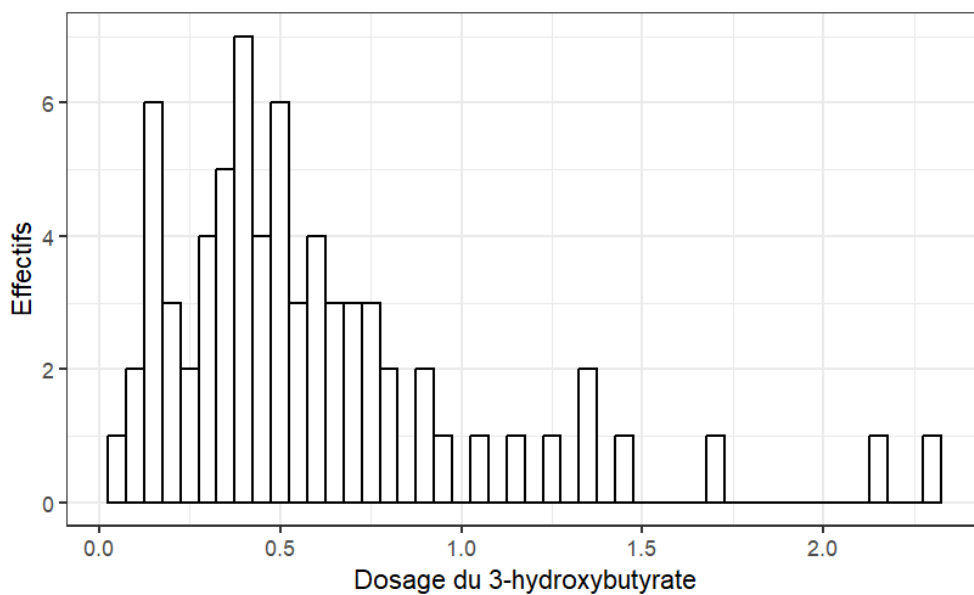
*Figure 25: courbe ROC du test Fungitell™ avec l'analyse histologique comme gold standard.*

L'analyse de cette courbe ROC indique un seuil intéressant de 290,2 pg/mL qui maximise l'indice de Youden. La sensibilité est alors de 83,3% et la spécificité s'élève à 100%.

3. 3-hydroxybutyrate

a) Dosage du 3-hydroxybutyrate

Les résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate au sein de la cohorte sont présentés graphiquement sous la forme d'un histogramme de distribution à la Figure 26. Les histogrammes de distribution obtenus à partir de l'analyse du groupe témoin et du groupe des malades sont à l'Annexe 4.



*Figure 26: histogramme de distribution des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate au sein de la cohorte.*

	Tous individus (n=70)	Groupe malade (n=16)	Groupe témoin (n=54)
<b>Moyenne</b>	0,59	0,82	0,52
<b>Min</b>	0,06	0,11	0,06
<b>Max</b>	2,29	2,15	2,29
<b>Q1</b>	0,32	0,5	0,29
<b>Médiane</b>	0,48	0,69	0,4
<b>Q3</b>	0,71	1,07	0,6
<b>Ecart-type</b>	0,44	0,49	0,41

Tableau XVI: paramètres descriptifs du dosage du 3-hydroxybutyrate chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.

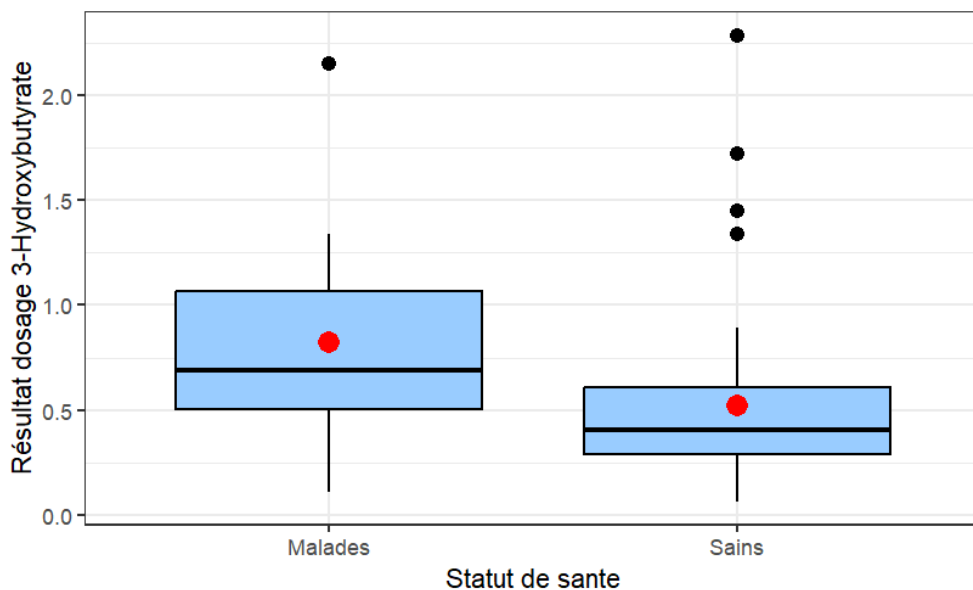


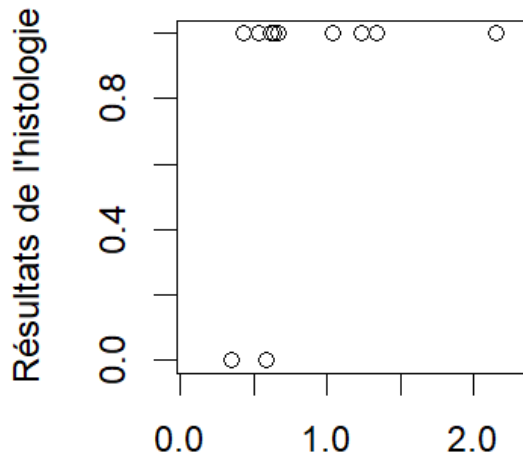
Figure 27: boxplot des résultats au dosage du 3-hydroxybutyrate au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.

Le résumé des résultats de l'expérience (Tableau XVI) et la représentation graphique sous forme de boxplot (Figure 27) montrent que la moyenne du taux sérique de 3-hydroxybutyrate est moins élevée dans le groupe témoin (0,52 mmol/L) que dans le groupe des individus malades (0,82 mmol/L).

Le test de Shapiro-wilk dont la p-value est égale à **8,75e-08** nous conduit à réaliser un test non paramétrique. Au test de Wilcoxon, la p-value obtenue est de **3,83e-09**, ce qui signifie que les moyennes obtenues dans chacun des groupes sont significativement différentes.

#### b) Courbe ROC

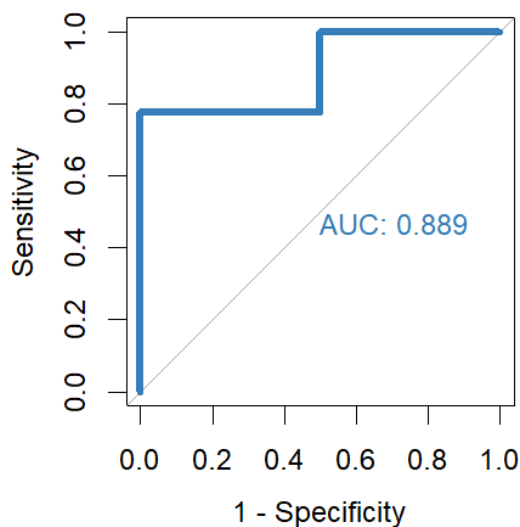
Les résultats combinés de l'analyse histologique et du dosage du 3-hydroxybutyrate sont présentés sous forme de graphique à la Figure 28.



### Résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate

*Figure 28: graphique descriptif des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate en fonction des résultats de l'analyse histologique.*

La Figure 29 représente la courbe ROC concernant le dosage du 3-hydroxybutyrate au sein de la cohorte, avec l'analyse histologique utilisée comme *gold standard*.



*Figure 29: courbe ROC du dosage du 3-hydroxybutyrate avec l'analyse histologique comme gold standard.*

L'analyse de la courbe ROC permet de mettre en évidence deux valeurs du dosage du 3-hydroxybutyrate intéressants. Ils permettent de maximiser l'indice de Youden et l'indice de vraisemblance; il s'agit respectivement des seuils de 0,39 mmol/L et de 0,597 mmol/L. La sensibilité est meilleure lorsque le seuil est à 0,39 mmol/L ; elle est alors de 100% tandis que la spécificité est de 50%. Un meilleur compromis est obtenu avec le seuil à 0,597 mmol/L avec une sensibilité de 77,8% et une spécificité de 100%.

#### 4. Electrophorèse des protéines sériques

Compte tenu du peu de données bibliographiques disponibles concernant l'électrophorèse des protéines sériques chez les oiseaux et le manque de fiabilité de la mesure des fractions de pré-albumine, des  $\alpha$ 1-globulines, des  $\beta$ -globulines et des  $\gamma$ -globulines, seuls les dosages de l'albumine et de la fraction en  $\alpha$ 2-globulines, et le calcul du rapport A/G sont interprétés dans cette partie Résultats. Les autres éléments sont disponibles à l'Annexe 9 (tableaux des paramètres descriptifs et histogrammes de distribution).



a) Dosage de l'albumine

La Figure 30 représente l'histogramme de distribution du dosage de l'albumine dans l'ensemble de la cohorte ; les histogrammes de distribution concernant le groupe témoin et le groupe des individus malades sont présentés à l'Annexe 5.

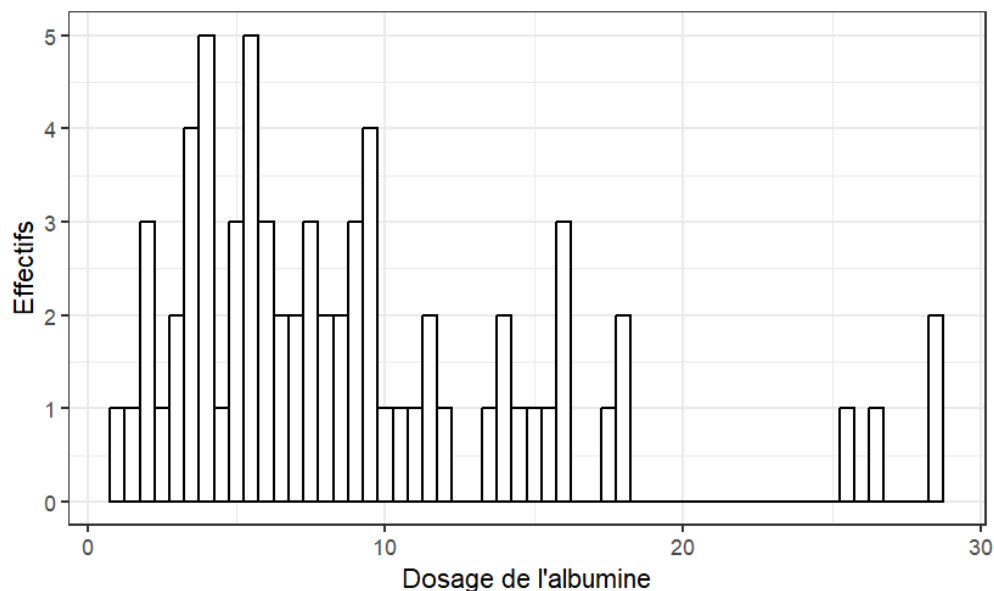
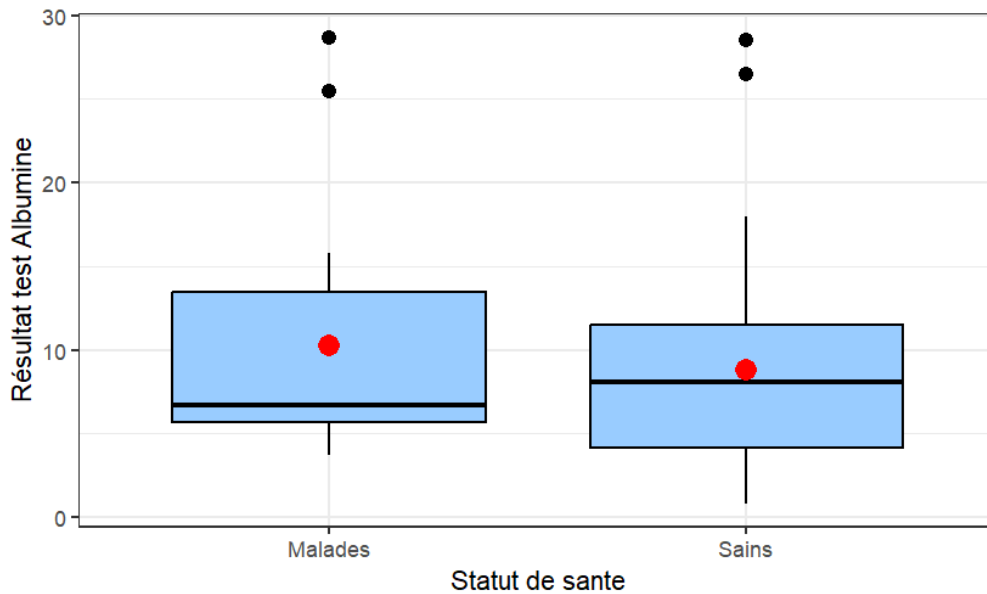


Figure 30: histogramme de distribution des résultats du dosage de l'albumine au sein de la cohorte.

	Tous individus (n=69)	Groupe malade (n=15)	Groupe témoin (n=54)
<b>Moyenne</b>	9,1	10,27	8,78
<b>Min</b>	0,8	3,7	0,8
<b>Max</b>	28,7	28,7	28,5
<b>Q1</b>	4,4	5,65	4,12
<b>Médiane</b>	7,5	6,7	8,05
<b>Q3</b>	11,5	13,45	11,5
<b>Ecart-type</b>	6,34	7,8	5,91

Tableau XVII: paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction de l'albumine) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.



*Figure 31: boxplot des résultats à la mesure de la fraction en albumine au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.*

D'après les résultats résumés dans le Tableau XVII et le boxplot de la Figure 31, la moyenne du groupe témoin (8,78 g/L) est plus faible que la moyenne du groupe des individus malades (10,27 g/L).

La p-value obtenue au test de Shapiro-wilk est de  $3,4 \times 10^{-4}$  ; elle est inférieure à 0.05, ce qui indique que la distribution normale de la variable dans chacun des deux groupes est rejetée. Un test non paramétrique de Wilcoxon est donc réalisé, pour lequel la p-value est inférieure à  $2,2 \times 10^{-16}$ . Les moyennes calculées d'après les mesures du taux d'albumine sont donc significativement différentes entre le groupe témoin et le groupe des individus malades.

#### b) $\alpha$ 2-globulines

(1) *Dosage des  $\alpha$ 2-globulines*

Les résultats du dosage des  $\alpha$ 2-globulines sont présentés sous forme d'un histogramme de distribution à la Figure 32 ; les histogrammes concernant le groupe témoin et le groupe des individus malades sont disponibles à l'Annexe 6.

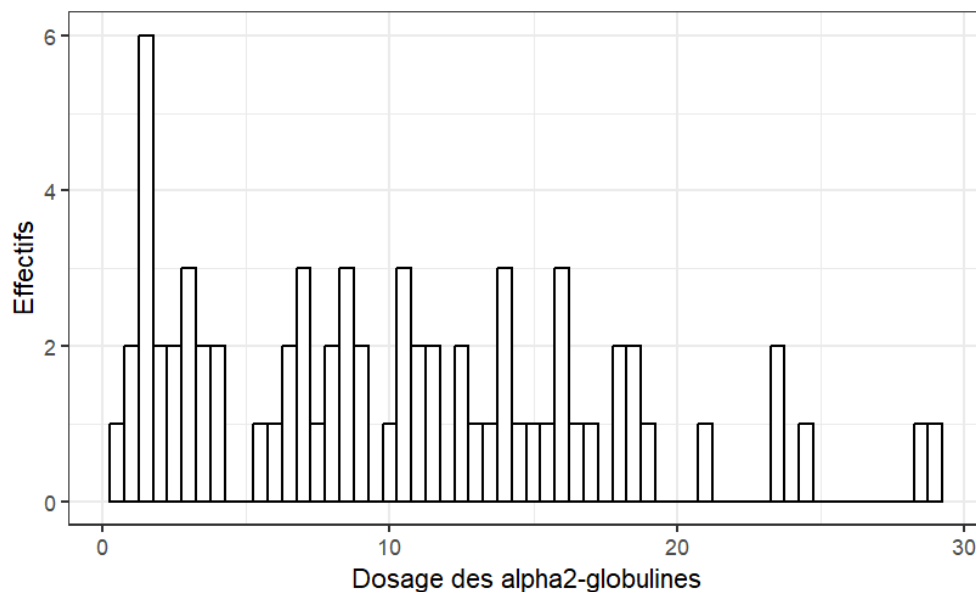
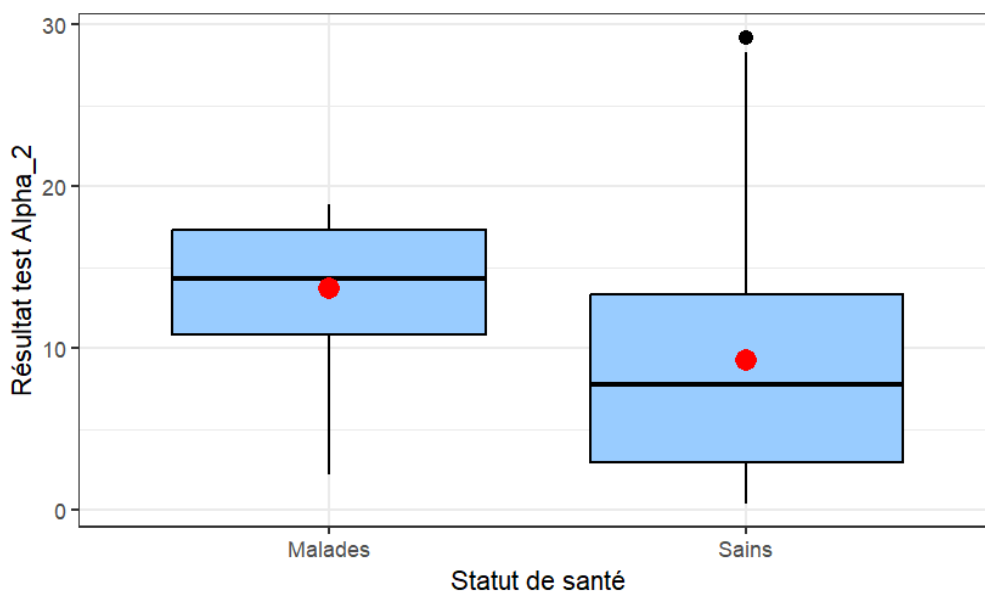


Figure 32: histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\alpha_2$ -globulines au sein de la cohorte.

	Tous individus (n=69)	Groupe malade (n=15)	Groupe témoin (n=54)
<b>Moyenne</b>	10,23	13,73	9,25
<b>Min</b>	0,4	2,2	0,4
<b>Max</b>	29,2	18,9	29,2
<b>Q1</b>	3,4	10,85	2,95
<b>Médiane</b>	9,2	14,3	7,75
<b>Q3</b>	14,9	17,3	13,33
<b>Ecart-type</b>	7,12	4,58	7,42

Tableau XVIII: paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction des  $\alpha_2$ -globulines) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.



*Figure 33: boxplot des résultats à la mesure de la fraction en  $\alpha$ 2-globulines au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.*

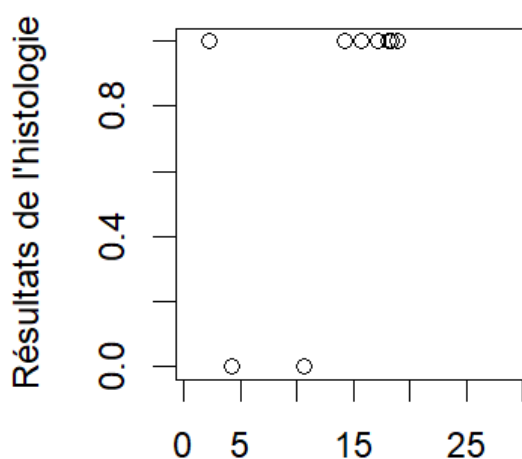
La moyenne du taux sériques en  $\alpha$ 2-globulines est supérieure chez les individus malades (13,73 g/L) par rapport à celle du groupe témoin (9,25 g/L) d'après les résultats du Tableau XVIII. Le test de Shapiro-wilk (p-value = **2.6<sup>e</sup>-4**) effectué permet de mettre en évidence que la variable ne suit pas une loi normale dans les deux groupes, un test de Wilcoxon est donc mené.

La p-value de ce test est de **2.2e-16**, donc inférieure à 0,05. L'hypothèse H0 est rejetée, ce qui signifie que les moyennes sont significativement différentes entre les deux groupes.

La Figure 33 et le Tableau XVII indiquent de plus que la valeur maximale du taux sérique en  $\alpha$ 2-globulines est retrouvée chez un individu du groupe témoin.

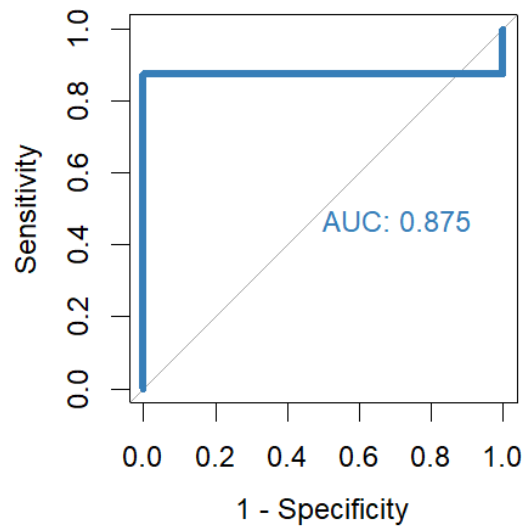
(2) Courbe ROC

Le graphique des résultats du dosage des  $\alpha$ 2-globulines en fonction de l'analyse histologique est présenté à la Figure 34, et la courbe ROC des résultats du dosage des  $\alpha$ 2-globulines à la Figure 35. Le *gold standard* pour cette courbe est également l'analyse histologique.



**Résultats du dosage des alpha-2 globulines**

*Figure 34: graphique descriptif des résultats du dosage des  $\alpha$ 2-globulines en fonction des résultats de l'analyse histologique.*



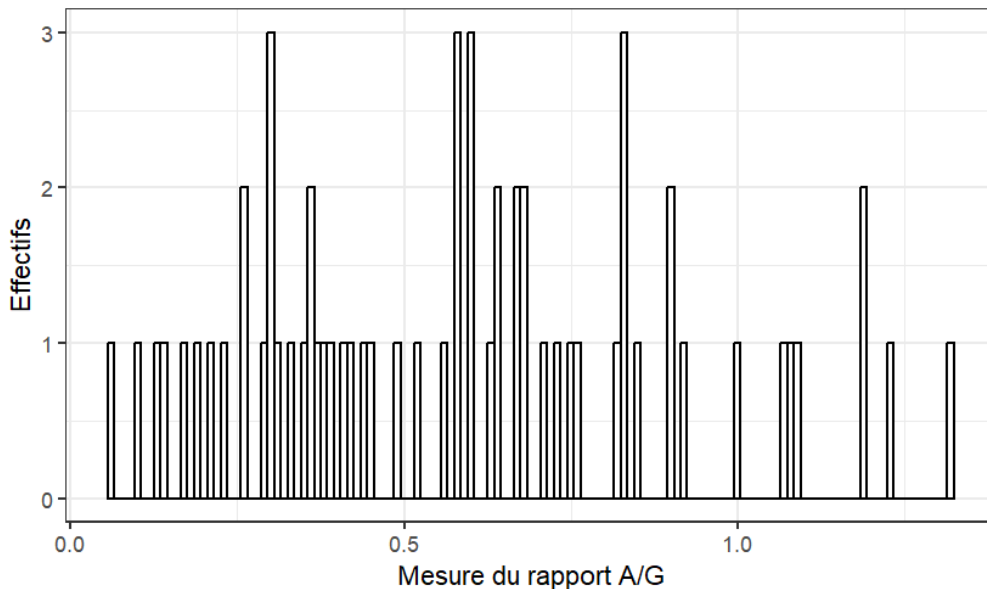
*Figure 35: courbe ROC du dosage des  $\alpha$ 2-globulines avec l'analyse histologique comme gold standard.*

L'analyse de la courbe ROC permet de déterminer deux seuils pour lesquels l'indice de vraisemblance et l'indice de Youden sont maximisés. Il s'agit respectivement des concentrations de 7,4 g/L et de 12,4 g/L. La sensibilité est identique dans les deux cas ; elle est de 87,5%. La spécificité est meilleure lorsque l'indice de Youden est maximisé, elle est alors de 100%, alors qu'elle ne s'élève qu'à 50 dans le cas où le seuil est à 7,4 g/L.

c) Rapport A/G

(1) *Mesure du rapport A/G*

Les résultats de la mesure du rapport A/G à partir de l'électrophorèse des protéines sériques sous forme graphique sont présentés à la Figure 36. Les histogrammes de distribution du groupe malade et du groupe témoin sont disponibles à l'Annexe 7.



*Figure 36: histogramme de distribution des résultats de la mesure du rapport A/G au sein de la cohorte.*

	Tous individus (n=62)	Individus malades (n=8)	Individus témoins (n=54)
<b>Moyenne</b>	0,58	0,36	0,62
<b>Min</b>	0,06	0,1	0,06
<b>Max</b>	1,32	0,83	1,32
<b>Q1</b>	0,33	0,14	0,36
<b>Médiane</b>	0,58	0,3	0,6
<b>Q3</b>	0,8	0,5	0,83

Tableau XIX: paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (rapport A/G) chez l'ensemble des individus, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.

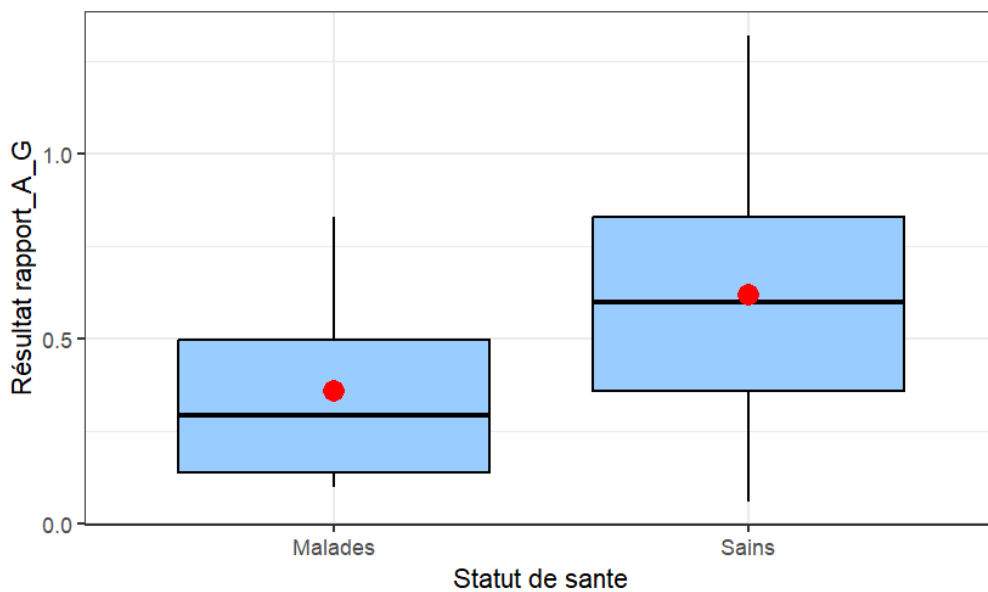


Figure 37: boxplot des résultats du rapport A/G au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.

La moyenne du rapport A/G est supérieure chez les individus du groupe témoin (0,62) par rapport au groupe des individus malades (0,36) d'après le Tableau XIX et la Figure 37.

La p-value du test de Shapiro-wilk est égale à **0.12** ; comme elle est supérieure à 0.05 l'hypothèse H0 selon laquelle la variable suit une loi normale est acceptée. Des graphiques QQplot sont réalisés dans chaque groupe et les coefficients de Skewness et Kurtosis sont calculés.

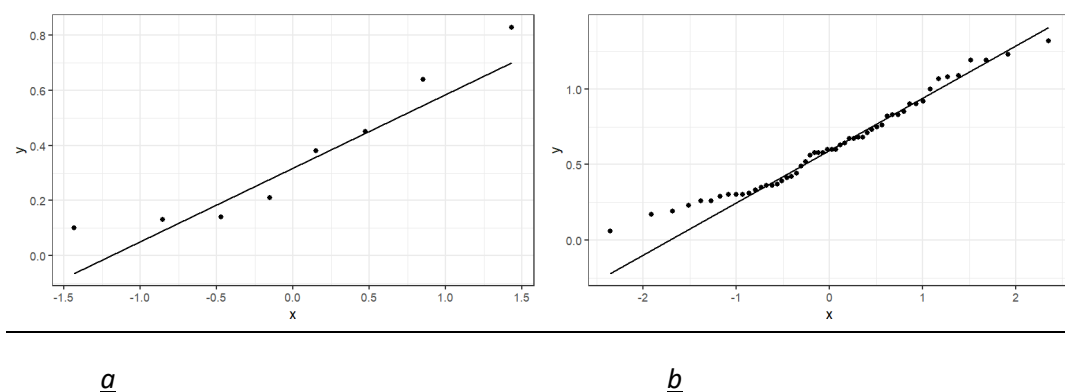


Figure 38: graphiques QQplot du rapport A/G dans le groupe des malades (38.a) et dans le groupe témoin (38.b).

Graphiquement, les mesures du rapport A/G semblent en effet suivre une loi normale dans chacun des groupes d’après la Figure 38. Cela est confirmé par le calcul des coefficients de Skewness et Kurtosis qui sont respectivement de **0,42** et **-0,65**, donc compris entre -2 et 2. La normalité étant confirmée dans chacun des groupes, un test paramétrique est utilisé pour déterminer si les moyennes sont significativement différentes.

La p-value du test d’homogénéité des variances est supérieure à 0.05 (**0,76**), l’hypothèse H0 selon laquelle les variances de la variable sont homogènes n’est pas rejeté. Les variances du rapport A/G sont donc considérées comme égales dans les deux groupes.

Le test de Student standard repose sur l’hypothèse H0 qui stipule qu’il n’existe pas de différence significative entre les deux populations. La p-value du test est de **0,025** ; comme elle est inférieure à 0.05 cela signifie que les moyennes concernant la mesure du rapport A/G sont significativement différentes entre le groupe témoin et le groupe des individus malades.

(2) Courbe ROC

Les résultats combinés de la mesure du rapport A/G et de l’analyse histologique sont présentés à la Figure 39.

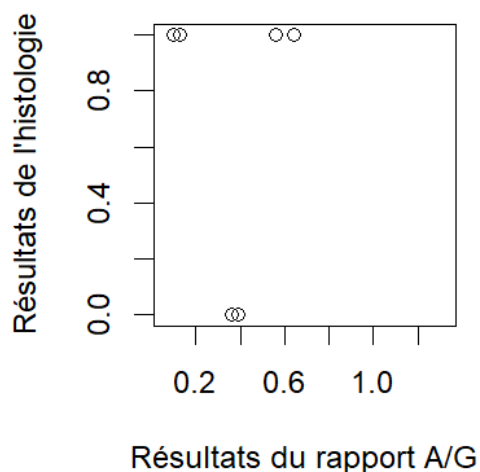
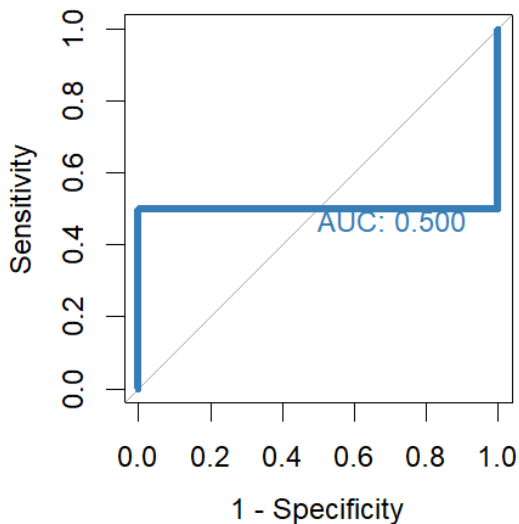


Figure 39: graphique descriptif des résultats de la mesure du rapport A/G en fonction des résultats de l’analyse histologique.

La courbe ROC de la mesure du rapport A/G, obtenue avec l'analyse histologique comme *gold standard*, est représentée à la Figure 40.



*Figure 40: courbe ROC de la mesure du rapport A/G avec l'analyse histologique comme gold standard.*

Les indices de Youden et de vraisemblance sont maximisés respectivement par les seuils de 0,245 et de 0,375. La sensibilité est de 50% dans les deux cas. Cependant, la spécificité est meilleure lorsque le seuil est à 0,245 ; elle est alors de 100%, alors qu'elle n'est que de 50% dans le cas du seuil à 0,375.

## 5. Protéines totales

### a) *Dosage des protéines totales*

L'histogramme de distribution des résultats du dosage des protéines totales au sein de la cohorte est présenté à la Figure 41. Les histogrammes concernant le groupe témoin et le groupe des individus malades sont présentés à l'Annexe 8.



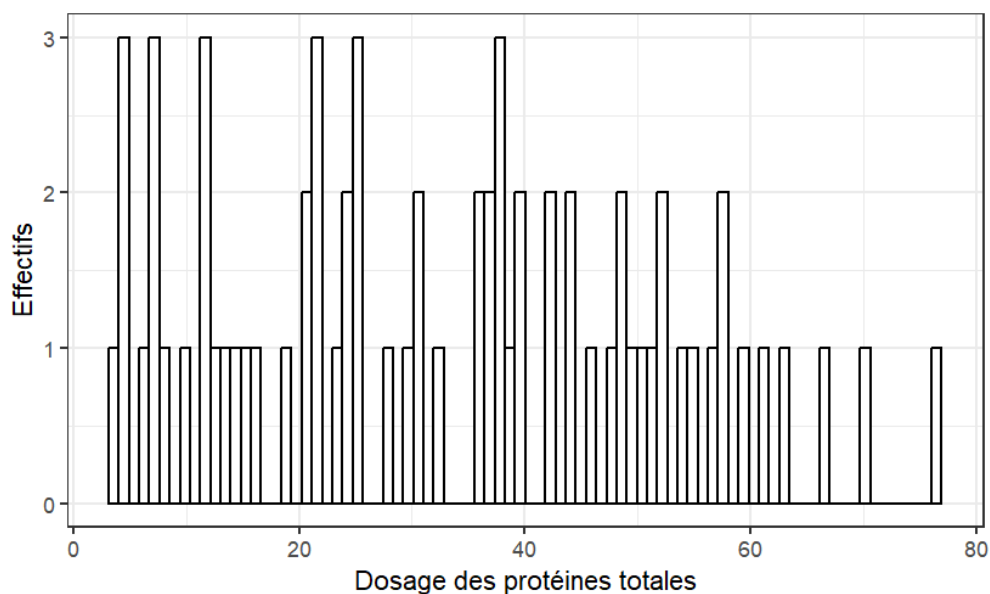
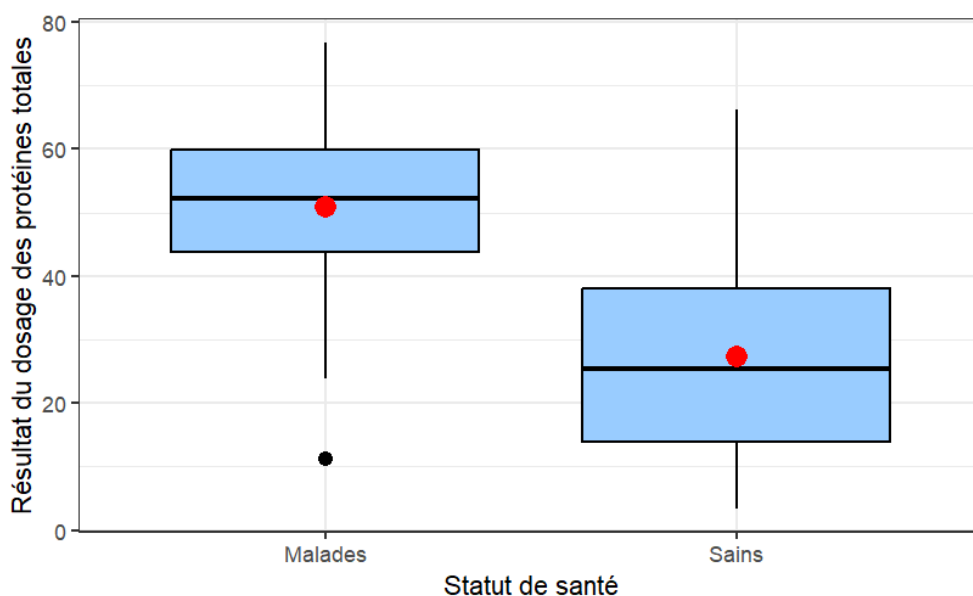


Figure 41: histogramme de distribution des résultats du dosage des protéines totales au sein de la cohorte.

	Tous individus (n=70)	Individus malades (n=16)	Individus témoins (n=54)
<b>Moyenne</b>	32,83	50,83	27,39
<b>Min</b>	3,37	11,29	3,37
<b>Max</b>	76,8	76,8	66,19
<b>Q1</b>	16,41	43,83	13,94
<b>Médiane</b>	32,25	52,3	25,35
<b>Q3</b>	48,38	59,96	38
<b>Ecart-type</b>	18,9	16,16	16,19

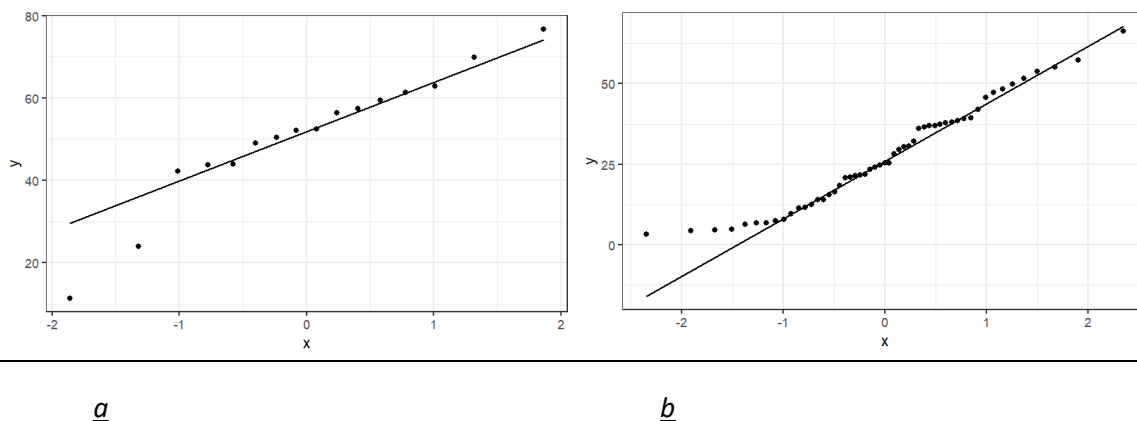
Tableau XX: paramètres descriptifs de la mesure des protéines totales chez l'ensemble des individus, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.



*Figure 42: boxplot des résultats de la mesure des protéines totales au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.*

La moyenne du taux sérique des protéines totales obtenue chez les individus malades (50,83 g/L) est supérieure par rapport à celle du groupe témoin (27,39 g/L) d'après le Tableau XX et la Figure 42. L'un des individus malades est à l'origine de la mesure la plus élevée.

La p-value du test de Shapiro-wilk (**0,07**) ne permet pas de rejeter la distribution normale. Des graphiques QQplot sont réalisés dans chaque groupe et les coefficients de Skewness et Kurtosis sont calculés.



*Figure 43: graphiques QQplot des protéines totales dans le groupe de malades (43.a) et dans le groupe témoin (43.b).*

Graphiquement, les mesures de protéines totales semblent en effet suivre une loi normale dans chaque groupe d'après la Figure 43. Cela est confirmé par le calcul des coefficients de Skewness et Kurtosis qui sont respectivement de **0,195** et **-0,99**, donc compris entre -2 et 2. La normalité étant confirmée dans chacun des groupes, un test paramétrique est utilisé pour déterminer si les moyennes sont significativement différentes.

La p-value du test d'homogénéité des variances est supérieur à 0.05 (**0,94**). Les variances de la mesure des protéines totales sont donc considérées comme égales dans les deux groupes.

Un test de Student standard est donc finalement utilisé. La p-value du test est de **3,24<sup>e-06</sup>** ; comme elle est inférieure à 0.05 cela signifie que les moyennes concernant le dosage des protéines totales sont significativement différentes entre le groupe témoin et le groupe des individus malades.

#### b) Courbe ROC

Le graphique descriptif des résultats combinés du dosage des protéines totales et de l'analyse histologique est représenté à la Figure 44. La courbe ROC obtenue à partir des résultats du dosage des protéines totales, avec l'analyse histologique comme *gold standard*, est présentée à la Figure 45.

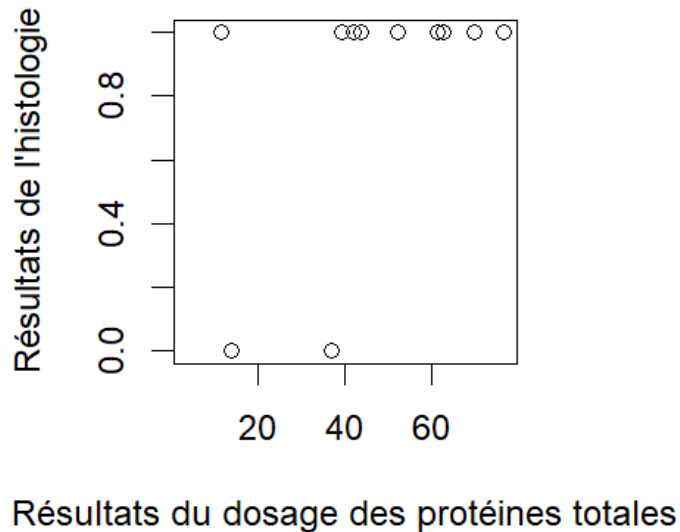


Figure 44: graphique descriptif des résultats du dosage des protéines totales en fonction des résultats de l'analyse histologique.

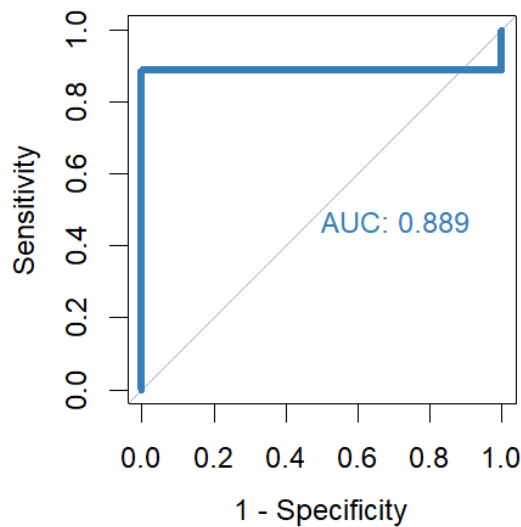


Figure 45: courbe ROC des résultats du dosage des protéines totales avec l'analyse histologique comme gold standard.

L'analyse de la courbe ROC permet de mettre en évidence le seuil de 38,19 g/L pour lequel l'indice de Youden est maximisé. Avec ce seuil, la sensibilité du dosage des protéines totales est de 88,9%, et la spécificité est de 100%. Le seuil de 23,43 g/L permet d'obtenir la même sensibilité, mais avec une spécificité moindre, de 50%.

#### E. Résumé de la partie descriptive des tests quantitatifs

La comparaison des moyennes obtenues aux différents tests quantitatifs montre que les individus du groupe « malade » présentent des concentrations sériques significativement plus

élevées en galactomannane, en  $\beta$ -D-glucan, en 3- $\beta$ -hydroxybutyrate, en albumine, en  $\alpha$ 2-globulines et en protéines totales. La mesure du rapport A/G est significativement moins élevée parmi les individus du groupe « malade ».

L'établissement et l'analyse d'une courbe ROC pour chacun de ces tests permet d'obtenir différents seuils, considérés comme optimaux car ils maximisent l'indice de Youden ou l'indice de vraisemblance associés à la courbe ROC. La sensibilité et la spécificité obtenues à partir de ces seuils au sein de la cohorte sont résumées dans le Tableau XXI. L'étude des seuils utilisés par les fabricants du test Fungitell™, qui s'avèrent discriminants pour notre cohorte, est également résumée dans le tableau.

Test quantitatif	Seuil obtenu pour la cohorte	Sensibilité au sein de la cohorte	Spécificité au sein de la cohorte
Dosage sérique du galactomannane (Platelia™)	2,43 <sup>(1)</sup>	66,7%	50%
	0,18 <sup>(1)</sup>	33,3%	100%
Dosage sérique du $\beta$ -D-glucane (Fungitell™)	60 pg/mL <sup>(2)</sup>	100%	41%
	80 pg/mL <sup>(2)</sup>	100%	46%
	290,2 pg/mL <sup>(1)</sup>	83,3%	100%
Dosage sérique du 3-hydroxybutyrate	0,39 mmol/L <sup>(1)</sup>	100%	50%
	0,597 mmol/L <sup>(1)</sup>	71,8%	100%
Dosage sérique des $\alpha$ 2-globulines	7,4 g/L <sup>(1)</sup>	87,5%	50%
	12,4 g/L <sup>(1)</sup>	87,5%	100%
Mesure du rapport A/G	0,245 <sup>(1)</sup>	50%	100%
	0,375 <sup>(1)</sup>	50%	50%
Dosage sérique des protéines totales	38,19 g/L <sup>(1)</sup>	88,9%	100%
	23,43 g/L <sup>(1)</sup>	88,9%	50%

Tableau XXI: tableau synthétique des sensibilités et spécificités obtenues lors de l'analyse univariée des différents tests diagnostics quantitatifs. L'origine des seuils est soit l'analyse de la courbe ROC établie dans cette étude (1), soit le seuil préconisé par les fabricants du test (2).

F. Description des tests qualitatifs

1. Description des résultats de la culture fongique

Chaque prélèvement effectué à partir des lésions évocatrices d'aspergillose est ensemencé dans une boîte de Pétri pour la culture fongique. Au total, 12 cultures ont été réalisées, et 10 d'entre elles sont positives à *Aspergillus* spp.

Le Tableau XXII présente les résultats sous forme d'un tableau de contingence.

Résultats de la culture fongique	Statut de santé des animaux		Total colonnes
	Malades	Témoins	
0	0	2	2
1	8	2	10
<b>Total lignes</b>	8	4	12

*Tableau XXII: table de contingence des résultats obtenus à la culture fongique.*

La p-value du test de Fisher mené à partir de cette table de contingence est égale à **0,09** ; elle est supérieure à 0,05, donc l'hypothèse H0 est acceptée. Ainsi, les résultats de la culture fongique sont indépendants du statut de santé des animaux au sein de la cohorte d'étude.

La sensibilité obtenue à la culture fongique est de 100%, et la spécificité est de 50%

2. Description des résultats de l'analyse histologique

Les prélèvements sont effectués, comme ceux destinés à la culture fongique, à partir des lésions évocatrices d'aspergillose. Ainsi, 12 prélèvements ont été réalisés, et 10 d'entre eux sont positifs à *Aspergillus* spp.

Le Tableau XXIII présente les résultats sous forme d'un tableau de contingence.

Résultats de l'histologie	Statut de santé des animaux		Total colonnes
	Malades	Témoins	
0	0	3	3
1	8	1	9
<b>Total lignes</b>	8	4	12

*Tableau XXIII: table de contingence des résultats obtenus à l'analyse histologique.*

La p-value du test de Fisher appliquée à cette table de contingence est égale à **0,02** ; elle est inférieure à 0,05. L'hypothèse H0 est donc rejetée. Ainsi, les résultats de l'analyse histologique ne sont pas indépendants du statut de santé des animaux ; les animaux du groupe témoin présentent plus de résultats négatifs que les animaux malades.

La sensibilité obtenue à l'analyse histologique au sein de notre cohorte est de 100%, et la spécificité est de 75%.

3. Description des résultats de la détection de la mannoprotéine

a) Tables de contingence et test de Fisher

La table de contingence des résultats obtenus au test qualitatif de l'Asp-LFD est présentée au Tableau XXIV.

Résultats au test de l'Asp-LFD	Statut de santé des animaux		Total colonnes
	Malades	Témoins	
0	8	31	39
1	1	2	3
2	1	0	1
3	1	0	1
<b>Total lignes</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>44</b>

*Tableau XXIV: table de contingence des résultats obtenus au test de l'Asp-LFD.*

Pour le premier cas envisagé, un résultat est considéré comme négatif seulement lorsque le score est égal à « 0 ». Cette hypothèse induit une nouvelle table de contingence représentée dans le Tableau XXV.

Résultats au test de l'Asp-LFD	Statut de santé des animaux		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	8	31	39
Positif	3	2	5
<b>Total lignes</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>44</b>

*Tableau XXV: table de contingence des résultats au test de l'Asp-LFD lorsqu'un résultat « 0 » est considéré comme négatif.*

Le test de Fisher appliqué à cette première situation renvoie une p-value de **0,09**. Cette p-value étant supérieure à 0,05, l'hypothèse H0 selon laquelle les résultats au test sont indépendants entre les groupes est acceptée. Cela signifie qu'il n'existe pas de lien significatif entre l'état de santé et le résultat de l'Asp-LFD lorsque le test est considéré comme négatif en l'absence de trait.

Dans la deuxième situation envisagée, un résultat est négatif s'il présente un score de « 0 » ou « 1 » ; la nouvelle table de contingence est présentée dans le Tableau XXVI.

Résultats au test de l'Asp-LFD	Statut de santé des animaux		Total colonnes
	Malades	Témoins	
Négatif	9	33	42
Positif	2	0	2
<b>Total lignes</b>	<b>11</b>	<b>33</b>	<b>44</b>

*Tableau XXVI: table de contingence des résultats au test de l'Asp-LFD lorsque les résultats « 0 » et « 1 » sont considérés comme négatifs.*

Dans cette situation, la **p-value** obtenue au test de Fisher est de **0,058**. A l'instar de la situation précédent, l'hypothèse H0 est acceptée ; les animaux malades ne présentent statistiquement pas plus de chances d'obtenir un test positif.

b) Calcul des sensibilités et spécificités

En ce qui concerne la sensibilité, elle est de 27% dans la première situation (le test est considéré comme négatif lorsque le score est de 0) et de 18% dans la deuxième situation (le test est considéré comme négatif lorsque le score est de 0 ou 1). La spécificité est bien meilleure ; elle est respectivement de 94% et de 100% dans les deux situations. Cela signifie que le test n'indique pas de résultats positifs parmi les animaux témoins de notre cohorte dans la deuxième situation.

G. Résumé de la partie descriptive des tests qualitatifs

D'après les tests de Fisher menés sur les tables de contingence des tests qualitatifs, la culture fongique et l'Asp-LFD ne sont pas des tests discriminants au sein de notre cohorte ; en effet, les résultats sont indépendants du statut de santé des individus. En revanche, les échantillons provenant d'animaux atteints d'aspergillose ont plus de chances de présenter un résultat positif à l'analyse histologique.

Les sensibilités et spécificités calculées pour chacun des tests qualitatifs appliqués à notre cohorte sont résumées dans le Tableau XXVII.

Test qualitatif	Sensibilité au sein de la cohorte	Spécificité au sein de la cohorte
<b>Culture fongique</b>	100%	50%
<b>Analyse histologique</b>	100%	75%
<b>Asp-LFD (résultat négatif en l'absence de trait)</b>	27%	94%
<b>Asp-LFD (résultat négatif en l'absence de trait ou en présence d'un trait de faible intensité)</b>	18%	100%

*Tableau XXVII: tableau synthétique des calculs de sensibilités et spécificités obtenues à partir des tests qualitatifs appliqués à la cohorte d'étude.*

H. Comparaison des tests quantitatifs

Lors de la comparaison des tests quantitatifs, aucune relation de corrélation forte entre les tests n'a été mise en évidence au sein de notre cohorte. Tous les graphiques et les coefficients de Spearman associés sont disponibles à l'Annexe 10.

I. Comparaison des tests qualitatifs

Afin de comparer le test de l'Asp-LFD et la culture fongique, une table de contingence est réalisée et résumée dans le Tableau XXVIII. La même table est obtenue dans le cas où le test Asp-LFD est négatif si le score est égal à 0 et dans le cas où il est négatif si le score est égal à 0 ou 1.

Résultats au test de l'Asp-LFD	Résultat de la culture fongique		Total colonnes
	Positif	Négatif	
Négatif	0	2	2
Positif	3	0	3
Total lignes	3	2	5

Tableau XXVIII: table de contingence des résultats de la culture fongique et du test de l'Asp-LFD.

La p-value obtenue au test de Fisher est de **0.1**. Cette p-value est supérieure à 0.05, ce qui signifie qu'il n'est pas possible de rejeter l'hypothèse H0 selon laquelle les résultats des tests sont indépendants entre eux.

J. Combinaison des tests diagnostiques

1. Détermination des seuils utilisés pour chacun des tests

Les seuils utilisés pour chaque test afin de décider du résultat « positif » ou « négatif » sont ceux qui permettent d'obtenir la meilleure sensibilité d'après l'analyse descriptive menée en amont. Ainsi, il s'agit pour le test Fungitell™ du seuil de 290,2 pg/mL, de 2,43 pour le test Platelia™, de 12,4 g/L pour le dosage des  $\alpha$ 2-globulines, et de 38,19 g/L pour le dosage des protéines totales. Pour le test Asp-LFD, le résultat est négatif en l'absence de trait. Pour le dosage du 3-hydroxybutyrate, les deux seuils sont utilisés. En effet, la sensibilité obtenue à partir du seuil de 0,39 mmol/L est parfaite, cependant la spécificité est médiocre. Le seuil de 0,597 mmol/L est donc également utilisé dans l'étude de la combinaison.

La culture fongique et l'analyse histologique ne sont pas incluses dans cette partie car ce sont des examens permettant de diagnostiquer l'aspergillose aviaire post-mortem, or ici l'objectif est de déterminer la meilleure combinaison pour le diagnostic de la maladie du vivant du patient.

2. Tableau synthétique des combinaisons des différents tests diagnostiques

Le Tableau XXIX résume l'ensemble des données concernant le calcul des sensibilités et spécificités obtenues lors de la combinaison en série et en parallèle des différents tests diagnostiques.

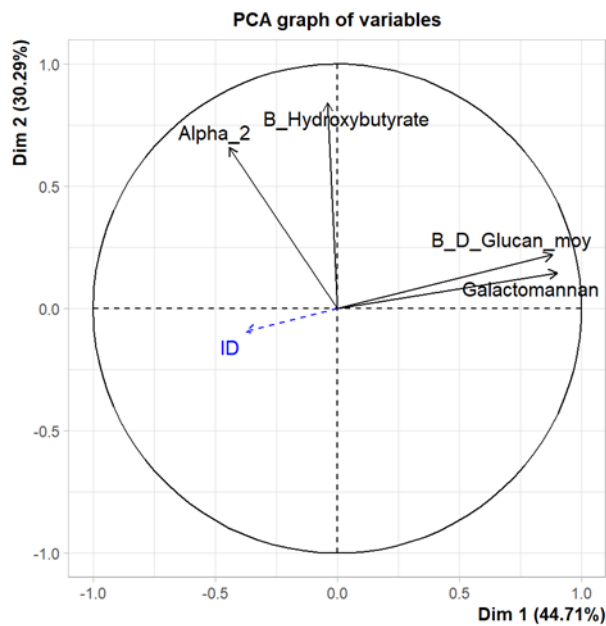


Type de combinaison	En série		En parallèle	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
Platelia™ x Fungitell™ (n = 27)	55,6%	100%	94,4%	50%
Fungitell™ x dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,39 mmol/L) (n = 48)	83,3%	100%	100%	100%
Fungitell™ x dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,597 mmol/L) (n = 48)	60%	100%	95,3%	100%
Fungitell™ x Asp-LFD (n = 31)	22,5%	100%	87,8%	94%
Platelia™ x Asp-LFD (n = 21)	18%	97%	75,7%	47%
Platelia™ x dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,39 mmol/L) (n = 33)	66,7%	75%	100%	50%
Platelia™ x dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,597 mmol/L) (n = 33)	47,9%	100%	90,6%	50%
Dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,39 mmol/L) x Asp-LFD (n = 44)	27%	97%	100%	94%
Dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,597 mmol/L) x Asp-LFD (n = 44)	19,4%	100%	79%	94%
Dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,39 mmol/L) x dosage des protéines totales (n = 66)	88,9%	100%	100%	100%
Dosage du 3-hydroxybutyrate (seuil : 0,597 mmol/L) x dosage des protéines totales (n = 66)	63,8%	100%	96,9%	100%
Dosage des protéines totales x Asp-LFD (n = 44)	24%	100%	91,9%	94%
Dosage des protéines totales x Platelia™ (n = 33)	59,3%	100%	96,3%	50%
Dosage des protéines totales x Fungitell™ (n = 33)	74%	100%	98,1%	100%

*Tableau XXIX: synthèse des spécificités et sensibilités obtenues lors de la combinaison en parallèle et en série des tests diagnostics.*

## K. Analyse multivariée

L'ACP permet de mettre en évidence une corrélation négative en le dosage du 3-hydroxybutyrate et le dosage des  $\alpha$ 2-globulines d'une part, et entre la détection du galactomannane et le dosage du  $\beta$ -D-glucane d'autre part. Ces corrélations sont illustrées sur le graphique de corrélation des variables présenté à la Figure 46. En effet, les variables 3-hydroxybutyrate et  $\alpha$ 2-globulines sont situées dans un même quadrant ; il en est de même pour les variables galactomannane et  $\beta$ -D-glucane.



*Figure 46: graphique de corrélation des variables obtenu par l'ACP des quatre variables suivantes : détection du galactomannane, dosage du  $\beta$ -D-glucane, dosage du 3-hydroxybutyrate et dosage des  $\alpha$ 2-globulines*

De plus, il semblerait que les variables  $\beta$ -D-glucane et galactomannane sont corrélées négativement à la variable  $\alpha$ 2-globulines. Cela signifie que lorsque la concentration sérique en  $\beta$ -D-glucane et que la détection du galactomannane augmentent, le taux sérique en  $\alpha$ 2-globulines a tendance à diminuer.

## VII. Discussion

### A. Discussion autour de la constitution de la base de données

L'objectif initial de l'étude est de s'intéresser à plusieurs outils diagnostiques utilisés dans le cadre de l'aspergillose parmi plusieurs taxons aviaires. La qualité de l'anamnèse et du suivi clinique des patients recrutés diffèrent selon l'origine de l'oiseau (provenant de parcs zoologiques, de particuliers ou du CVFSE).

Les taxons choisis initialement sont les oiseaux aquatiques, les perroquets et les rapaces. Cependant, dans les cas recrutés, qu'ils soient témoins ou atteints d'aspergillose, le taxon des oiseaux aquatiques est sur-représenté.

L'origine de cette sur-représentation est probablement multi-factorielle. Certaines espèces d'oiseaux semblent plus sensibles à l'aspergillose (*Hauck, Cray, França 2020*). Parmi les espèces évoquées par les auteurs sont cités les manchots, ainsi que les groupes des perroquets et des rapaces, c'est-à-dire les espèces ciblées pour notre étude. Le fait que les oiseaux aquatiques soient majoritaires dans la base de données initiale peut être donc être lié à leur sur-représentation dans les structures qui ont participé à l'élaboration de la base de données, et en particulier les parcs zoologiques et le CVFSE qui ont été les contributeurs majoritaires.

Ceci nous a conduit à mener notre étude exclusivement sur les oiseaux marins, afin de pouvoir réaliser les tests statistiques sur un échantillon de patients suffisamment important, tout en travaillant au sein d'un même taxon afin de limiter les biais liés aux variations physiologiques inter-espèces.

### B. Discussion autour des échantillons de sang

#### 1. Concernant la quantité prélevée

Pour chaque échantillon sanguin inclus dans la base de données, tous les tests diagnostiques n'ont pas pu être réalisés car la quantité de sang prélevée n'est pas suffisante chez tous les individus.

#### 2. Concernant la conservation des échantillons

Les échantillons de sang qui sont utilisés dans notre étude ont été congelés après la prise de sang. En effet, pour des raisons techniques, certaines analyses sont réalisées plusieurs semaines voire plusieurs mois après le recueil du prélèvement.

Cette conservation au froid pourrait induire des diminutions dans la concentration en métabolites au sein des échantillons. Cet aspect est validé dans une étude portant sur le galactomannane. Cette étude met en évidence le fait que l'index du galactomannane diminue dans les échantillons de sérum des individus témoins conservés au froid (qu'il soit positif ou négatif) pendant plusieurs mois. Cette diminution est moins significative concernant les prélèvements plasmatiques, et absente lors de ré-analyse des échantillons de sérum des individus malades (*Kimpton, White, Barnes 2014*).

### 3. Concernant la manipulation des échantillons

Pour des raisons pratiques, lors de la réception, une première décongélation permet le dosage des protéines totales, du 3-hydroxybutyrate et la réalisation de l'électrophorèse des protéines sériques. Après ces premières analyses, des aliquots sont préparés à partir des prélèvements de sérum restants pour réaliser dans un second temps le dosage du  $\beta$ -D-glucane, la détection du galactomannane et de la mannoprotéine. Cette première étape permet le transport au froid positif et la manipulation des prélèvements de sérum lors de la réalisation des analyses sans compromettre la conservation de la totalité du prélèvement qui doit être conservé par la suite au froid négatif pour les analyses ultérieures.

Les aliquots sont réalisés sous PSM, dans de bonnes conditions d'asepsie, afin d'éviter la contamination des échantillons. Malgré ces précautions, le risque d'inoculer des agents pathogènes (notamment des spores d'*Aspergillus*) dans les prélèvements et/ou les aliquots n'est pas nul.

### 4. Concernant la qualité des échantillons

Certains prélèvements présentent une hémolyse élevée. Ces prélèvements ne sont pas éliminés de l'étude car ils concernent pour certains des individus du groupe des malades, or ce groupe présente un effectif relativement faible. Cependant, l'hémolyse interfère avec certains examens, comme par exemple la mesure du  $\beta$ -D-glucane. Dans le cadre de ce test, l'hémolyse peut induire des faux-positifs (*Pickering et al. 2005*). L'électrophorèse des protéines sériques peut également être modifiée, avec une augmentation des  $\gamma$ -globulines (*Melillo 2013*).

Les prélèvements présentant une lipémie marquée sont également conservés dans l'étude. La lipémie peut impacter elle aussi l'électrophorèse des protéines sériques. Dans ce cas, les modifications concernent la fraction des  $\beta$ -globulines et qui se caractérisent par un pic élevé (*Melillo 2013*).

Enfin, certains prélèvements présentent de la fibrine suite à la centrifugation, en conséquence les analyses ultérieures telles que la détection du galactomannane et de la mannoprotéine ne peuvent parfois pas être réalisées.

### C. Discussion autour de l'analyse du $\beta$ -D-glucane

La manipulation laboratoire pour la réalisation du test Fungitell™ est très délicate. Il est nécessaire d'être très précautionneux car il est facile de contaminer les prélèvements. Plusieurs individus témoins présentent des concentrations sériques en  $\beta$ -D-glucane élevées, ce qui nous amène à suspecter une contamination par l'environnement, l'alimentation des animaux, les soins potentiels effectués avant le prélèvement, la réalisation du prélèvement ou encore au cours de la manipulation.

## D. Discussion autour des résultats

### 1. Analyse descriptive des résultats quantitatifs

#### a) Le dosage du 3-hydroxybutyrate

Les animaux du groupe malade présentent des valeurs sériques du dosage du 3-hydroxybutyrate plus élevées que les animaux témoins. Ce résultat semble cohérent ; en effet, la concentration sérique en 3-hydroxybutyrate augmente dans des situations métaboliques particulières, généralement lors d'amaigrissement marqué et chronique. Or, les individus atteints d'aspergillose sont souvent diagnostiqués tardivement, ils présentent alors une diminution de leur score scorporel. Les vétérinaires des parcs zoologiques participant à l'étude rapportent également que l'amaigrissement est un signe clinique fréquemment observé sur les oiseaux atteints d'aspergillose dans leurs établissements. Il aurait été intéressant de déterminer la distribution des notes d'état corporel parmi les deux groupes (témoin et malade) afin de déterminer si au sein de notre cohorte cette note est corrélée à la concentration sérique en 3- $\beta$ -hydroxybutyrate. En effet, parmi les individus témoins, de nombreux oiseaux ont été pris en charge par le CVFSE, et ces oiseaux sont souvent eux aussi débilités, affectés par des maladies chroniques ou des traumatismes, responsables généralement d'un lent amaigrissement.

L'un des seuils déterminés à partir de l'étude de la courbe ROC établie avec l'analyse histologique comme *gold standard* permet de détecter tous les individus atteints d'aspergillose au sein de notre cohorte. Cependant, la spécificité associée à ce seuil de 0,39 mmol/L est faible. En effet, comme évoqué dans le paragraphe précédent, l'augmentation de la concentration sérique en 3- $\beta$ -hydroxybutyrate est peu spécifique de l'aspergillose aviaire, puisqu'elle est souvent liée à un amaigrissement de l'individu. Le seuil de 0,597 mmol/L présente un meilleur compromis avec une sensibilité certes imparfaite (77,8%) mais qui reste correcte, et une spécificité de 100%. Ainsi, au sein de notre cohorte, tous les oiseaux présentant une concentration sérique en 3- $\beta$ -hydroxybutyrate supérieure à 0,597 mmol/L sont atteints d'aspergillose.

#### b) L'électrophorèse des protéines sériques

Les résultats au sein de notre cohorte mettent en évidence une moyenne concernant la concentration sérique en  $\alpha$ 2-globulines significativement plus élevée chez les individus atteints d'aspergillose.

Ces résultats sont cohérents avec les données bibliographiques. L'électrophorèse des protéines sériques est reconnue comme étant un examen complémentaire fiable chez les oiseaux (*Roman et al. 2009*), cependant les variations des fractions protéiques ne sont pas spécifiques d'une maladie. Les  $\alpha$ 2-globulines représentent des protéines positives de l'inflammation, leur concentration sérique augmente donc en cas d'infection à *Aspergillus spp*, comme lors de toute autre situation inflammatoire. Cependant, malgré ce manque de spécificité du dosage de la fraction en  $\alpha$ 2-globulines par rapport à l'aspergillose aviaire, au sein de notre cohorte, le seuil de 12,4 g/L est associé à une spécificité forte (100%), en plus d'une sensibilité correcte (87,5%).

La mesure du rapport A/G au sein de notre cohorte est également en accord avec la bibliographie. En effet, la concentration sérique en globulines augmente en cas d'inflammation car parmi les globulines de nombreuses protéines positives de l'inflammation sont retrouvées

(immunoglobulines, céruléoplasmine, haptoglobine). Au contraire, l'albumine est une protéine négative de l'inflammation, ce qui signifie que sa concentration sérique diminue. La conjonction de ces deux phénomènes induit une diminution du rapport A/G. Or, au sein de notre cohorte, les individus malades présentent une mesure moyenne du rapport A/G significativement diminuée par rapport aux individus témoins.

#### c) La détection du galactomannane

Deux seuils sont utilisés pour le test Platelia™ en médecine humaine afin de déterminer si le résultat du patient est positif ou négatif. Il s'agit des seuils de 0,5 et 1. Au sein de la cohorte d'étude, ces deux valeurs ne sont pas des seuils de positivité acceptables puisque les résultats sont alors indépendants du statut de santé des individus.

Une étude bibliographique s'intéressant au test Platelia™ au sein d'une population de manchots (*Cabana et al. 2019*) met en évidence qu'avec un seuil de 2, la sensibilité est de 34,5% et la spécificité s'élève à 91,3%. Au sein de notre cohorte, de la même manière que pour les seuils de 0,5 et 1, ce seuil de 2 ne permet pas de discriminer les animaux malades des animaux sains. De plus, la sensibilité obtenue est moins élevée (14,3%) que celle retrouvée dans la bibliographie.

Les résultats obtenus au test Platelia™ chez les individus malades de notre cohorte doivent être considérés avec prudence. En effet, parmi les sept échantillons issus de patients du groupe des malades, cinq proviennent d'individus ayant reçu un traitement antifongique. Or, d'après les données bibliographiques, l'administration de molécules antifongiques peut altérer la circulation et donc la détection du galactomannane sérique (*Cabana et al. 2019*). Parmi ces cinq résultats, un seul est au-dessus du seuil de positivité obtenu à l'analyse de la courbe ROC du test Platelia™. Cependant, ce seuil est peu pertinent ; en effet, l'AUC de la courbe ROC associée n'est que de 0,5. Un AUC aussi faible rend compte d'un modèle aléatoire, c'est-à-dire non performant. La réalisation d'autres expériences concernant la détection du galactomannane, en particulier parmi des individus atteints d'aspergillose aviaire, permettrait probablement d'améliorer la performance du modèle.

#### d) Le dosage du $\beta$ -D-glucane

Pour chaque prélèvement analysé, deux dosages sont systématiquement réalisés ; en sortie d'analyseur, les résultats de chacun des deux dosages et leur moyenne sont présentés. En médecine humaine, la moyenne est utilisée pour l'interprétation du résultat ; c'est la méthode retenue pour cette étude. L'analyse est considérée comme ininterprétable et est répétée dans le cas où les deux dosages indiquent deux résultats incohérents (par exemple un résultat « positif » et un résultat « négatif », ou un résultat « négatif » et un résultat « douteux »). De plus, si les deux dosages indiquent deux résultats cohérents mais avec une différence importante en termes de concentration sérique, le test est répété également.

Cinquante-deux résultats au test Fungitell™ ont été inclus initialement au sein de l'étude. Cependant, quatre résultats ont été exclus par la suite ; il s'agit des échantillons provenant des individus PZP006, CVF056, BVL024 et CVF034. Ces quatre échantillons exclus présentent des

résultats incohérents entre les deux dosages, ainsi qu'une différence notable entre les deux concentrations sériques obtenues.

Au sein de la cohorte, la valeur moyenne obtenue au test Fungitell™ est significativement supérieure parmi les individus du groupe malade, ce qui est cohérent avec les données bibliographiques. Cependant, la valeur maximale parmi les résultats du dosage du  $\beta$ -D-glucane provient d'un oiseau du groupe témoin. Cela peut être causé par une infection par un autre agent comme par exemple *Candida* spp., *Fusarium* spp., *Trichosporon* spp., *Saccharomyces cerevisiae*. Cette valeur élevée chez un individu du groupe témoin peut aussi être liée à une contamination du prélèvement au cours de la phase pré-analytique ou lors de la réalisation du test Fungitell™.

La bibliographie fait état chez les oiseaux marins d'un seuil intéressant à 461 pg/mL (*Burco et al. 2012*). Les résultats au sein de notre cohorte ne concordent pas avec cette donnée bibliographique. En effet, une meilleure sensibilité (100%) est obtenue avec les seuils utilisés en médecine humaine, qui sont de 60 pg/mL et 80 pg/mL, cependant les spécificités sont alors inférieures à 50%. Le seuil de 290,2 pg/mL, déterminé grâce à l'étude de la courbe ROC, offre un meilleur compromis entre une bonne sensibilité et une spécificité correcte.

## 2. La détection de la mannoprotéine

### a) Analyse univariée

D'après les tests statistiques réalisés, les résultats au test de l'Asp-LFD ne permettent pas de discriminer les animaux atteints d'aspergillose des animaux témoins. Ce test est mené sur un effectif de quarante-quatre animaux, dont onze font partie du groupe des animaux malades. Parmi ces onze animaux, deux faisaient initialement partie du groupe des animaux suspects d'être atteints d'aspergillose ; au test de l'Asp-LFD, le score de ces deux individus est de 0. Les résultats de ces deux individus doivent donc être considérés avec précautions.

Les sensibilités obtenues au sein de la cohorte concernant ce test sont faibles, que l'on considère le score 1 comme un résultat positif ou négatif, cependant la spécificité est forte. Cela signifie que le test n'indique pas de résultats positifs parmi les animaux témoins de notre cohorte ; cependant, le test n'est pas très performant dans la détection des animaux malades. D'autres expériences doivent être menées afin de déterminer si la sensibilité peut être améliorée, cependant les résultats au sein de notre cohorte sont cohérentes avec les données bibliographiques limitées concernant l'utilisation du test Asp-LFD parmi les populations aviaires. En effet, une étude portant sur les manchots met en évidence une sensibilité de 33% à partir de l'analyse du plasma (*Mota et al. 2023*) ; cette sensibilité est améliorée lors de l'analyse en parallèle de prélèvements trachéaux par écouvillonnage. Compte tenu du délai de plusieurs mois entre la réception des premiers échantillons et la mise en œuvre du test de l'Asp-LFD lors de l'étude, la réalisation de ce type d'analyse sur écouvillonnages trachéaux n'aurait pas été pertinente

### b) La comparaison de la culture fongique et du test Asp-LFD

La réalisation du test de Fisher à partir de la table de contingence regroupant les résultats de la culture fongique et de l'Asp-LFD ne conclue pas à une corrélation entre les résultats des deux

tests. Cette conclusion est cohérente compte tenu du fait que le test de l'Asp-LFD ne s'est pas avéré concluant au sein de notre cohorte pour discriminer les individus témoins des patients malades.

### 3. La combinaison des tests

Les deux types de combinaison étudiés dans cette étude permettent d'atteindre des objectifs différents. La combinaison en série maximise la spécificité ; en effet, le résultat de la combinaison est positif seulement si les résultats des deux tests sont positifs, ce qui diminue le risque d'obtenir des faux positifs. Au contraire, la combinaison en parallèle augmente la sensibilité ; le fait de qualifier un animal de positif dès qu'un examen est positif permet de limiter les faux négatifs, c'est-à-dire des animaux effectivement malades qui présentent un résultat négatif.

Le défi concernant l'aspergillose aviaire est de traiter les patients dès le début de l'évolution de la maladie afin d'augmenter les chances de guérison. Pour cela, un diagnostic, qui plus est précoce, est nécessaire. Ainsi, il semble plus intéressant de maximiser la sensibilité des tests, plutôt que la spécificité. C'est la raison pour laquelle le seuil déterminant si un test quantitatif est « positif » ou « négatif » est fixé de manière à optimiser la sensibilité du test.

Au sein de notre cohorte, la meilleure sensibilité obtenue par les combinaisons de tests s'élève à 100%. Elle concerne quatre combinaisons de tests en parallèle. Un même test, peu spécifique du diagnostic de l'aspergillose aviaire, est retrouvé dans les quatre combinaisons, il s'agit du dosage sérique du 3-hydroxybutyrate avec le seuil de positivité de 0,39 mmol/L. Ce test est combiné avec des tests plus spécifiques de l'infection par *Aspergillus* spp : le dosage sérique du  $\beta$ -D-glucane (test Fungitell™), la détection du galactomannane (test Platelia™), et enfin la détection qualitative d'une mannoprotéine dans le sérum (test Asp-LFD). La dernière combinaison qui permet d'obtenir une sensibilité de 100% est celle du dosage sérique du 3-hydroxybutyrate et du dosage des protéines totales.

Les spécificités obtenues sont bonnes, exceptée celle obtenue à l'issue de la combinaison du dosage du 3-hydroxybutyrate et du test Platelia™ qui n'est que de 50%. La spécificité atteint même 100% dans le cas des combinaisons du dosage sérique du 3-hydroxybutyrate avec le dosage des protéines totales et avec le test Fungitell™.

Deux autres combinaisons en parallèle présentent de très bonnes performances. Il s'agit du dosage des protéines totales combiné au Fungitell™ et du dosage des protéines totales associé au test Asp-LFD. Cette dernière combinaison est particulièrement intéressante pour la pratique courante compte tenu de la facilité de la mise en œuvre des analyses et de leur coût relativement faible, ainsi que de la rapidité d'obtention des résultats.

### 4. Analyse multivariée

Le fait que les variables galactomannane et  $\beta$ -D-glucane soient corrélées positivement est cohérent. En effet, elles reflètent la présence dans les prélèvements sanguins de deux éléments libérés lors de la croissance fongique.



La corrélation positive entre les variables 3-hydroxybutyrate et  $\alpha$ 2-globulines ne reflète pas nécessairement un lien de causalité. Cependant, une situation d'inflammation (au cours de laquelle la concentration sérique en  $\alpha$ 2-globulines augmente) peut être tout à fait propice à une perte de poids, qui est généralement à l'origine d'une augmentation du taux sérique en 3-hydroxybutyrate.

Par ailleurs, la corrélation négative entre les variables galactomannane et  $\beta$ -D-glucane d'une part et la variable  $\alpha$ 2-globulines est difficilement interprétable.

La classification ascendante hiérarchique a pour objectif de mettre en évidence un profil homogène concernant les quatre variables parmi les individus d'une même classe. Les résultats de cette classification au sein de notre cohorte démontrent qu'il n'existe pas de profil homogène parmi les individus du groupe des malades, ni parmi les individus témoins.

#### E. Discussion autour des effectifs de la présente étude

Agrandir la base de données permettrait de ré-itérer les analyses statistiques déjà effectuées et de mettre éventuellement en évidence des résultats significatifs, autant dans la description de la distribution des résultats des tests que dans l'établissement des courbes ROC (en particulier celle de la détection du galactomannane) ou encore dans la comparaison entre les tests. Notamment, il serait intéressant de calculer la corrélation entre la culture fongique et l'Asp-LFD avec des effectifs plus importants.

L'analyse multivariée basée sur une analyse en composantes principales serait également plus pertinente avec un nombre d'échantillons plus important. Cette analyse multivariée est compliquée par le fait que toutes les analyses n'ont pas été réalisées sur la totalité des échantillons. Ainsi, l'effectif des patients concernés par l'ensemble des tests utilisés dans l'ACP est encore plus faible que le nombre de prélèvements initial.

#### F. Discussion autour des outils diagnostiques à choisir selon la forme clinique de l'aspergillose

En médecine humaine, l'aspergillose peut se manifester sous différentes formes parmi lesquelles nous pouvons citer l'aspergillose invasive et l'aspergillose pulmonaire chronique. Les outils diagnostiques utilisés sont différents selon la forme clinique suspectée. En cas de suspicion d'aspergillose pulmonaire chronique, la radiographie est le premier examen d'imagerie envisagé (*Denning et al. 2016*). Dans le cadre de l'aspergillose invasive, même s'il existe des images radiographiques typiques, le scanner présente l'intérêt d'évaluer l'extension de la maladie (*Warris et al. 2019*).

En termes d'examens sanguins, la recherche d'anticorps anti-*Aspergillus* est courante en cas de suspicion d'aspergillose pulmonaire chronique. Le taux sérique en anticorps est alors très élevé, et il permet en particulier une détection fiable des patients qui présentent une colonisation d'*Aspergillus* dans leurs poumons sous la forme d'un aspergillome, par rapport aux patients seulement infectés (*Denning et al. 2016*).

Si une aspergillose invasive est suspectée, en plus du titrage en anticorps anti-*Aspergillus* sériques, le recours à la détection des antigènes d'*Aspergillus* grâce aux tests Platelia™ et Fungitell™ présente un intérêt diagnostique (Cadena, Thompson, Patterson 2016).

Chez les oiseaux, les études concernant ces aspects sont moins développées. En matière d'examens d'imagerie, les critères de coût et de faisabilité sont les éléments importants dans la prise de décision. Cela conduit généralement à choisir la radiographie, bien que le scanner soit plus sensible. L'un des vétérinaires travaillant dans un parc zoologique duquel proviennent plusieurs prélèvements de l'étude a également indiqué que, bien qu'un animal soit atteint d'aspergillose, les lésions associées ne sont pas systématiquement visibles lors d'un examen tomодensitométrique.

Concernant les examens sérologiques, dans les cas où les anticorps sont faiblement détectés (individus immunodéprimés, affection aiguë), la détection des antigènes sera plus utile que la recherche des anticorps (Beernaert et al. 2010). Au contraire, lors d'affection chronique, les niveaux d'antigènes étant faibles, il sera préférable d'avoir recours à la détection des anticorps (Jones, Orosz 2000). Pour autant, des résultats négatifs aux tests sérologiques n'excluent pas l'aspergillose, et des résultats positifs ne sont diagnostiques que lorsqu'ils sont corroborés par d'autres preuves diagnostiques (Wellehan et al. 2016).

## Conclusion

Cette étude vise à identifier une combinaison de tests diagnostiques non invasifs pour l'aspergillose aviaire, en analysant la distribution des résultats obtenus avec différentes méthodes actuelles sur une population d'oiseaux.

Les oiseaux semblent plus sensibles à cette affection fongique de par leurs particularités anatomiques et métaboliques. Par ailleurs, leurs conditions de vie, moins aseptisées que les humains, les exposent plus fréquemment aux spores du champignon. L'affection entraîne le plus souvent des signes cliniques non spécifiques, et parfois une atteinte respiratoire qui devient cliniquement visible lorsque la maladie est déjà avancée. L'un des défis dans la prise en charge de l'aspergillose est la précocité du diagnostic. En effet, les lésions avancées sont difficiles à traiter avec des molécules antifongiques, ce qui conduit fréquemment au décès du patient au cours de la prise en charge.

La partie expérimentale de cette étude met en évidence des concentrations sériques moyennes en 3-hydroxybutyrate, en protéines totales, en  $\alpha$ 2-globulines, en galactomannane et en  $\beta$ -D-glucane significativement supérieures parmi les individus malades. Au contraire, le test rapide Asp-LFD ne semble pas être discriminant en ce qui concerne le statut de santé des individus. L'analyse histologique a été utilisée comme *gold standard* pour établir les courbes ROC, permettant ainsi de définir des seuils de positivité pour les dosages de  $\beta$ -D-glucane (test Fungitell™), la mesure de la densité optique du galactomannane (test Platelia™), les dosages de protéines totales, de 3-hydroxybutyrate, d' $\alpha$ 2-globulines, ainsi que le rapport albumine/globulines. Il est à noter que la courbe ROC du test Platelia™ présente une AUC de 0,5, indiquant un manque de fiabilité et suggérant un modèle aléatoire.

Les sensibilités et spécificités calculées pour chaque test rendent compte d'un manque de performance lorsque les tests sont envisagés individuellement. Cette lacune est cohérente avec ce qui est décrit dans la bibliographie. Des combinaisons en série et en parallèle sont donc réalisées afin d'améliorer ces caractéristiques. Les combinaisons en parallèle sont celles qui se révèlent les plus intéressantes compte tenu de l'objectif de l'étude qui est de détecter les patients atteints d'aspergillose aviaire, autrement dit d'éviter les faux négatifs. Deux combinaisons en particulier s'avèrent intéressantes car la spécificité et la sensibilité atteignent 100%. Il s'agit du dosage sérique des protéines totales et du 3-hydroxybutyrate d'une part, et le test Fungitell™ et le dosage sérique du 3-hydroxybutyrate d'autre part.

Pour aller plus loin dans cette étude il serait intéressant de mener une analyse multivariée avec un effectif plus important. Cela permettrait de mettre en évidence des liens entre l'ensemble des tests quantitatifs, plutôt que de les comparer deux à deux seulement.

# Annexes

## Annexe 1 : présentation de la base de données anonymisée et du dictionnaire de données associé

La base de données ne regroupe que les données utilisées lors de la présente étude ; de nombreux items sont supprimés par rapport à la base de données élaborée pour la thèse d'Université du Dr. Vétérinaire VIEU Sabrina.

Cette base de données est anonymisée concernant l'origine des patients dont sont issus les échantillons.

Deux abréviations sont utilisées :

- l'abréviation « SO » signifie « Sans Objet » ; l'oiseau n'est pas concerné par l'information.
- l'abréviation « DM » signifie « Donnée Manquante » ; l'oiseau est concerné par l'information mais celle-ci n'est pas récupérable.

Le contenu des cases concernées par ces abréviations est effacé pour l'analyse des données sur le logiciel R®.

Le dictionnaire des données associé est également simplifié pour ne regrouper que les items conservés dans la base de données.

	Code_Oniris	Nom_Animal	Structure	Espece	Taxon	Age_Precis	Age_estime	Sexe	Groupe	Date_prelev	Type_Prelev	Prospectif	rcScore_Corpo	Autopsie
1000	CVF003	23-1787	1	1	3 DM			2	0	2 04/10/2023	1	1	1	1
1001	CVF004	23-1792	1	2	3 DM			2	2	2 05/10/2023	1	1	3	1
1002	CVF005	FDB23-1798	1	3	1 DM			1	0	2 09/10/2023	1	1	2	1
1003	ROU001	V01	31	4	1	0,5		3	0	4 18/10/2023	1	1 DM		1
1004	ROU002	V02	31	4	1	0,5		3	0	4 18/10/2023	1	1 DM		1
1005	ROU003	V03	31	4	1	0,5		3	0	4 18/10/2023	1	1 DM		1
1006	CVF001	FDB23-1861	1	3	1 DM			1	0	4 25/10/2023	1	1	1	1
1007	ONI001	Jeannot	2	5	4	7		1	1	4 25/10/2023	2	1	1	1
1008	CVF002	FDB23-1905	1	3	1 DM			2	1	2 03/11/2023	1	1	1	1
1009	CVF006	GDT23-1911	1	6	1 DM			2	2	2 03/11/2023	1	1	2	1
1010	CVF007	FDB23-1920	1	3	1 DM			2	2	1 06/11/2023	1	1	1	1
1011	CVF008	FDB23-1925	1	3	1 DM			2	0	1 06/11/2023	1	1	2	0
1012	CVF009	FDB23-1927	1	3	1 DM			2	0	1 06/11/2023	1	1	1	0
1013	CVF010	FDB23-1928	1	3	1 DM			1	1	1 06/11/2023	1	1	1	1
1014	CVF011	FDB23-1929	1	3	1	24		1	1	1 06/11/2023	1	1	1	1
1015	CVF012	FDB23-1940	1	3	1 DM			2	0	1 07/11/2023	1	1	1	1
1016	CVF013	GDT23-1932	1	6	1 DM			2	0	1 07/11/2023	1	1	2	1
1017	CVF014	GDT23-1933	1	6	1 DM			2	1	1 07/11/2023	1	1	1	1
1018	CVF015	FDB23-1937	1	3	1 DM			2	1	1 07/11/2023	1	1	1	1
1019	CVF016	BV23-1931	1	30	3 DM			1	1	2 08/11/2023	1	1	4	1
1020	CVF017	FDB23-1944	1	3	1 DM			2	0	1 09/11/2023	1	1	3	0
1021	CVF018	FDB23-1928	1	3	1 DM			1	1	1 09/11/2023	1	1	1	1
1022	CVF019	FDB23-1926	1	3	1 DM			2	0	1 09/11/2023	1	1	2	0
1023	CVF020	FDB23-1921	1	3	1 DM			2	0	1 09/11/2023	1	1	2	0
1024	CVF021	FDB23-1964	1	3	1 DM			3	2	1 13/11/2023	1	1	1	1
1025	CVF022	FDB23-1942	1	3	1 DM			2	0	1 13/11/2023	1	1	2	0
1026	CVF023	GDT23-1932	1	6	1 DM			2	0	2 13/11/2023	1	1	2	1
1027	CVF024	FDB23-1970	1	3	1 DM			1	2	1 13/11/2023	1	1	1	1
1028	CVF025	FDB23-1940	1	3	1 DM			2	0	1 13/11/2023	1	1	1	1
1029	CVF026	GDT23-1989	1	6	1 DM			2	2	1 16/11/2023	1	1	1	1
1030	CVF027	GDT23-1990	1	6	1 DM			2	2	1 16/11/2023	1	1	2	1
1031	CVF028	GDT23-1991	1	6	1 DM			2	0	1 16/11/2023	1	1	2	0
1032	CVF029	PI23-1992	1	7	1 DM			2	1	1 16/11/2023	1	1	2	0
1033	CVF030	GDT23-1996	1	6	1 DM			2	2	1 16/11/2023	1	1	2	1
1034	CVF031	FDB23-1997	1	3	1 DM			2	0	1 16/11/2023	1	1	2	0
1035	CVF032	GDT23-1990	1	6	1 DM			2	2	1 17/11/2023	1	1 DM		1
1036	CVF033	FDB23-2018	1	3	1 DM			2	0	1 20/11/2023	1	1	3	0
1037	CVF034	PI23-1992	1	7	1 DM			2	1	1 21/11/2023	1	1 DM		1
1038	CVF035	FDB23-2021	1	3	1 DM			2	0	1 21/11/2023	1	1	3	0
1039	CVF036	PI23-2038	1	7	1 DM			2	0	1 27/11/2023	1	1	2	0
1040	CVF037	GDT23-1996	1	6	1 DM			2	2	4 07/12/2023	1	1	2	1
1041	CVF038	GDT24-0005	1	6	1 DM			2	0	1 02/01/2024	1	1	2	1
1042	CVF039	FDB24-0007	1	3	1 DM			2	0	1 03/01/2024	1	1	2	1
1043	CVF040	FDB24-0011	1	3	1 DM			2	0	1 04/01/2024	1	1	2	1
1044	CVF041	PT24-0012	1	11	1 DM			2	0	1 04/01/2024	1	1	2	0
1045	CVF042	FDB24-0018	1	3	1 DM			2	2	1 04/01/2024	1	1	1	1
1046	CVF043	GDT24-0077	1	6	1 DM			2	2	1 23/01/2024	1	1	1	1
1047	CVF044	GDT24-0083	1	6	1 DM			2	0	1 24/01/2024	1	1	2	1
1048	CVF045	GDT28-0086	1	6	1 DM			2	0	1 29/01/2024	1	1 DM		1
1049	CVF046	FDB23-1957	1	3	1 DM			2	1	2 10/11/2023	1	1	2	1
1050	CVF047	GDT24-0129	1	6	1 DM			2	0	1 07/02/2024	1	1	2	0
1051	CVF048	GDT24-0136	1	6	1 DM			2	0	1 09/02/2024	1	1	2	1
1052	CVF049	GDT24-0147	1	6	1 DM			2	0	1 13/02/2024	1	1	2	0
1053	CVF050	GDT24-0180	1	6	1 DM			2	2	1 20/02/2024	1	1	1	1
1054	AMI001	Kyra	22	9	2	20		2	2	1 18/03/2024	1	1 DM		0
1055	PZP001	Nina ZB8107	14	8	1	70		2	2	4 27/02/2024	2	1	1	1
1056	PZP002	Nayla ZC1064	14	8	1	34		1	2	3 09/02/2024	1	1 DM		0
1057	PZP003	Skipper ZB808	14	8	1	4		1	1	3 01/08/2022	1	0	2,5	0
1058	PZP004	Oreo ZB8075	14	8	1	6		3	1	3 27/09/2018	1	0	1	1
1059	PZP005	Johan ZB430	14	8	1	108		2	1	4 28/01/2021	1	0	1	1
1060	PZP006	Skipper ZB808	14	8	1	44		2	1	3 23/11/2021	1	0	2,5	0
1061	PZP007	Skipper ZB808	14	8	1	43		2	1	3 30/10/2021	1	0	2	0
1065	CVF051	GDT24-0403	1	6	1 DM			2	0	1 05/04/2024	1	1	2	0
1066	CVF052	GDT24-0440	1	6	1 DM			2	0	1 09/04/2024	1	1	1	1
1067	CVF053	FP24-0202	1	10	3 DM			2	2	2 11/04/2024	1	1	3	1
1068	CVF054	GDT24-0197	1	6	1 DM			2	0	1 26/02/2024	1	1	1	0
1069	CVF055	GDT24-0208	1	6	1 DM			2	0	1 01/03/2024	1	1 DM		0
1070	BVL001	MIG12-2924	17	12	2	270		2	1	1 03/01/2020	0	0 DM		1
1070	BVL002	QRD18-0414	17	13	1	23		2	1	1 08/08/2020	0	0 DM		0
1071	BVL003	QRD17-0276	17	13	1	6		1	1	1 02/03/2018	1	0 DM		0
1072	BVL004	QRD23-0842	17	14	1	10		1	2	2 17/04/2024	0	1 DM		1
1073	BVL005	14534457	17	15	3	222		2	1	1 17/10/2022	1	0 DM		0
1074	BVL006	QRD23-0827	17	15	3	5		1	1	1 25/09/2023	0	1 DM		0
1075	BVL007	QRD22-0753	17	16	3	2		3	2	1 13/06/2022	0	0 DM		0
1076	BVL008	14533916	17	17	3	191		2	1	1 04/06/2018	1	0 DM		0
1077	BVL009	14534338	17	17	3	196		2	1	1 20/10/2020	0	0 DM		0
1078	BVL010	QRD20-0627	17	18	2	34		3	1	4 23/03/2023	0	0	1,5	1
1079	BVL011	QRD23-0893	17	19	1	7		3	1	1 26/12/2023	0	0 DM		0
1080	BVL012	14533052	17	20	3	329		2	1	1 16/06/2023	0	0 DM		0
1081	BVL013	QRD20-0608	17	21	2	47		2	1	1 11/04/2024	0	1 DM		0
1082	BVL014	QRD13-0244	17	22	3	126		2	1	1 14/11/2023	0	0	3	0
1083	BVL015	10245950	17	23	3	387		2	1	1 20/04/2022	0	0	3	0
1084	BVL016	MIG12-2819	17	23	3	336		2	1	4 28/01/2020	0	0	2	1
1085	BVL017	26730103	17	24	3	210		2	2	1 09/08/2022	1	0 DM		0
1086	BVL018	15226273	17	8	1	210		2	2	1 24/09/2022	0	0 DM		1
1087	BVL019	MIG12-1689	17	8	1	240		2	2	4 22/04/2024	1	1 DM		1
1088	BVL020	QRD19-0528	17	8	1	40		2	1	4 06/01/2023	0	0	1,5	1
1089	BVL021	QRD21-0659	17	8	1	24		1	2	4 03/01/2023	0	0 DM		1
1090	BVL022	QRD21-0659	17	8	1	25		1	2	4 03/01/2023	0	0	0	1
1091	BVL023	18094146	17	8	1	224		2	1	4 26/01/2024	1	0	0	0
1092	BVL024	18806232	17	8	1	211		2	2	4 15/12/2023	0	0	0	1
1093	BVL025	18806225	17	8	1	217		2	1	4 19/05/2024	1	0	0	1
1094	BVL026	QRD17-0297	17	25	2	78		2	1	1 11/04/2024	0	1 DM		0
1095	BVL027	QRD20-0585	17	25	2	52		2	1	1 11/04/2024	0	1 DM		0
1096	BVL028	CTB17-01362	17	26	3	77		2	1	1 14/11/2023	0	0	3	0
1097	BVL029	QRD14-0353	17	27	3	81		2	1	1 15/01/2021	0	0 DM		0
1098	BVL030	WBW14-000	17	28	2	315		2	1	1 25/06/2024	0	1 thin		0
1099	LGD001	INDIA (12594	26	29	2	96		2	2	3 06/08/2024	1	1 DM		0
1101	LGD002	PEPITA (1172	26	28	2	224		2	2	3 22/11/2023	1	1	1,5	0
1102	CVF056	GDT24-0403	1	6	1 DM					1 26/04/2024	1	1	2	1
1103	CVF057	BV24-1931	1	30	3 DM			1 DM		2 29/08/2024	1	1	3	0
1104	CVF058	24-1860	1	31	3 DM				2	4 16/09/2024	1	1	1	1

Code_Oniris	Date_Autops	Jour_Analyse	Ref_Gel	Hemolyse	Lipemie	Fibrine	Proteines_Tc	B_Hydroxybu	Pre_Albumin	Albumine	Alpha_1	Alpha_2	Alpha_total	
1000 CVF003	DM	04/04/2024	6.2		0	0	0 16.06	1,49	0,7	5,9	0,9	2,7	3,6	
1001 CVF004	DM	04/04/2024	6.3		2	0	0 25.75	0,42	0,5	9,3	2	6,6	8,6	
1002 CVF005	DM	07/02/2024	5.5		2	0	0 30.49	0,688	0,3	14,2	1,9	7	8,9	
1003 ROU001	SO	18/10/2023	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	
1004 ROU002	SO	18/10/2023	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	
1005 ROU003	SO	18/10/2023	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	
1006 CVF001	25/10/2023	07/02/2024	5.4		1	0	0 11.29	0,632	0,2	4,2	0,7	2,2	2,9	
1007 ONI001	25/10/2023	04/04/2024	6.4		1	0	0 27.98	0,43	0,3	4,8	3	4,5	7,5	
1008 CVF002	DM	07/02/2024	4.3		1	0	0 15.63	0,374	0,1	8	0,7	3,1	3,8	
1009 CVF006	03/11/2023	07/02/2024	5.3		0	0	0 53.8	1,724	0,2	11,8	0,8	29,2	30	
1010 CVF007	DM	07/02/2024	5.7		0	0	0 11.38	0,594	0,2	4,2	0,6	3,4	4	
1011 CVF008	SO	04/04/2024	6.5		2	0	0 29.53	0,48	0,3	11,5	0,8	9,2	10	
1012 CVF009	SO	28/05/2024	9.2		1	0	0 24.76	0,51	0,6	9,3	0,9	8,6	9,5	
1013 CVF010	09/11/2023	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	
1014 CVF011	06/11/2023	07/02/2024	4.5		0	0	0 11.56	0,389	0,2	5,1	0,6	2,9	3,5	
1015 CVF012	DM	16/05/2024	8.2		0	0	0 20.98	0,4	0,4	7,5	0,8	6,9	7,7	
1016 CVF013	DM	28/05/2024	9.4		3	0	0 42.02	0,5	0,3	8,4	1,5	23,6	25,1	
1017 CVF014	DM	28/05/2024	9.5		2	0	0 18.46	0,63	0,4	5,7	0,4	6,5	6,9	
1018 CVF015	DM	28/05/2024	9.6		0	0	0 3.37	0,25	0,6	0,8	0,2	0,4	0,6	
1019 CVF016	DM	28/05/2024	9.7		2	0	0 34.45	0,95	0,4	12	0,8	13,5	14,3	
1020 CVF017	SO	28/05/2024	9.3		1	0	0 32.25	0,71	0,1	8,4	1,3	13,6	14,9	
1021 CVF018	09/11/2023	07/02/2024	4.6		3	0	0 36.93	0,584	0,5	9,2	1,2	10,6	11,8	
1022 CVF019	SO	07/02/2024	4.7		0	0	0 25.35	0,515	0,3	9	1,1	7,8	8,9	
1023 CVF020	SO	21/08/2024	14.2		1	0	0 28.2	0,56	0,6	9	1,2	10,9	12,1	
1024 CVF021	14/11/2023	07/02/2024	4.4		0	1	0 13.94	0,349	0,2	3,7	1	4,2	5,2	
1025 CVF022	SO	21/08/2024	14.3		0	0	0 36.12	0,8	0,5	9,3	2,3	13,9	16,2	
1026 CVF023	DM	17/01/2024	1.2		3	0	0 36.42	0,775	0,2	5,1	0,5	17,9	18,4	
1027 CVF024	DM	17/01/2024	1.3		1	0	0 14.05	0,895	0,3	5,7	0,5	2,9	3,4	
1028 CVF025	DM	17/01/2024	1.4		0	0	0 20.9	0,323	0,3	5,9	1,3	7,1	8,4	
1029 CVF026	20/11/2023	17/01/2024	1.5		1	0	0 23.38	0,157	0,4	5,2	0,6	12,5	13,1	
1030 CVF027	20/11/2023	17/01/2024	1.6		1	0	0 45.66	0,197	0,2	10,7	1	24,6	25,6	
1031 CVF028	SO	17/01/2024	1.7		0	0	0 51.56	0,155	0,4	11,5	0,9	28,3	29,2	
1032 CVF029	SO	17/01/2024	2.2		1	0	0 21.43	0,442	0,3	7,7	0,5	5,5	6	
1033 CVF030	07/12/2023	07/02/2024	5.6		1	0	0 139.45	1,339	0,3	13,8	0,5	17,1	17,6	
1034 CVF031	SO	17/01/2024	2.3		1	0	0	38	0,311	0,5	14,9	2,1	10,6	12,7
1035 CVF032	20/11/2023	17/01/2024	2.4		1	1	0 39.25	0,519	0,2	9,6	0,7	20,9	21,6	
1036 CVF033	SO	17/01/2024	2.5		1	1	0 49.95	0,063	0,4	18	1,7	14,9	16,6	
1037 CVF034	SO	17/01/2024	2.6		0	1	0 12.4	0,756	0,2	3	0,3	2,3	2,6	
1038 CVF035	SO	17/01/2024	2.7		1	1	0 37.45	0,166	1	13,4	2	12,4	14,4	
1039 CVF036	SO	17/01/2024	3.2		0	0	0 21.72	0,391	0,4	8,1	0,5	6,6	7,1	
1040 CVF037	07/12/2023	07/02/2024	4.2		2	0	0 43.7	1,041	0,6	4,4	0,8	18,3	19,1	
1041 CVF038	06/01/2024	17/01/2024	3.3		3	0	0 66.19	0,331	0,3	14,7	0,9	23,5	24,4	
1042 CVF039	09/01/2024	17/01/2024	3.4		1	1	0 38.56	0,538	0,7	16	1,4	13,8	15,2	
1043 CVF040	DM	17/01/2024	3.5		0	0	0 19.76	0,391	0,3	4,1	0,5	2,4	2,9	
1044 CVF041	SO	17/01/2024	3.6		0	0	0 48.38	2,286	0,3	9,6	0,7	16	16,7	
1045 CVF042	DM	17/01/2024	3.7		0	0	0 6.88	0,159	0,4	3,4	0,2	1,7	1,9	
1046 CVF043	DM	26/08/2024	15.2		0	0	0 4.41	0,74	0,1	1,9	0,2	1,1	1,3	
1047 CVF044	DM	26/08/2024	15.3		1	0	0 16.41	0,38	0,4	5,6	1,1	3,9	5	
1048 CVF045	01/02/2024	26/08/2024	15.4		0	3	0 21.86	1,45	0,3	3,8	6,8	6,1	12,9	
1049 CVF046	10/11/2023	07/02/2024	5.2		0	0	0 25.38	0,882	0,3	10	1,5	7,7	9,2	
1050 CVF047	SO	28/08/2024	16.3		0	0	0 4.61	0,33	0,2	2,2	0,4	1,1	1,5	
1051 CVF048	01/03/2024	26/08/2024	15.5		5	0	0 30.7	0,14	0,2	1,6	0,7	1,5	2,2	
1052 CVF049	SO	16/05/2024	8.7		0	0	0 7.55	0,27	0,2	3,9	0,5	1,4	1,9	
1053 CVF050	01/03/2024	26/08/2024	15.6		0	0	0 7.83	0,35	0,2	3,4	0,5	2	2,5	
1054 AMI001	SO	04/04/2024	6.6		0	0	0 23.99	0,46	0,8	10,8	6,4	1,2	7,6	
1055 PZP001	27/02/2024	04/04/2024	6.7		3	0	0 76.8	0,61	0,5	6,4	1,4	18,9	20,3	
1056 PZP002	SO	04/04/2024	7.2		0	0	0 50.35	0,78	0,4	5,9	2,3	15,8	18,1	
1057 PZP003	SO	04/04/2024	7.3		1	0	0 23.93	0,11	0,5	3,7	5,8	8,8	14,6	
1058 PZP004	27/01/2019	04/04/2024	7.4		2	0	0 52.2	0,71	0,6	15,7	1,4	13,1	14,5	
1059 PZP005	28/01/2021	04/04/2024	7.5		5	0	0 69.98	0,67 SO	SO	SO	SO	SO	SO	
1060 PZP006	SO	04/04/2024	7.6		0	0	0 57.42	0,42	0,6	25,5	0,9	11,4	12,3	
1061 PZP007	SO	04/04/2024	7.7		0	0	0 59.48	0,43	0,7	15,8	1,9	14,3	16,2	
1065 CVF051	SO	26/08/2024	15.7		0	0	0 24.14	0,17	0,4	7	1	11,1	12,1	
1066 CVF052	12/04/2024	16/05/2024	8.3		0	0	0 6.39	0,41	0,3	3	0,2	1,7	1,9	
1067 CVF053	11/04/2024	16/05/2024	8.4		0	0	0	30	0,82	2,1	3,5	0,4	16,7	17,1
1068 CVF054	SO	16/05/2024	8.5		0	0	0 6.9	0,29	0,3	2,6	0,4	1,7	2,1	
1069 CVF055	SO	16/05/2024	8.6		0	0	0 4.85	0,48	0,2	2	0,3	1,4	1,7	
1070 BVL001	21/02/2024	04/07/2024	12.2		0	0	0 28.95	1,22	0,6	16,9 SO	SO	SO	5,8	
1070 BVL002	SO	21/08/2024	14.4		0	1	0 36.91	0,21	0,4	17,4	1,6	8,4	10	
1071 BVL003	SO	21/08/2024	14.5		1	0	0 37.88	0,29	0,4	17,8	2,3	8,2	10,5	
1072 BVL004	17/05/2024	21/08/2024	14.6		0	2	0 47.33	0,22	0,4	26,5	2,8	3,3	6,1	
1073 BVL005	SO	03/07/2024	10.2		1	0	0 28.81	1,03	1,1	10,7	1,6	8,5	10,1	
1074 BVL006	SO	03/07/2024	10.3		0	0	0 29.03	1,02	0,7	11,2	1,2	10,3	11,5	
1075 BVL007	SO	04/07/2024	13.2		0	0	0 22.44	0,55	0,3	9,1	1,2	5,5	6,7	
1076 BVL008	SO	04/07/2024	13.3		0	1	0 25.52	0,55	0,5	8,4	1,7	7,5	9,2	
1077 BVL009	SO	04/07/2024	13.4		0	0	0 38.52	0,82	0,5	15,7	1,8	12,3	14,1	
1078 BVL010	27/03/2023	04/07/2024	12.3		0	0	0 18.71	2,46	0,2	0,9 SO	SO	SO	4,1	
1079 BVL011	SO	21/08/2024	14.7		1	0	0 55.04	0,11	1,4	28,5	2,9	8,7	11,6	
1080 BVL012	SO	04/07/2024	12.6		0	0	0 29.83	0,56	0,4	11,6	2,7	6,7	9,4	
1081 BVL013	SO	04/07/2024	12.4		0	0	0	41	2,59	0,8	18,7 SO	SO	SO	9,6
1082 BVL014	SO	04/07/2024	13.7		0	0	0 29.77	0,77	1	12,5	0,9	8,1	9	
1083 BVL015	SO	03/07/2024	10.4		2	0	0 45.05	1,73 SO	SO	SO	SO	SO	SO	
1084 BVL016	02/02/2020	03/07/2024	10.5	DM	DM		1,23	0,5	0,9	5,6	6,4	4,8	11,2	
1085 BVL017	SO	03/07/2024	10.6		2	0	0 34.97	0,79	0,7	14,6	3	4,9	7,9	
1086 BVL018	02/11/2022	28/08/2024	16.2		1	0	0 57.38	0,47	1	15,8	0,8	11,5	12,3	
1087 BVL019	24/04/2024	03/07/2024	10.7		2	0	0 42.14	0,43	0,5	5,4	2,1	15,7	17,8	
1088 BVL020	10/01/2023	03/07/2024	11.2		0	0	0 62.86	0,53	0,6	7,1	0,8	18,1	18,9	
1089 BVL021	07/01/2023	03/07/2024	11.3		0	0	0 61.39	2,15	1,6	6,7	2,4	18,4	20,8	
1090 BVL022	09/01/2023	03/07/2024	11.4		0	0	0 52.4	1,23	0,6	7,3	1,8	14,2	16	
1091 BVL023	SO	03/07/2024	11.5		0	0	0 56.46	1,14	0,6	28,7	0,9	10	10,9	
1092 BVL024	21/12/2023	03/07/2024	11.6		0	0	0 49.05	1,34	0,4	11,2	1,2	10,3	11,5	
1093 BVL025	21/05/2024	03/07/2024	11.7		0	0	0 43.88	0,95	0,4	6,1	1,3	16,5	17,8	
1094 BVL026	SO	04/07/2024	12.5		0	0	0 29.52	1,06	0,8	18,2 SO	SO	SO	5,9	
1095 BVL027	SO	04/07/2024	12.6		0	0	0 31.58	1,85	0,6	18,5 SO	SO	SO	6,8	
1096 BVL028	SO	28/08/2024	16.7		2	0	0 38.25	0,15	1	12,7	0,7	7,5	8,2	
1097 BVL029	SO	04/07/2024	13											

	Code_Oniris	Beta	Gamma	Rapport_A	Galactoman	B_D_Glucan	B_D_Glucan	B_D_Glucan	Jour_Aspfld	Aspflfd	Jour_Culture	Culture_Real	Culture_Pos	Histologie_R
1000	CVF003	3,5	2,2	0,7	0,102	47,202	52,493	49,8475	17/06/2024		1 SO		0	0
1001	CVF004	3,5	4,1	0,61	0,139	42,016	44,019	43,0175	17/06/2024		0 SO		0	0
1002	CVF005	5,7	0,8	0,9	0,026	15,586	16,375	15,9805	17/06/2024		0 SO		0	0
1003	ROU001	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO		0 SO	0
1004	ROU002	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO		0 SO	0
1005	ROU003	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO		0 SO	0
1006	CVF001	3,6	0,1	0,64	4,221	632,072	794,891	713,4815	17/06/2024		3 30/10/2023		1	1
1007	ONI001	2	13,4	0,22	0,105	754,704	764,655	759,6795	17/06/2024		1 30/10/2023		1	1
1008	CVF002	3,9	0,2	1,08	0,081	101,794	111,034	106,414	17/06/2024		1 SO		0	0
1009	CVF006	10,8	1,2	0,3	0,041	15,497	21,317	18,407	17/06/2024		0 SO		0	0
1010	CVF007	2,3	0,4	0,63	0,282	13,446	17,188	15,317	17/06/2024		0 SO		0	0
1011	CVF008	3,8	4,5	0,67	0,261	31,43	40,393	35,9115	SO	SO			0	0
1012	CVF009	2,4	3,3	0,67	0,11	109,416	133,056	121,236	SO	SO			0	0
1013	CVF010	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO	14/11/2023		1	1
1014	CVF011	2,6	0,6	0,85	0,244	571,897	575,735	573,816	17/06/2024		1 SO		0	0
1015	CVF012	1,7	3,7	0,6	1,764	117,673	723,01	420,3415	17/06/2024		0 SO		0	0
1016	CVF013	6,8	1,5	0,26	1,013	608,254	783,961	696,1075	SO	SO			0	0
1017	CVF014	4,8	0,9	0,49	0,188	194,623	205,142	199,8825	17/06/2024		0 SO		0	0
1018	CVF015	0,6	0,1	0,71	0,09	34,69	61,681	48,1855	17/06/2024		0 SO		0	0
1019	CVF016	5	2,9	0,56	0,439	117,611	218,192	167,9015	17/06/2024		0 SO		0	0
1020	CVF017	3	5,6	0,36	0,104	17,296	57,073	37,1845	17/06/2024		0 SO		0	0
1021	CVF018	14	1,5	0,36	0,208	264,738	368,527	316,6325	17/06/2024		0 18/11/2023		1	1
1022	CVF019	6,3	0,4	0,58	0,299	158,893	189,054	173,9735	17/06/2024		0 SO		0	0
1023	CVF020	3,2	3,1	0,52	SO	276,97	313,937	295,4535	SO	SO			0	0
1024	CVF021	4,5	0,4	0,39	3,798	3,752	DM	DM	17/06/2024		0 16/11/2023		1	1
1025	CVF022	3,9	6,2	0,37	SO	329,61	345,799	337,7045	SO	SO			0	0
1026	CVF023	11,2	1,1	0,17	SO	33,806	65,056	49,431	SO	SO			0	0
1027	CVF024	1,9	2,6	0,75	0,393	254,187	419,029	336,608	SO	SO			0	0
1028	CVF025	1,8	4,7	0,42	0,199	7,975	34,275	21,125	17/06/2024		0 SO		0	0
1029	CVF026	3,7	0,6	0,3	0,049	20,089	61,411	40,75	17/06/2024		0 SO		0	0
1030	CVF027	7,1	2,4	0,31	0,099	15,174	39,697	27,4355	17/06/2024		0 SO		0	0
1031	CVF028	9,2	1,7	0,3	0,08	28,413	34	31,2065	17/06/2024		0 SO		0	0
1032	CVF029	2,7	4,4	0,6	0,09	24,022	33,963	28,9925	17/06/2024		0 SO		0	0
1033	CVF030	6,2	1	0,56	SO	53,21	68,933	61,0715	SO	SO	11/12/2023		1	1
1034	CVF031	4,2	5,8	0,68	0,071	21,281	54,659	37,97	SO	SO			0	0
1035	CVF032	6,2	1,4	0,33	0,046	14,718	20,976	17,847	SO	SO			0	0
1036	CVF033	10	5,1	0,58	SO	14,657	50,479	32,568	SO	SO			0	0
1037	CVF034	3,9	2,3	0,35	SO	5,913	98,481	52,197	17/06/2024		0 SO		0	0
1038	CVF035	3	5,3	0,6	SO	645,818	878,535	762,1765	SO	SO			0	0
1039	CVF036	3,2	3,2	0,64	0,113	32,416	53,67	43,043	SO	SO			0	0
1040	CVF037	15,4	4,6	0,13	0,15	143,75	179,676	161,713	SO	SO	11/12/2023		1	1
1041	CVF038	25,1	1,5	0,29	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1042	CVF039	2,7	4,4	0,76	0,226	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1043	CVF040	1,2	1,5	0,82	0,224	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1044	CVF041	17,1	4,2	0,26	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1045	CVF042	0,4	0,8	1,23	SO	SO	SO	SO	17/06/2024		0 SO		0	0
1046	CVF043	0,5	0,1	0,83	SO	89,476	90,978	90,227	06/09/2024		0 SO		0	0
1047	CVF044	4,6	0,4	0,58	SO	64,635	66,696	65,6655	06/09/2024		0 SO		0	0
1048	CVF045	4,6	0,3	0,23	SO	27,322	DM	DM	06/09/2024		0 SO		0	0
1049	CVF046	4,7	0,8	0,68	SO	SO	SO	SO	17/06/2024		0 SO		0	0
1050	CVF047	1	0,2	1,09	SO	50,582	142,799	96,6905	06/09/2024		0 SO		0	0
1051	CVF048	26,6	0,5	0,06	SO	SO	SO	SO	06/09/2024		0 SO		0	0
1052	CVF049	0,8	0,6	1,19	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1053	CVF050	1,7	0,2	0,9	SO	119,098	331,554	225,326	06/09/2024		0 SO		0	0
1054	AMI001	1,5	3,2	0,94	SO	SO	SO	SO	SO	SO	28/03/2024		1	1
1055	PZP001	10,1	39,7	0,1	SO	SO	SO	SO	SO	SO	28/03/2024		1	1
1056	PZP002	11,4	15,1	0,14	SO	512,899	555,609	534,254	SO	SO			0 SO	0
1057	PZP003	4,6	0,7	0,21	0,092	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1058	PZP004	11,3	10	0,45	0,125	198	369,421	283,7105	SO	SO			0	0
1059	PZP005	SO	SO	SO	1,054	SO	SO	SO	17/06/2024		2 29/01/2021		1	1
1060	PZP006	9,7	9,9	0,83	0,137	13,552	89,321	51,4365	17/06/2024		0 SO		0	0
1061	PZP007	10,2	17	0,38	0,13	83,012	322,03	202,521	17/06/2024		0 SO		0	0
1065	CVF051	3,5	0,9	0,44205496	SO	106,693	109,231	107,962	17/06/2024		0 SO		0	0
1066	CVF052	0,8	0,4	1,06796117	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1067	CVF053	5,9	1,5	0,2295082	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1068	CVF054	1,7	0,3	0,73	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	0
1069	CVF055	0,8	0,3	0,83	SO	SO	SO	SO	17/06/2024		0 SO		0	0
1070	BVL001	3,1	2,6	1,53	SO	32,484	44,616	38,55	06/09/2024		0 SO		0	0
1070	BVL002	7,8	1,3	1	SO	154,517	230,746	192,6315	06/09/2024		0 SO		0	0
1071	BVL003	7,8	1,5	0,92	SO	290,317	617,302	453,8095	06/09/2024		0 SO		0	0
1072	BVL004	12,4	1,5	1,32	SO	565,648	596,825	581,2365	06/09/2024		0 SO		0	0
1073	BVL005	2,1	5	SO	SO	35,046	43,555	39,3005	06/09/2024		0 SO		0	0
1074	BVL006	3,2	2,4	SO	SO	36,084	40,581	38,3325	06/09/2024		0 SO		0	0
1075	BVL007	3,8	2,2	0,7	SO	77,211	84,428	80,8195	06/09/2024		0 SO		0	0
1076	BVL008	4,1	3,8	0,5354994	SO	302,501	327,796	315,1485	06/09/2024		0 SO		0	0
1077	BVL009	5,7	3,1	0,72580645	SO	286,031	291,005	288,518	06/09/2024		0 SO		0	0
1078	BVL010	4,9	8,9	0,06	SO	168,852	171,024	169,938	06/09/2024		1 SO		0	1
1079	BVL011	10,2	3,2	1,19	SO	417,372	486,644	452,008	SO	SO			0	0
1080	BVL012	6,3	2,3	0,67	SO	58,828	134,278	96,553	06/09/2024		0 SO		0	0
1081	BVL013	6,8	5,1	0,91	SO	62,754	62,917	62,8355	06/09/2024		0 SO		0	0
1082	BVL014	5,5	2,1	0,83	SO	28,211	157,461	92,836	06/09/2024		0 SO		0	0
1083	BVL015	SO	SO	SO	SO	117,098	168,911	143,0045	06/09/2024		0 SO		0	0
1084	BVL016	3,7	1,6	SO	SO	SO	SO	SO	SO	SO			0	1
1085	BVL017	6	5,8	SO	SO	52,347	77,757	65,052	06/09/2024		0 SO		0	0
1086	BVL018	16,9	11,3	0,41399704	SO	337,112	709,398	523,255	06/09/2024		0 SO		0	0
1087	BVL019	7,5	10,8	SO	SO	SO	SO	SO	06/09/2024		1 DM		1	1
1088	BVL020	19,7	16,8	SO	SO	175,08	242,05	208,565	06/09/2024		0 SO		0	1
1089	BVL021	20,5	12,4	SO	SO	144,211	312,227	228,219	06/09/2024		0 DM		1	1
1090	BVL022	15,3	12,6	SO	SO	196,201	331,406	263,8035	06/09/2024		0 DM		1	1
1091	BVL023	9,2	7,6	SO	SO	113,76	158,114	135,937	06/09/2024		0 SO		0	0
1092	BVL024	14,3	11,6	SO	SO	5,088	159,296	82,192	06/09/2024		0 SO		0	0
1093	BVL025	8,1	11,6	SO	SO	SO	SO	SO	06/09/2024		0 DM		1	1
1094	BVL026	2,7	2,5	1,80608365	SO	43,2	48,27	45,735	06/09/2024		0 SO		0	0
1095	BVL027	3,7	2,3	1,53044872	SO	15,972	35,491	25,7315	06/09/2024		0 SO		0	0
1096	BVL028	11	5,1	0,55804481	SO	156,487	290,472	223,4795	06/09/2024		0 SO		0	0
1097	BVL029	4	1,8	0,5	SO	30,817	33,453	32,135	06/09/2024		0 SO		0	0
1098	BVL030	2,2	2,3	1,23	SO	93,063	142,172	117,6175	06/09/2024					



Code_Oniris	Histologie_Pr	Qualite_Rem	Cas_Fiable	Biais_Sabrina
1000 CVF003		0	5	0
1001 CVF004		0 DM	DM	DM
1002 CVF005		0	4	0
1003 ROU001	SO	DM	DM	DM
1004 ROU002	SO	DM	DM	DM
1005 ROU003	SO	DM	DM	DM
1006 CVF001		1	4	1
1007 ONI001		1	1	1
1008 CVF002		0	4	0
1009 CVF006		0 DM	DM	DM
1010 CVF007		0	4	0
1011 CVF008		0 DM	DM	DM
1012 CVF009		0 DM	DM	DM
1013 CVF010		0	4	1
1014 CVF011		0	4	0
1015 CVF012		0 DM	DM	DM
1016 CVF013		0 DM	DM	DM
1017 CVF014		0 DM	DM	DM
1018 CVF015		0 DM	DM	DM
1019 CVF016		0 DM	DM	DM
1020 CVF017		0 DM	DM	DM
1021 CVF018		0 DM	DM	DM
1022 CVF019		0 DM	DM	DM
1023 CVF020		0 DM	DM	DM
1024 CVF021		0	4	1
1025 CVF022		0 DM	DM	DM
1026 CVF023		0 DM	DM	DM
1027 CVF024		0 DM	DM	DM
1028 CVF025		0 DM	DM	DM
1029 CVF026		0 DM	DM	DM
1030 CVF027		0 DM	DM	DM
1031 CVF028		0 DM	DM	DM
1032 CVF029		0 DM	DM	DM
1033 CVF030		1	4	4
1034 CVF031		0 DM	DM	DM
1035 CVF032		0 DM	DM	DM
1036 CVF033		0 DM	DM	DM
1037 CVF034		0 DM	DM	DM
1038 CVF035		0 DM	DM	DM
1039 CVF036		0 DM	DM	DM
1040 CVF037		1	4	1
1041 CVF038		0 DM	DM	DM
1042 CVF039		0 DM	DM	DM
1043 CVF040		0 DM	DM	DM
1044 CVF041		0 DM	DM	DM
1045 CVF042		0 DM	DM	DM
1046 CVF043		0 DM	DM	DM
1047 CVF044		0 DM	DM	DM
1048 CVF045		0 DM	DM	DM
1049 CVF046		0	4	0
1050 CVF047		0 DM	DM	DM
1051 CVF048		0 DM	DM	DM
1052 CVF049		0 DM	DM	DM
1053 CVF050		0 DM	DM	DM
1054 AMI001		0 DM	DM	DM
1055 P2P001		1 DM	DM	DM
1056 P2P002	SO	DM	DM	DM
1057 P2P003		0 DM	DM	DM
1058 P2P004		0 DM	DM	DM
1059 P2P005		1 DM	DM	DM
1060 P2P006		0 DM	DM	DM
1061 P2P007		0 DM	DM	DM
1065 CVF051		0 DM	DM	DM
1066 CVF052		0 DM	DM	DM
1067 CVF053		0 DM	DM	DM
1068 CVF054		0 DM	DM	DM
1069 CVF055		0 DM	DM	DM
1070 BVL001		0 DM	DM	DM
1070 BVL002		0 DM	DM	DM
1071 BVL003		0 DM	DM	DM
1072 BVL004		0 DM	DM	DM
1073 BVL005		0 DM	DM	DM
1074 BVL006		0 DM	DM	DM
1075 BVL007		0 DM	DM	DM
1076 BVL008		0 DM	DM	DM
1077 BVL009		0 DM	DM	DM
1078 BVL010		1 DM	DM	DM
1079 BVL011		0 DM	DM	DM
1080 BVL012		0 DM	DM	DM
1081 BVL013		0 DM	DM	DM
1082 BVL014		0 DM	DM	DM
1083 BVL015		0 DM	DM	DM
1084 BVL016		1 DM	DM	DM
1085 BVL017		0 DM	DM	DM
1086 BVL018		0 DM	DM	DM
1087 BVL019		1 DM	DM	DM
1088 BVL020		1 DM	DM	DM
1089 BVL021		1 DM	DM	DM
1090 BVL022		1 DM	DM	DM
1091 BVL023		0 DM	DM	DM
1092 BVL024		0 DM	DM	DM
1093 BVL025		0 DM	DM	DM
1094 BVL026		0 DM	DM	DM
1095 BVL027		0 DM	DM	DM
1096 BVL028		0 DM	DM	DM
1097 BVL029		0 DM	DM	DM
1098 BVL030		0 DM	DM	DM
1099 LGD001		0 DM	DM	DM
1101 LGD002		0 DM	DM	DM
1102 CVF056		0 DM	DM	DM
1103 CVF057	SO	DM	DM	DM
1104 CVF058	SO	DM	DM	DM

***Base de données de l'étude***

Nom Variable	Signification	Codage pour R	Type	Unité/Modalité	Commentaires
Identification	Identifiant élevage anonymisé	Ident	Quantitatif	X modalités à partir de 1000	
Code Oniris	Code attribué à l'arrivée du sérum à Oniris pour l'identification des prélèvements	Code_Oniris	Qualitatif nominal	102 modalités à partir de : 3 première lettre structure + 3 chiffres	
Nom Animal Structure	Nom ou référence de l'animal dans la structure	Nom_Animal_Structure	Qualitatif nominal	102 modalités	<i>A retirer pour travail sur R</i>
Structure	Identifiant structure anonymisé	Structure	Qualitatif nominal	modalités 1 2 14 17 22 26 31	<i>Anonymisé</i>
Espèce	Nom scientifique de l'espèce de l'oiseau	Espece	Qualitatif nominal	31 modalités : 1 = Tyto alba 2 = Accipiter Nisus 3 = Morus bassanus 4 = Cairina moschata 5 = Gallus gallus domesticus 6 = Uria aalge 7 = Gavia immer 8 = Spheniscus humboldti 9 = Ara chloropterus 10 = Falco peregrinus 11 = Pingouin Torda 12 = Ara macao 13 = Sarkidiornis melanotos 14 = Chenonetta jubata 15 = Haliaeetus leucocephalus 16 = Gypaetus barbatus 17 = Milvus migrans 18 = Pionites melanocephalus 19 = Cygnus melancoryphus 20 = Buteo regalis 21 = Eolophus roseicapilla 22 = Strix nebulosa 23 = Gyps fulvus 24 = Gyps himalayensis 25 = Calyptorhynchus banksii 26 = Bubo scandiacus 27 = Haliaeetus pelagicus 28 = Psittacus erithacus erithacus 29 = Cacatua alba 30 = Buteo buteo 31 = Larus sp.	
Taxon	Taxon de l'animal	Taxon	Qualitatif ternaire	3 modalités : 1 = Oiseaux aquatiques 2 = Perroquets 3 = Rapaces	
Âge Précis	Age de l'animal au moment du prélèvement	Age_Precis	Quantitatif continu	Age en mois	
Age Estimé	Age estime de l'animale selon	Age_Estime	Qualitatif ternaire	3 modalités :	

	plumage et morphologie			1 = immature 2 = Adulte 3 = Juvénile	
<b>Sexe</b>	Sexe de l'oiseau	Sexe	Qualitatif ternaire	3 modalités : 2 = Femelle 1 = Mâle 0 = Ne sait pas	
<b>Groupe</b>	Répartition dans un groupe de l'étude	Groupe	Qualitatif nominal	4 modalités avec MENU DEROULANT 1 = Sains 2 = Traumatiques 3 = Aspergillose suspectée 4 = Aspergillose confirmée	
<b>Date prélèvement</b>	Date de prélèvement du sérum	Date_Prelevement	Date	JJ/MM/AAAA	
<b>Type de prélèvement</b>	Nature du prélèvement ajouté à l'étude	Type_Prelevement	Qualitatif ternaire	3 modalités : 0 = plasma 1 = sérum 2 = épanchement péricardique	
<b>Prospectif-retrospectif</b>	Renseignement si obtention du prélèvement rétrospectif à l'étude ou prospectif	Prospectif_retrospectif	Qualitatif binaire	2 modalités : 1 = prospectif 0 = rétrospectif	
<b>Score Corporel</b>	Score corporel de l'animale noté sur 5 (délivré par le vétérinaire lors de l'examen clinique)	Score_Corporel	Qualitatif binaire	5 modalités : 1=Cachectique 2=Maigre 3=Normal 4=Surpoids 5=Obésité	
<b>Autopsie</b>	Réalisation d'une autopsie	Autopsie	Qualitatif binaire	Présence : 1 = Oui 0 = Non	
<b>Date autopsie</b>	Date de la réalisation de l'autopsie	Date_Autopsie	Date	JJ/MM/AAAA	
<b>Jour analyse serum</b>	Jour de l'analyse du sérum	Jour_Analyse_Serum	Date	JJ/MM/AAAA	
<b>Référence du gel d'électrophorèse</b>	Référence du gel d'électrophorèse lors du stockage des résultats	Ref_Gel	Quantitatif continu	97 modalités	
<b>Hémolyse</b>	Présence d'une hémolyse et grade	Hemolyse	Qualitatif nominal	4 Modalités : 0 = Pas d'hémolyse 1 = 1 + d'hémolyse 2 = 2 + hémolyse 3 = 3 + d'hémolyse	
<b>Lipémie</b>	Présence d'une lipémie et grade	Lipemie	Qualitatif nominal	4 Modalités : 0 = Pas de lipémie 1 = 1 + lipémie 2 = 2 + lipémie 3 = 3 + lipémie	
<b>Fibrine</b>	Description de l'absence ou non de fibrine dans l'échantillon	Fibrine	Qualitatif binaire	Présence : 1 = Oui 0 = Non	

<b>Protéines totales expérience</b>	Concentration de protéines totales mesurées sur le daytona + dans le prélèvement dans le cadre de l'étude	Proteines_Totales_Experience	Quantitatif continu	En g/L	
<b>3-Hydroxybutyrate</b>	Concentration de 3-Hydroxybutyrate mesurées sur le daytona + dans le prélèvement dans le cadre de l'étude	B_Hydroxybutyrate	Quantitatif continu	En mmol/L	
<b>Pre-albumine</b>	Concentration mesurée dans le serum en pré-albumine dans le cadre de l'étude	Pre_Albumine_Experience	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Albumine</b>	Concentration mesurée dans le serum en albumine dans le cadre de l'étude	Albumine	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Alpha1</b>	Concentration mesurée dans le serum en $\alpha$ 1 globulines dans le cadre de l'étude	Alpha_1	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Alpha2</b>	Concentration mesurée dans le serum en $\alpha$ 2 globulines dans le cadre de l'étude	Alpha_2	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Alpha total</b>	Concentration mesurée dans le serum des deux types d' $\alpha$ -globulines dans le cadre de l'étude	Alpha_total	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Beta</b>	Concentration mesurée dans le serum en $\beta$ globulines dans le cadre de l'étude	Beta	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Gamma</b>	Concentration mesurée dans le serum en gamma-globulines dans le cadre de l'étude	Gamma	Quantitatif continu	En g/L	
<b>Rapport albumine/globulines</b>	Mesure du rapport A/G dans le sérum dans le cadre de l'étude	Rapport_A_G	Quantitatif continu	Ratio	
<b>Galactomannane</b>	Index du galactomannane du sérum	Galacto	Quantitatif continu	Index	
<b>B-D-Glucan minimum</b>	Concentration minimale en B-D-glucane mesurée dans le serum	B_D_Glucan_min	Quantitatif continu	En pg/mL	
<b>B-D-Glucan</b>	Concentration	B_D_Glucan_max	Quantitatif	En pg/mL	

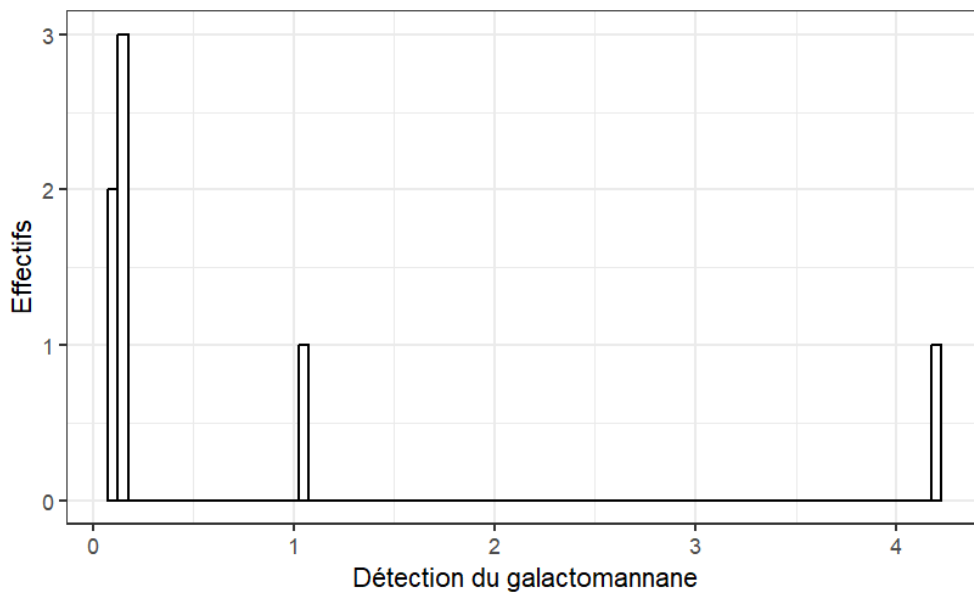
<b>maximum</b>	maximale en B-D-glucane mesurée dans le serum		continu		
<b>B-D-Glucan moyen</b>	Concentration moyenne en B-D-glucane mesurée dans le serum	B_D_Glucan_moyenn	Quantitatif continu	En pg/mL	
<b>Jour de l'Asp-LFD</b>	Date de la réalisation du test de l'Asp-LFD	Jour_Asplfd	Date		
<b>Asplfd</b>	Résultat obtenu au test de l'Asp-LFD	Asplfd	Qualitatif nominal	4 modalités : 0 = absence de trait dans la zone test 1 = trait de faible intensité dans la zone test 2 = trait d'intensité modérée dans la zone test 3 = trait de forte intensité dans la zone test	
<b>Jour de la culture</b>	Date de l'ensemencement de la culture fongique	Jour_Culture	Date		
<b>Culture réalisée</b>	Réalisation d'une culture fongique	Culture_Realisee	Qualitatif binaire	2 modalités : 1 = Oui 0 = Non	
<b>Culture positive</b>	Culture fongique positive à l'aspergillus	Cult_Positive	Qualitatif binaire	2 modalités : 1 = Oui 0 = Non	
<b>Histologie réalisée</b>	Réalisation d'une histologie	Histologie_Realisee	Qualitatif binaire	2 modalités : 1 = Oui 0 = Non	
<b>Histologie positive</b>	Histologie positive à l'aspergillus	Histo_Positive	Qualitatif binaire	2 modalités : 1 = Oui 0 = Non	
<b>Qualité remplissage cas</b>	Qualification du cas en fonction des informations délivrés par le vétérinaire	QualCas	Qualitatif nominal	4 Modalités MENU DEROLANT : 1 = Excellent 2 = Très bon 3 = Bon 4 = Mauvais	
<b>Cas fiable</b>	Fiabilité du cas envoyé par le vétérinaire selon les critères mentionnés.		Qualitatif nominal	1 = Excellent (Aspergillose confirmée avec photos lésions autopsie ou endoscopie) 2 = Très bon (Aspergillose confirmée sans photos lésions, Aspergillose suspectée sur base scanner et symptômes) 3 = Bon (Aspergillose suspectée sur base radiographies et symptômes) 4 = Mauvais (Aspergillose suspectée sur symptômes et radiographies non évocatrices)	

<b>Biais SV</b>	Y'a-t-il un biais par la doctorante dans l'interprétation de la fiabilité du cas ou de la qualité du remplissage des feuilles commémoratives		Qualitatif binaire	2 modalités : 1 = Oui 0 = Non	
-----------------	--	--	--------------------	-------------------------------------	--

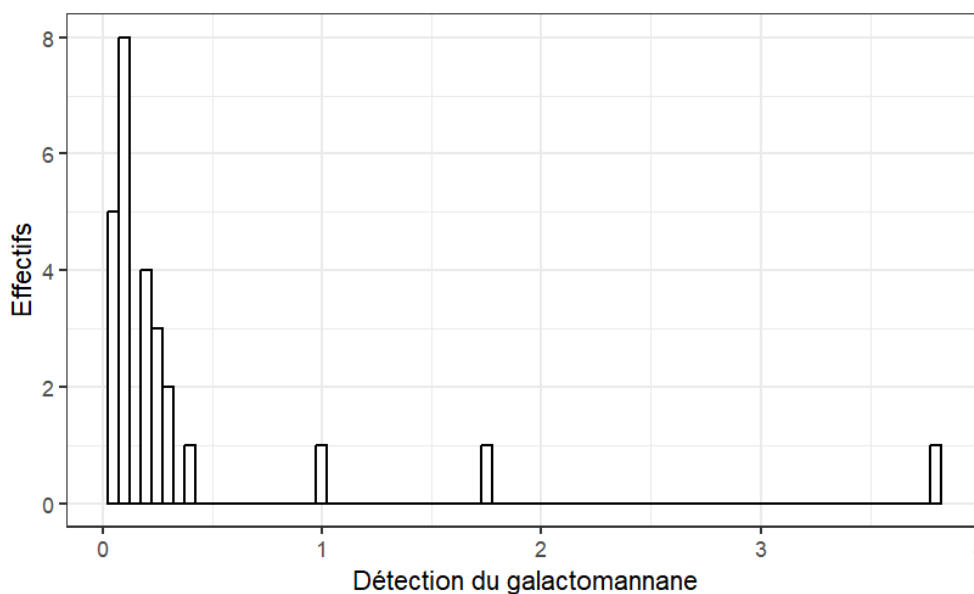
*Dictionnaire des données associé à la base de données de l'étude, élaboré par le Dr. Vétérinaire VIEU*

*Sabrina*

Annexe 2 : résultats complémentaires concernant la détection du galactomannane

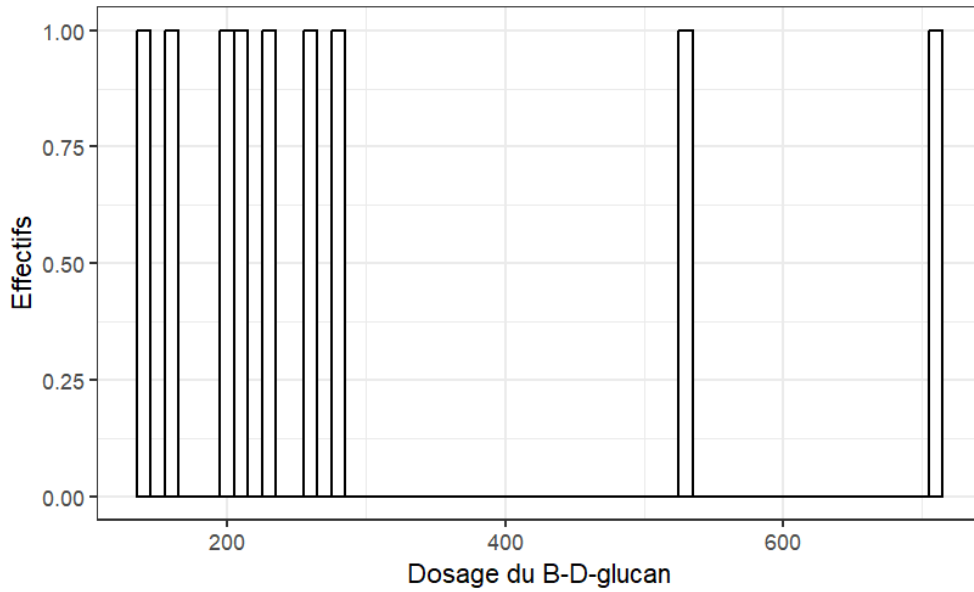


Histogramme de distribution des résultats de la détection du galactomannane au sein du groupe des individus malades

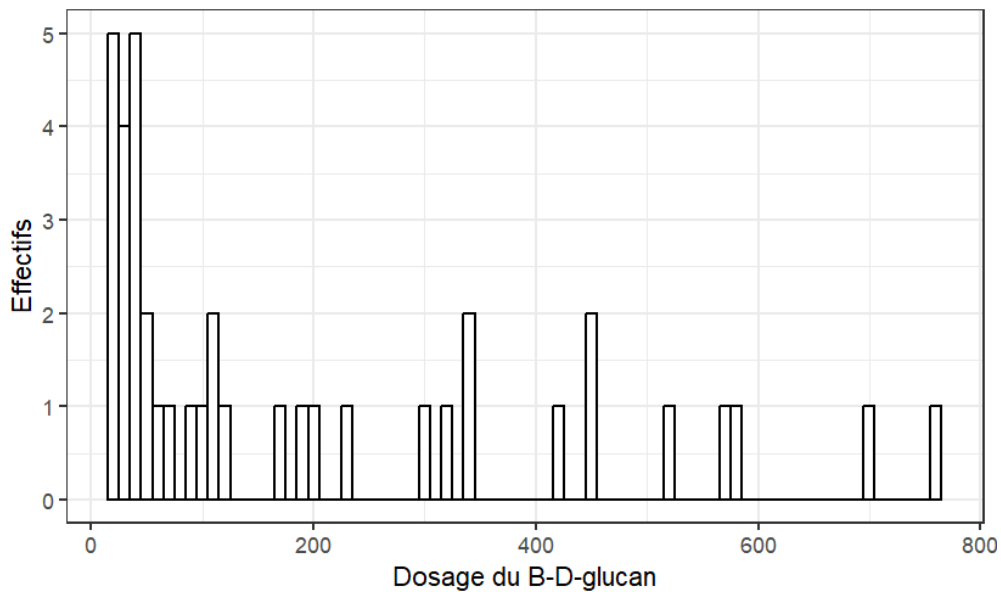


Histogramme de distribution des résultats de la détection du galactomannane au sein du groupe des individus témoins

Annexe 3 : résultats complémentaires concernant le dosage du  $\beta$ -D-glucane



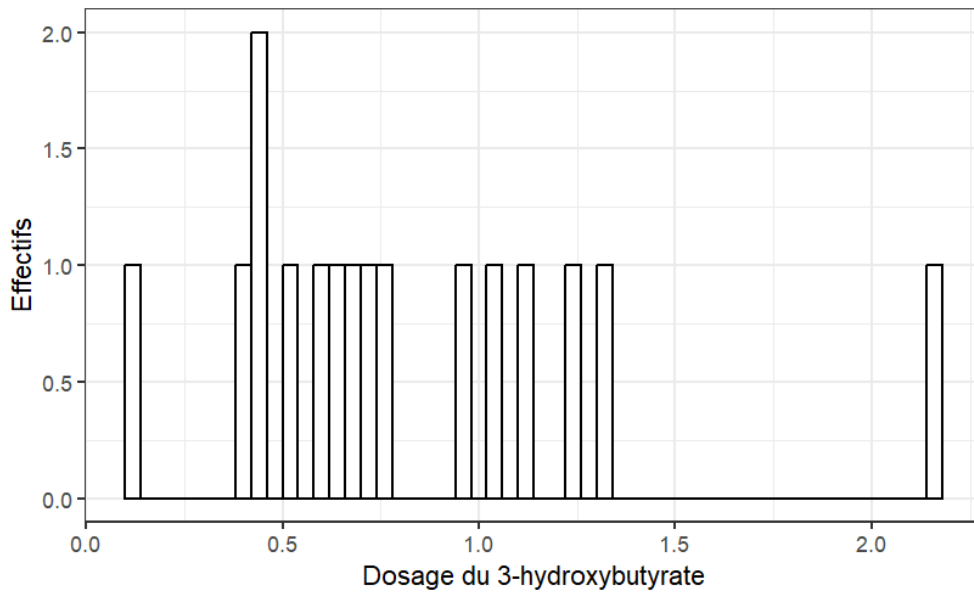
Histogramme de distribution des résultats du dosage du B-D-glucane au sein du groupe des individus malades



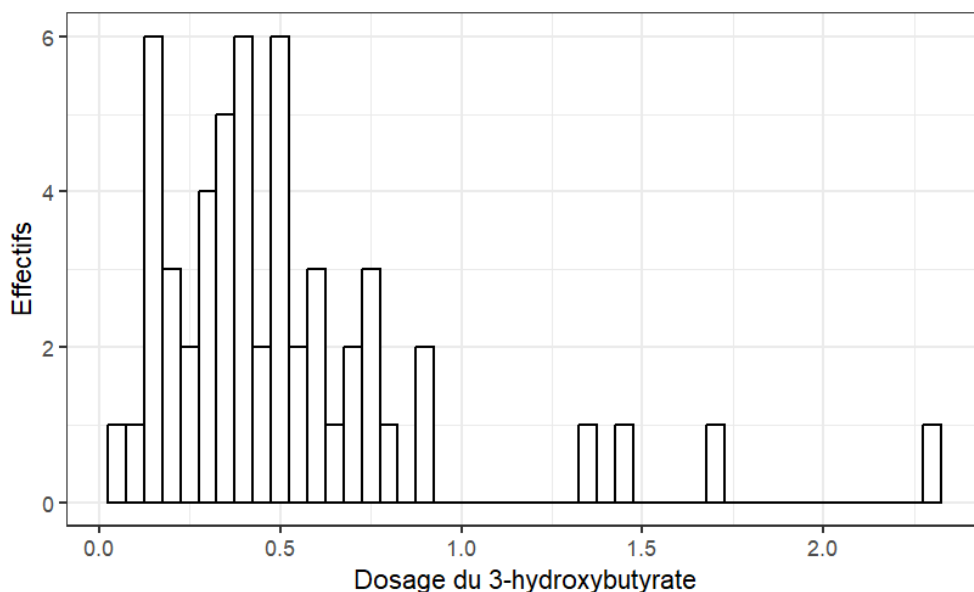
Histogramme de distribution des résultats du dosage du B-D-glucane au sein du groupe des individus témoins



Annexe 4 : résultats complémentaires concernant le dosage du 3-hydroxybutyrate

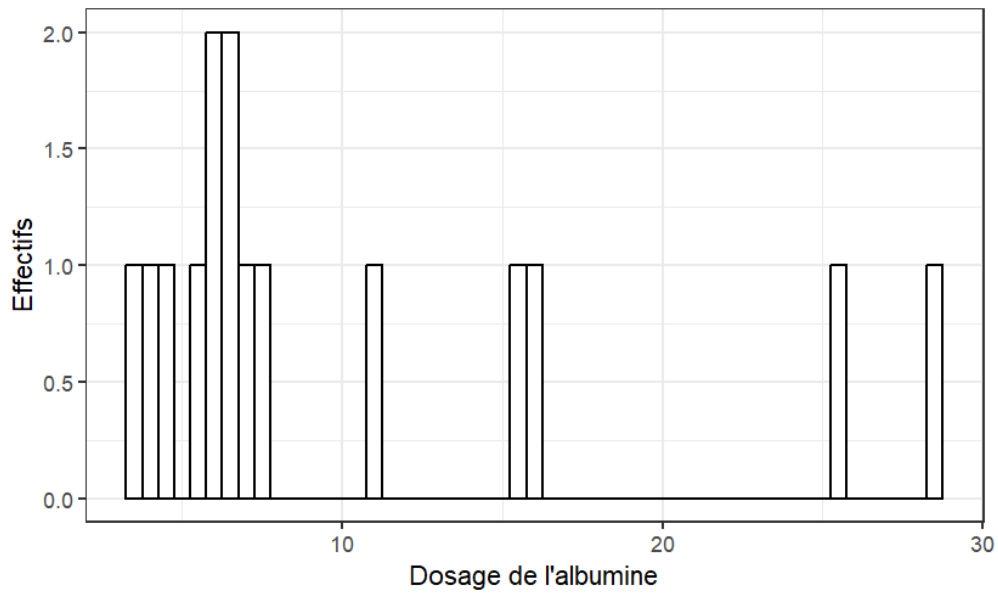


*Histogramme de distribution des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate au sein du groupe des individus malades*

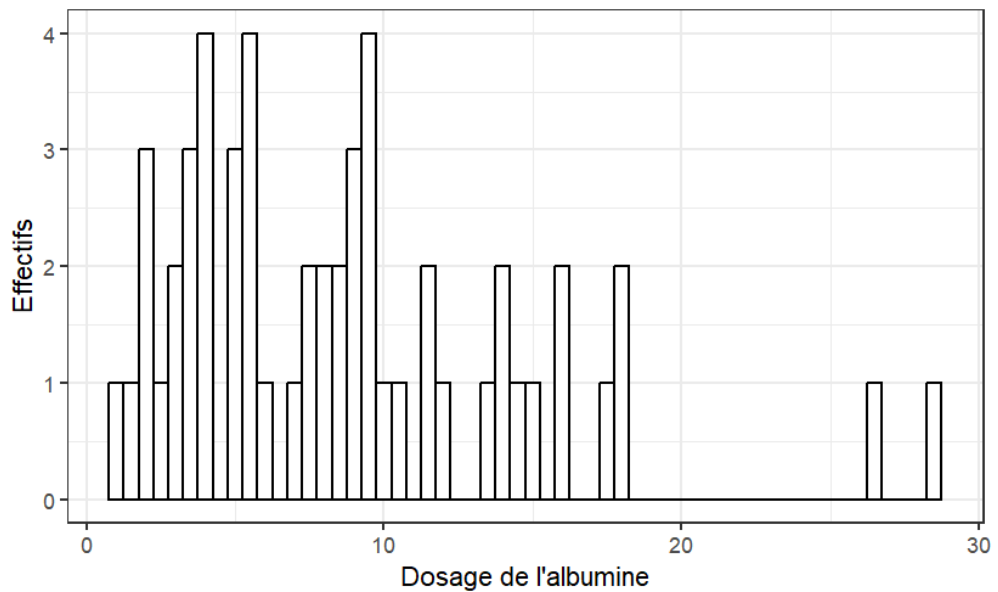


*Histogramme de distribution des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate au sein du groupe des individus témoins*

Annexe 5 : résultats complémentaires concernant le dosage de la fraction en albumine dans le cadre de l'électrophorèse des protéines sériques

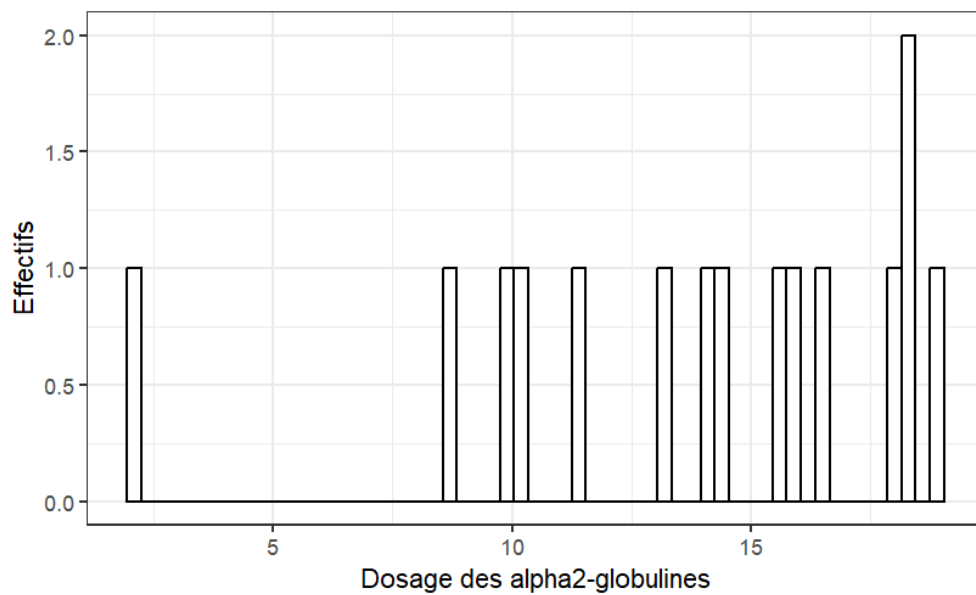


*Histogramme de distribution des résultats du dosage de l'albumine au sein du groupe des individus malades*

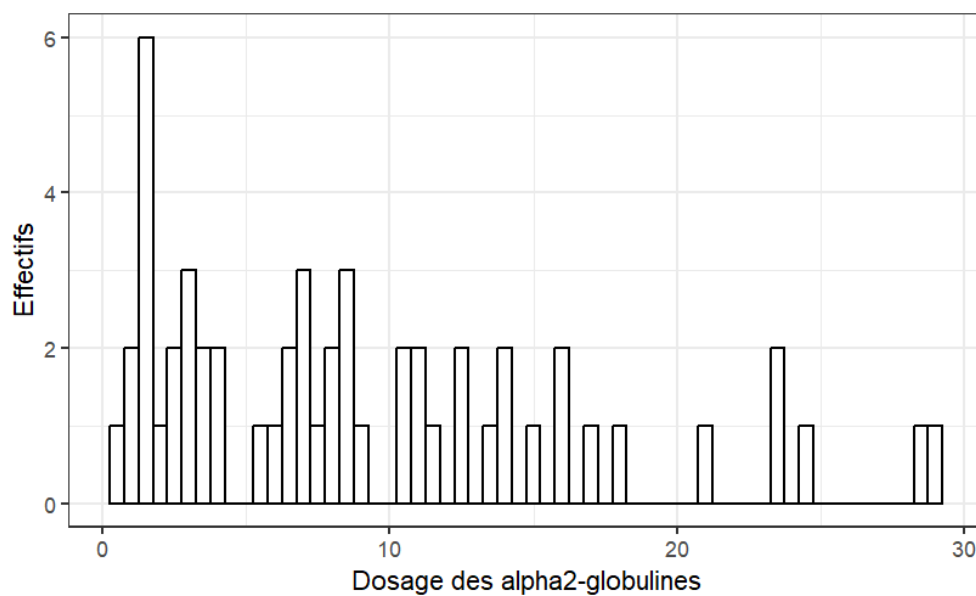


*Histogramme de distribution des résultats du dosage de l'albumine au sein du groupe des individus témoins*

Annexe 6 : résultats complémentaires concernant le dosage de la fraction en  $\alpha$ 2-globulines dans le cadre de l'électrophorèse des protéines sériques

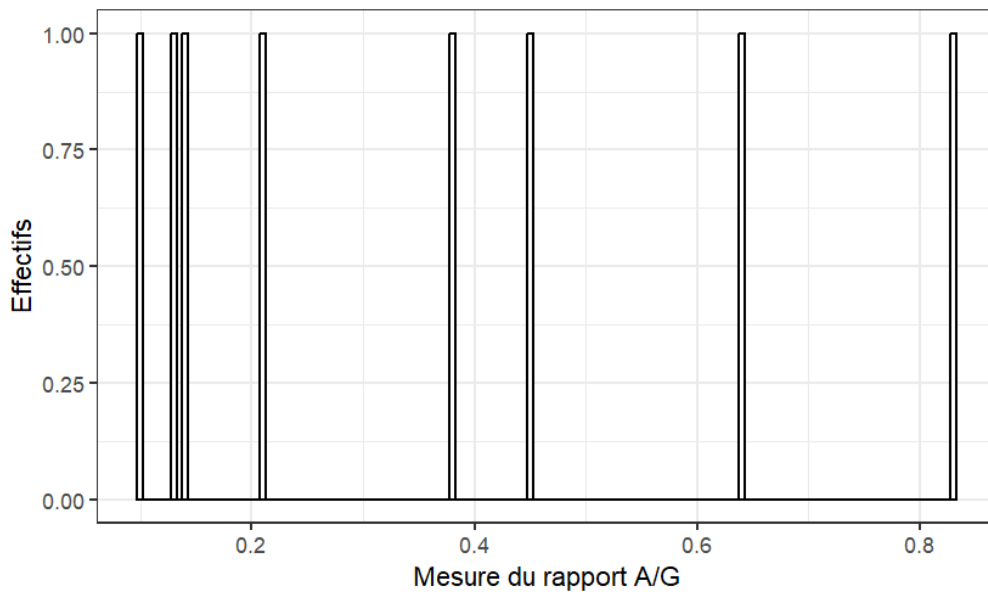


Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\alpha$ 2-globulines au sein du groupe des individus malades

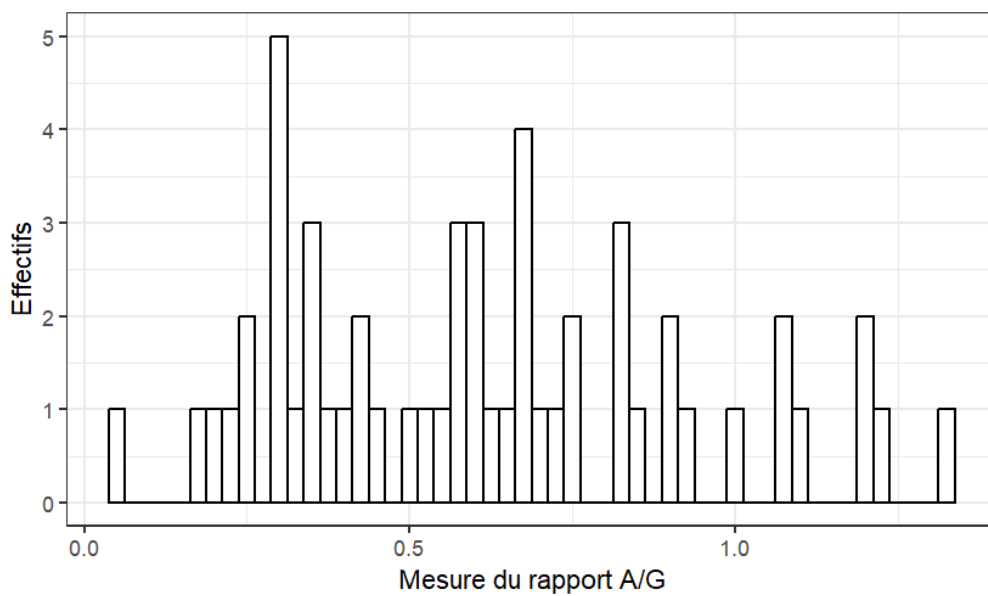


Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\alpha$ 2-globulines au sein du groupe des individus témoins

Annexe 7 : résultats complémentaires concernant la mesure du rapport A/G dans le cadre de l'électrophorèse des protéines sériques

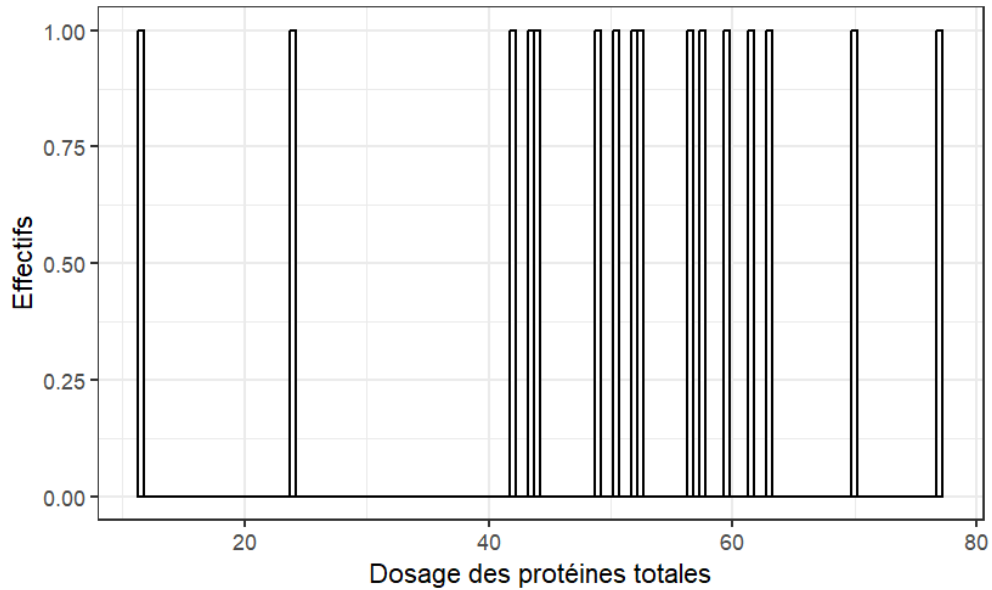


Histogramme de distribution des résultats du rapport A/G au sein du groupe des individus malades

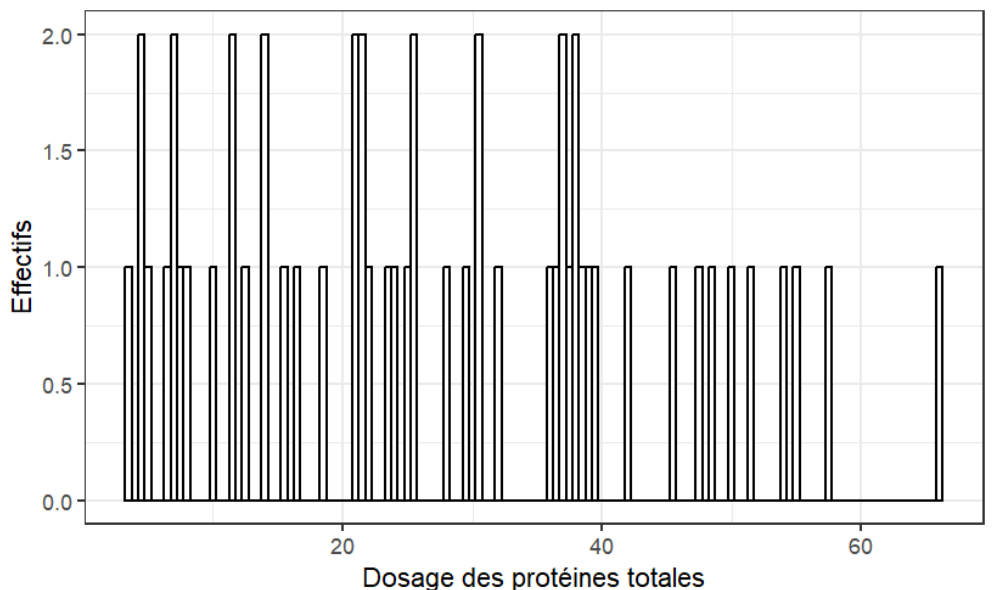


Histogramme de distribution des résultats du rapport A/G au sein du groupe des individus témoins

Annexe 8 : résultats complémentaires concernant la mesure des protéines totales



Histogramme de distribution des résultats du dosage des protéines totales au sein du groupe des individus malades.

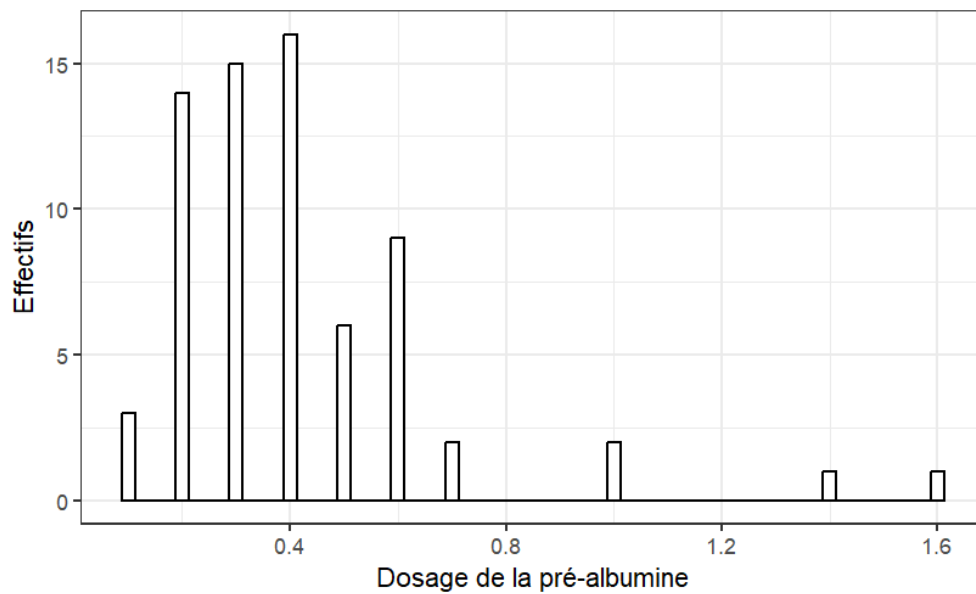


Histogramme de distribution des résultats du dosage des protéines totales au sein du groupe des individus témoins

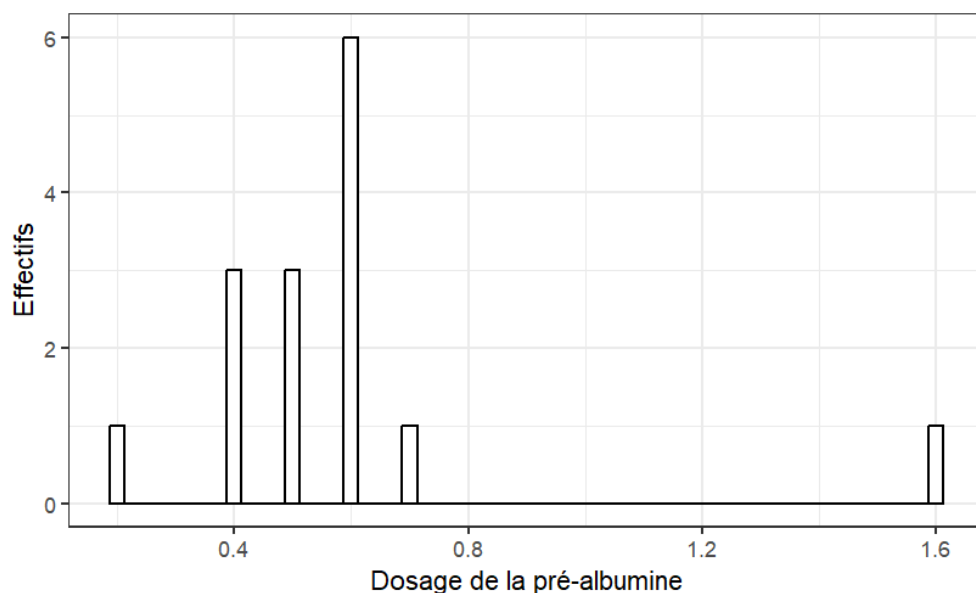
Annexe 9 : histogrammes de distribution et tableaux récapitulatifs des paramètres descriptifs des mesures de pré-albumine, des  $\alpha$ 1-globulines, des  $\beta$ -globulines et des  $\gamma$ -globulines (non exploités dans la partie « Résultats »)

**Etude concernant la pré-albumine :**

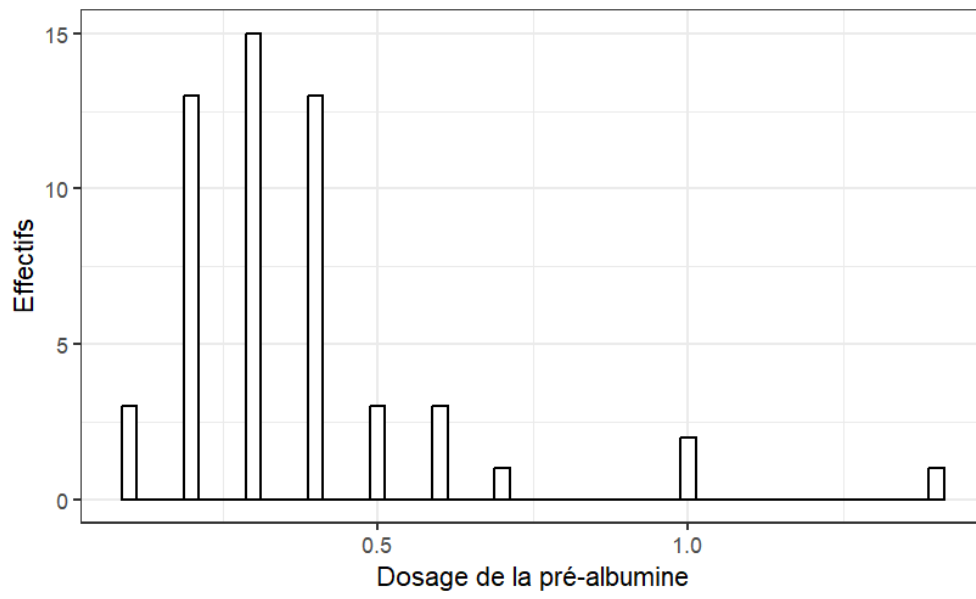
Les histogrammes de distribution



Histogramme de distribution des résultats du dosage de la pré-albumine au sein de la cohorte



Histogramme de distribution des résultats du dosage de la pré-albumine au sein du groupe des individus malades

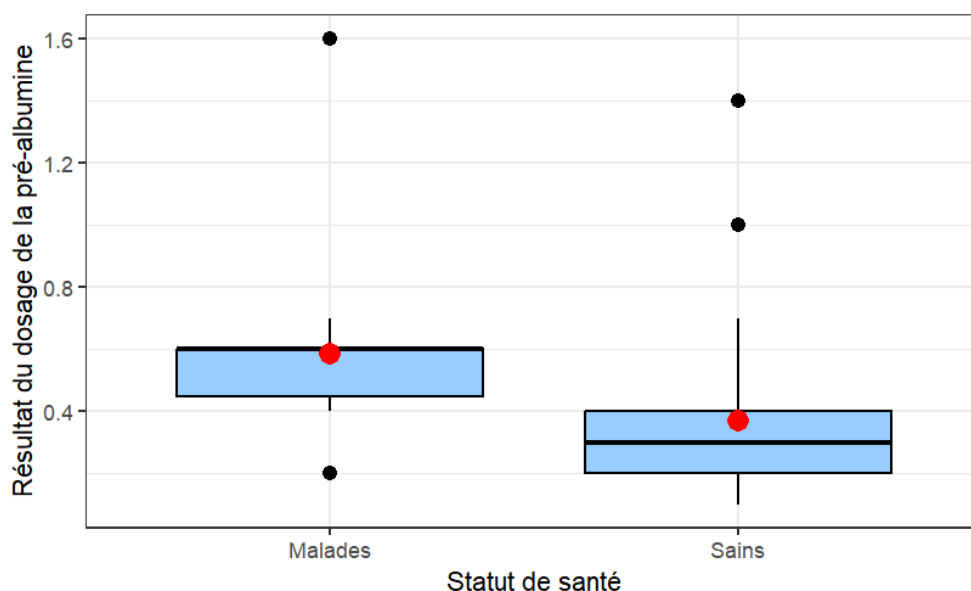


Histogramme de distribution des résultats du dosage de la pré-albumine au sein du groupe des individus témoins

Etude des moyennes observées dans chaque groupe

	Tous individus (n=69)	Groupe malades (n=15)	Groupe témoin (n=54)
<b>Moyenne</b>	0,42	0,59	0,37
<b>Min</b>	0,1	0,2	0,1
<b>Max</b>	1,6	1,6	1,4
<b>Q1</b>	0,3	0,45	0,2
<b>Médiane</b>	0,4	0,6	0,3
<b>Q3</b>	0,5	0,6	0,4
<b>Ecart-type</b>	0,26	0,31	0,23

Tableau résumant les paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction de la pré-albumine) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades



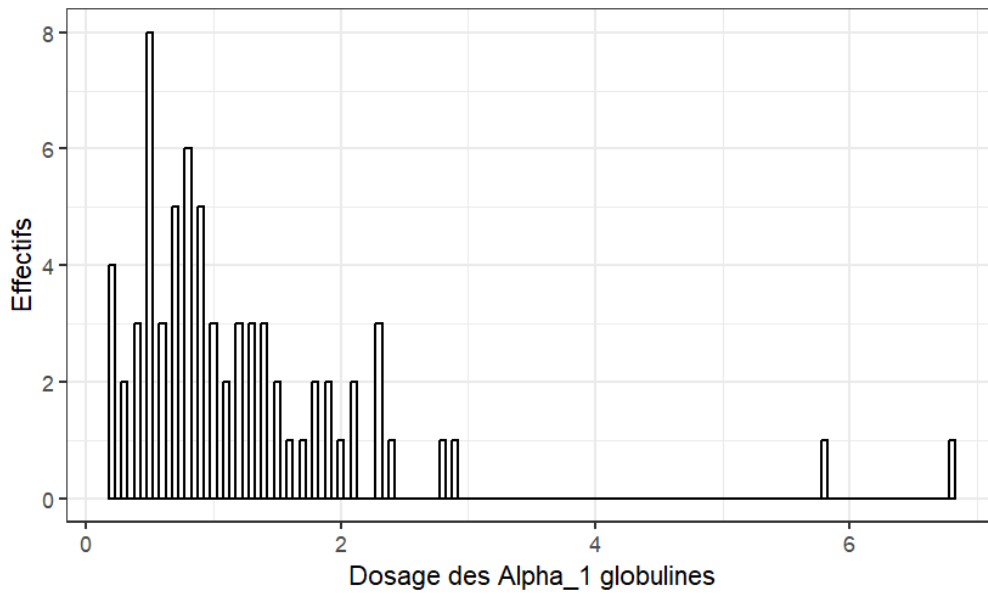
Boxplot des résultats du dosage de la fraction en pré-albumine au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.

La p-value du test de Shapiro-wilk est égale à **3.62e-08** ; la distribution de la variable ne suit pas une loi normale. Un test de Wilcoxon est donc réalisé, dont la p-value est inférieure à **5.9e-08**. L'hypothèse H0 est donc rejetée ; la moyenne du dosage de la pré-albumine est significativement plus élevée chez les individus malades que chez les individus du groupe témoin.

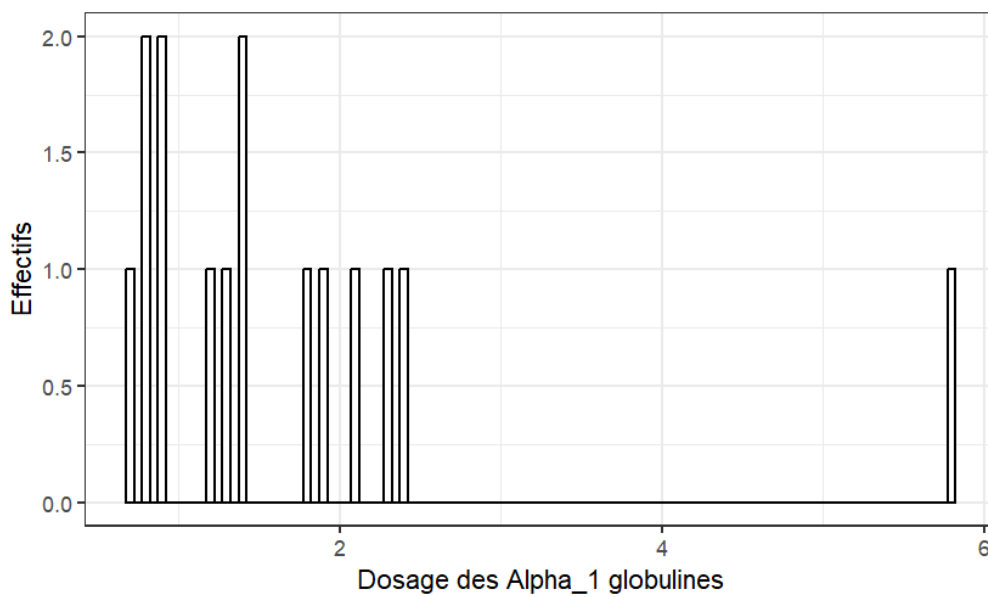


**Etude concernant les  $\alpha$ 1-globulines :**

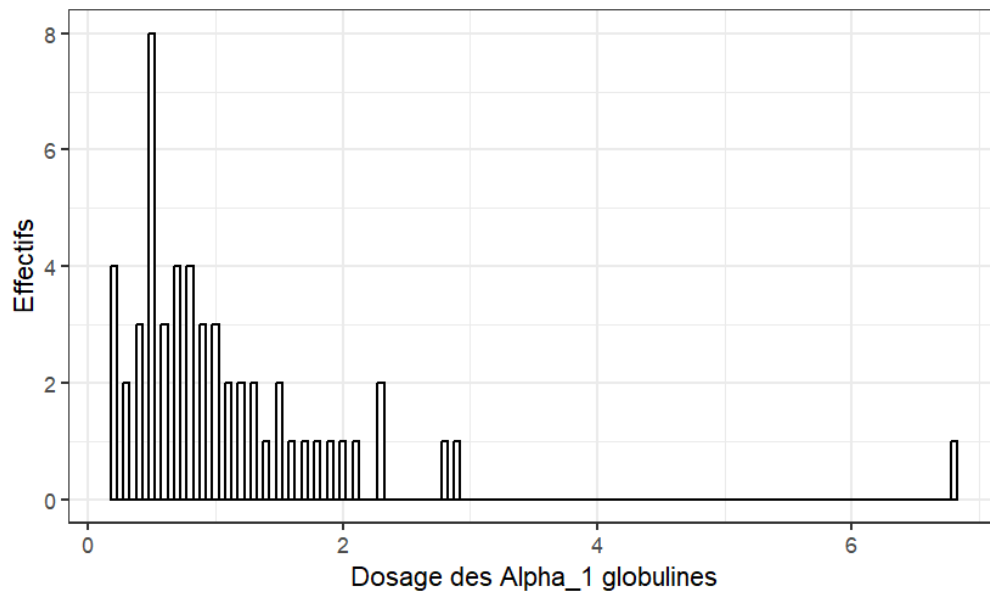
*Les histogrammes de distribution*



*Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\alpha$ 1-globulines au sein de la cohorte*



*Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\alpha$ 1-globulines au sein du groupe des individus malades*

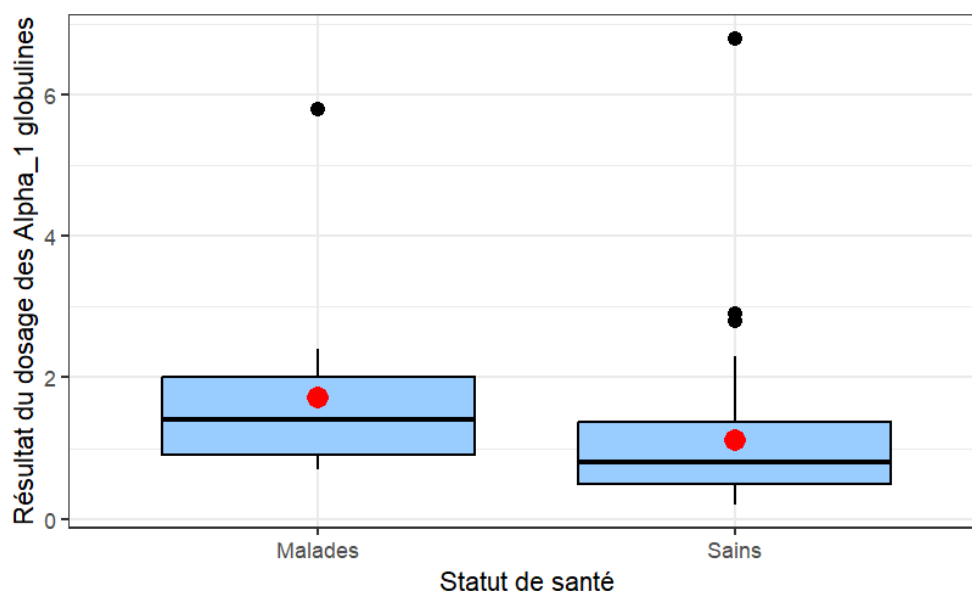


Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\alpha_1$ -globulines au sein du groupe des individus témoins

Etude des moyennes observées dans chaque groupe

	Tous individus (n=69)	Groupe malades (n=15)	Groupe témoin (n=54)
Moyenne	1,24	1,71	1,1
Min	0,2	0,7	0,2
Max	6,8	5,8	6,8
Q1	0,6	0,9	0,5
Médiane	0,9	1,4	0,8
Q3	1,5	2	1,37
Ecart-type	1,1	1,26	1,03

Tableau résumant les paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction des  $\alpha$ 1-globulines) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.

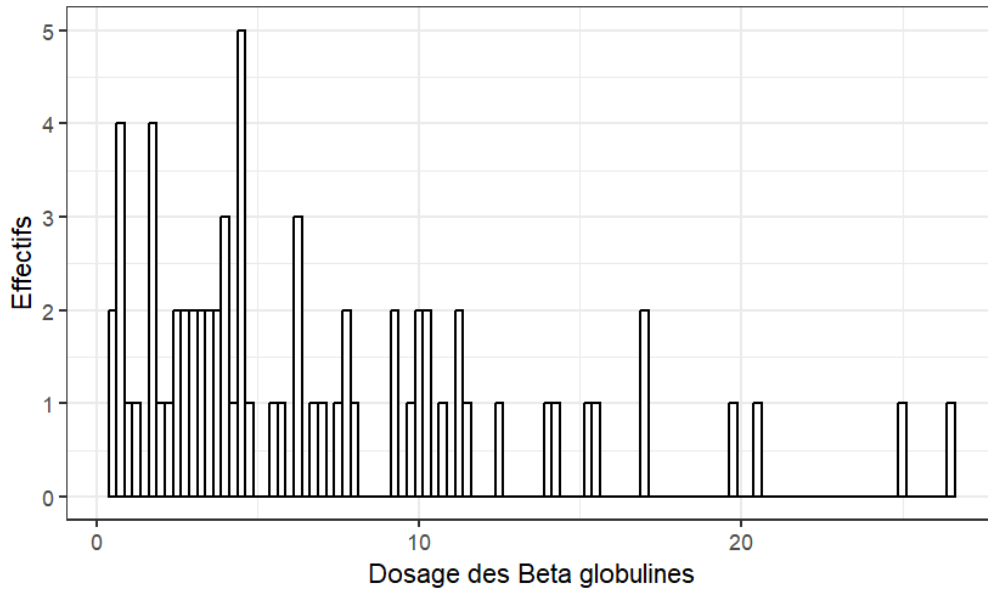


Boxplot des résultats du dosage de la fraction en  $\alpha$ 1-globulines au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.

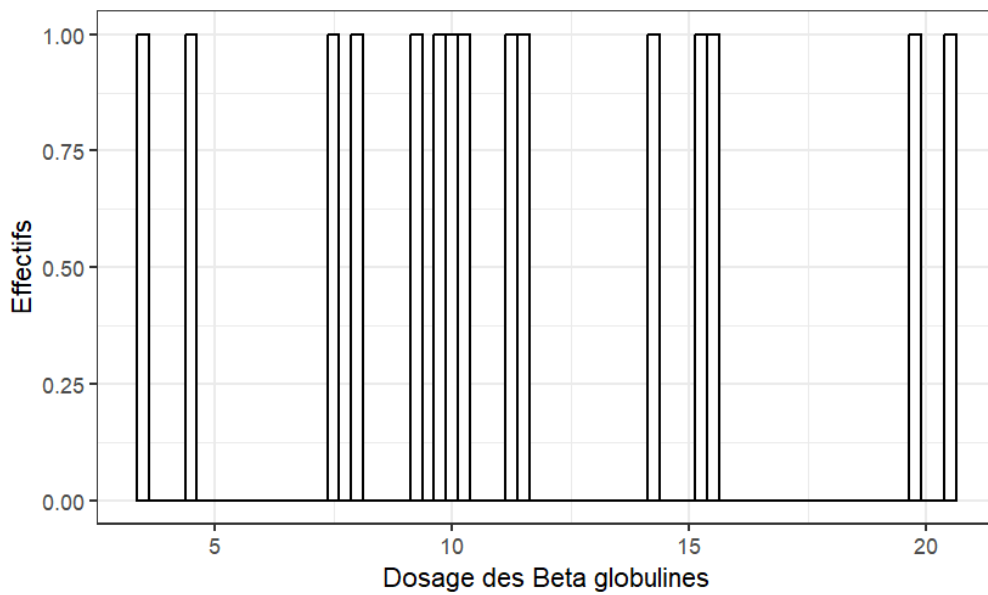
La p-value du test de Shapiro-wilk est égale à **1.66e-09** ; la distribution de la variable ne suit pas une loi normale. Un test de Wilcoxon est donc réalisé, dont la p-value est inférieure à **1.71e-14**. L'hypothèse H0 est donc rejetée ; la moyenne du dosage des  $\alpha$ 1 globulines est significativement plus élevée chez les individus malades que chez les individus du groupe témoin.

## Etude concernant les $\beta$ -globulines :

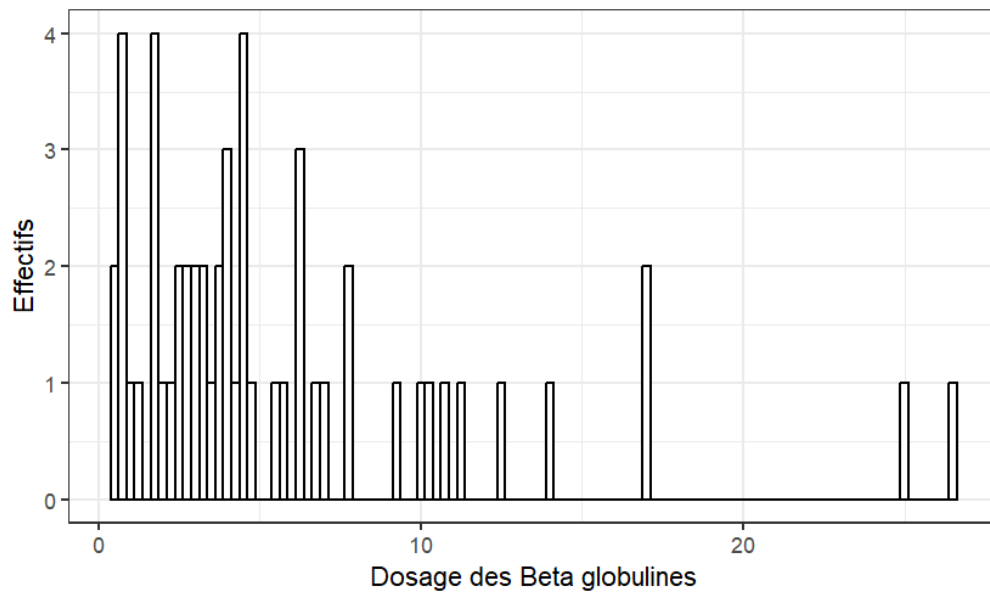
### Les histogrammes de distribution



Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\beta$ -globulines au sein de la cohorte



Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\beta$ -globulines au sein du groupe des individus malades

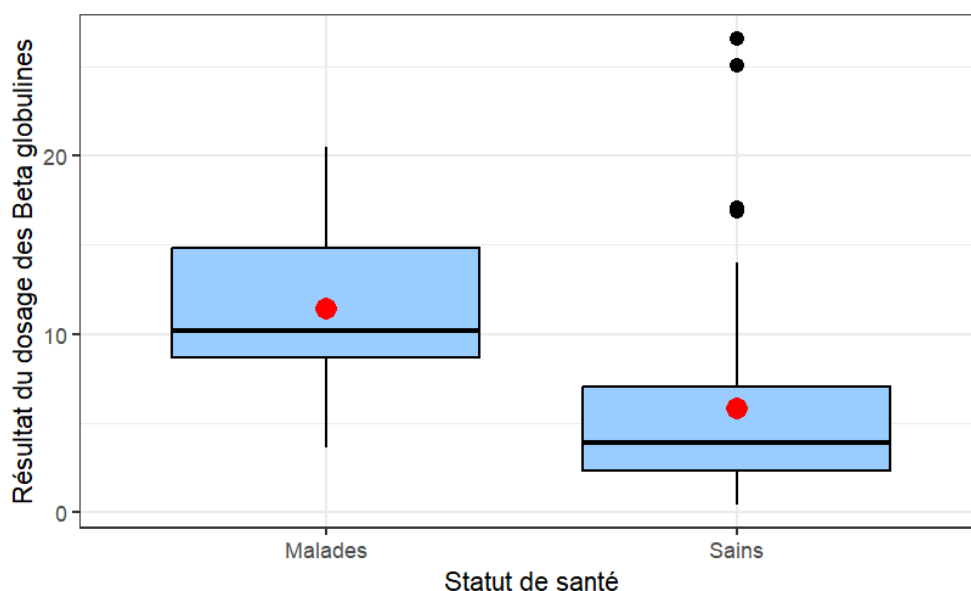


Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\beta$ -globulines au sein du groupe des individus témoins

Etude des moyennes observées dans chaque groupe

	Tous individus (n=69)	Groupe malades (n=15)	Groupe témoin (n=54)
<b>Moyenne</b>	7,01	11,39	5,79
<b>Min</b>	0,4	3,6	0,4
<b>Max</b>	26,6	20,5	26,6
<b>Q1</b>	2,7	8,65	2,32
<b>Médiane</b>	4,6	10,2	10,2
<b>Q3</b>	10,1	14,8	7,03
<b>Ecart-type</b>	5,92	4,9	5,63

Tableau résumant les paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction des  $\beta$ -globulines) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.

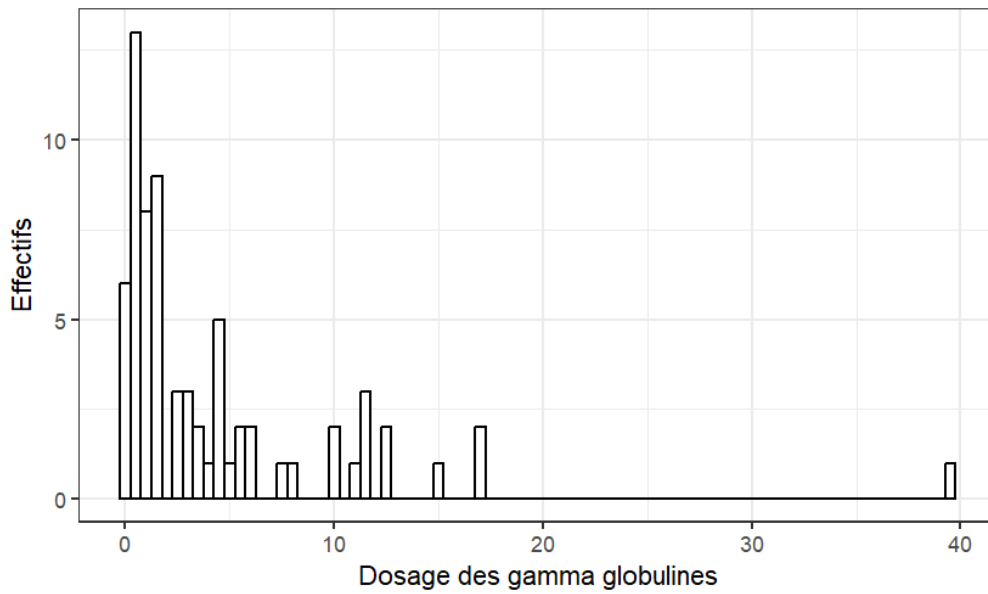


Boxplot des résultats du dosage de la fraction en  $\beta$ -globulines au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux.

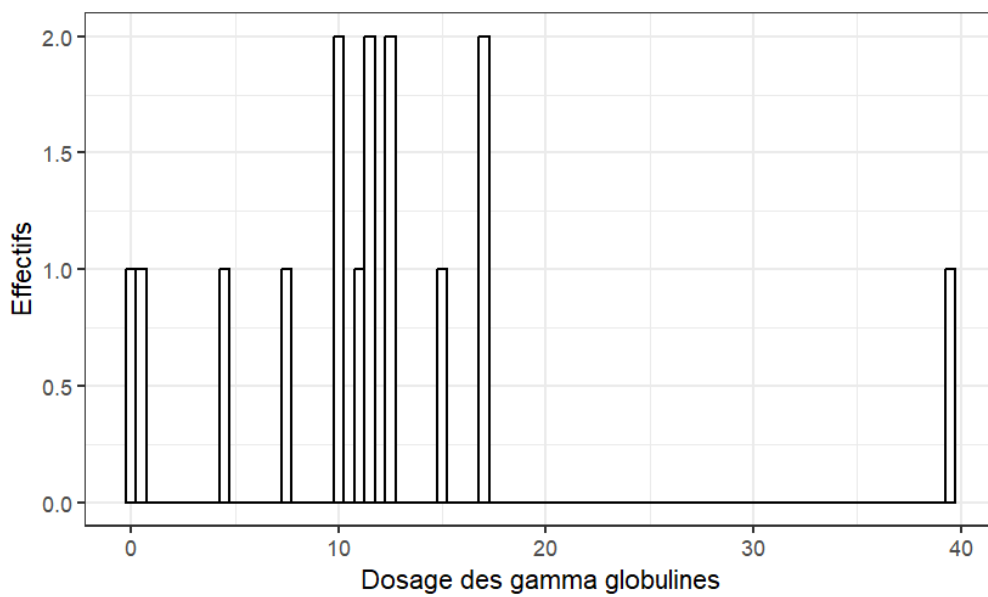
La p-value du test de Shapiro-wilk est égale à **1.34e-07** ; la distribution de la variable ne suit pas une loi normale. Un test de Wilcoxon est donc réalisé, dont la p-value est inférieure à **2.2e-16**. L'hypothèse H0 est donc rejetée ; la moyenne du dosage des  $\alpha$ 1 globulines est significativement plus élevée chez les individus malades que chez les individus du groupe témoin.

**Etude concernant les Y-globulines :**

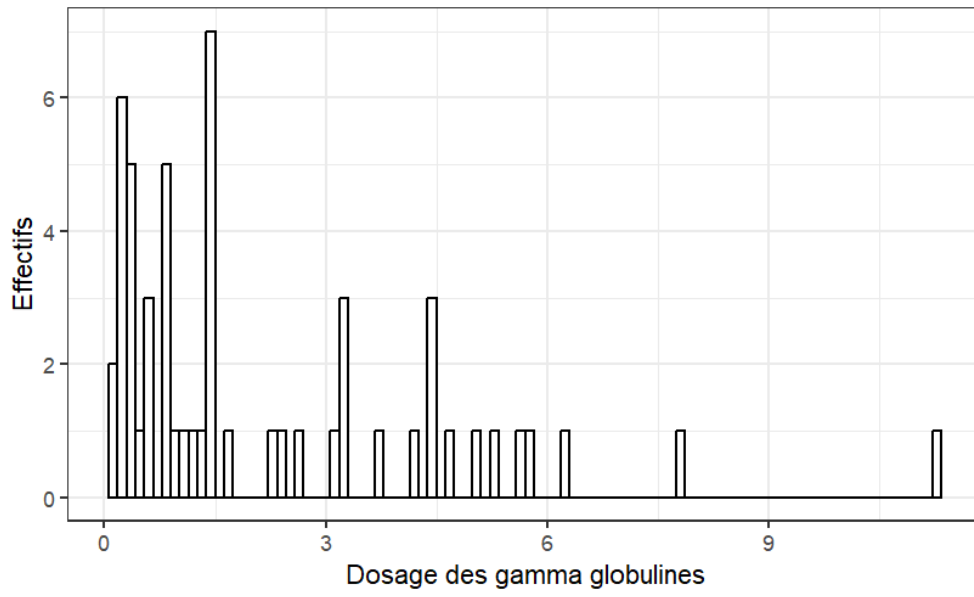
*Les histogrammes de distribution*



*Histogramme de distribution des résultats du dosage des Y-globulines au sein de la cohorte*



*Histogramme de distribution des résultats du dosage des Y-globulines au sein du groupe des individus malades*



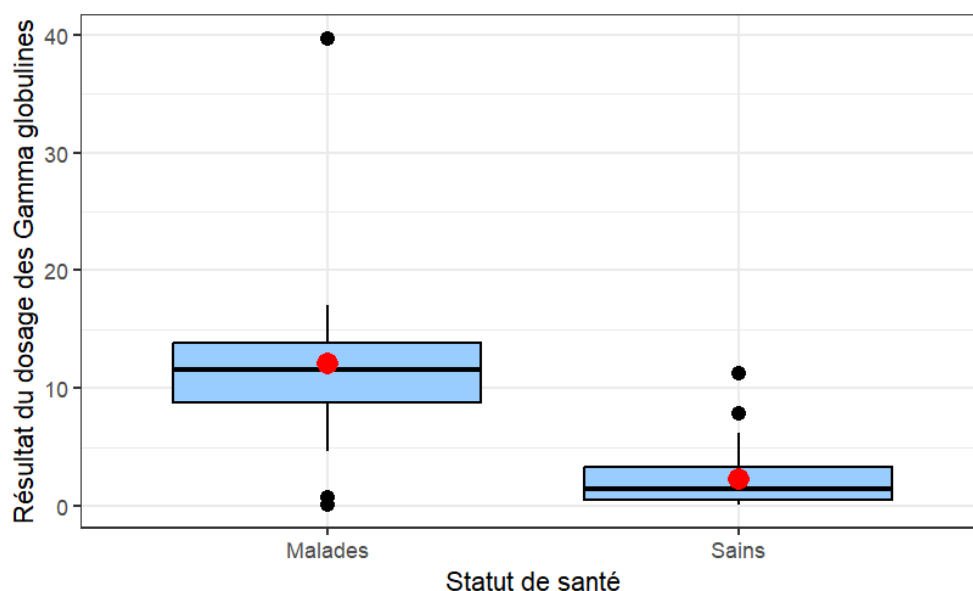
Histogramme de distribution des résultats du dosage des  $\gamma$ -globulines au sein du groupe des individus témoins



Etude des moyennes observées dans chaque groupe

	Tous individus (n=69)	Groupe malades (n=15)	Groupe témoin (n=54)
<b>Moyenne</b>	4,36	12,03	2,22
<b>Min</b>	0,1	0,1	0,1
<b>Max</b>	39,7	39,7	11,3
<b>Q1</b>	0,6	8,75	0,53
<b>Médiane</b>	1,5	11,6	1,45
<b>Q3</b>	5,3	13,85	3,3
<b>Ecart-type</b>	6,17	9,18	2,3

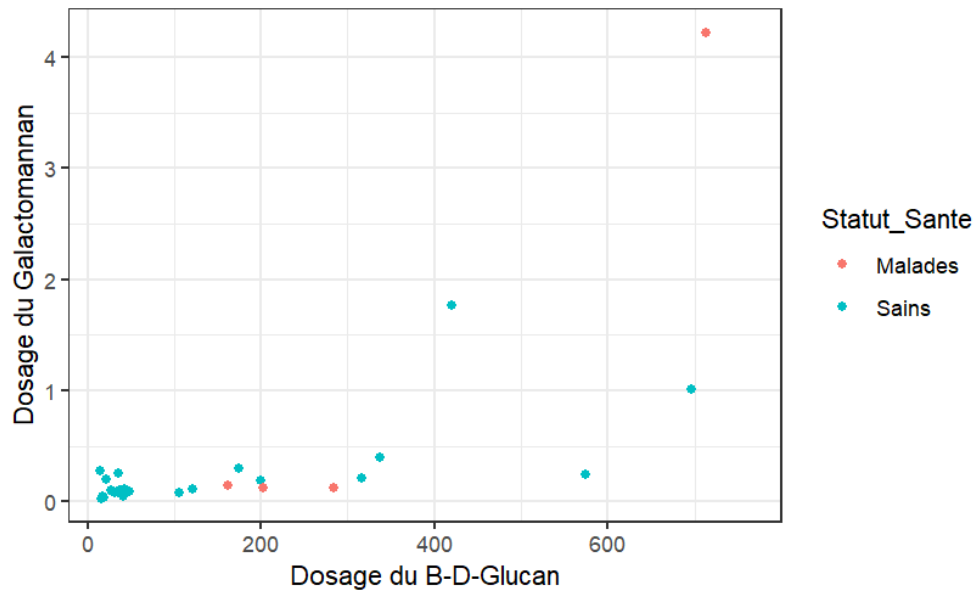
Tableau résumant les paramètres descriptifs de l'électrophorèse des protéines sériques (fraction des  $\gamma$ -globulines) chez l'ensemble des individus de la cohorte, au sein du groupe témoin et du groupe des individus malades.



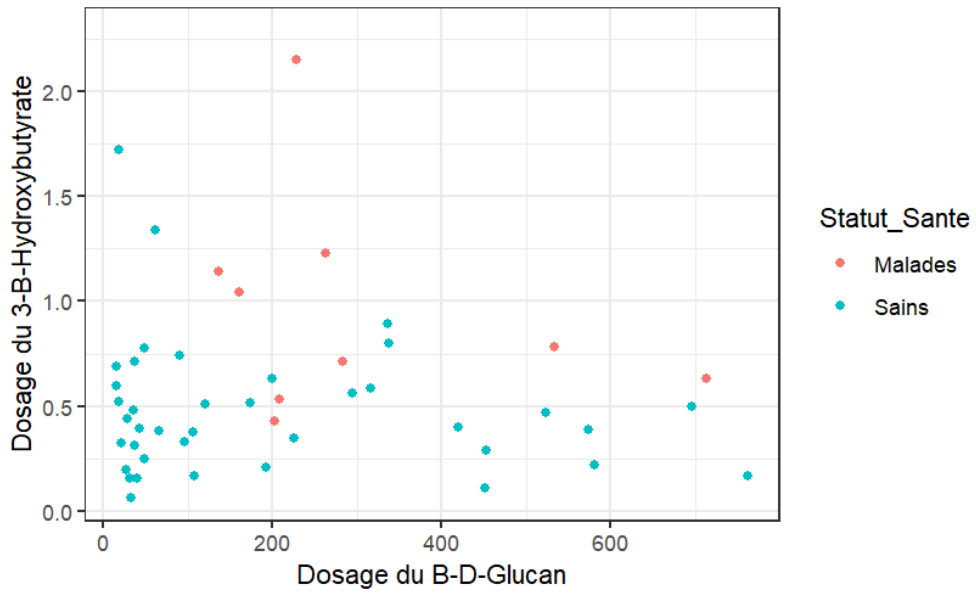
Boxplot des résultats du dosage de la fraction en  $\gamma$ -globulines au sein de la cohorte, en fonction du statut de santé des animaux

La p-value du test de Shapiro-wilk est égale à **8.93e-07** ; la distribution de la variable ne suit pas une loi normale. Un test de Wilcoxon est donc réalisé, dont la p-value est inférieure à **2.2e-16**. L'hypothèse H0 est donc rejetée ; la moyenne du dosage des  $\alpha$ 1 globulines est significativement plus élevée chez les individus malades que chez les individus du groupe témoin.

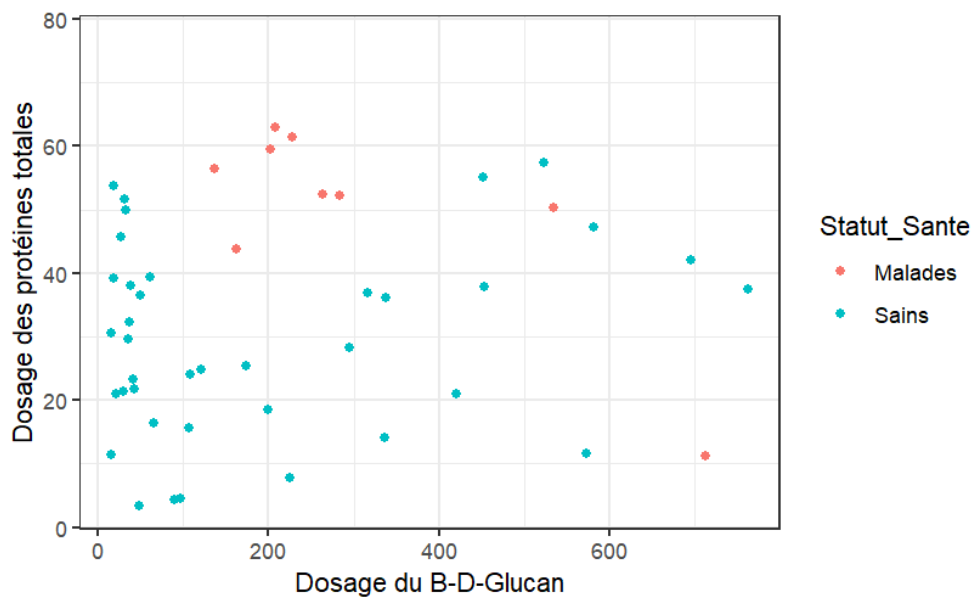
Annexe 10 : comparaisons des tests quantitatifs qui ne présentent pas de lien de corrélation forte, représentées sous forme de nuages de points, avec le calcul du coefficient de Spearman associé



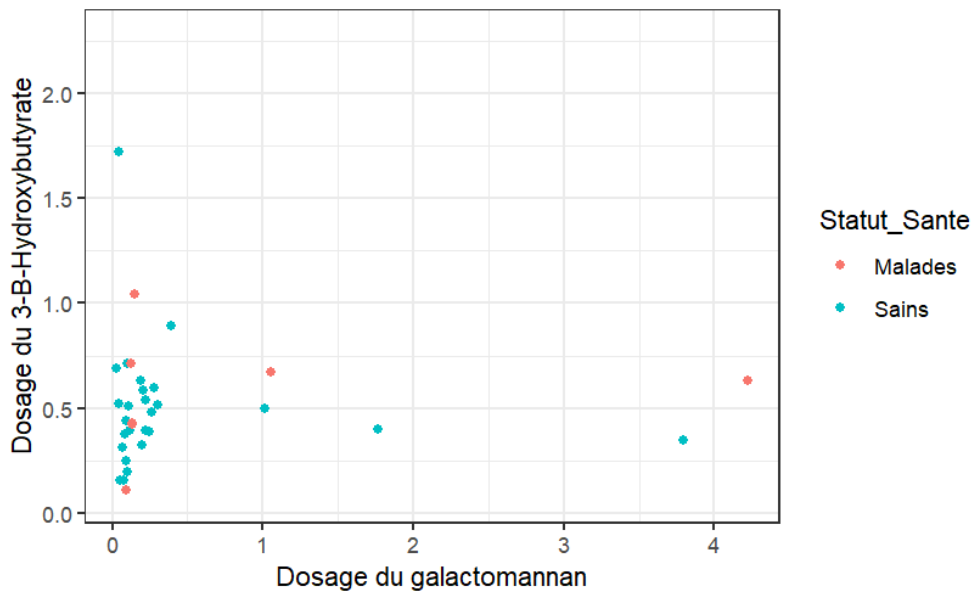
Comparaison des résultats du test Fungitell™ et du test Platelia™ pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,65



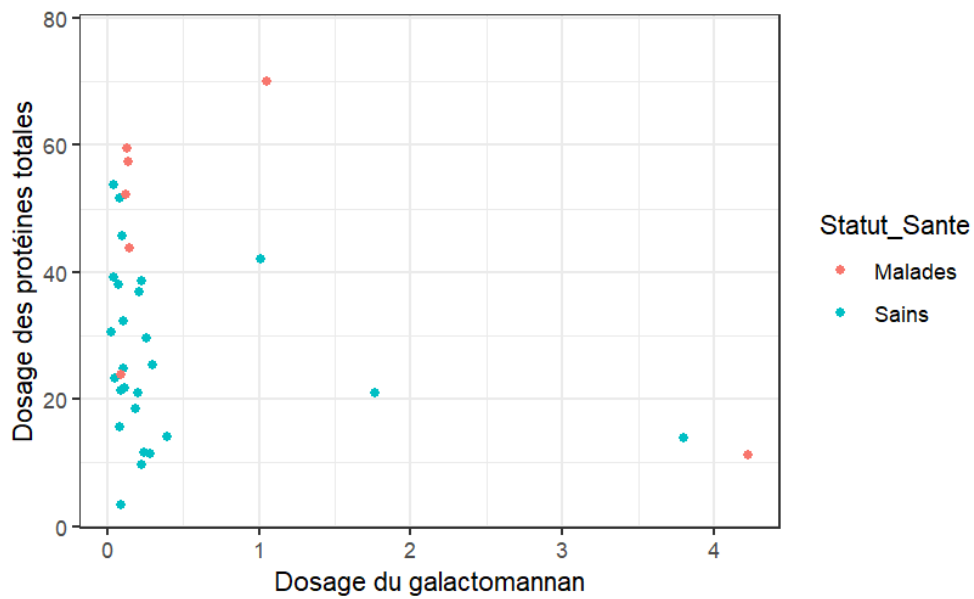
*Comparaison des résultats du test Fungitel<sup>TM</sup> et du dosage du 3-hydroxybutyrate pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,05*



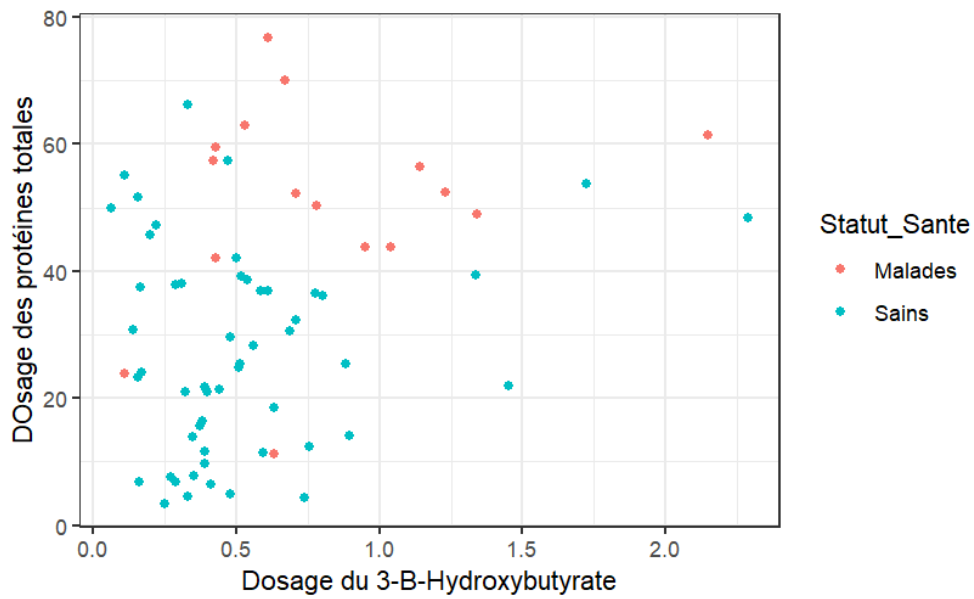
*Comparaison des résultats du test Fungitel<sup>TM</sup> et du dosage des protéines totales pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,14*



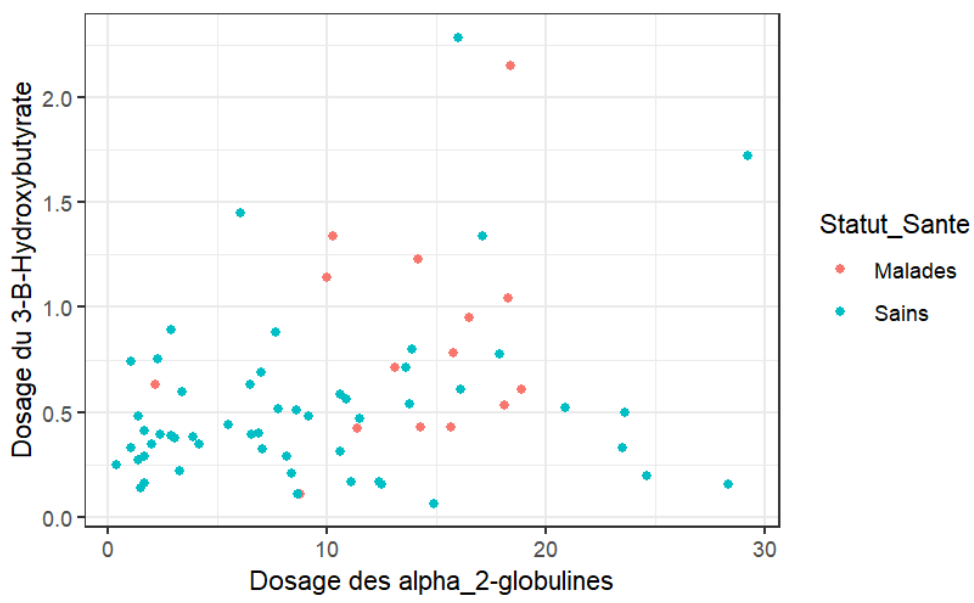
Comparaison des résultats du test Platelia™ et du dosage du 3-hydroxybutyrate pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,21



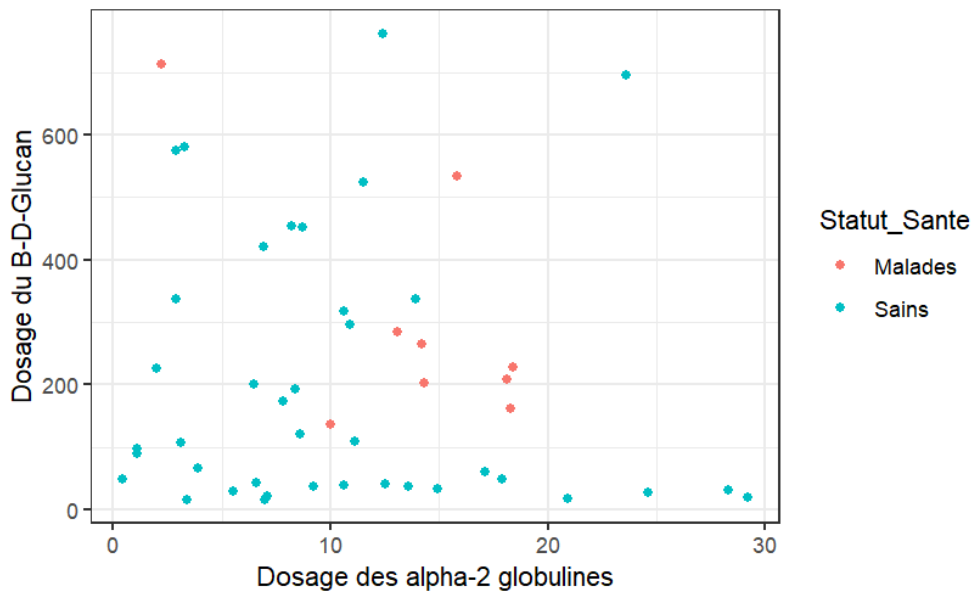
Comparaison des résultats du test Platelia™ et du dosage des protéines totales pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à -0,27



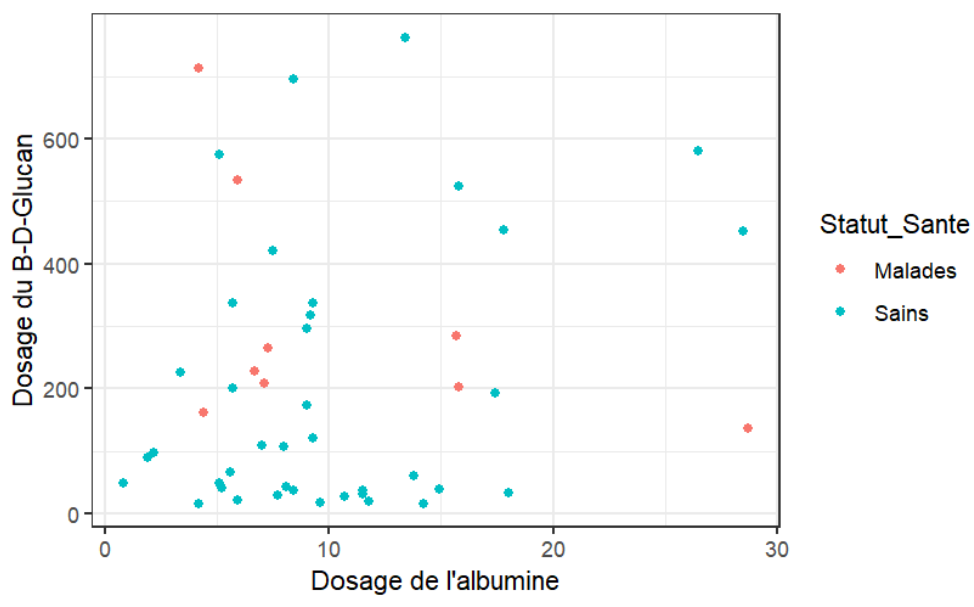
Comparaison des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate et du dosage des protéines totales pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,25



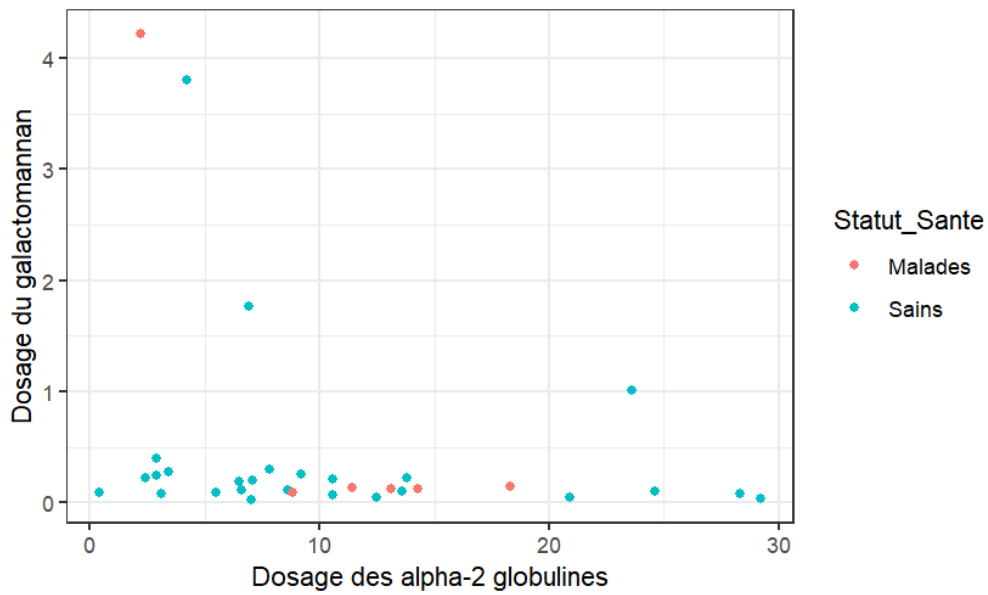
Comparaison des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate et du dosage de la fraction en  $\alpha_2$ -globulines pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,28



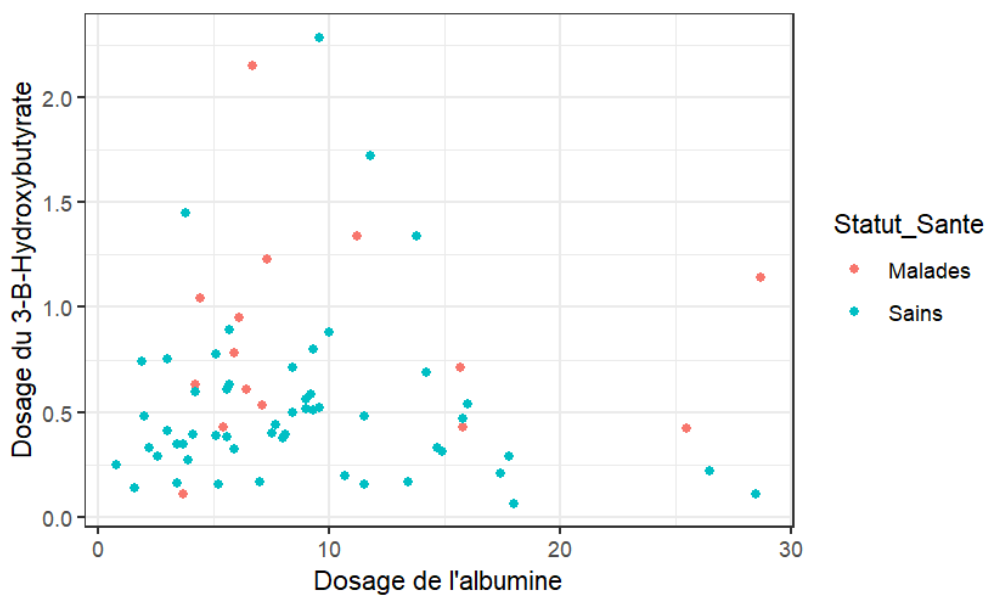
Comparaison des résultats du test Fungitel<sup>TM</sup> et du dosage de la fraction en  $\alpha$ 2-globulines pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à  $-0,1$



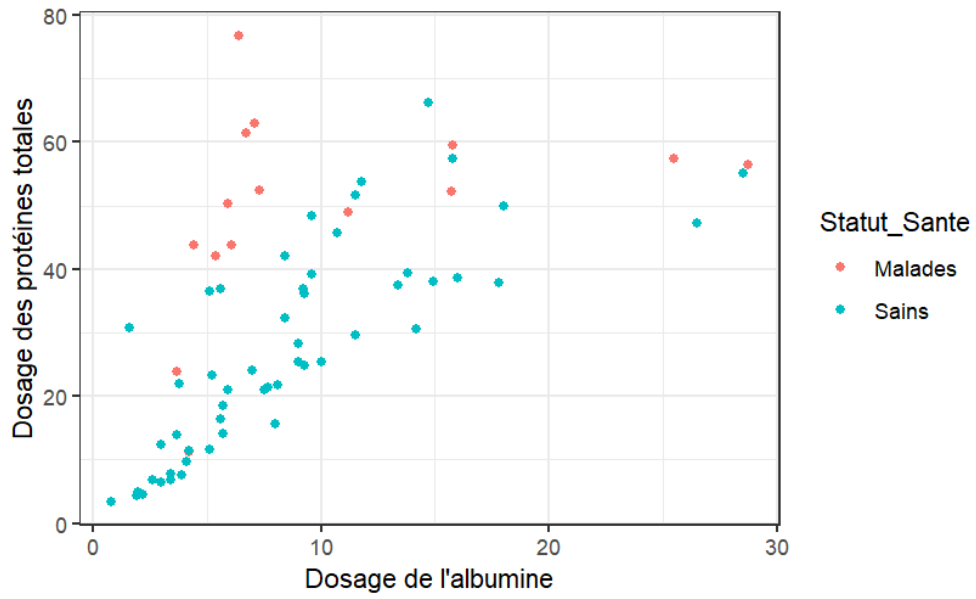
Comparaison des résultats du test Fungitel<sup>TM</sup> et du dosage de la fraction en albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à  $0,05$



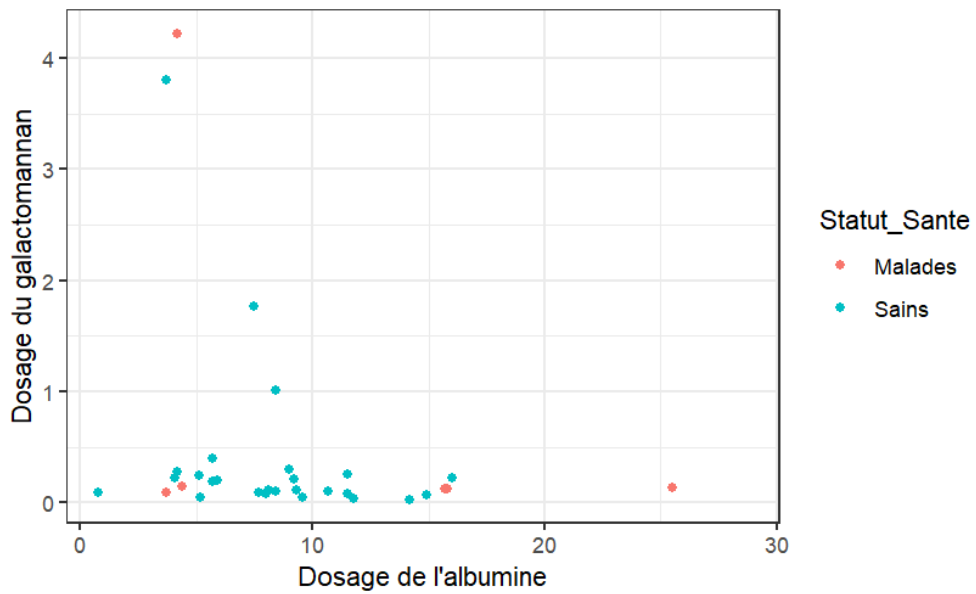
Comparaison des résultats du test Platelia™ et du dosage de la fraction en  $\alpha$ 2-globulines pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à -0,36



Comparaison des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate et du dosage de la fraction en albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,03

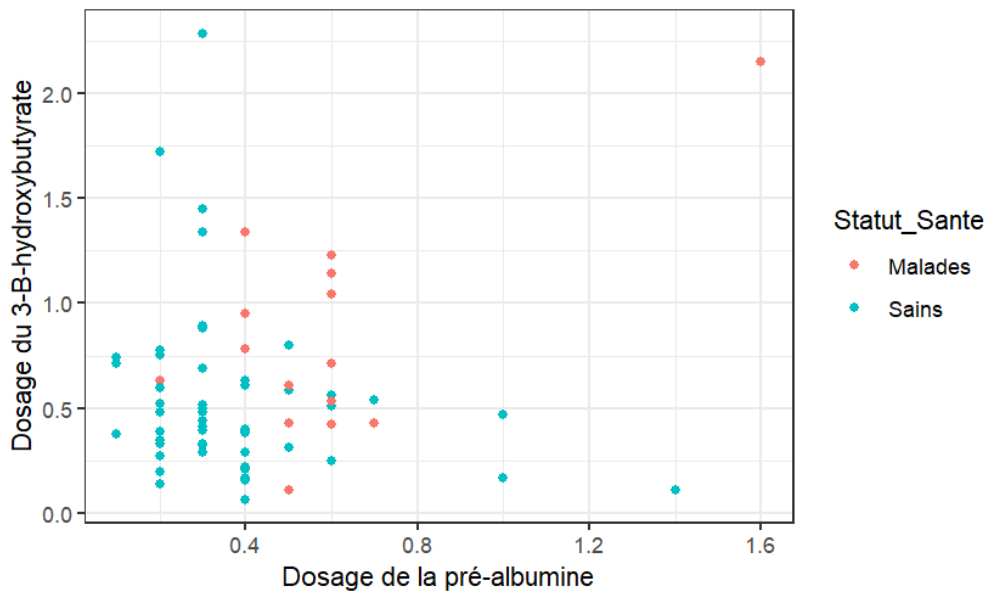


Comparaison du dosage des protéines totales et du dosage de la fraction en albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,03

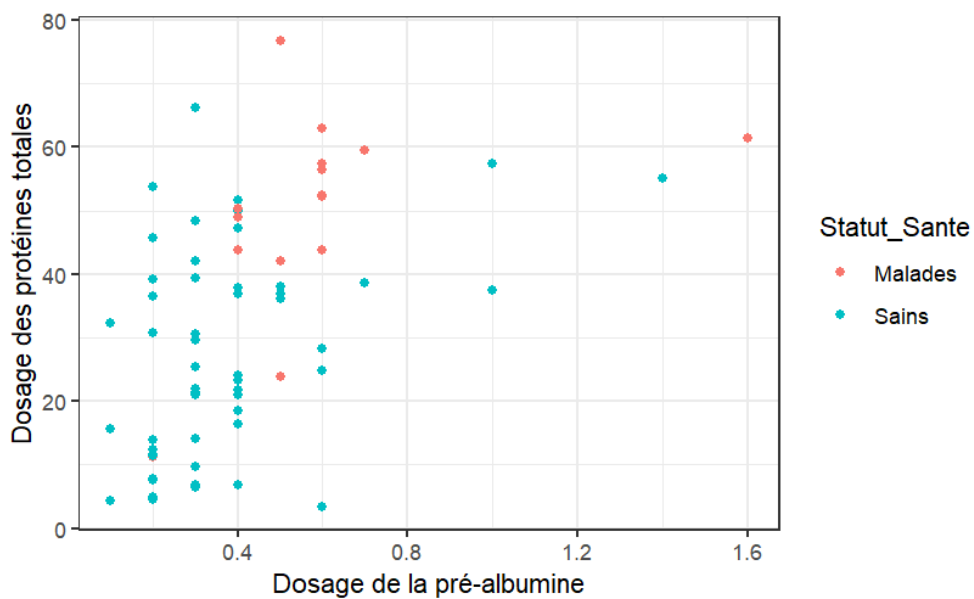


Comparaison des résultats du test Platelia™ et du dosage de la fraction en albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à -0,32

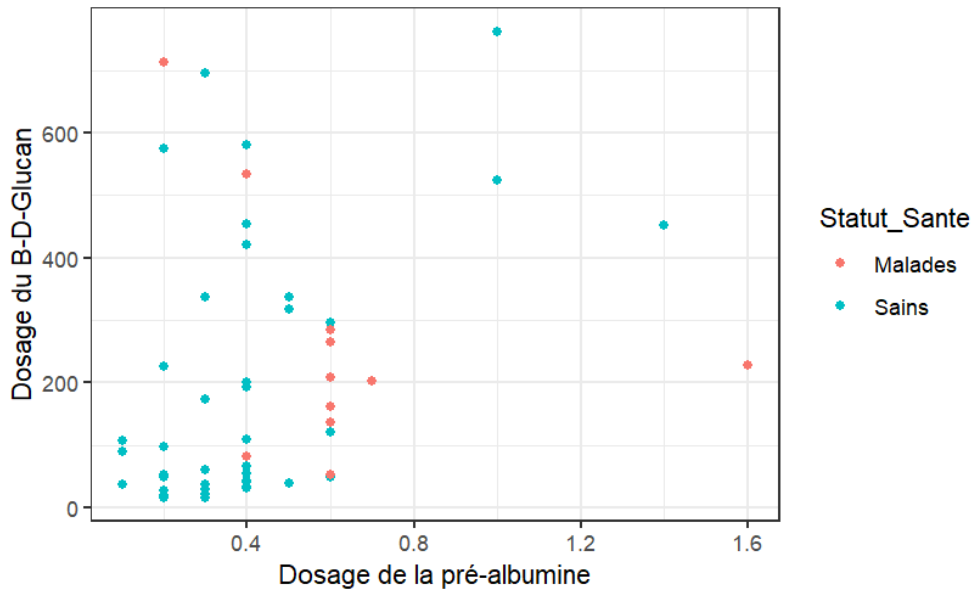




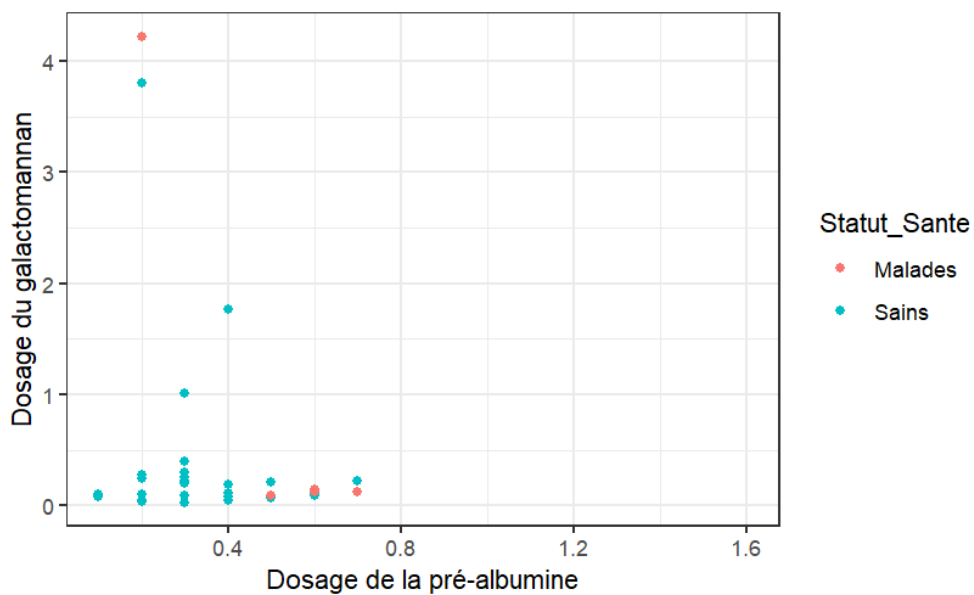
Comparaison des résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate et du dosage de la fraction en pré-albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à -0,02



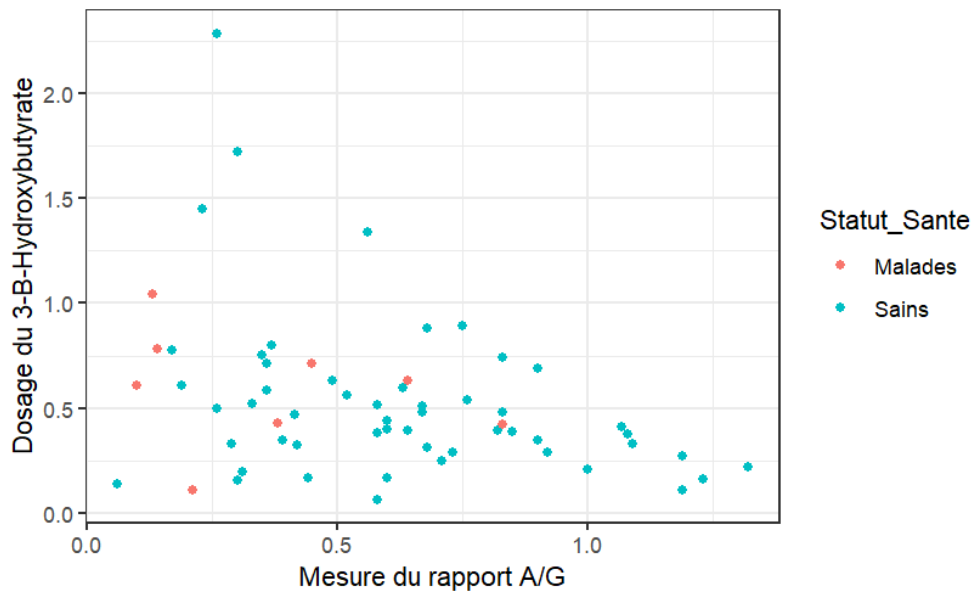
Comparaison des résultats du dosage des protéines totales et du dosage de la fraction en pré-albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,53



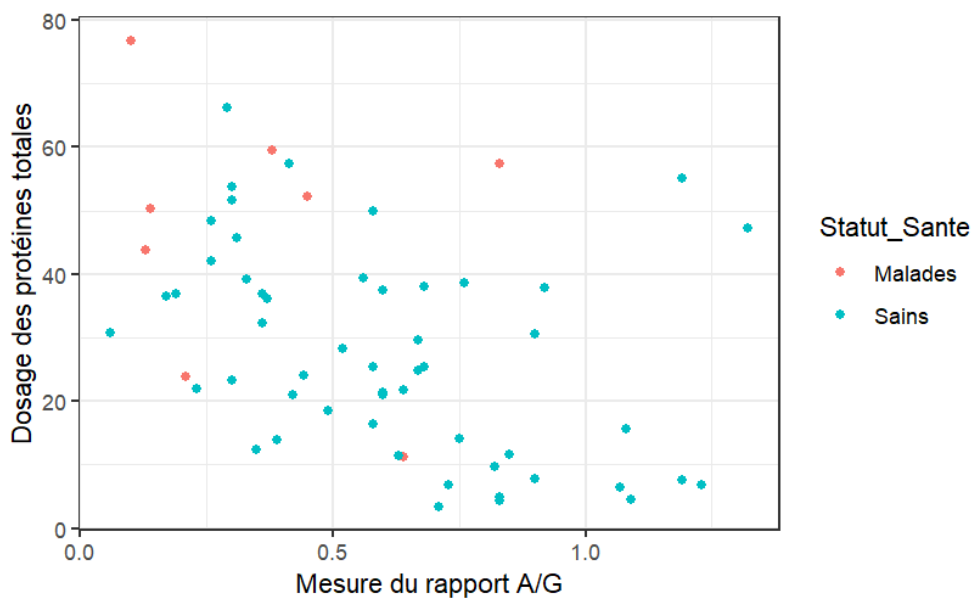
Comparaison des résultats du test Fungitel<sup>TM</sup> et du dosage de la fraction en pré-albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,38



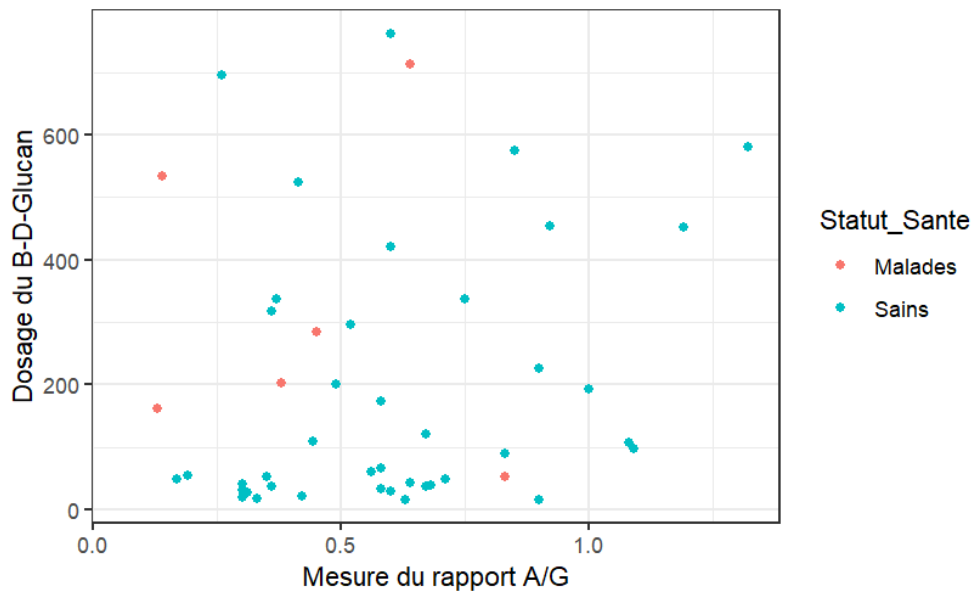
Comparaison des résultats du test Platelia<sup>TM</sup> et du dosage de la fraction en pré-albumine pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à -0,07



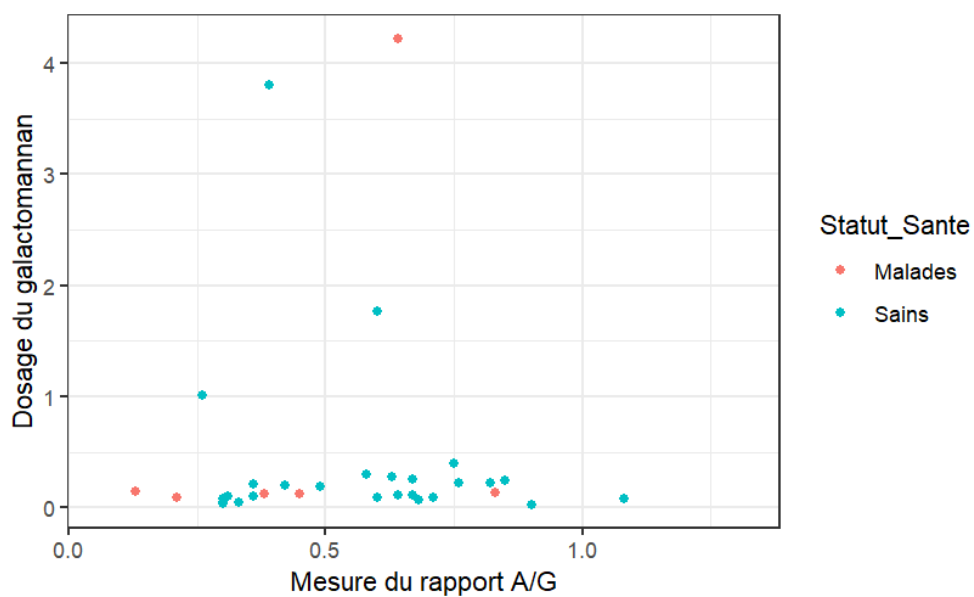
Comparaison des résultats de la mesure du rapport A/G et du dosage du 3-hydroxybutyrate pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à  $-0,3$



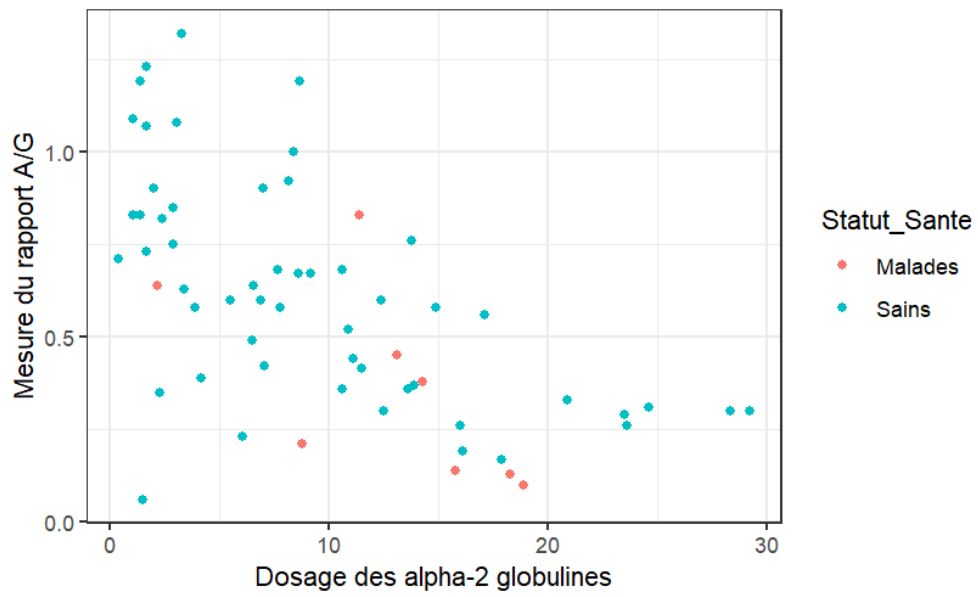
Comparaison des résultats de la mesure du rapport A/G et du dosage des protéines totales pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à  $-0,48$ .



*Comparaison des résultats de la mesure du rapport A/G et des résultats du test Fungitell™ pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,17*

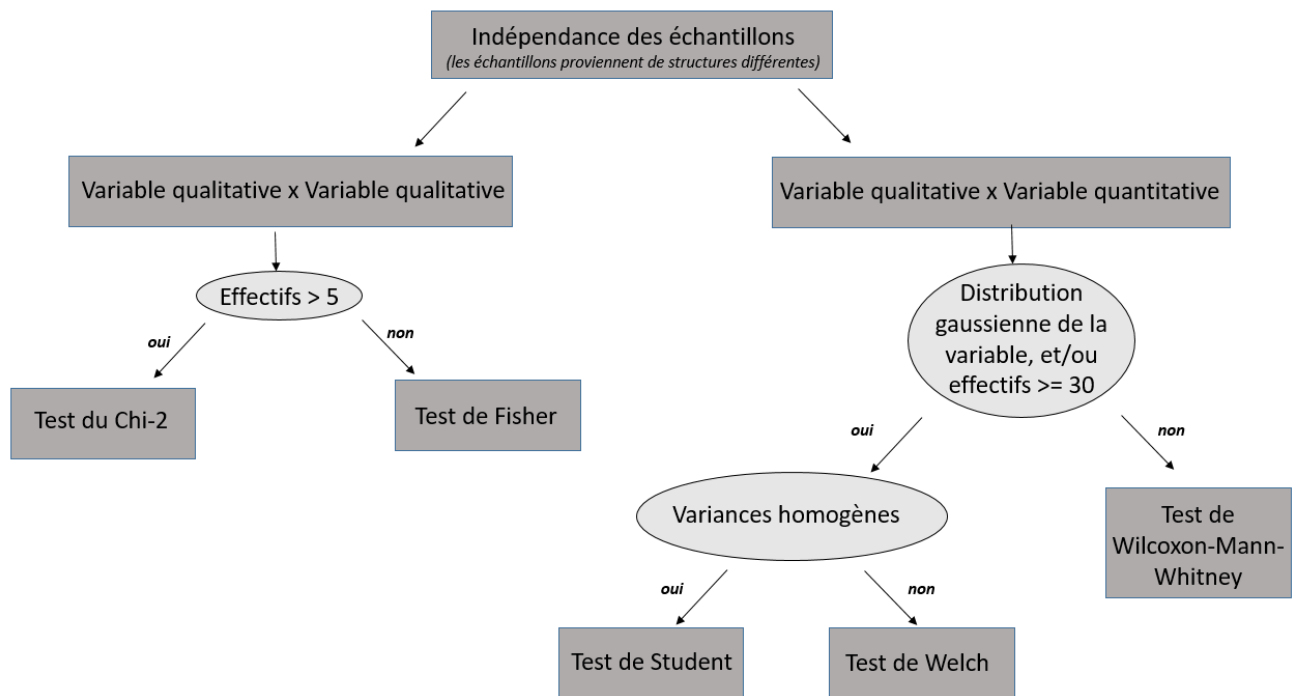


*Comparaison des résultats de la mesure du rapport A/G et des résultats du test Platelia™ pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à 0,13*



Comparaison des résultats de la mesure du rapport A/G et du dosage des  $\alpha$ 2-globulines pour l'ensemble de la cohorte. Le coefficient de Spearman associé est égal à -0,64

Annexe 11 : arbre décisionnel concernant le choix des tests statistiques utilisés dans le traitement des données



Annexe 12 : mode opératoire illustré de la réalisation en laboratoire du test  
Fungitell™

Matériel nécessaire : Micropipettes avec cônes adaptés « Pyroclear® » - pipette multi-distributrice – Agitateur de type « vortex » - Pyrotubes® – Plaque « Pyroplate » 96 puits – Portoir pour tubes à hémolyse – Parafilm® – Lecteur de plaque thermostaté équipé de filtre de 405 nm et de 492 nm – Gants – Chronomètre – Coffret Fungitell™

Contenu du kit Fungitell™ :



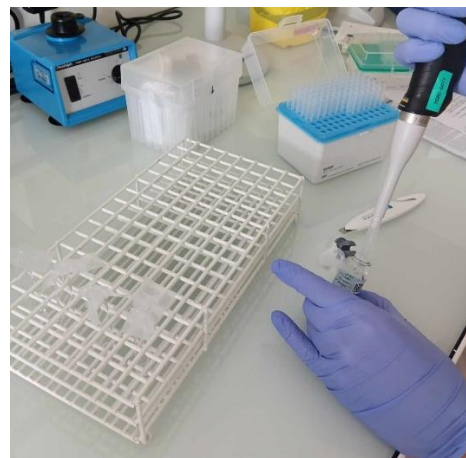
(1) *Glucan standard lyophilisé ; (2) Tampon de reconstitution au Pyrosol ; (3) Réactif Fungitell lyophilisé ; (4) Eau pure pour analyse EPA ; (5) Solution de pré-traitement*

Etapes pré-analytiques

- Placer les échantillons à température ambiante.
- Allumer le lecteur de plaque et le paramétrer (température à 37°C).

Etapes analytiques

Pour chaque analyse, les bouchons des flacons fournis dans le kit sont retirés et remplacés par des bandes de parafilm afin de faciliter les manipulations et ainsi diminuer le risque de contamination.



**a) Préparation de la « gamme étalon glucan »** : l'objectif est d'obtenir 4 solutions à concentrations décroissantes de glucan standard.

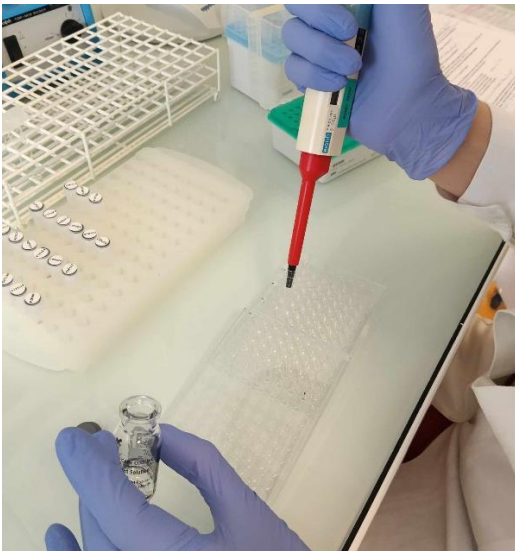
Plaque 1 - Plaque 1		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A													
B		SGE 1											
C		SGE 2											
D		SGE 3											
E		SGE 4											
F		SGE 5											
G		échantillon négatif											
H													

- Mise en solution du glucan standard à l'aide 2,9 mL d'EPA. Cela permet d'obtenir la solution 1 à une concentration de 100 pg/mL.
- Préparation de 4 tubes Pyrosol qui contiendront les 4 autres solutions constituant la gamme étalon.
- Dans le premier tube sont mélangés 500 µL de la solution 1 avec 500 µL d'EPA. Cela constitue la solution 2 (50 pg/mL).
- Dans le deuxième tube sont mélangés 500 µL de la solution 2 avec 500 µL d'EPA. Cela constitue la solution 3 (25 pg/mL).
- Dans le troisième tube sont mélangés 500 µL de la solution 3 avec 500 µL d'EPA. Cela constitue la solution 4 (12,5 pg/mL).
- Enfin, dans le quatrième tube sont mélangés 500 µL de la solution 4 avec 500 µL d'EPA. Cela constitue la solution 5 (6,25 pg/mL).

**(b) Définition du plan de plaque et configuration sur le logiciel.**

Chaque échantillon est analysé deux fois et les deux puits contenant le même échantillon sont situés côte à côte.

SGE : « Solution Gamme Etalon » ; de 1 à 5



**c) Ajout des échantillons de sérum et de la solution alcaline de pré-traitement :** après avoir mélangé doucement le flacon de solution alcaline en réalisant des petits 8 sur la table, ajout de 20 µL de la solution dans chacun des puits des échantillons, à l'exception de ceux de la gamme étalon (*photographie de gauche*). Chaque échantillon est ensuite vortexé 30 secondes. Puis deux prélèvements de 5 µL sont réalisés pour chaque échantillon et chaque prélèvement est placé dans le puits correspondant selon le plan de plaque défini à l'étape b) (*photographie de droite*).



**d) Incubation de la plaque** : la plaque est agitée pendant 5 à 10 secondes avant d'être incubée pendant 10 minutes à 37°C dans le lecteur de la plaque.

**e) Reconstitution du réactif Fungitell** : en parallèle, le réactif Fungitell est reconstitué. Pour cela, à l'aide de la pipette de 1000 µL, 2,8 mL d'EPA et 2,8 mL du tampon Pyrosol sont ajoutés dans le flacon du réactif Fungitell lyophilisé. Le flacon est mélangé en lui inscrivant des mouvements de « 8 » sur la paillasse.



**f) Ajout des contrôles négatifs et des étalons** : la plaque est ensuite complétée avec les éléments manquants. Tout d'abord, 25 µL de l'EPA sont ajoutés dans chaque puits des deux contrôles négatifs. Ensuite, 25 µL de chaque solution de la gamme étalon sont ajoutés dans les puits « SGE » selon le plan de plaque.

**g) Ajout du réactif Fungitell** : un cône est ensuite apposé de manière stérile sur la pipette multi-distributrice. Le réactif Fungitell est d'abord homogénéisé à l'aide de la pipette, puis 100 µL sont placés dans chaque puits.

**h) Lecture** : La plaque est ensuite insérée dans le lecteur de microplaque pendant 50 minutes, à une température de 37°C. La lecture de la plaque est réalisée par le logiciel.

## Annexe 13 : mode opératoire illustré de la réalisation en laboratoire du test Platelia™

Matériel nécessaire : Pipettes à volumes variables (10-1000 µL) et cônes adaptés stériles – microtubes coniques en polypropylène stériles de 1,5 mL - pipette multi-distributrice – Seringues de 2,5 mL et 5 mL - Agitateur de type « vortex » - Récipient pour bain-marie et plaque chauffante – Portoir flottant – Portoir pour microtubes de 1,5 mL et portoir pour tubes de 5 mL – Pot étanche de 100 mL – Centrifugeuse pour microtubes – Incubateur sec de microplaques - Lecteur de plaque équipé de filtre de 450 nm et de 620/630 nm – Coffret Platelia™

Contenu du kit Platelia™ :



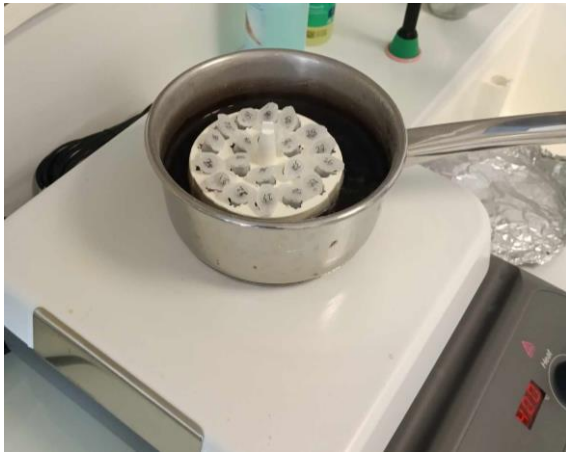
(1) *Sérum de contrôle négatif* ; (2) *Sérum de contrôle seuil* ; (3) *Sérum de contrôle positif* ; (4)  
*Solution de chromogène TMB*

*Non présentés sur la photographie : Microplaque constituée de 12 barrettes non sécables – Solution de lavage – Solution de traitement des échantillons – Solution d'arrêt – Conjugué.*

### Etapes pré-analytiques

- Placer les échantillons et le kit à température ambiante.
- Allumer l'incubateur de microplaque et le paramétrer (température à 37°C).
- Préparation de la solution de lavage : dans le pot de 100 mL, diluer 5 mL de la solution de lavage dans 95 mL d'eau stérile.
- Préparer la feuille de travail.

### Etapes analytiques :



### **a) Traitement des échantillons**

- Disposer sur un portoir les tubes de 1,5 mL. Il est nécessaire de préparer autant de tubes qu'il y a d'échantillons à analyser + 3 tubes (qui contiendront chacun l'une des 3 solutions-contrôles).
- Dans chaque tube sont ajoutés 150  $\mu\text{L}$  :
  - Soit du sérum du prélèvement à analyser,
  - Soit de la solution-contrôle :
    - Sérum de contrôle négatif
    - Sérum de contrôle seuil
    - Sérum de contrôle positif
- Dans chaque tube est ajouté 50  $\mu\text{L}$  de la solution de traitement. Le tube est ensuite identifié, vortexé pendant 30 secondes et placé sur le portoir flottant.
- Le portoir est ensuite mis au bain-marie pendant 3 minutes (*photographie de gauche*).
- Enfin, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 10 000g (*photographie de droite*).



### **(b) Distribution des échantillons**

- Disposer un cadre adapté le nombre adéquat de barrettes et distribuer dans chaque cupule 50  $\mu\text{L}$  de conjugué.
- En suivant le plan de la feuille de travail, ajouter 50  $\mu\text{L}$  de solution-contrôle ou des échantillons traités selon la cupule concernée.
- Disposer un film adhésif sur la microplaque et la déposer dans l'incubateur réglé sur 37°C pendant 90 minutes.

### **c) Lavage :**

- Après avoir retiré le film adhésif, retourner la microplaque pour vider le contenu des cupules puis la tapoter sur un papier absorbant.
- Distribuer à l'aide de la micropipette 300  $\mu\text{L}$  de solution de lavage dans chaque cupule. Vider puis égoutter à nouveau.

- Ré-itérer 4 fois les 2 étapes de lavage.

**d) Révélation :**

- Ajouter 200  $\mu$ L de la solution chromogène de TMB dans chaque puits puis incuber la plaque à l'obscurité pendant 30 minutes.
- A l'issue des 30 minutes, ajouter 100  $\mu$ L de la solution d'arrêt dans chaque puits.

**e) Lecture :** La plaque est ensuite insérée dans le lecteur de microplaque pour lecture de la densité optique de chaque puits à 450 nm.

Annexe 14 : échelle de condition corporelle des oiseaux utilisée pour scorer l'état d'embonpoint des individus de l'étude



- ① Oiseau émacié – muscle pectoral concave et bréchet très saillant
- ② Oiseau maigre – muscle pectoral plus ou moins plat et bréchet saillant
- ③ Oiseau de corpulence normale – muscle pectoral convexe et bréchet moins saillant
- ④ Oiseau en surpoids – muscle pectoral développé
- ⑤ Oiseau obèse – muscle pectoral très développé et bréchet difficile à palper

Annexe 15 : exemples de scripts réalisés sur le logiciel R pour l'analyse statistique des données obtenues lors de l'étude

**Script concernant l'import de la base de données :**

## Import base de données

2024-05-28

### Import de la base de données initiale

#### Chargement des packages nécessaires

```
library(tidyverse) library(conflicted) conflict_prefer("filter","dplyr")  
conflict_prefer("lag","dplyr")
```

#### Chargement de la base de données initiale

```
BDD_Init<-read.csv2("~/VET6/Thèse  
rangée/These_R/Formation_R/BDD/BDD_definitive_pour_R.csv"),header=TRUE,sep=";",  
dec="," ,fileEncoding="Latin1")
```

### Création de la base de données de travail

#### Flow-chart: retrait des individus n'appartenant pas au taxon des oiseaux marins

```
BDD_travail<-BDD_Init %>% filter(Taxon==1) head(BDD_travail)
```

#### Retrait des colonnes concernant les signes cliniques, inutiles dans notre analyse

```
BDD_travail<-BDD_travail %>% select(Code_Oniris,Taxon,  
Age_Precis,Age_estime,Sexe,Groupe,Date_prelevement,  
Prospectif_retrospectif,Score_Corporel,Examen_complementaire,  
Proteines_Totales,Hematocrite,Buffy_Coat,Antifongique,Antibiotique,Radiographie  
s,Scanner,Autopsie,Date_Autopsie,Jour_Analyse_Serum,Ref_Gel,Hemolyse,Lipemie,Fi  
brine,Proteines_Totales_Experience,Pre_Albumine_Experience,Albumine,Alpha_1,Alp  
ha_2,Alpha_total,Beta,Rapport_A_G,Gamma,Galactomannan,B_D_Glucan_min,B_D_Glucan  
_max,B_D_Glucan_moyen,B_Hydroxybutyrate,Jour_Culture,Culture_Realisee,Culture_P  
ositive,Histologie_Realisee,Histologie_Positive,Jour_Asplfd,Asplfd,Analyse_Prot  
eomique,Qualite_Replissage_Cas,Cas_Fiable)
```

## Création des bases de données utiles pour l'analyse, à partir de la base de données de travail

### Création de la base de données des individus malades

```
BDD_travail_malades <- BDD_travail %>% filter(Groupe==4|Groupe==3)
head(BDD_travail_malades)
```

### Création de la base de données des individus sains

```
BDD_travail_sains <- BDD_travail %>% filter(Groupe==1|Groupe==2)
head(BDD_travail_sains)
```

## Création des variables utiles pour l'analyse

### Création de la variable qui désigne chaque individu comme appartenant au groupe témoin (sains + traumatique) ou appartenant au groupe malade (aspergillose confirmée ou suspectée).

```
BDD_travail <- BDD_travail %>%
mutate(Statut_Sante=ifelse(BDD_travail$Groupe==1,"Sains",
ifelse(BDD_travail$Groupe==2,"Sains",
ifelse(BDD_travail$Groupe==3,"Malades","Malades"))))
```

### Création de la variable "statut de santé" en version numérique

```
BDD_travail<-BDD_travail %>%
mutate(Statut_Sante_Num=ifelse(Statut_Sante=="Sains",0,1))
```

## Script concernant l'analyse univariée du $\beta$ -D-glucane :

### Analyses univariées concernant le dosage du B-D-Glucane

2024-06-11

#### Analyse statistique descriptive concernant tous les individus

**Obtention d'un résumé des paramètres statistiques de l'analyse descriptive :  
moyenne, écart-type, médiane, minimum et maximum**

```
Desc_B_D_Glucan <- BDD_travail_prov %>%  
summarise(B_D_Glucan_Moy=mean(B_D_Glucan, na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan_sd=sd(B_D_Glucan, na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan6_med=median(B_D_Glucan,na.rm=TRUE), B_D_Glucan_Min=min(B_D_Glucan,  
na.rm=TRUE), B_D_Glucan_Max=max(B_D_Glucan, na.rm=TRUE)) head(Desc_B_D_Glucan)
```

#### Obtention des quantiles

```
Quartiles_B_D_Glucan_TI <- BDD_travail_prov %>%  
summarise(Q1_B_D_Glucan_TI=quantile(B_D_Glucan,na.rm=TRUE,probs=0.25),Q3_B_D_G  
lucan_TI=quantile(B_D_Glucan,na.rm=TRUE,probs=0.75))  
head(Quartiles_B_D_Glucan_TI)
```

#### Représentation graphique des résultats sous forme d'un histogramme

```
library(ggplot2) library(scales) Graph_B_D_Glucan_TI<-  
ggplot(BDD_travail_prov)+aes(x=B_D_Glucan) +  
geom_histogram(binwidth=10,color="black",fill="white")  
Graph_B_D_Glucan_TI+theme_bw()
```

#### Transformation logarithmique de la variable

```
BDD_travail_prov <- BDD_travail_prov %>% mutate(log_B_D_Glucan=log(B_D_Glucan))  
head(BDD_travail_prov)
```

#### Analyse statistique descriptive concernant les individus malades

**Obtention d'un résumé des paramètres statistiques de l'analyse descriptive :  
moyenne, écart-type, médiane, minimum et maximum**

```
Desc_B_D_Glucan_M <- BDD_travail_malades %>%  
summarise(B_D_Glucan_M_Moy=mean(B_D_Glucan, na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan_M_sd=sd(B_D_Glucan, na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan_M_med=median(B_D_Glucan,na.rm=TRUE),
```



```
B_D_Glucan_M_Min=min(B_D_Glucan, na.rm=TRUE), B_D_Glucan_M_Max=max(B_D_Glucan, na.rm=TRUE)) head(Desc_B_D_Glucan_M)
```

### Obtention des quantiles

```
Quartiles_B_D_Glucan_M <- BDD_travail_malades %>%  
summarise(Q1_B_D_Glucan_M=quantile(B_D_Glucan,na.rm=TRUE,probs=0.25),Q3_B_D_Glucan_M=quantile(B_D_Glucan,na.rm=TRUE,probs=0.75))  
head(Quartiles_B_D_Glucan_M)
```

### Représentation graphique des résultats sous forme d'un histogramme

```
library(ggplot2) library(scales) Graph_B_D_Glucan_M<-  
ggplot(BDD_travail_malades)+aes(x=B_D_Glucan) +  
geom_histogram(binwidth=10,color="black",fill="white")  
Graph_B_D_Glucan_M+theme_bw()
```

### Transformation logarithmique de la variable

```
BDD_travail_malades <- BDD_travail_malades %>%  
mutate(log_B_D_Glucan=log(B_D_Glucan)) head(BDD_travail_malades)
```

## Analyse statistique descriptive concernant les individus témoins

### Obtention d'un résumé des paramètres statistiques de l'analyse descriptive : moyenne, écart-type, médiane, minimum et maximum

```
Desc_B_D_Glucan_S <- BDD_travail_sains %>%  
summarise(B_D_Glucan_S_Moy=mean(B_D_Glucan, na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan_S_sd=sd(B_D_Glucan, na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan_S_med=median(B_D_Glucan,na.rm=TRUE),  
B_D_Glucan_S_Min=min(B_D_Glucan, na.rm=TRUE), B_D_Glucan_S_Max=max(B_D_Glucan, na.rm=TRUE)) head(Desc_B_D_Glucan_S)
```

### Obtention des quantiles

```
Quartiles_B_D_Glucan_S <- BDD_travail_sains %>%  
summarise(Q1_B_D_Glucan_S=quantile(B_D_Glucan,na.rm=TRUE,probs=0.25),Q3_B_D_Glucan_S=quantile(B_D_Glucan,na.rm=TRUE,probs=0.75))  
head(Quartiles_B_D_Glucan_S)
```

### Représentation graphique des résultats sous forme d'un histogramme

```
library(ggplot2) library(scales) Graph_B_D_Glucan_S<-  
ggplot(BDD_travail_sains)+aes(x=B_D_Glucan) +  
geom_histogram(binwidth=10,color="black",fill="white")  
Graph_B_D_Glucan_S+theme_bw()
```

## Transformation logarithmique de la variable

```
BDD_travail_sains <- BDD_travail_sains %>%  
mutate(log_B_D_Glucan=log(B_D_Glucan)) head(BDD_travail_sains)
```

## Comparaison des moyennes du groupe des individus témoins et du groupe des individus malades

L'objectif de cette partie est de déterminer si les moyennes obtenues concernant la mesure du B-D-glucane entre les individus témoins et les individus malades sont effectivement statistiquement différentes. Un test statistique est donc réalisé.

### Indépendance des échantillons

La première condition à vérifier est l'indépendance des échantillons. Les individus des deux groupes proviennent de structures différentes, l'indépendance est donc acceptée.

### Distribution de la variable

La deuxième condition à vérifier est la distribution de la variable. Un test de shapiro est réalisé afin de déterminer si la distribution de la variable quantitative suit, ou non, une loi normale.

```
tapply(BDD_travail_prov$B_D_Glucan, BDD_travail_prov$Statut_Sante,  
shapiro.test)
```

La distribution ne suit pas une loi normale, il est donc inutile de vérifier l'homogénéité des variances.

### Réalisation du test non paramétrique

Comme la variable ne suit pas une loi normale, un test non paramétrique est réalisé.

```
wilcox.test(BDD_travail_prov$B_D_Glucan,BDD_travail_prov$Statut_Sante_Num)
```

La p-value du test est inférieure à 0.05, les moyennes obtenues lors du dosage du B-D-glucan ne sont donc pas significativement différentes entre les individus du groupe des malades et les individus du groupe témoin.

## Représentation graphique des résultats au test du B-D-glucane parmi les individus du groupe témoin et du groupe malade, sous forme d'un boxplot

```
Boxplot_B_D_Glucan<-ggplot(BDD_travail_prov)+aes(x=Statut_Sante, y=B_D_Glucan)  
+ geom_boxplot(outlier.colour="black", outlier.shape=20,outlier.size=4,  
fill='#99CCFF', color="black")+ stat_summary(fun.y=mean, geom="point",  
shape=16, size=4, col="red")+ xlab("Statut de sante")+
```

```
ylab("Résultat test B_D_Glucan") Boxplot_B_D_Glucan+theme_bw()
```

## **Etude du niveau de B-D-glucane chez les animaux de l'étude par rapport au seuil utilisé en médecine humaine. Ce seuil de 80 désigne un test comme "positif"**

### **Création de la variable qui désigne chaque individu comme positif ou négatif au test du B\_D\_Glucane, selon le seuil de la médecine humaine**

```
BDD_travail_prov <- BDD_travail_prov %>%  
mutate(B_D_Glucan_seuil_MH=ifelse(BDD_travail_prov$B_D_Glucan<80,0,1))
```

### **Réalisation du tableau de contingence à partir de la variable précédemment créée**

```
library(gmodels)  
CrossTable(BDD_travail_prov$B_D_Glucan_seuil,BDD_travail_prov$Statut_Sante)
```

### **Vérification des conditions d'application afin de choisir le test statistique adéquat**

La première condition à vérifier est l'indépendance des échantillons. Les individus des deux groupes proviennent de structures différentes, l'indépendance est donc acceptée. Cependant, les effectifs théoriques des différents groupes ne sont pas tous supérieurs à 5, Le test du Chi-2 n'est pas applicable, le test de Fisher est donc utilisé.

```
CrossTable(BDD_travail_prov$B_D_Glucan_seuil,BDD_travail_prov$Statut_Sante,  
digits=3, max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE,  
fisher=TRUE, mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE,  
prop.c=FALSE,resid=FALSE, sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE,  
format=c("SAS", "SPSS"))
```

La p-value obtenue au test de Fisher est supérieure à 0,05, il est donc possible de conclure qu'il n'y a pas de lien significatif entre le statut de santé des individus et les résultats au test au B-D-glucane avec le seuil appliqué en médecine humaine.

### **Représentation graphique des effectifs témoins/malades et des résultats au test du B\_D\_Glucane selon le seuil de la médecine humaine.**

```
Boxplot_B_D_Glucan<-ggplot(BDD_travail_prov)+aes(x=Statut_Sante, y=B_D_Glucan)  
+ geom_boxplot(outlier.colour="black", outlier.shape=20,outlier.size=4,  
fill='#99CCFF', color="black")+ stat_summary(fun.y=mean, geom="point",  
shape=16, size=4, col="red")+ xlab("Statut de sante")+
```

```
ylab("Résultat test B_D_Glucan") Boxplot_B_D_Glucan+theme_bw()
```

### **Comparaison des effectifs parmi les individus témoins et les individus malades qui présentent un résultat positif ou négatif au test du B-D-glucane selon le seuil utilisé en médecine humaine**

```
Comparaison_B_Glucan<-ggplot(BDD_travail_prov) + aes(x = Statut_Sante,fill =  
B_D_Glucan_seuil_MH) + geom_bar(position="dodge") + xlab("Statut de santé") + ylab("Effectifs")  
+ labs(fill = "Résultat test B_D_Glucan") Comparaison_B_Glucan+theme_bw()
```

### **Etude du niveau de B-D-glucane chez les animaux de l'étude par rapport à l'un des seuils rapportés en bibliographie pour les oiseaux aquatiques. Création de la variable qui désigne chaque individu comme positif ou négatif au test du B\_D\_Glucane, selon le seuil de la bibliographie**

```
BDD_travail_prov <- BDD_travail_prov %>%  
mutate(B_D_Glucan_seuil_biblio=ifelse(BDD_travail_prov$B_D_Glucan<461,0,1))
```

### **Réalisation du tableau de contingence à partir de la variable précédemment créée**

```
library(gmodels)  
CrossTable(BDD_travail_prov$B_D_Glucan_seuil_biblio,BDD_travail_prov$Statut_San  
te)
```

### **Vérification des conditions d'application afin de choisir le test statistique adéquat**

La première condition à vérifier est l'indépendance des échantillons. Les individus des deux groupes proviennent de structures différentes, l'indépendance est donc acceptée. Cependant, les effectifs théoriques des différents groupes ne sont pas tous supérieurs à 5, Le test du Chi-2 n'est pas applicable, le test de Fisher est donc utilisé.

```
CrossTable(BDD_travail_prov$B_D_Glucan_seuil_biblio,BDD_travail_prov$Statut_San  
te, digits=3, max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE,  
fisher=TRUE, mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE,  
prop.c=FALSE,resid=FALSE, sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE,  
format=c("SAS", "SPSS"))
```

La p-value obtenue au test de Fisher est supérieure à 0,05, il est donc possible de conclure qu'il n'y a pas de lien significatif entre le statut de santé des individus et les résultats au test au B-D-glucane avec le seuil provenant de la bibliographie

### **Etude du niveau de B-D-glucane chez les animaux de l'étude par rapport au seuil utilisé en médecine humaine. Ce seuil de 60 désigne un test comme "douteux"**

#### **Création de la variable qui désigne chaque individu comme positif ou négatif au test du B\_D\_Glucane, selon le seuil "douteux" de la médecine humaine**

```
BDD_travail_prov <- BDD_travail_prov %>%  
mutate(B_D_Glucan_seuil_MH_bis=ifelse(BDD_travail_prov$B_D_Glucan<60,0,1))
```

### **Réalisation du tableau de contingence à partir de la variable précédemment créée**

library

```
CrossTable(BDD_travail_prov$B_D_Glucan_seuil_MH_bis,BDD_travail_prov$Statut_Sante)
```

### Vérification des conditions d'application afin de choisir le test statistique adéquat

La première condition à vérifier est l'indépendance des échantillons. Les individus des deux groupes proviennent de structures différentes, l'indépendance est donc acceptée. Cependant, les effectifs théoriques des différents groupes ne sont pas tous supérieurs à 5, Le test du Chi-2 n'est pas applicable, le test de Fisher est donc utilisé.

```
CrossTable(BDD_travail_prov$B_D_Glucan_seuil_MH_bis,BDD_travail_prov$Statut_Sante, digits=3, max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE, fisher=TRUE, mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE, prop.c=FALSE,resid=FALSE, sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE, format=c("SAS", "SPSS"))
```

La p-value obtenue au test de Fisher est supérieure à 0,05, il est donc possible de conclure qu'il n'y a pas de lien significatif entre le statut de santé des individus et les résultats au test au B-D-glucose avec le seuil "douteux" de la médecine humaine.

**Script concernant l'analyse bivariée du test Asp-LFD par rapport à l'analyse histologique :**

## **Analyse bivariée de la détection de la mannoprotéine et de l'analyse histologique**

2024-10-07

### **Réalisation de la table de contingence brute présentant les résultats croisés de la culture fongique et du test Asp-LFD**

#### **Création de la variables Culture\_Pos\_Neg**

```
BDD_travail <- BDD_travail %>% mutate  
(Culture_Pos_Neg=ifelse(Culture_Positive=="1", "Culture Positive", "Culture  
Negative"))
```

#### **Création des variables de l'Asp-LFD**

**Création de la variable qui indique que l'animal est négatif au test de l'Asp-LFD lorsque le score obtenu est égal à 0 (absence de trait)**

```
BDD_travail <- BDD_travail %>% mutate (Asp_Pos_Neg_v1=ifelse(Asplfd=="0", "Asp  
Négatif", "Asp Positive"))
```

**Création de la variable qui indique que l'animal est négatif au test de l'Asp-LFD lorsque le score obtenu est égal à 0 ou 1 (trait absent ou de faible intensité)**

```
BDD_travail <- BDD_travail %>% mutate (Asp_Pos_Neg_v2=ifelse(Asplfd=="0" |  
Asplfd=="1", "Asp Négatif", "Asp Positive"))
```

### **Réalisation de la table de contingence de la 1ère version de la variable Asp\_Pos\_Neg (lorsque l'animal est considéré comme négatif au test de l'Asp-LFD quand le score obtenu au test est égal à 0)**

```
library(gmodels)  
CrossTable(BDD_travail$Culture_Pos_Neg,BDD_travail$Asp_Pos_Neg_v1, digits=3,  
max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE, fisher=FALSE,  
mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE, prop.c=FALSE,resid=FALSE,  
sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE, format=c("SAS","SPSS"))
```

### **Réalisation de la table de contingence de la 2ème version de la variable Asp\_Pos\_Neg (lorsque l'animal est considéré comme négatif au test de l'Asp-LFD quand le score obtenu au test est égal à 0 ou 1)**

```
library(gmodels)  
CrossTable(BDD_travail$Culture_Pos_Neg,BDD_travail$Asp_Pos_Neg_v2, digits=3,  
max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE, fisher=FALSE,  
mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE, prop.c=FALSE,resid=FALSE,  
sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE, format=c("SAS","SPSS"))
```

## Réalisation des tests statistiques

### Indépendance des échantillons

La première condition à vérifier est l'indépendance des échantillons. Les individus des deux groupes proviennent de structures différentes, l'indépendance est donc acceptée.

### Choix du test statistique

Les effectifs de chacune des catégories ne sont pas tous supérieurs à 5, le test du Chi-2 ne peut donc pas être mené. Le test de FISHER est donc appliqué.

#### Test de FISHER pour la 1ère situation : l'animal est considéré comme négatif lorsque le score obtenu au test Asp-LFD est égal à 0

```
CrossTable(BDD_travail$Culture_Pos_Neg,BDD_travail$Asp_Pos_Neg_v1, digits=3,
max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE, fisher=TRUE,
mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE, prop.c=FALSE,resid=FALSE,
sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE, format=c("SAS","SPSS"))
```

La p-value est égale à  $0.02 < 0.05$  ; il existe un lien significatif entre les résultats de l'analyse histologique et du test de l'Asp-LFD. Un animal présentant des résultats histologiques positifs aura plus de chance d'obtenir un test Asp-LFD positif.

#### Test de FISHER pour la 2ème situation : l'animal est considéré comme négatif lorsque le score obtenu au test Asp-LFD est égal à 0 ou 1

```
library(gmodels)
```

```
CrossTable(BDD_travail$Culture_Pos_Neg,BDD_travail$Asp_Pos_Neg_v2, digits=3,
max.width = 5,prop.t=FALSE, prop.chisq=FALSE, chisq = FALSE, fisher=TRUE,
mcnemar=FALSE,expected=TRUE, prop.r=FALSE, prop.c=FALSE,resid=FALSE,
sresid=FALSE, asresid=FALSE,missing.include=FALSE, format=c("SAS","SPSS"))
```

La p-value est égale à  $0.02 < 0.05$  ; il existe un lien significatif entre les résultats de l'analyse histologique et du test de l'Asp-LFD. Un animal présentant des résultats histologiques positifs aura plus de chance d'obtenir un test Asp-LFD positif.

## Script concernant l'analyse bivariée de quelques tests quantitatifs :

### Analyse bivariée du dosage de l'albumine

2024-06-21

#### Etude de la relation entre le dosage de l'albumine et du 3-B-hydroxybutyrate

##### Représentation graphique des résultats sous forme d'un nuage de points

```
Bivar_Albumine_Hydroxy<-ggplot(BDD_travail)+aes(x=Albumine,  
y=B_Hydroxybutyrate,color=Statut_Sante) + geom_point() + xlab("Dosage de  
l'albumine")+ ylab("Dosage du 3-B-Hydroxybutyrate")  
Bivar_Albumine_Hydroxy+theme_bw()
```

##### Calcul du coefficient de corrélation de Spearman

```
cor(BDD_travail$Albumine,  
BDD_travail$B_Hydroxybutyrate,use="complete.obs",method="spearman")
```

##### Calcul de la significativité du coefficient de Spearman.

```
cor.test(BDD_travail$Albumine,BDD_travail$B_Hydroxybutyrate,alternative="two.sided",methode="spearman",exact="NULL")
```

#### Etude de la relation entre le dosage de l'albumine et des protéines totales

##### Représentation graphique des résultats sous forme d'un nuage de points

```
Bivar_Albumine_PT<-ggplot(BDD_travail)+aes(x=Albumine,  
y=Proteines_Totales_Experience,color=Statut_Sante) + geom_point() +  
xlab("Dosage de l'albumine")+ ylab("Dosage des protéines totales")  
Bivar_Albumine_PT+theme_bw()
```

##### Calcul du coefficient de corrélation de Spearman

```
cor(BDD_travail$Albumine,  
BDD_travail$Proteines_Totales_Experience,use="complete.obs",method="spearman")
```

##### Calcul de la significativité du coefficient de Spearman.

```
cor.test(BDD_travail$Albumine,BDD_travail$Proteines_Totales_Experience,alternative="two.sided",methode="spearman",exact="NULL")
```



## Etude de la relation entre le dosage de l'albumine et du B-D-Glucane

### Représentation graphique des résultats sous forme d'un nuage de points

```
Bivar_Albumine_Glucan<-ggplot(BDD_travail)+aes(x=Albumine,  
y=B_D_Glucan_moyen,color=Statut_Sante) + geom_point() + xlab("Dosage de  
l'albumine")+ ylab("Dosage du B-D-Glucan") Bivar_Albumine_Glucan+theme_bw()
```

### Calcul du coefficient de corrélation de Spearman

```
cor(BDD_travail$Albumine,  
BDD_travail$B_D_Glucan_moyen,use="complete.obs",method="spearman")
```

### Calcul de la significativité du coefficient de Spearman.

```
cor.test(BDD_travail$Albumine,BDD_travail$B_D_glucan_moyen,alternative="two.sided",  
methode="spearman",exact="NULL")
```

## Etude de la relation entre le dosage de l'albumine et du galactomannan

### Représentation graphique des résultats sous forme d'un nuage de points

```
Bivar_Albumine_Galac<-ggplot(BDD_travail)+aes(x=Albumine,  
y=Galactomannan,color=Statut_Sante) + geom_point() + xlab("Dosage de  
l'albumine")+ ylab("Dosage du galactomannan") Bivar_Albumine_Galac+theme_bw()
```

### Calcul du coefficient de corrélation de Spearman

```
cor(BDD_travail$Albumine,  
BDD_travail$Galactomannan,use="complete.obs",method="spearman")
```

### Calcul de la significativité du coefficient de Spearman.

```
cor(BDD_travail$Albumine, BDD_travail$Galactomannan,use="complete.obs",method="
```

## Script concernant l'établissement de la courbe ROC du 3-hydroxybutyrate :

### Courbe ROC du 3-hydroxybutyrate

2024-09-16

#### Objectifs

L'objectif ici est de déterminer les seuils de dosage du 3-B-hydroxybutyrate à partir des courbes ROC dont le gold standard est l'histologie. La priorité est de conserver une bonne sensibilité afin de limiter l'occurrence de faux négatifs.

#### Chargement du package

```
install.packages("pROC") library(pROC) library(gmodels)
```

#### Graphique descriptif des résultats de l'histologie et du 3-hydroxybutyrate

```
Graph_ROC_hydroxy<-  
plot(x=BDD_travail$B_Hydroxybutyrate,BDD_travail$Histologie_Positive,ylab="Résultats de l'histologie", xlab="Résultats du dosage du 3-hydroxybutyrate")  
Graph_ROC_hydroxy+theme_bw()
```

#### Courbe ROC

##### Visualisation de la courbe ROC

```
par(pty="s") par(mfrow=c(1,1))  
roc(BDD_travail$Histologie_Positive,BDD_travail$B_Hydroxybutyrate,  
plot=TRUE,legacy.axes=TRUE,col="#377eb8",lwd=4,print.auc=TRUE)
```

##### Récupération des informations de la courbe ROC

```
head(ROC_hydroxy_data<-  
roc(BDD_travail$Histologie_Positive,BDD_travail$B_Hydroxybutyrate,legacy.axes=TRUE)) head(ROC_hydroxy_infos<-  
data.frame(tpp=ROC_hydroxy_data$sensitivities*100,fpp=(1-  
ROC_hydroxy_data$specificities)*100,Se=ROC_hydroxy_data$sensitivities,Sp=ROC_hydroxy_data$specificities,thresholds=ROC_hydroxy_data$thresholds))
```

## Calcul des indices

### Calcul du rapport de vraisemblance

```
head(ROC_hydroxy_infos$RV<-  
ifelse(ROC_hydroxy_infos$Sp!=1,ROC_hydroxy_infos$Se/(1-  
ROC_hydroxy_infos$Sp),NA))
```

### Calcul de l'indice de Youden

```
head(ROC_hydroxy_infos$IndiceYouden<-  
(ROC_hydroxy_infos$Se+ROC_hydroxy_infos$Sp)-1)
```

### Tableau des résultats

```
head(ROC_hydroxy_infos)
```

## Choix des seuils

### Maximisation de l'indice de vraisemblance

```
Max_RV_Hydroxy<-max(ROC_hydroxy_infos$RV,na.rm=TRUE) Seuil_Max_RV_Hydroxy<-  
subset(ROC_hydroxy_infos,RV==Max_RV_Hydroxy) Seuil_Max_RV_Hydroxy
```

### Maximisation de l'indice de Youden

```
Max_Youden_Hydroxy<-max(ROC_hydroxy_infos$IndiceYouden)  
Seuil_Max_Youden_Hydroxy<-  
subset(ROC_hydroxy_infos,IndiceYouden==Max_Youden_Hydroxy)  
Seuil_Max_Youden_Hydroxy
```

## Références bibliographiques

- ABAD, Ana, VICTORIA FERNÁNDEZ-MOLINA, Jimena, BIKANDI, Joseba, RAMÍREZ, Andoni, MARGARETO, Javier, SENDINO, Javier, LUIS HERNANDO, Fernando, PONTÓN, Jose, GARAIZAR, Javier et REMENTERIA, Aitor, 2010. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1 octobre 2010. Vol. 27, n° 4, pp. 155-182.
- ABRAMS, George A., PAUL-MURPHY, Joanne, RAMER, Jan C. et MURPHY, Christopher J., 2001. *Aspergillus* Blepharitis and Dermatitis in a Peregrine Falcon-Gyrfalcon Hybrid (*Falco peregrinus* × *Falco rusticolus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*. juin 2001. Vol. 15, n° 2, pp. 114-120.
- AGUT, Montserrat, 2000. Atlas of clinical fungi (2nd edn). G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras. . 2000.
- Atlas of clinical fungi (2nd edn). G.S. de Hoog, J. Guarro, J. Gené, M.J. Figueras
- AINSWORTH, G. G. (Geoffrey Clough), AUSTWICK, P. K. C. et HEALTH, Commonwealth Bureau of Animal, 1973. *Fungal diseases of animals / G.C. Ainsworth and P.K.C. Austwick*. CBAH. ISBN 978-0-85198-268-7.
- ALBERT, O., TOUBAS, D., STRADY, C., COUSSON, J., DELMAS, C., VERNET, V. et VILLENA, I., 2011. Reactivity of (1→3)-β-d-glucan assay in bacterial bloodstream infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*. novembre 2011. Vol. 30, n° 11, pp. 1453-1460.
- AMITANI, R., TAYLOR, G., ELEZIS, E. N., LLEWELLYN-JONES, C., MITCHELL, J., KUZE, F., COLE, P. J. et WILSON, R., 1995. Purification and characterization of factors produced by *Aspergillus fumigatus* which affect human ciliated respiratory epithelium. *Infection and Immunity*. septembre 1995. Vol. 63, n° 9, pp. 3266-3271.
- AQUINO, Valério R., GOLDANI, Luciano Z. et PASQUALOTTO, Alessandro C., 2007. Update on the contribution of galactomannan for the diagnosis of invasive aspergillosis. *Mycopathologia*. avril 2007. Vol. 163, n° 4, pp. 191-202.
- ARCA-RUIBAL, B., WERNERY, U., ZACHARIAH, R., BAILEY, T. A., DI SOMMA, A., SILVANOSE, C. et MCKINNEY, P., 2006. Assessment of a commercial sandwich ELISA in the diagnosis of aspergillosis in falcons. *The Veterinary Record*. 1 avril 2006. Vol. 158, n° 13, pp. 442-444.
- ATASEVER, A. et GÜMÜŞSOY, K. S., 2004. Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. février 2004. Vol. 51, n° 1, pp. 19-22.
- BARTON, J. T., DAFT, B. M., READ, D. H., KINDE, H. et BICKFORD, A. A., 1992. Tracheal Aspergillosis in 6 1/2-Week-Old Chickens Caused by *Aspergillus flavus*. *Avian Diseases*. 1992. Vol. 36, n° 4, pp. 1081-1085.
- BEAVER, J. P. et WARING, P., 1994. Lack of correlation between early intracellular calcium ion rises and the onset of apoptosis in thymocytes. *Immunology and Cell Biology*. décembre 1994. Vol. 72, n° 6, pp. 489-499.
- BECH, Claus et REINERTSEN, Randi Eidsmo (éd.), 1989. Physiology of Cold Adaptation in Birds. In : . Boston, MA : Springer US. 1989. DOI 10.1007/978-1-4757-0031-2.
- BECKMAN, B. J., HOWE, C. W., TRAMPEL, D. W., DEBEY, M. C., RICHARD, J. L. et NIYO, Y., 1994. *Aspergillus fumigatus* keratitis with intraocular invasion in 15-day-old chicks. *Avian Diseases*. 1994. Vol. 38, n° 3, pp. 660-665.

- BEERNAERT, L. A., PASMANS, F., VAN WAEYENBERGHE, L., HAESEBROUCK, F. et MARTEL, A., 2010. Aspergillus infections in birds: a review. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* octobre 2010. Vol. 39, n° 5, pp. 325-331.
- BENGOA, A., BRIONES, V., LÓPEZ, M. B. et PAYÁ, M. J., 1994. Beak infection by *Penicillium cyclopium* in a macaw (*Ara ararauna*). *Avian Diseases*. 1994. Vol. 38, n° 4, pp. 922-927.
- BLATZER, Michael, BARKER, Bridget M., WILLGER, Sven D., BECKMANN, Nicola, BLOSSER, Sara J., CORNISH, Elizabeth J., MAZURIE, Aurelien, GRAHL, Nora, HAAS, Hubertus et CRAMER, Robert A., 2011. SREBP Coordinates Iron and Ergosterol Homeostasis to Mediate Triazole Drug and Hypoxia Responses in the Human Fungal Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Genetics*. 1 décembre 2011. Vol. 7, n° 12, pp. e1002374.
- BRACKENBURY, John, 1980. Respiration and Production of Sounds by Birds. *Biological Reviews*. 1980. Vol. 55, n° 4, pp. 363-378.
- BRAKHAGE, A. A. et LIEBMANN, B., 2005. *Aspergillus fumigatus* conidial pigment and cAMP signal transduction: significance for virulence. *Medical Mycology*. mai 2005. Vol. 43 Suppl 1, pp. S75-82.
- BURCO, Julia D., ZICCARDI, Michael H., CLEMONS, Karl V. et TELL, Lisa A., 2012. Evaluation of Plasma (1→3) β-D-glucan Concentrations in Birds Naturally and Experimentally Infected with *Aspergillus fumigatus*. *Avian Diseases*. mars 2012. Vol. 56, n° 1, pp. 183-191.
- CABANA, A. L., XAVIER, M. O., MENDES, J. F., TELES, A. J., MARTINS, A. M., SILVA-FILHO, R. P. et MEIRELES, M. C. A., 2019. Applicability of the Platelia EIA® *Aspergillus* test for the diagnosis of aspergillosis in penguins. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia*. 2019. Vol. 79, n° 2, pp. 169-173.
- CABANA, Ângela L., XAVIER, Melissa O., POESTER, Vanice, KLAFFKE, Gabriel B., B.FILHO, Pedro L., MARTINS, Aryse, S.FILHO, Rodolfo P. et MEIRELES, Mário C.A., 2015. Serological monitoring of antibodies for an early diagnosis of aspergillosis in captive penguins. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. juin 2015. Vol. 35, n° 6, pp. 573-578. DOI 10.1590/S0100-736X2015000600015.
- CADENA, Jose, THOMPSON, George R. et PATTERSON, Thomas F., 2016. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infectious Disease Clinics of North America*. mars 2016. Vol. 30, n° 1, pp. 125-142.
- CAFARCHIA, Claudia, CAMARDA, Antonio, IATTA, Roberta, DANESI, Patrizia, FAVUZZI, Vincenza, DI PAOLA, Giancarlo, PUGLIESE, Nicola, CAROLI, Anna, MONTAGNA, Maria Teresa et OTRANTO, Domenico, 2014. Environmental contamination by *Aspergillus* spp. in laying hen farms and associated health risks for farm workers. *Journal of Medical Microbiology*. mars 2014. Vol. 63, n° Pt 3, pp. 464-470.
- CASTELEYN, C., CORNILLIE, P., VAN CRUCHTEN, S., VAN DEN BROECK, W., VAN GINNEKEN, C. et SIMOENS, P., 2018. Anatomy of the lower respiratory tract in domestic birds, with emphasis on respiration. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. avril 2018. Vol. 47, n° 2, pp. 89-99.
- CHAUDHARY, B. et SINGH, B., 1983. Pathogenicity of *aspergillus fumigatus* in chicks, guinea fowl, rabbits and mice. *Mykosen*. août 1983. Vol. 26, n° 8, pp. 421-429.
- CONVERSE, Kathryn A., 2007. Aspergillosis. In : *Infectious Diseases of Wild Birds*. John Wiley & Sons, Ltd. pp. 360-374.
- CRAY, Carolyn, REAVILL, Drury, ROMAGNANO, April, VAN SANT, Fern, CHAMPAGNE, Daphne, STEVENSON, Rhoda, ROLFE, Vanessa, GRIFFIN, Chris et CLUBB, Susan, 2009. Galactomannan assay and plasma protein electrophoresis findings in psittacine birds with aspergillosis. *Journal of avian medicine and surgery*. 1 juin 2009. Vol. 23, n° 2, pp. 125-135.

- CRAY, Carolyn, RODRIGUEZ, Marilyn et ZAIAS, Julia, 2007. Protein electrophoresis of psittacine plasma. *Veterinary Clinical Pathology*. mars 2007. Vol. 36, n° 1, pp. 64-72.
- CRAY, Carolyn, WATSON, Toshiba et ARHEART, Kristopher L., 2009. Serosurvey and diagnostic application of antibody titers to *Aspergillus* in avian species. *Avian Diseases*. décembre 2009. Vol. 53, n° 4, pp. 491-494.
- CRAY, Carolyn, WATSON, Toshiba, RODRIGUEZ, Marilyn et ARHEART, Kristopher L., 2009. Application of Galactomannan Analysis and Protein Electrophoresis in the Diagnosis of Aspergillosis in Avian Species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. mars 2009. Vol. 40, n° 1, pp. 64-70.
- CRESPO, R., YAMASHIRO, S. et HUNTER, D. B., 1998. Development of the thoracic air sacs of turkeys with age and rearing conditions. *Avian Diseases*. 1998. Vol. 42, n° 1, pp. 35-44.
- CROSTA, Lorenzo, 2021. Respiratory Diseases of Parrots: Anatomy, Physiology, Diagnosis and Treatment. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. mai 2021. Vol. 24, n° 2, pp. 397-418.
- DA FONSECA, Leandro Abreu, MONTIANI-FERREIRA, Fabiano, SOTO, Jeny, JONES, Michael P., ZAGAYA, Nancy et CRAY, Carolyn, 2023. Comparison of agarose gel and capillary zone electrophoresis methods with preliminary reference interval generation using capillary zone electrophoresis in bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *Veterinary Clinical Pathology*. septembre 2023. Vol. 52, n° 3, pp. 452-460.
- DENNING, David W., CADRANEL, Jacques, BEIGELMAN-AUBRY, Catherine, ADER, Florence, CHAKRABARTI, Arunaloke, BLOT, Stijn, ULLMANN, Andrew J., DIMOPOULOS, George, LANGE, Christoph, et EUROPEAN SOCIETY FOR CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES AND EUROPEAN RESPIRATORY SOCIETY, 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *The European Respiratory Journal*. janvier 2016. Vol. 47, n° 1, pp. 45-68.
- DESOUBEAUX, Guillaume, RODRIGUEZ, Marilyn, BRONSON, Ellen, SIRPENSKI, Gayle et CRAY, Carolyn, 2018. APPLICATION OF 3-HYDROXYBUTYRATE MEASUREMENT AND PLASMA PROTEIN ELECTROPHORESIS IN THE DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN AFRICAN PENGUINS (*SPHENISCUS DEMERSUS*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. septembre 2018. Vol. 49, n° 3, pp. 696-703.
- DRGONA, L., KHACHATRYAN, A., STEPHENS, J., CHARBONNEAU, C., KANTECKI, M., HAIDER, S. et BARNES, R., 2014. Clinical and economic burden of invasive fungal diseases in Europe: focus on pre-emptive and empirical treatment of *Aspergillus* and *Candida* species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2014. Vol. 33, n° 1, pp. 7-21.
- DUDAKOVA, Anna, SPIESS, Birgit, TANGWATTANACHULEEPORN, Marut, SASSE, Christoph, BUCHHEIDT, Dieter, WEIG, Michael, GROSS, Uwe et BADER, Oliver, 2017. Molecular Tools for the Detection and Deduction of Azole Antifungal Drug Resistance Phenotypes in *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews*. octobre 2017. Vol. 30, n° 4, pp. 1065-1091.
- DUNCKER, H. R., 1974. Structure of the avian respiratory tract. *Respiration Physiology*. octobre 1974. Vol. 22, n° 1-2, pp. 1-19.
- DÜRING, Daniel N., ZIEGLER, Alexander, THOMPSON, Christopher K., ZIEGLER, Andreas, FABER, Cornelius, MÜLLER, Johannes, SCHARFF, Constance et ELEMANS, Coen P. H., 2013. The songbird syrinx morphome: a three-dimensional, high-resolution, interactive morphological map of the zebra finch vocal organ. *BMC biology*. 8 janvier 2013. Vol. 11, pp. 1.

- DYKSTRA, M.J., CHARLTON, B.R., CHIN, R.P. et BARNES, H.J., 2013. Fungal infections. In : SWAYNE, D.E., GLISSON, J.R., MCDOUGALD, L.R., NOLAN, L.K., SUAREZ, D.L. et NAIR, V., *Diseases of poultry*. 13th. Iowa State Press. pp. 1077-1096.
- FAGERLAND, J. A. et ARP, L. H., 1993. Distribution and quantitation of plasma cells, T lymphocyte subsets, and B lymphocytes in bronchus-associated lymphoid tissue of chickens: age-related differences. *Regional Immunology*. 1993. Vol. 5, n° 1, pp. 28-36.
- FEDDE, M. R., 1998. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poultry Science*. août 1998. Vol. 77, n° 8, pp. 1130-1138.
- FEMENIA, Françoise, FONTAINE, Jean-Jacques, LAIR-FULLERINGER, Sybille, BERKOVA, Nadia, HUET, Dominique, TOWANOU, Narcisse, RAKOTOVAO, Faraso, GRANET, Oumaima-Ibrahim, LE LOC'H, Guillaume, ARNÉ, Pascal et GUILLOT, Jacques, 2007. Clinical, mycological and pathological findings in turkeys experimentally infected by *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathology*. juin 2007. Vol. 36, n° 3, pp. 213-219.
- FISCHER, D., VAN WAEYENBERGHE, L., CRAY, C., GROSS, M., USLEBER, E., PASMANS, F., MARTEL, A. et LIERZ, M., 2014. Comparison of diagnostic tools for the detection of aspergillosis in blood samples of experimentally infected falcons. *Avian Diseases*. décembre 2014. Vol. 58, n° 4, pp. 587-598.
- FISCHER, Dominik et LIERZ, Michael, 2015. Diagnostic Procedures and Available Techniques for the Diagnosis of Aspergillosis in Birds. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 1 juillet 2015. Vol. 24, n° 3, pp. 283-295.
- FORBES, N. A., SIMPSON, G. N. et GOUDSWAARD, M. F., 1992. Diagnosis of avian aspergillosis and treatment with itraconazole. *The Veterinary Record*. 6 juin 1992. Vol. 130, n° 23, pp. 519-520.
- GARDINER, Donald M., WARING, Paul et HOWLETT, Barbara J., 2005. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology*. 2005. Vol. 151, n° 4, pp. 1021-1032.
- GEORGIEVA, T., KOINARSKI, V., URUMOVA, V., MARUTSOV, P., CHRISTOV, T. T., NIKOLOV, J., CHAPRAZOV, T., WALSHE, K., KAROV, R., GEORGIEV, I. et KOINARSKI, Z. V., 2010. Effects of *Escherichia coli* infection and *Eimeria tenella* invasion on blood concentrations of some positive acute phase proteins (haptoglobin (PIT 54), fibrinogen and ceruloplasmin) in chickens. *Revue De Medecine Veterinaire*. 2010.
- GERMAN, Allison, SHANKLAND, Gillian, EDWARDS, J et FLACH, Edmund, 2002. Development of an indirect ELISA for the detection of serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* in captive penguins. *The Veterinary record*. 1 avril 2002. Vol. 150, pp. 513-8. DOI 10.1136/vr.150.16.513.
- GHORI, H. M. et EDGAR, S. A., 1979. Comparative susceptibility and effect of mild *Aspergillus fumigatus* infection on three strains of chickens. *Poultry Science*. janvier 1979. Vol. 58, n° 1, pp. 14-17.
- GOETTING, Valerie, LEE, Kelly A., WOODS, Leslie, CLEMONS, Karl V., STEVENS, David A. et TELL, Lisa A., 2013. Inflammatory marker profiles in an avian experimental model of aspergillosis. *Medical Mycology*. octobre 2013. Vol. 51, n° 7, pp. 696-703.
- GOLLER, F. et LARSEN, O. N., 1997. In situ biomechanics of the syrinx and sound generation in pigeons. *The Journal of Experimental Biology*. août 1997. Vol. 200, n° Pt 16, pp. 2165-2176.
- GONZÁLEZ-RAMÍREZ, Alejandra Itzel, RAMÍREZ-GRANILLO, Adrián, MEDINA-CANALES, María Gabriela, RODRÍGUEZ-TOVAR, Aída Verónica et MARTÍNEZ-RIVERA, María Angeles, 2016. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. *BMC microbiology*. 18 octobre 2016. Vol. 16, n° 1, pp. 243.

GRAVELAT, Fabrice N., BEAUVAIS, Anne, LIU, Hong, LEE, Mark J., SNARR, Brendan D., CHEN, Dan, XU, Wenjie, KRAVTSOV, Ilia, HOAREAU, Christopher M. Q., VANIER, Ghyslaine, URB, Mirjam, CAMPOLI, Paolo, AL ABDALLAH, Qusai, LEHOUX, Melanie, CHABOT, Josée C., OUIOMET, Marie-Claude, BAPTISTA, Stefanie D., FRITZ, Jörg H., NIERMAN, William C., LATGÉ, Jean Paul, MITCHELL, Aaron P., FILLER, Scott G., FONTAINE, Thierry et SHEPPARD, Donald C., 2013. Aspergillus galactosaminogalactan mediates adherence to host constituents and conceals hyphal  $\beta$ -glucan from the immune system. *PLoS pathogens*. 2013. Vol. 9, n° 8, pp. e1003575.

GREENBARG, Esther H. et SECREST, Scott A., 2016. What Is Your Diagnosis? Fungal pneumonia and aspergillosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1 mai 2016. Vol. 248, n° 9, pp. 999-1001.

GUGNANI, Harish C, 2003. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Frontiers in Bioscience*. 2003. Vol. 8, n° 6, pp. s346-357.

GUO, Ya-Ling, CHEN, Yi-Qiang, WANG, Ke, QIN, Shou-Ming, WU, Cong et KONG, Jin-Liang, 2010. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest*. octobre 2010. Vol. 138, n° 4, pp. 817-824.

HALL, L. A. et DENNING, D. W., 1994. Oxygen requirements of Aspergillus species. *Journal of Medical Microbiology*. novembre 1994. Vol. 41, n° 5, pp. 311-315.

HAMET, N., SEIGLE-MURANDI, F. et STEIMAN, R., 1991. Contribution to the prophylaxis of chicks aspergillosis: study of the contamination of a hatchery by Aspergillus fumigatus. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. Journal of Veterinary Medicine. Series B*. septembre 1991. Vol. 38, n° 7, pp. 529-537.

HARMON, B. G. et GLISSON, J. R., 1990. Disassociation of bactericidal and fungistatic activities from the oxidative burst of avian macrophages. *American Journal of Veterinary Research*. janvier 1990. Vol. 51, n° 1, pp. 71-75.

HAUCK, Ruediger, CRAY, Carolyn et FRANÇA, Monique, 2020. Spotlight on avian pathology: aspergillosis. *Avian Pathology*. 3 mars 2020. Vol. 49, n° 2, pp. 115-118.

HERBRECHT, Raoul, LETSCHER-BRU, Valérie, OPREA, Corina, LIOURE, Bruno, WALLER, Jocelyn, CAMPOS, France, VILLARD, Odile, LIU, Kun-Lun, NATARAJAN-AMÉ, Shanti, LUTZ, Patrick, DUFOUR, Patrick, BERGERAT, Jean-Pierre et CANDOLFI, Ermanno, 2002. Aspergillus galactomannan detection in the diagnosis of invasive aspergillosis in cancer patients. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1 avril 2002. Vol. 20, n° 7, pp. 1898-1906.

HETTICK, Justin M., GREEN, Brett J., BUSKIRK, Amanda D., KASHON, Michael L., SLAVEN, James E., JANOTKA, Erika, BLACHERE, Françoise M., SCHMECHEL, Detlef et BEEZHOLD, Donald H., 2008. Discrimination of Aspergillus isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Biochemistry*. 15 septembre 2008. Vol. 380, n° 2, pp. 276-281.

HOPE, W. W., WALSH, T. J. et DENNING, D. W., 2005. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet. Infectious Diseases*. octobre 2005. Vol. 5, n° 10, pp. 609-622.

HURNE, Alanna M., CHAI, Christina L.L., MOERMAN, Katherine et WARING, Paul, 2002. Influx of Calcium through a Redox-sensitive Plasma Membrane Channel in Thymocytes Causes Early Necrotic Cell Death Induced by the Epipolythiodioxopiperazine Toxins. *Journal of Biological Chemistry*. août 2002. Vol. 277, n° 35, pp. 31631-31638.

JEURISSEN, S. H., JANSE, E. M., KOCH, G. et DE BOER, G. F., 1989. Postnatal development of mucosa-associated lymphoid tissues in chickens. *Cell and Tissue Research*. octobre 1989. Vol. 258, n° 1, pp. 119-124.



- JEURISSEN, Suzan H. M., JANSE, E. Marga, KOK, Gerard L. et DE BOER, Gerben F., 1989. Distribution and function of non-lymphoid cells positive for monoclonal antibody CVI-ChNL-68.2 in healthy chickens and those infected with Marek's disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1 septembre 1989. Vol. 22, n° 2, pp. 123-133.
- JONES, Michael P. et OROSZ, Susan E., 2000. The diagnosis of aspergillosis in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 1 avril 2000. Vol. 9, n° 2, pp. 52-58.
- KIMPTON, George, WHITE, P. Lewis et BARNES, Rosemary A., 2014. The effect of sample storage on the performance and reproducibility of the galactomannan EIA test. *Medical Mycology*. août 2014. Vol. 52, n° 6, pp. 618-626.
- KLASING, K. C., 1991. Avian inflammatory response: mediation by macrophages. *Poultry Science*. mai 1991. Vol. 70, n° 5, pp. 1176-1186.
- KÖNIG, H. E., NAVARRO, M., ZENGERLING, G. et KORBEL, R., 2016. "Respiratory system (apparatus respiratorius)". In : *Avian Anatomy Textbook and Colour Atlas, 2nd Edn*, eds König H. E., Korbelt R., Liebich H. G. Sheffield: 5M Publishing Ltd; pp. 118-130.
- KOWALSKI, Caitlin H., MORELLI, Kaesi A., SCHULTZ, Daniel, NADELL, Carey D. et CRAMER, Robert A., 2020. Fungal biofilm architecture produces hypoxic microenvironments that drive antifungal resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 8 septembre 2020. Vol. 117, n° 36, pp. 22473-22483.
- KROLL, M., ARENZANA-SEISDEDOS, F., BACHELERIE, F., THOMAS, D., FRIGUET, B. et CONCONI, M., 1999. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chemistry & Biology*. octobre 1999. Vol. 6, n° 10, pp. 689-698.
- KUMMROW, Maya, SILVANOSE, Christudas, DI SOMMA, Antonio, BAILEY, Thomas A. et VORBRÜGGEN, Susanne, 2012. Serum protein electrophoresis by using high-resolution agarose gel in clinically healthy and Aspergillus species-infected falcons. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. décembre 2012. Vol. 26, n° 4, pp. 213-220.
- LAM, K. M. et LIN, W., 1984. Resistance of chickens immunized against Mycoplasma gallisepticum is mediated by bursal dependent lymphoid cells. *Veterinary Microbiology*. septembre 1984. Vol. 9, n° 5, pp. 509-514.
- LE CARRER, Didier, 1994. *Electrophorèse & immunofixation des protéines sériques: interprétations illustrées*. Issy-les-Moulineaux, France : Laboratoires Sebia. ISBN 978-2-84123-000-6.
- MAINA, J. N., 2002. Some recent advances on the study and understanding of the functional design of the avian lung: morphological and morphometric perspectives. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. février 2002. Vol. 77, n° 1, pp. 97-152.
- MAINA, John N., 2017. Pivotal debates and controversies on the structure and function of the avian respiratory system: setting the record straight. *Biological Reviews*. août 2017. Vol. 92, n° 3, pp. 1475-1504.
- MARIAPPAN, A. K., MUNUSAMY, P., LATHEEF, S. K., KOHALE, S., VERMA, A., PUVVALA, B., MATHESH, K. et DHAMA, K., 2022. Grading of Anatomopathological Disparity in the Cases of Invasive Pulmonary Aspergillosis in wild avian species as recorded in Pigeons (*Columba livia*), Peafowls (*Pavo cristatus*), and Griffon Vultures (*Gyps fulvus*). *Archives of Razi Institute*. 2022. Vol. 77, n° 1, pp. 301-313.
- MARR, Kieren A., BALAJEE, S. Arunmozhi, MCLAUGHLIN, Lisa, TABOURET, Marc, BENTSEN, Christopher et WALSH, Thomas J., 2004. Detection of Galactomannan Antigenemia by Enzyme Immunoassay for the

- Diagnosis of Invasive Aspergillosis: Variables That Affect Performance. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004. Vol. 190, n° 3, pp. 641-649.
- MAZUR-GONKOWSKA, B., KONCICKI, Andrzej et KRASNODĘBSKA-DEPTA, A., 2004. Assessment of acute phase response in turkeys experimentally infected with *Escherichia coli* or haemorrhagic enteritis virus. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 1 janvier 2004. Vol. 48, pp. 19-23.
- MCLELLAND, J., 1989a. Larynx and trachea. In : *King, A.S., McLelland, J. (Eds), Form and Function in Birds*. Academic Press, London. pp. 69-104.
- MCMILLAN, Marjorie C. et PETRAK, Margaret L., 1989. Retrospective Study of Aspergillosis in Pet Birds. In : *Journal of the Association of Avian Veterinarians*. 1989. pp. 211. Semantic Scholar extracted view of « Retrospective Study of Aspergillosis in Pet Birds » by M. C. McMillan et al.
- MELILLO, Alessandro, 2013. Applications of Serum Protein Electrophoresis in Exotic Pet Medicine. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*. janvier 2013. Vol. 16, n° 1, pp. 211-225.
- MELO, Aryse Martins, SILVA-FILHO, Rodolfo Pinho Da, POESTER, Vanice Rodrigues, VON GROLL, Andrea, FERNANDES, Cristina Gevehr, STEVENS, David A., SABINO, Raquel et XAVIER, Melissa Orzechowski, 2020. Aspergillosis in free-ranging aquatic birds. *Medical Mycology Case Reports*. juin 2020. Vol. 28, pp. 36-38.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S., TAYLOR, M. L., BOUCHARA, J. B., BURGER, E., CALICH, V. L. G., ESCALANTE, E. D., HANNA, S. A., LENZI, H. L., MACHADO, M. P., MIYAJI, M., DA SILVA, J. L. Monteiro, MOTA, E. M., RESTREPO, A., RESTREPO, S., TRONCHIN, G., VINCENZI, L. R., XIDIEH, C. F. et ZENTENO, E., 2000. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. *Medical Mycology*. 30 décembre 2000. Vol. 38, n° Supplement\_1, pp. 113-123.
- MENGOLI, C., CRUCIANI, M., BARNES, R. A., LOEFFLER, J. et DONNELLY, J. P., 2009. Use of PCR for diagnosis of invasive aspergillosis: systematic review and meta-analysis. In : *Database of Abstracts of Reviews of Effects (DARE): Quality-assessed Reviews [Internet]*. Centre for Reviews and Dissemination (UK).
- MENNINK-KERSTEN, Monique A. S. H., DONNELLY, J. Peter et VERWEIJ, Paul E., 2004. Detection of circulating galactomannan for the diagnosis and management of invasive aspergillosis. *The Lancet. Infectious Diseases*. juin 2004. Vol. 4, n° 6, pp. 349-357.
- MORELLI, Kaesi A., KERKAERT, Joshua D. et CRAMER, Robert A., 2021. *Aspergillus fumigatus* biofilms: Toward understanding how growth as a multicellular network increases antifungal resistance and disease progression. *PLoS Pathogens*. 26 août 2021. Vol. 17, n° 8, pp. e1009794.
- MOTA, Stéphanie M., GIRLING, Simon J., COLE, Georgina, BROWN, Donna, JOHNSON, Gemma et NAYLOR, Adam D., 2023. APPLICATION OF A NOVEL ASPERGILLUS LATERAL-FLOW DEVICE IN THE DIAGNOSIS OF ASPERGILLOSIS IN CAPTIVE GENTOO PENGUINS (*PYGOSCELIS PAPUA PAPUA*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. juillet 2023. Vol. 54, n° 2, pp. 360-366.
- MUHLSCHLEGAL, F., FONZI, W., HOYER, L., PAYNE, T., POULET, F. M., CLEVENGER, J., LATGÉ, J. P., CALERA, J., BEAUVAIS, A., PARIS, S., MONOD, M., STURTEVANT, J., GHANNOUM, M., NOZAWA, Y. et CALDERONE, R., 1998. Molecular mechanisms of virulence in fungus-host interactions for *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 1998. Vol. 36 Suppl 1, pp. 238-248.
- MÜLLBACHER, A., WARING, P. et EICHNER, R. D., 1985. Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying anti-phagocytic and immunomodulating activity in vitro. *Journal of General Microbiology*. mai 1985. Vol. 131, n° 5, pp. 1251-1258.

- MUTUA, P. M, GICHERU, M. M, MAKANYA, A. N et KIAMA, S. G, 2011. Comparative Quantitative and Qualitative Attributes of the Surface Respiratory Macrophages in the Domestic Duck and the Rabbit. *International Journal of Morphology*. juin 2011. Vol. 29, n° 2, pp. 353-362.
- NETT, Jeniel E., CRAWFORD, Kyler, MARCHILLO, Karen et ANDES, David R., 2010. Role of Fks1p and matrix glucan in *Candida albicans* biofilm resistance to an echinocandin, pyrimidine, and polyene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. août 2010. Vol. 54, n° 8, pp. 3505-3508.
- NEUMANN, 2016. Aspergillosis in Domesticated Birds. *Journal of Comparative Pathology*. août 2016. Vol. 155, n° 2-3, pp. 102-104.
- OBAYASHI, T., YOSHIDA, M., MORI, T., GOTO, H., YASUOKA, A., IWASAKI, H., TESHIMA, H., KOHNO, S., HORIUCHI, A. et ITO, A., 1995. Plasma (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet (London, England)*. 7 janvier 1995. Vol. 345, n° 8941, pp. 17-20.
- OBAYASHI, Taminori, NEGISHI, Kumiko, SUZUKI, Tomokazu et FUNATA, Nobuaki, 2008. Reappraisal of the serum (1 $\rightarrow$ 3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. *Clinical infectious diseases*. 1 juin 2008. Vol. 46, n° 12, pp. 1864-1870.
- OHSHIMA, K. et HIRAMATSU, K., 2000. Distribution of T-cell subsets and immunoglobulin-containing cells in nasal-associated lymphoid tissue (NALT) of chickens. *Histology and Histopathology*. juillet 2000. Vol. 15, n° 3, pp. 713-720.
- OLIAS, Philipp, HAUCK, Rüdiger, WINDHAUS, Heinrich, VAN DER GRINTEN, Elisabeth, GRUBER, Achim D. et HAFEZ, Hafez M., 2010. Articular aspergillosis of hip joints in turkeys. *Avian Diseases*. septembre 2010. Vol. 54, n° 3, pp. 1098-1101.
- O'MEARA, D.C. et WITTER, J.F., 1971. Aspergillosis. In : DAVIS, J.N., ANDERSON, R.C., KARSTAD, L. et TRAINER, D.O., *Infectious and Parasitic Diseases of Wild Birds*,. Iowa State University Press. Ames, IA, USA. pp. 153-162.
- OMOTE, Hiroshi et AL-SHAWI, Marwan K., 2002. A Novel Electron Paramagnetic Resonance Approach to Determine the Mechanism of Drug Transport by P-glycoprotein\*. *Journal of Biological Chemistry*. 22 novembre 2002. Vol. 277, n° 47, pp. 45688-45694.
- OROSZ, Susan E. et LICHTENBERGER, Marla, 2011. Avian Respiratory Distress: Etiology, Diagnosis, and Treatment. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. mai 2011. Vol. 14, n° 2, pp. 241-255.
- OZMEN, O. et DORRESTEIN, M. G., 2004. Observations of aspergillosis in the brains of turkey poults using different histopathological staining techniques. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*. avril 2004. Vol. 79, n° 2, pp. 95-99.
- PAGANO, Susan, MCWILLIAMS, Scott et GUGLIELMO, CHRISTOPHER, 2007. Effect of diet composition on plasma metabolite profiles in a migratory songbird. *Condor*. 1 février 2007. Vol. 109.
- PAN, Zhijie, FU, Mengjiao, ZHANG, Jiaojiao, ZHOU, Hua, FU, Yiqi et ZHOU, Jianying, 2015. Diagnostic accuracy of a novel lateral-flow device in invasive aspergillosis: a meta-analysis. *Journal of Medical Microbiology*. juillet 2015. Vol. 64, n° 7, pp. 702-707.
- PAPPALARDO, Lucia, HOIJEMBERG, Pablo, PELCZER, Istvan et BAILEY, Thomas, 2014. NMR-Metabolomics Study on Falcons Affected by Aspergillosis. In : *Current Metabolomics*. 27 novembre 2014. pp. 155-161. journalAbbreviation:CMB

- PATTERSON, Karen C. et STREK, Mary E., 2014. Diagnosis and treatment of pulmonary aspergillosis syndromes. *Chest*. novembre 2014. Vol. 146, n° 5, pp. 1358-1368.
- PHALEN, D. N., 2000. Respiratory medicine of cage and aviary birds. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*. mai 2000. Vol. 3, n° 2, pp. 423-452, vi.
- PICKERING, Jerry W., SANT, Howard W., BOWLES, Catherine A. P., ROBERTS, William L. et WOODS, Gail L., 2005. Evaluation of a (1→3)-β-d-Glucan Assay for Diagnosis of Invasive Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. décembre 2005. Vol. 43, n° 12, pp. 5957-5962.
- PIERCY, D. W., 1979. Acute phase responses to experimental salmonellosis in calves and colibacillosis in chickens: serum iron and caeruloplasmin. *Journal of Comparative Pathology*. juillet 1979. Vol. 89, n° 3, pp. 309-319.
- POWELL, F. L. et MAZZONE, R. W., 1983. Morphometrics of rapidly frozen goose lungs. *Respiration Physiology*. mars 1983. Vol. 51, n° 3, pp. 319-332.
- RAJENDRAN, Ranjith, MOWAT, Eilidh, MCCULLOCH, Elaine, LAPPIN, David F., JONES, Brian, LANG, Sue, MAJITHIYA, Jayesh B., WARN, Peter, WILLIAMS, Craig et RAMAGE, Gordon, 2011. Azole Resistance of *Aspergillus fumigatus* Biofilms Is Partly Associated with Efflux Pump Activity  $\nabla$ . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. mai 2011. Vol. 55, n° 5, pp. 2092-2097.
- RAJENDRAN, Ranjith, WILLIAMS, Craig, LAPPIN, David F., MILLINGTON, Owain, MARTINS, Margarida et RAMAGE, Gordon, 2013. Extracellular DNA Release Acts as an Antifungal Resistance Mechanism in Mature *Aspergillus fumigatus* Biofilms. *Eukaryotic Cell*. mars 2013. Vol. 12, n° 3, pp. 420-429.
- REESE, Sven, DALAMANI, Grammatia et KASPERS, Bernd, 2006. The avian lung-associated immune system: a review. *Veterinary Research*. mai 2006. Vol. 37, n° 3, pp. 311-324.
- REIDY, Lisa, DESOUBEAUX, Guillaume, CARDENAS, Julia, SEITHER, Joshua, KAHL, Kristin, CHAUVIN, David, ADKESSON, Michael, GOVETT, Pamela, AITKEN-PALMER, Copper, STADLER, Cynthia, TOCIDLOWSKI, Maryanne, SIRPENSKI, Gayle, BRONSON, Ellen et CRAY, Carolyn, 2022. DETECTION OF GLIOTOXIN BUT NOT BIS(METHYL)GLIOTOXIN IN PLASMA FROM BIRDS WITH CONFIRMED AND PROBABLE ASPERGILLOSIS. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 11 mars 2022. Vol. 53, n° 1.
- RICHARD, J. L., CUTLIP, R. C., THURSTON, J. R. et SONGER, J., 1981. Response of turkey poults to aerosolized spores of *Aspergillus fumigatus* and aflatoxigenic and nonaflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Avian Diseases*. 1981. Vol. 25, n° 1, pp. 53-67.
- RICHARD, J. L., PEDEN, W. M. et WILLIAMS, P. P., 1994. Gliotoxin inhibits transformation and its cytotoxic to turkey peripheral blood lymphocytes. *Mycopathologia*. mai 1994. Vol. 126, n° 2, pp. 109-114.
- RICHARD, J. L., THURSTON, J. R., RICHARD, J. L. et THURSTON, J. R., 1983. Rapid hematogenous dissemination of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* spores in turkey poults following aerosol exposure. *Avian Diseases*. 1 janvier 1983. Vol. 27, n° 4, pp. 1025-1033.
- RITCHIE, HARISSON et HARISSON, 1994. Anatomy of the Umbrella cockatto, acetate overlay structure identification system. In : *Avian medicine : principles and application*. Wingers Publishing.
- ROMAN, Yannick, BOMSEL-DEMONTROY, Marie-Claude, LEVRIER, Julie, CHASTE-DUVERNOY, Daniel et JALME, Michel Saint, 2009. Effect of hemolysis on plasma protein levels and plasma electrophoresis in birds. *Journal of Wildlife Diseases*. janvier 2009. Vol. 45, n° 1, pp. 73-80.

- SALZER, Helmut J. F., PRATTES, Juergen, FLICK, Holger, REIMANN, Maja, HEYCKENDORF, Jan, KALSDORF, Barbara, OBERSTEINER, Sabrina, GAEDE, Karoline I., HERZMANN, Christian, JOHNSON, Gemma L., LANGE, Christoph et HOENIGL, Martin, 2018. Evaluation of Galactomannan Testing, the Aspergillus-Specific Lateral-Flow Device Test and Levels of Cytokines in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of Chronic Pulmonary Aspergillosis. *Frontiers in Microbiology*. 2 octobre 2018. Vol. 9, pp. 2223.
- SAVELIEFF, Masha G., PAPPALARDO, Lucia et AZMANIS, Panagiotis, 2018. The current status of avian aspergillosis diagnoses: Veterinary practice to novel research avenues. *Veterinary Clinical Pathology*. septembre 2018. Vol. 47, n° 3, pp. 342-362.
- SCANES, Colin G. et DRIDI, Sami (éd.), 2022. Index. In : , *Sturkie's Avian Physiology (Seventh Edition)*. San Diego : Academic Press. pp. 1405-1430. ISBN 978-0-12-819770-7.
- SCHEID, P. et PIIPER, J., 1989. Respiratory mechanics and air flow in birds. In : KING, A. S. et MCLELLAND, J. London : Academic Press. pp. 364-391.
- SCHEID, P., SLAMA, H. et WILLMER, H., 1974. Volume and ventilation of air sacs in ducks studied by inert gas wash-out. *Respiration Physiology*. juillet 1974. Vol. 21, n° 1, pp. 19-36.
- SCHEID, Peter et PIIPER, Johannes, 1972. Cross-current gas exchange in avian lungs: Effects of reversed parabronchial air flow in ducks. *Respiration Physiology*. 1 décembre 1972. Vol. 16, n° 3, pp. 304-312.
- SCHMIDT, Marc F. et WILD, J. Martin, 2014. The respiratory-vocal system of songbirds: Anatomy, physiology, and neural control. *Progress in brain research*. 2014. Vol. 212, pp. 297-335.
- SCHWARZ, Tobias, KELLEY, Cristin, PINKERTON, Marie E. et HARTUP, Barry K., 2016. COMPUTED TOMOGRAPHIC ANATOMY AND CHARACTERISTICS OF RESPIRATORY ASPERGILLOSIS IN JUVENILE WHOOPING CRANES. *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*. janvier 2016. Vol. 57, n° 1, pp. 16-23.
- SEYEDMOUSAVI, Seyedmojtaba, GUILLOT, Jacques, ARNÉ, Pascal, DE HOOG, G. Sybren, MOUTON, Johan W., MELCHERS, Willem J. G. et VERWEIJ, Paul E., 2015. Aspergillus and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Medical Mycology*. 1 novembre 2015. Vol. 53, n° 8, pp. 765-797.
- SHARMA, J. M., 1997. The structure and function of the avian immune system. *Acta Veterinaria Hungarica*. 1997. Vol. 45, n° 3, pp. 229-238.
- SMIAŁEK, M., TYKAŁOWSKI, B., STENZEL, T. et KONCICKI, A., 2011. Local immunity of the respiratory mucosal system in chickens and turkeys. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2011. Vol. 14, n° 2, pp. 291-297.
- SMITH, J. H., MEIER, J. L., LAMKE, C., NEILL, P. J. et BOX, E. D., 1986. Microscopic and submicroscopic anatomy of the parabronchi, air sacs, and respiratory space of the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *The American Journal of Anatomy*. octobre 1986. Vol. 177, n° 2, pp. 221-242.
- SPAGNOLO, Valentina, CRIPPA, Valentina, MARZIA, Amelia et SARTORELLI, Paola, 2006. Reference intervals for hematologic and biochemical constituents and protein electrophoretic fractions in captive common buzzards (*Buteo buteo*). *Veterinary Clinical Pathology*. mars 2006. Vol. 35, n° 1, pp. 82-87.
- TELL, L. A., 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*. mai 2005. Vol. 43 Suppl 1, pp. S71-73.
- THOREL, Milan, ROMAN, Yannick et LECLERC, Antoine, 2024. PLASMA PROTEIN ELECTROPHORESIS IN THE WHITE STORK (*CICONIA CICONIA*): AGREEMENT BETWEEN AGAROSE GEL VERSUS CAPILLARY ZONE METHODS

- AND DEVELOPMENT OF REFERENCE INTERVALS. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*. juin 2024. Vol. 55, n° 2, pp. 330-340.
- THORNTON, Christopher R., 2008. Development of an Immunochromatographic Lateral-Flow Device for Rapid Serodiagnosis of Invasive Aspergillosis. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. juillet 2008. Vol. 15, n° 7, pp. 1095-1105.
- TOTH, Thomas E, 2000. Nonspeci<sup>®</sup>c cellular defense of the avian respiratory system: a review. *Developmental and Comparative Immunology*. 2000.
- TSAI, S. S., PARK, J. H., HIRAI, K. et ITAKURA, C., 1992. Aspergillosis and candidiasis in psittacine and passeriforme birds with particular reference to nasal lesions. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* décembre 1992. Vol. 21, n° 4, pp. 699-709.
- VAN ALSTINE, W. G. et ARP, L. H., 1988. Histologic evaluation of lung and bronchus-associated lymphoid tissue in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *American Journal of Veterinary Research*. juin 1988. Vol. 49, n° 6, pp. 835-839.
- VAN DER LINDEN, Jan W. M., SNELDERS, Eveline, ARENDS, Jan P., DAENEN, Simon M., MELCHERS, Willem J. G. et VERWEIJ, Paul E., 2010. Rapid Diagnosis of Azole-Resistant Aspergillosis by Direct PCR Using Tissue Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. avril 2010. Vol. 48, n° 4, pp. 1478-1480.
- VAN WAEYENBERGHE, Lieven, PASMANS, Frank, BEERNAERT, Lies A., HAESEBROUCK, Freddy, VERCAMMEN, Francis, VERSTAPPEN, Frank, DORRESTEIN, Gerry M., KLAASSEN, Corné H. W. et MARTEL, An, 2011. Microsatellite typing of avian clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A.* février 2011. Vol. 40, n° 1, pp. 73-77.
- VERSTAPPEN, Frank A. L. M. et DORRESTEIN, Gerry M., 2005. Aspergillosis in Amazon Parrots After Corticosteroid Therapy for Smoke-inhalation Injury. *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2005. Vol. 19, n° 2, pp. 138-141.
- VORBRÜGGEN, S., BAILEY, T. et KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.-E., 2013. [Radiographic findings in raptors affected with a mycosis of the respiratory tract]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*. 2013. Vol. 41, n° 5, pp. 311-318.
- WARING, P., EICHNER, R. D. et MÜLLBACHER, A., 1988. The chemistry and biology of the immunomodulating agent gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Medicinal Research Reviews*. 1988. Vol. 8, n° 4, pp. 499-524. DOI 10.1002/med.2610080404.
- WARRIS, A., LEHRNBECHER, T., ROILIDES, E., CASTAGNOLA, E., BRÜGGEMANN, R. J. M. et GROLL, A. H., 2019. ESCMID-ECMM guideline: diagnosis and management of invasive aspergillosis in neonates and children. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. septembre 2019. Vol. 25, n° 9, pp. 1096-1113.
- WASYLNKA, Julie A., SIMMER, Megan I. et MOORE, Margo M., 2001. Differences in sialic acid density in pathogenic and non-pathogenic *Aspergillus* species. *Microbiology (Reading, England)*. avril 2001. Vol. 147, n° Pt 4, pp. 869-877.
- WELLEHAN , James F. X., LIERZ, Michael, PHALEN, David, RAIDAL, Shane, STYLES, Darrel K., CROSTA, Lorenzo, MELILLO, Alessandro, SCHNITZER, Petra, LENNOX, Angela et LUMEIJ, Johannes Thomas, 2016. CHAPTER 2 - Infectious disease. In : SPEER, BRIAN L. (éd.), *Current Therapy in Avian Medicine and Surgery*. W.B. Saunders. pp. 22-106. ISBN 978-1-4557-4671-2.

WHITE, P. Lewis, WINGARD, John R., BRETAGNE, Stéphane, LÖFFLER, Jürgen, PATTERSON, Thomas F., SLAVIN, Monica A., BARNES, Rosemary A., PAPPAS, Peter G. et DONNELLY, J. Peter, 2015. Aspergillus Polymerase Chain Reaction: Systematic Review of Evidence for Clinical Use in Comparison With Antigen Testing. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 15 octobre 2015. Vol. 61, n° 8, pp. 1293-1303.

WIEDERHOLD, Nathan P., NAJVAR, Laura K., BOCANEGRA, Rosie, KIRKPATRICK, William R., PATTERSON, Thomas F. et THORNTON, Christopher R., 2013. Interlaboratory and Interstudy Reproducibility of a Novel Lateral-Flow Device and Influence of Antifungal Therapy on Detection of Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. février 2013. Vol. 51, n° 2, pp. 459.

WILSON, R. M. et REEVES, W. G., 1986. Neutrophil phagocytosis and killing in insulin-dependent diabetes. *Clinical and Experimental Immunology*. février 1986. Vol. 63, n° 2, pp. 478-484.

ZARNOWSKI, Robert, SANCHEZ, Hiram, COVELLI, Antonio S., DOMINGUEZ, Eddie, JAROMIN, Anna, BERNHARDT, Jörg, MITCHELL, Kaitlin F., HEISS, Christian, AZADI, Parastoo, MITCHELL, Aaron et ANDES, David R., 2018. Candida albicans biofilm–induced vesicles confer drug resistance through matrix biogenesis. *PLoS Biology*. 8 octobre 2018. Vol. 16, n° 10, pp. e2006872.





**Emilie JEANNÈS**

**TITRE DE LA THÈSE :**

Étude préliminaire sur l'apport du galactomannane, du  $\beta$ -D-glucane, du 3-hydroxybutyrate et de l'électrophorèse des protéines sériques dans le diagnostic de l'aspergillose des oiseaux.

Input of galactomannane,  $\beta$ -D-glucan, 3-hydroxybutyrate and serum protein electrophoresis in the avian aspergillosis diagnosis : a preliminary study.

**Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire** : Nantes, le 5 décembre 2024.

**RÉSUMÉ :**

L'aspergillose aviaire est une maladie présentant de nombreux défis, notamment en ce qui concerne la précocité du diagnostic et la prise en charge thérapeutique. En effet, les signes cliniques sont d'abord frustes. Lorsque la suspicion clinique d'atteinte par *Aspergillus* spp est renforcée, les lésions causées par la maladie sont généralement avancées, rendant le traitement antifongique souvent inefficace.

L'objectif de cette étude est de décrire la distribution des résultats de différents examens utilisés dans le diagnostic de l'aspergillose en médecine aviaire et en médecine humaine, et de déterminer si les combinaisons de ces tests permettent d'obtenir de meilleures performances diagnostiques. Les analyses sont menées sur une cohorte d'oiseaux marins. La base de données comporte 74 prélèvements, dont 19 appartiennent au groupe des individus malades et 55 au groupe des individus témoins.

Les résultats démontrent que les oiseaux atteints d'aspergillose présentent des concentrations sériques en 3-hydroxybutyrate, en protéines totales, en  $\alpha$ 2-globulines, en galactomannane et en  $\beta$ -D-glucane supérieures. L'utilisation d'un test qualitatif pour la détection d'une mannoprotéine fongique, l'Asp-LFD, ne s'est pas avérée concluante. Différents seuils de positivité sont identifiés à partir des courbes ROC établies pour les tests quantitatifs. Les sensibilités obtenues sont faibles, ce qui motive la réalisation de combinaisons de tests. Deux combinaisons permettent d'obtenir de très bonnes sensibilités et spécificités : les dosages sériques des protéines totales et du 3-hydroxybutyrate d'une part, et le test Fungitel<sup>TM</sup> et le dosage sérique du 3-hydroxybutyrate d'autre part.

**MOTS-CLÉS :**

- ASPERGILLOSE
- OISEAU
- DIAGNOSTIC
- GALACTOMANNANE
- PROTEINE SERIQUE
- BETA-GLUCANE
- ACIDE 3 HYDROXYBUTIRIQUE

**DATE DE SOUTENANCE** : 5 décembre 2024