

**CROISSANCE LINÉAIRE DE SOUCHES
D'ASPERGILLUS FUMIGATUS FRESENIUS
ET ASPERGILLUS FLAVUS LINK
ISOLÉES A L'ÉTAT PARASITAIRE ET NON PARASITAIRE**

H. SAËZ

*Parc zoologique du Muséum national d'Histoire naturelle,
53, avenue de Saint-Maurice, 75 - Paris 12^e*

RÉSUMÉ

La croissance mycélienne linéaire d'*A. fumigatus* et *A. flavus* a été étudiée à 30°, 35° et 37°C sur des souches parasites et non parasites. Cette croissance peut servir de critère pour départager les deux groupes de souches en ce qui concerne *A. fumigatus*, mais pour *A. flavus* les résultats sont plus irréguliers. Enfin les propriétés thermiques permettent de comprendre la plus grande facilité d'*A. fumigatus* à s'implanter chez les Oiseaux.

Aspergillus fumigatus FRESENIUS et *Aspergillus flavus* LINK sont deux espèces fongiques que l'on identifie communément chez l'Homme, les Mammifères et les Oiseaux, et dans leur environnement. Dans l'organisme de ces hôtes on les rencontre soit à l'état non parasitaire, principalement dans l'appareil respiratoire ou le tube digestif où ils s'y trouvent *en survie* (sans développement saprophytique), soit à l'état parasitaire, et presque uniquement chez les oiseaux en ce qui concerne *A. flavus*.

Pour ces deux *Aspergillus*, on constate, au cours de recherches écologiques et épidémiologiques, une double disproportion : tout d'abord une fréquence plus grande des isoléments à l'état non parasitaire, puis, parmi les isoléments à l'état parasitaire, une fréquence plus grande des aspergilloses à *A. fumigatus* par rapport à *A. flavus*. Ainsi nous avons isolé 139 souches d'*A. fumigatus* et 66 d'*A. flavus* en quatre ans chez des pensionnaires du Parc zoologique de Paris, à l'état non parasitaire ; quant aux 35 aspergilloses aviaires que nous avons décrites (SAEZ, 1961), 32 sont dues à *A. fumigatus* et 1 seule à *A. flavus*. En 1938 déjà, URBAIN et GUILLOT avaient signalé

le pouvoir pathogène de ce dernier champignon pour des oiseaux sauvages en captivité dans ce même Parc.

Devant le faible contingent d'*Aspergillus* responsables d'aspergilloses, bien des auteurs ont cherché à savoir si les souches passées au parasitisme ne différaient pas morphologiquement ou biologiquement des souches isolées ailleurs qu'au niveau de lésions mycosiques. La plupart des travaux sont consacrés à *A. fumigatus*, l'espèce la plus commune.

Dans la description botanique d'*A. fumigatus* de 1965, RAPER et FENNEL nous apprennent que des souches provenant de tissus humains et animaux ont présenté, en culture, quelques différences morphologiques : conidiophores ramifiés, proliférations des têtes, phialides allongées et parfois septées, grande variabilité de taille et de forme des conidies. Cette même année (SAEZ, 1965) nous signalions comme anomalies micromorphologiques chez *A. fumigatus* les variations observées par les auteurs cités ; cependant ces anomalies nous avons l'occasion de les voir aussi bien dans des colonies de souches parasites que de souches non parasites.

La température étant l'un des facteurs physiques ayant le plus d'incidence sur la croissance des micromycètes, nous étudions les propriétés thermiques des champignons que nous cultivons le plus habituellement. A propos des *Aspergillus* nous avons recherché la température maximum de développement d'*A. fumigatus* (53°-54°C) et d'*A. flavus* (43°-46°C) (SAEZ, 1966). Nous avons remarqué que toutes les souches parasites d'*A. fumigatus* et la majorité de celles d'*A. flavus* se situent dans les limites les plus élevées de l'intervalle de température de l'espèce ; néanmoins, certaines souches non parasites possédant ces mêmes maxima également élevés, la température maximum ne suffit pas à départager les deux catégories de souches.

En étendant nos recherches à 12 espèces d'*Aspergillus* (SAEZ, 1969) nous avons noté un certain nombre de modifications morphologiques : macroscopiques (aspect et consistance de la colonie, retard ou changement dans la pigmentation) et microscopiques (portant sur le thalle, son protoplasme, la longueur des conidiophores, l'appareil de fructification, la conidiogenèse et l'ascogenèse). Mais alors que ces modifications semblent indépendantes de l'origine des souches, elles sont, pour quelques-unes, en relation avec l'augmentation de la température d'incubation.

S'appuyant sur les critères suivants : variations de la colonie, taille et forme des conidies, longueur des conidiophores, sensibilité à des antimycotiques, fluorescence à la lumière de Wood, DE VRIES et CORMANE (1969) ont également étudié deux groupes de souches d'*A. fumigatus* : des parasites et des non parasites. Ils concluent, en substance, qu'aucune des caractéristiques notées n'appartenait exclusivement à l'un ou l'autre groupe de souches.

Nous allons examiner à présent la croissance linéaire d'*A. fumigatus* et *A. flavus*, à trois niveaux de température, et analyser le comportement des souches isolées à l'état parasitaire et non parasitaire.

MATÉRIEL, ET MÉTHODES

L'examen porte sur 55 souches isolées chez des Mammifères et des Oiseaux du Parc zoologique de Paris, à partir de prélèvements effectués au cours des autopsies : 33 souches d'*A. fumigatus*, dont 8 cultivées à partir de matériel mycosique et 22 d'*A. flavus*, dont 3 parasites.

Nous utilisons la technique :

- en boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre utile,
- avec milieu de Sabouraud glucosé à 2 p. 100,
- à pH 6,9,
- à l'obscurité,
- en étuve aérée deux fois par jour,
- à trois niveaux de température : 30°, 35° et 37°C.

Tous les tests sont dédoublés : deux boîtes par souche et par niveau thermique sont ensemencées avec une jeune colonie de 48 à 72 heures, obtenue sur milieu de Sabouraud glucosé 2 p. 100 à température du laboratoire. Un diamètre à l'encre de Chine est tracé sur le revers du fond de la boîte, et un petit fragment mycélien est déposé au milieu de ce diamètre vu par transparence à travers la gélose nutritive. Cinq lectures sont faites quotidiennement, une 6^e le dixième jour et une 7^e le quinzième jour : nous mesurons chaque fois le même diamètre de la colonie, matérialisé par le trait à l'encre de Chine ; le diamètre de l'inoculat est retranché ; le 1/2 millimètre est apprécié. Nous notons enfin en combien de jours toute la surface du milieu est recouverte par la colonie.

Outre la température, le développement des *Aspergillus* est principalement influencé par le pH, l'humidité, l'oxygénation (AGNIHOTRI, 1964 ; RAI, TEWARI, SINHA, 1967). Notre méthode, ne comportant que la variation de la température, devant être appliquée ultérieurement à d'autres *Aspergillus* que nous identifions chez l'animal, nous avons choisi des conditions qui soient favorables à la plupart des espèces. En ce qui concerne le pH, par exemple, les *Aspergillus* supportent une gamme de valeurs très large, mais nombre d'espèces ont un pH optimum compris entre 6 et 7. AGNIHOTRI (1964) rapporte que le meilleur développement en poids sec (qui ne correspond pas toujours au meilleur développement mycélien linéaire, mais s'en rapproche assez) a lieu à : pH 6 pour *A. fumigatus* ; 6,5 pour *A. rugulosus*, *A. quadrilineatus* et *A. violaceus* ; 7 pour *A. flavus*, *A. nidulans* et *A. varicolor*. RAI, TEWARI, SINHA (1967) ont testé la croissance d'*A. flavus* à 6 niveaux thermiques sur un milieu de pH 7,5 avant passage à l'autoclave.

RÉSULTATS

Voir les figures 1 à 4.

Voir les tableaux 1 et 2 : les résultats des deux dernières lectures n'y sont pas indiqués car toutes les colonies recouvrent la surface du milieu de culture au plus tard le 10^e jour.

1. *A. fumigatus*

Pour l'ensemble des souches le diamètre moyen augmente en fonction de la température. Ainsi toute la surface de la gélose est recouverte par la colonie :

- à 30°C : en 5-6 jours, par 28 souches
- à 30°C : en 7-8 jours, par 5 souches
- à 35°C : en 3-4 jours, par 31 souches
- à 35°C : en 5 jours, par 2 souches
- à 37°C : en 3-4 jours, par 33 souches

L'allongement quotidien moyen passe par un maximum entre le 1^{er} et le 2^e jour de culture, où il atteint à 30°C, 18,7 mm ; à 35°C, 26,6 mm et à 37°C, 27,5 mm.

La température optimum de la croissance linéaire d'*A. fumigatus* est située au-delà de 37°C, entre cette valeur et la limite supérieure de développement (53°-54°C)

Aux trois niveaux de température les souches parasites s'accroissent plus rapidement que les non parasites.

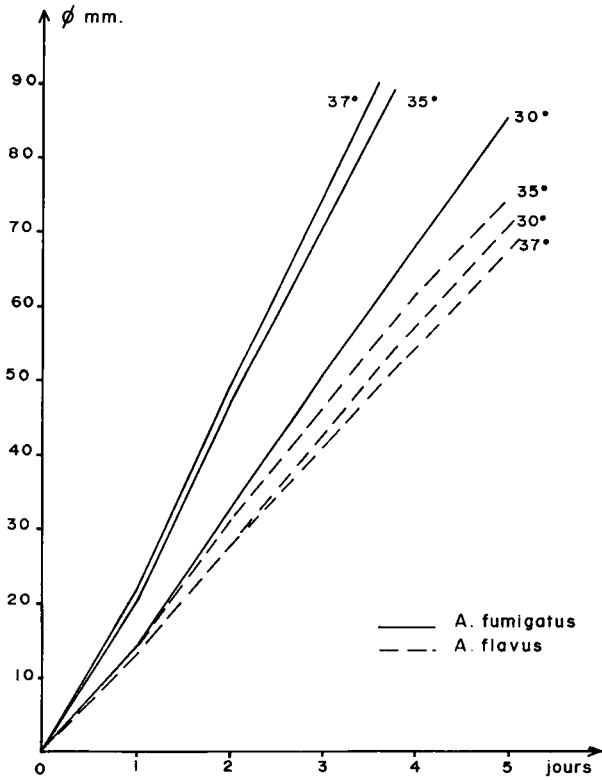


FIG. 1. — Accroissement du diamètre moyen (moyennes arithmétiques) de la colonie, pendant les cinq premiers jours de culture à 30°, 35° et 37°C, relatif à l'ensemble des souches parasites et non parasites de chacune des deux espèces fongiques.

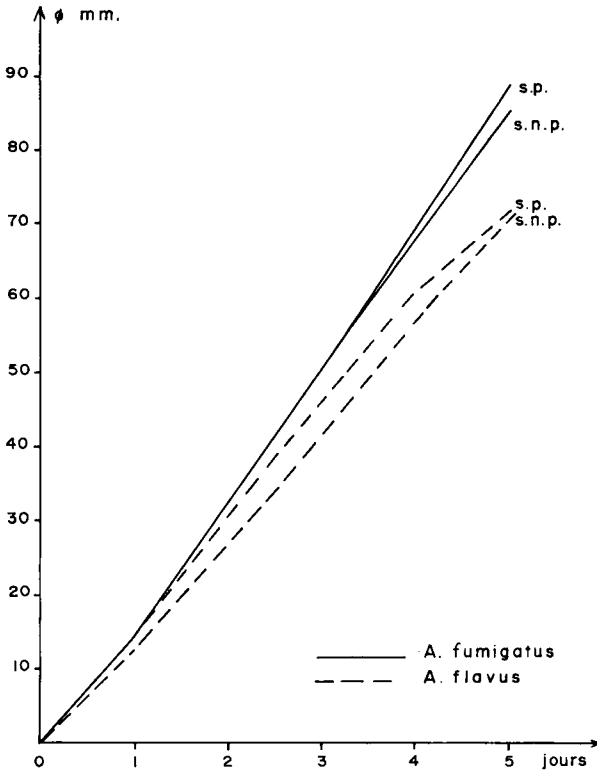


FIG. 2. — Accroissement du diamètre moyen de la colonie, pendant les cinq premiers jours de culture à 30°C, relatif, d'une part, aux souches parasites (s. p.), d'autre part, aux souches non parasites (s. n. p.), de chacune des deux espèces fongiques.

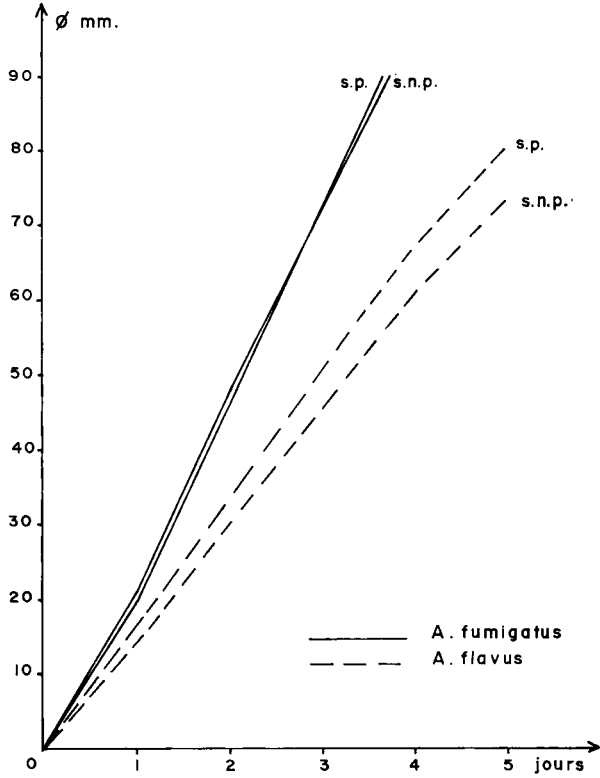


FIG. 3. — Accroissement du diamètre moyen de la colonie, pendant les cinq premiers jours de culture à 35°C, relatif, d'une part, aux souches parasites et, d'autre part, aux souches non parasites, de chacune des deux espèces fongiques.

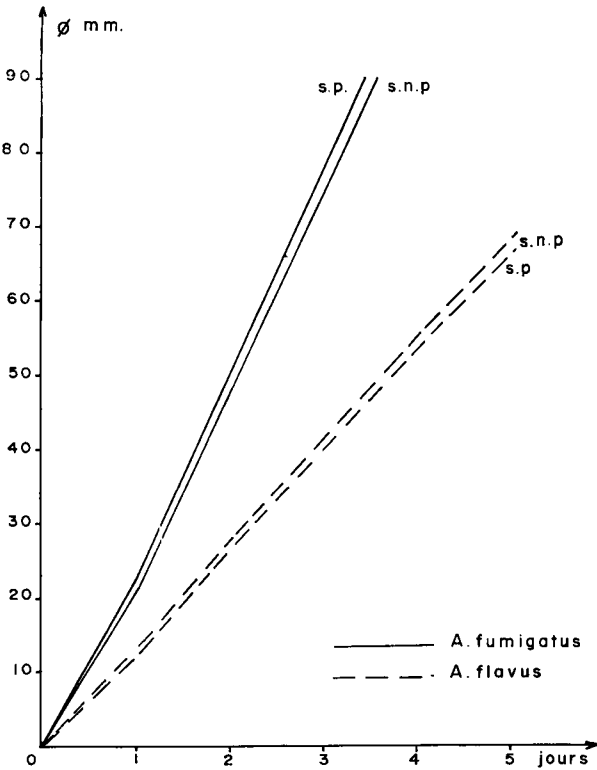


FIG. 4. — Accroissement du diamètre moyen de la colonie, pendant les cinq premiers jours de culture à 37°C relatifs, d'une part, aux souches parasites et, d'autre part, aux souches non parasites, de chacune des deux espèces fongiques.

TABLEAU I
Diamètres minimal et maximal de la colonie en millimètres

| | N. S. (1) | °C (2) | 1 ^{er} jour | 2 ^e jour | 3 ^e jour | 4 ^e jour | 5 ^e jour | Toute la largeur de la boîte |
|-------------------------|-----------|----------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <i>A. fumigatus</i> : | | | | | | | | |
| — ensemble des souches | 33 | 30 35 37 | 6,5-19,5 14,5-24,5 16 -30 | 26 -40,5 39 -54 41 -56 | 43 -61 61 -79 62 -82,5 | 61 -77,5 79 \geq 90 \geq 90 | 71,5 \geq 90 \geq 90 | 5-8 jours 3-5 — 3-4 — |
| — souches parasites | 8 | 30 35 37 | 6,5-16 14,5-24,5 19 -25,5 | 26 -37 42 -52 45 -53 | 43,5-54,5 66,5-77 70,5-81,5 | 63 -75,5 \geq 90 \geq 90 | 75 \geq 90 | 5-8 — 3-4 — 3-4 — |
| — souches non parasites | 25 | 30 35 37 | 8,5-19,5 15,5-24,5 16 -30 | 26 -40,5 39 -54 41 -56 | 43 -61 61 -79 62 -82,5 | 61 -77,5 79 \geq 90 \geq 90 | 71,5 \geq 90 \geq 90 | 5-7 — 4-5 — 3-4 — |
| <i>A. flavus</i> : | | | | | | | | |
| — ensemble des souches | 22 | 30 35 37 | 10 -17 10 -17,5 9 -16,5 | 23 -35 21,5-36,5 21,5-34 | 36 -51 37,5-54,5 32 -49,5 | 49,5-66 50,5-70 43 -62 | 59 -82 63,5-84,5 50,5-76 | 6-10 — 6-10 — 7-10 — |
| — souches parasites | 3 | 30 35 37 | 13 -16 15 -17,5 11 -14 | 29 -34 32,5-36 24,5-28,5 | 46 -47 50,5-51 40,5-47 | 56 -65 64,5-69 49 -55,5 | 68 -78 74 -83,5 62,5-70 | 7-9 — 6-9 — 10 — |
| — souches non parasites | 19 | 30 35 37 | 10 -17 10 -17 9 -16,5 | 23 -35 21,5-36,5 21,5-34 | 36 -51 37,5-54,5 32 -49,5 | 49,5-66 50,5-70 43 -62 | 59 -82 63,5-84,5 50,5-76 | 6-10 — 6-10 — 7-10 — |

(1) = nombre de souches étudiées.

(2) = température d'incubation.

TABEAU 2
Allongement du diamètre moyen de la colonie en millimètres

| | N. S. (1) | t°C (2) | Le 1er jour | Entre le 1er et le 2e jour | Entre le 2e et le 3e jour | Entre le 3e et le 4e jour | Entre le 4e et le 5e jour |
|-------------------------|-----------|----------------|----------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| <i>A. fumigatus</i> : | | | | | | | |
| — Ensemble des souches | 33 | 30 35 37 | 14,1 20,2 21,7 | 18,7 26,6 27,5 | 18 24 25,7 | 17,3 12,7 15,1 | 13,2 |
| — Souches parasites | 8 | 30 35 37 | 14,2 21 22,9 | 18,7 26,8 27,7 | 17,9 24,5 26,6 | 18,5 17,7 12,8 | 12,2 |
| — Souches non parasites | 25 | 30 35 37 | 14,1 19,9 21,3 | 18,6 26,7 27,5 | 17,4 23,6 25,3 | 17,6 13,3 15,9 | 13,5 |
| <i>A. flavus</i> : | | | | | | | |
| — Ensemble des souches | 22 | 30 35 37 | 13,3 14,7 13,2 | 14,4 16 14,5 | 14,4 15,6 13,2 | 14,5 15,2 13,4 | 13 12,8 13,1 |
| — Souches parasites | 3 | 30 35 37 | 14,6 16,5 12,3 | 16,6 17,2 14,2 | 15,1 17 13,4 | 14,5 16 12,8 | 10,7 14 12,8 |
| — Souches non parasites | 19 | 30 35 37 | 13 14,4 13,3 | 14,2 15,8 14,6 | 14,2 15,4 13,1 | 15,7 15,1 13,5 | 13,4 12,7 13,1 |

(1) Nombre de souches étudiées.

(2) Température d'incubation.

2. *A. flavus*

Pour l'ensemble des souches le diamètre moyen s'accroît entre 30° et 35°C, puis décroît à 37°C où il devient égal ou, plus souvent, inférieur à celui obtenu à 30°C. A 35° et 30°C, il n'y a plus, respectivement, que 1 et 2 souches à ne pas avoir encore recouvert entièrement la surface de la gélose avant le 10^e jour, contre 5 à 37°C.

L'allongement quotidien moyen passe par son maximum entre le 1^{er} et le 2^e jour à 35°C (16 mm) et à 37°C (14,5 mm), mais à 30°C il recule entre le 3^e et le 4^e jour (14,5 mm). Cependant, si l'on tient compte d'une erreur de $\pm 0,5$, le comportement d'*A. flavus*, sur ce point, est le même que celui d'*A. fumigatus*.

La température optimum de la croissance linéaire d'*A. flavus* est comprise entre 31° et 36°C.

Les souches parasites s'accroissent plus rapidement que les non parasites à 30° et à 35°C, mais à 37°C c'est l'inverse.

COMMENTAIRES

Alors qu'en ce qui concerne la température maximum de développement d'*A. fumigatus*, des souches parasites se retrouvent avec des non parasites parmi les valeurs les plus élevées, la croissance mycélienne linéaire a pu départager ces deux groupes : aux trois niveaux 30°, 35° et 37°C, les premières s'accroissent plus rapidement. Valable pour l'échantillon fongique utilisé, ce critère doit maintenant être appliqué à un plus grand nombre de souches des deux catégories pour juger de la constance de sa valeur. Avec *A. flavus*, les résultats sont, en revanche, irréguliers et à 37°C, les souches non parasites font une meilleure performance que les parasites.

Sur le plan pathogénique ces deux *Aspergillus* affrontent le parasitisme avec des heurs différents. Nombre d'oiseaux ont une température interne de l'ordre de 40°C. A ce niveau, *A. fumigatus* qui pousse jusqu'à 53°-54°C, possède encore une vigoureuse croissance mycélienne, une fructification rapide et une conidiogenèse abondante, tandis que nombre de souches d'*A. flavus* ont dépassé à 40°C leur température optimum de croissance et se rapprochent davantage de leur température maximum, 43°-46°C. Pour cette espèce donc, la croissance est dans sa phase de régression et les modifications apparaissant aux températures infra-maximales peuvent être notées : retard de formation des appareils de fructification, diminution de la conidiogenèse, voire des signes de souffrance du thalle. L'implantation et la propagation dans les tissus de ces hôtes ne se font pas dans les conditions les plus favorables. Ces caractéristiques permettent d'expliquer, en partie, la disparité des aspergilloses aviaires à *A. fumigatus* et à *A. flavus*.

Reçu pour publication en juillet 1970.

SUMMARY

LINEAR GROWTH OF STRAINS OF *ASPERGILLUS FUMIGATUS* FRESENIUS
AND *ASPERGILLUS FLAVUS* LINK ISOLATED IN THEIR PARASITIC
AND NON-PARASITIC STATES

The linear growth of the mycelium of *A. fumigatus* and *A. flavus* has been studied at 30°C, 35°C and 37°C, using parasitic and non-parasitic strains. This growth can serve as a criterion to distinguish the two forms as far as *A. fumigatus* is concerned, but for *A. flavus* the results are more irregular. However, the thermal characteristics allow one to understand why *A. fumigatus* infects birds so readily.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AGNIHOTRI V. P., 1964. Studies on *Aspergilli*. XVI. Effect of pH, temperature, and carbon and nitrogen interaction. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **24** (4), 305-314.
- RAI J. N., TEWARI J. P., SINHA A. K., 1967. Effect of environmental conditions on sclerotia and cleistothecia production in *Aspergillus*. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **31** (3-4), 209-224.
- RAPER K. B., FENNELL D. I., 1965. *The genus Aspergillus*. 1 vol. 686 p., Baltimore, The Williams and Wilkins Co.
- SAËZ H., 1961. Quelques cas d'aspergillose aviaire observés au Parc zoologique de Paris : le parasite et l'hôte. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, **36** (1-2), 154-165.
- SAËZ H., 1965. *Aspergillus fumigatus* FRESENIUS isolé chez l'animal. Analyse portant sur quatre années de recherches. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, **40** (1), 105-118.
- SAËZ H., 1966. Température maximum de développement d'*Aspergillus fumigatus* FRESENIUS et *Aspergillus flavus* LINK. *Rec. Méd. Vét.*, **142**, 205-213.
- SAËZ H., 1969. Température maximum de développement de quelques *Aspergillus* isolés chez l'animal. *Schweiz. Archiv Tierheilk.*, **111** (12), 673-687.
- URBAIN A., GUILLOT G., 1938. Les Aspergilloses aviaires. *L'Oiseau, Rev. Fr. Ornith.*, **4**, 558-591.
- VRIES (De) G. A., CORMANE R. H., 1969. A study on the possible relationships between certain morphological and physiological properties of *Aspergillus fumigatus* FRES. and its presence in, or on, human and animal (pulmonary) tissue. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **39** (3-4), 241-253.
-