

Effet de l'interaction cyclodextrine-difénoconazole sur la croissance d'une moisissure responsable d'infections fongiques graves*

STEFFI ROCCHI^{1,2}
 NADIA MORIN-CRINI¹
 CHLOTHILDE LÉCHENAULT-
 BERGEROT¹
 CHLOÉ GODEAU¹
 MARC FOURMENTIN³
 LAURENCE MILLON^{1,2}
 GRÉGORIO CRINI¹

¹ UMR 6249 Chrono-
 environnement
 Université Bourgogne
 Franche-Comté
 16, route de Gray
 25000 Besançon
 France

<steffi.rocchi@univ-fcomte.fr>
 <nadia.crini@univ-fcomte.fr>
 <chlothilde.lechenault@
 gmail.com>
 <chloe.godeau@univ-
 fcomte.fr>
 <laurence.millon@univ-
 fcomte.fr>
 <gregorio.crini@univ-
 fcomte.fr>

² Parasitologie mycologie
 Centre hospitalier régional
 universitaire
 25030 Besançon cedex
 France

³ Laboratoire de physico-
 chimie de l'atmosphère
 MREI2
 Université du Littoral Côte
 d'Opale
 189A, avenue Maurice
 Schumann
 59140 Dunkerque
 France
 <marc.fourmentin@univ-
 littoral.fr>

Tirés à part :
 S. Rocchi

Article reçu le 14 novembre
 2018, accepté le 11 mars 2018

Résumé. Les molécules triazolées sont utilisées en médecine humaine comme antifongiques mais également en agriculture pour lutter contre les champignons phytopathogènes. Dans l'environnement, ces produits phytosanitaires ont un impact non intentionnel sur les souches d'*Aspergillus fumigatus*, responsables d'infection grave chez l'homme. Cette moisissure développe ainsi des résistances, qui sont de plus en plus observées à travers le monde. Dans cette étude, nous avons montré que l'utilisation de cyclodextrines, molécules naturelles issues de la biodégradation enzymatique de l'amidon, permettait de réduire significativement l'activité fongique d'un dérivé triazolé, comme le difénoconazole, sur *A. fumigatus*. L'utilisation des cyclodextrines semble être une voie prometteuse dans la recherche de solutions pour limiter l'émergence des phénomènes de résistance aux antifongiques triazolés.

Mots clés : *Aspergillus fumigatus* ; résistance aux agents antimicrobiens ; triazolés ; cyclodextrine.

Abstract

Effect of the interaction between cyclodextrin and difenoconazole on the growth of mold causing serious fungal infections

Triazole molecules are used as antifungals in human medicine but also in agriculture to control fungi pathogenic to plants. In the environment, these phytosanitary products have an unintended impact on strains of *Aspergillus fumigatus* that cause serious infections in humans, inducing its resistance, as increasingly observed throughout the world. In this study, we showed that the use of cyclodextrins, natural molecules resulting from the enzymatic biodegradation of starch, significantly reduced the fungal activity of a triazole derivative, such as difenoconazole, on *A. fumigatus*. The use of cyclodextrins appears to be a promising approach toward limiting the emergence of resistance to triazole antifungals.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; microbial drug resistance; triazole; cyclodextrin.

A *Aspergillus fumigatus* est une moisissure filamenteuse microscopique ubiquitaire responsable d'un large spectre de pathologies pulmonaires, appelées aspergilloses. Ces pathologies, probablement sous-estimées, touchent trois millions de personnes à travers le monde. Elles peuvent être chroniques ou immuno-allergiques, chez les patients atteints de mucoviscidose ou d'asthme par exemple, ou infectieuses,

* Cette étude a fait l'objet d'une communication orale lors des 19^e Journées francophones des cyclodextrines à Besançon (11 et 12 octobre 2018).

Pour citer cet article : Rocchi S, Morin-Crini N, Léchenault-Bergerot C, Godeau C, Fourmentin M, Millon L, Crini G. Effet de l'interaction cyclodextrine-difénoconazole sur la croissance d'une moisissure responsable d'infections fongiques graves. *Environ Risque Sante* 2019 ; 18 : 411-417. doi : 10.1684/ers.2019.1343

chez les patients immunodéprimés tels que ceux atteints de leucémie aiguë, transplantés (greffes de cellules souches hématopoïétiques), ou encore chez les patients sidéens. L'aspergillose invasive (AI) est la forme la plus sévère d'aspergillose et entraîne des taux de mortalité élevés. Les options de traitements antifongiques en médecine humaine sont limitées. La prophylaxie et le traitement de ces pathologies aspergillaires reposent sur l'utilisation de traitements antifongiques triazolés tels que l'itraconazole pour les formes chroniques, le voriconazole, le posaconazole ou l'isavuconazole pour les formes invasives. L'utilisation de ces antifongiques a considérablement amélioré le taux de survie des patients atteints d'AI. Cependant, des AI dues à des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux antifongiques triazolés sont de plus en plus observées à travers le monde [1-3], avec 85 % des patients immunodéprimés atteints d'AI résistantes mourant dans les trois mois.

Une des voies d'acquisition de résistance est liée à l'utilisation de fongicides inhibiteurs de la 14-alpha-déméthylase (IDM). Ces IDM sont largement utilisés en agriculture pour protéger les cultures céréalières, maraîchères et viticoles des moisissures phytopathogènes, mais aussi dans la culture des plantes ornementales et pour préserver les matériaux comme le bois [4-6]. Ils agissent par le même mécanisme d'action que les antifongiques triazolés médicaux en affectant une étape importante de la voie de biosynthèse de l'ergostérol, un stérol prédominant et essentiel des membranes fongiques. Ils se lient à la 14-alpha-lanostérol déméthylase codée par le gène *cyp51A* et empêchent la conversion du lanostérol en ergostérol, entraînant une accumulation toxique de stérols dans la cellule fongique et diminuant l'intégrité de la membrane [4-6]. Chez *A. fumigatus*, les mécanismes de résistance décrits sont principalement liés à des mutations sur le gène *cyp51A* et son promoteur. Lorsque les IDM sont appliqués pour la préservation contre les champignons phytopathogènes, par exemple par pulvérisation sur les cultures, ils ont aussi un impact non intentionnel sur les souches d'*A. fumigatus* naturellement présentes dans les sols. Par pression de sélection, les souches ayant acquis des mécanismes de résistance, caractérisés par des mutations complexes sur le gène *cyp51A* (TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A), vont subsister dans les sols. Bien que les conditions d'apparition de ces résistances ne soient pas encore connues (influence de facteurs stressants, type de souches, type de reproduction), ceci est corrélé à la présence persistante de molécules triazolées dans l'environnement. Cinq IDM (propiconazole, tébuconazole, difénoconazole, époxiconazole, bromuconazole) sont particulièrement mis en cause dans cette émergence de résistance [7]. Un lien a notamment été mis en évidence par notre équipe entre la présence de souches d'*A. fumigatus* résistantes aux traitements médicaux triazolés et celle de fongicides triazolés dans les sols des différentes exploitations (agricultures céréalières utilisant

du prothioconazole et de l'époxiconazole, scieries utilisant propiconazole et tébuconazole, maraîchers utilisant le difénoconazole) [8-10]. Diminuer les teneurs de ces molécules présentes dans les sols permettrait peut-être de limiter l'apparition des résistances. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce travail.

Récemment, nous avons proposé d'utiliser des cyclodextrines (CD) en tant que matériau encapsulant pour retenir des IDM [11, 12]. Les CD sont des substances issues de la dégradation enzymatique de l'amidon. Ce sont des molécules cages qui comportent au sein de leur structure une cavité qui permet d'emprisonner ou d'encapsuler d'autres molécules (figure 1). Cette propriété remarquable d'encapsulation permet d'établir une relation de type hôte-invité susceptible de modifier et/ou d'améliorer les caractéristiques chimiques et biologiques de la molécule invitée. Pratiquement, tous les domaines d'applications industrielles sont concernés, de la pharmacie au biomédical, en passant par l'hygiène et l'agroalimentaire. Nos résultats récents [11, 12] permettent d'envisager d'utiliser les CD pour piéger les triazoles afin d'éviter leur action non intentionnelle sur *A. fumigatus* entraînant une sélection d'individus résistants dans l'environnement. En effet, les fongicides triazolés présents en solution aqueuse peuvent être éliminés par des phénomènes d'adsorption utilisant des matériaux de CD. Ces fongicides pourraient alors continuer à être pulvérisés pour leurs propriétés fongiques attendues sur les cultures maraîchères par exemple, mais c'est leur dispersion incontrôlée dans les sols qui serait limitée par des processus de piégeage. Cependant, avant même de développer ces processus, différents points doivent être validés, comme par exemple une éventuelle inactivation du fongicide en présence de molécules de CD.

Ainsi, dans cette étude, nous proposons d'étudier l'effet de l'interaction CD-fongicide sur la croissance d'*A. fumigatus*. L'objectif était de vérifier que les molécules triazolées, une fois associées aux molécules de CD (figure 2), perdaient leur propriété fongicide sur *A. fumigatus*. Les expérimentations ont été réalisées avec le difénoconazole (DIFENO), IDM largement utilisé en culture maraîchère dans notre région [8] et présentant les meilleurs taux de rétention avec les CD [11]. En outre, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude de complexation entre le DIFENO et les CD.

Matériels et méthodes

Méthode de référence pour évaluer la résistance aux antifongiques médicaux

La méthode EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) [13, 14] est la méthode de

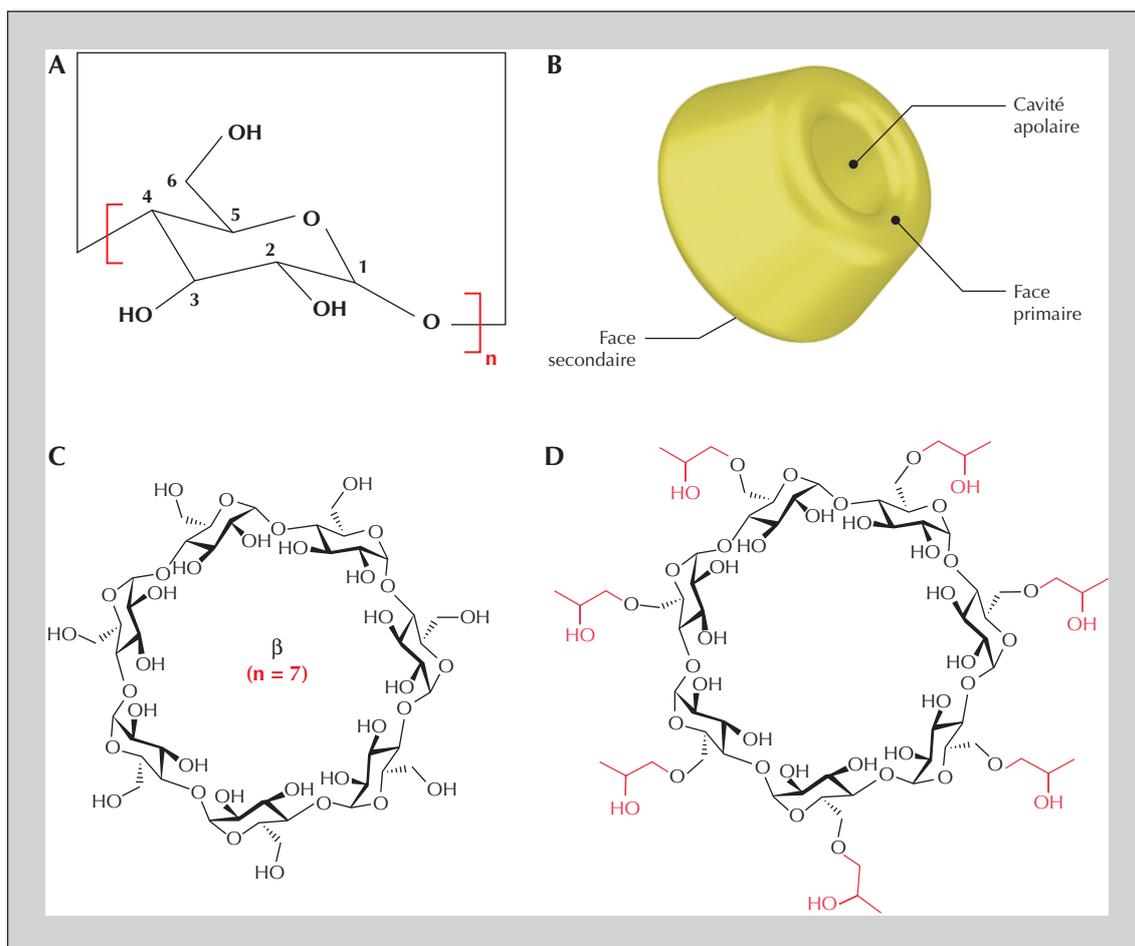


Figure 1. Structure chimique des cyclodextrines. (A) Unités glucose. (B) Représentation figurétique. (C) Structure de la bêta-cyclodextrine (β CD) avec $n = 7$. (D) Structure de l'hydroxypropyl-bêta-cyclodextrine (HP β CD) utilisées dans cette étude.

Figure 1. Chemical structure of cyclodextrins: (A) glucose units; (B) schematic representation; (C) structure of β -cyclodextrin (β CD) with $n = 7$ and (D) structure of the hydroxyl- β -cyclodextrin (HP β CD) used in this study.

référence utilisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) pour les antifongiques médicaux, définie comme la plus faible concentration suffisante pour inhiber la pousse de l'espèce. Cette technique, réalisée en microplaque, consiste à mettre en culture liquide l'espèce fongique avec une gamme de concentrations croissantes de l'antifongique. Le milieu liquide utilisé est le milieu RPMI 1 640 (Sigma Aldrich, Saint Louis, États-Unis). Ce milieu a d'abord été réalisé en mélangeant du RPMI 10,4 g/l ; du MOPS 34,53 g/l et du glucose 18 g/l dans un volume final de 500 ml. Le pH de la solution a été ajusté à 7. Une gamme de dilution de raison 2 allant de 16 à 0,0312 mg d'antifongique par litre est effectuée, puis 100 μ l de chaque point de gamme sont déposés en ligne dans une microplaque de 96 puits ; 100 μ l de solution de spores des différentes souches sont ajoutés. La lecture des CMI est ensuite réalisée par deux personnes, après 24 heures d'incubation à 37 °C (figure 3).

Adaptation de la méthode EUCAST et manipulations préliminaires

La méthode EUCAST a été adaptée afin d'évaluer les propriétés fongicides du DIFENO, associées ou non à différents oligomères. Le DIFENO provient de la société Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Ses caractéristiques sont les suivantes : numéro CAS 119445-68-3, masse moléculaire égale à 406 g/mol, solubilité dans l'eau à 20 °C de 15 mg/l, pureté ≥ 95 % et $\log K_{ow}$ égal à 4,36. Les CD (bêta-cyclodextrine [β CD], pureté ≥ 98 % ; hydroxypropyl-bêta-CD [HP β CD], pureté ≥ 95 %) proviennent de la société Janssen Chimica (Beerse, Belgique). Ce sont des oligomères cycliques du glucose (figure 1). Nous avons également utilisé une maltodextrine (MALTO, pureté $\geq 99,9$ %), oligomère linéaire issu de l'hydrolyse de l'amidon (fournisseur Roquettes, Lestrem, France).

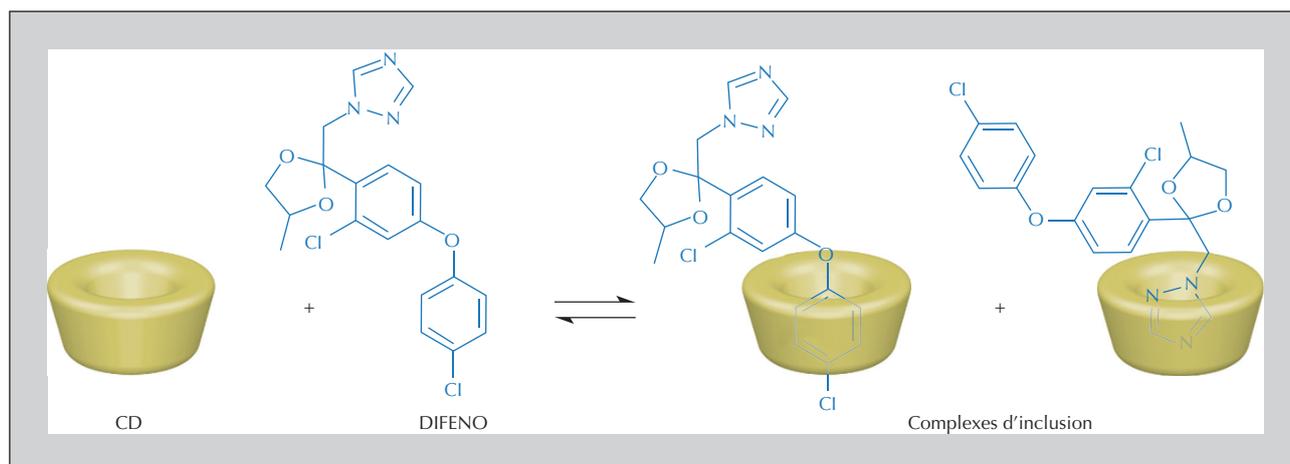


Figure 2. Représentation schématique des complexes d'inclusion possibles entre une cyclodextrine (CD : la molécule hôte) et le fongicide difénoconazole (DIFENO : la molécule invitée).

Figure 2. Schematic representation of the potential inclusion complexes between a cyclodextrin molecule (CD: the host) and a fungicide (difenoconazole: the guest).

En plus du milieu RPMI classique utilisé pour la méthode EUCAST, deux milieux RPMI contenant deux concentrations d'HP β CD ont été testés en solution avec du DIFENO. Le premier permettait d'être dans les conditions une mole de HP β CD pour une mole de DIFENO (à 16 mg/l), et l'autre dix moles de HP β CD pour une mole de DIFENO (à 16 mg/l). Ceci a été réalisé avec deux souches d'*A. fumigatus*, une sensible et une résistante aux traitements antifongiques triazolés médicaux. Nous avons également fait varier les temps de contact (30 minutes, 1 heure ou 24 heures) entre le DIFENO et l'HP β CD avant l'inoculation par les souches d'*A. fumigatus*.

Pour la suite des expérimentations, nous avons choisi un rapport molaire DIFENO/CD de 1/10 et les milieux ont directement été inoculés par les solutions de spores (pas de temps de contact DIFENO/CD).

Effet de l'interaction : détermination des CMI sur une sélection de souches fongiques

Les manipulations ont été réalisées sur 20 souches d'*A. fumigatus* isolées dans les cultures de deux maraîchers de Bourgogne-Franche-Comté, nommés B et L [8]. La sensibilité des souches vis-à-vis des antifongiques médicaux (itraconazole, voriconazole, posaconazole) a été vérifiée par méthode EUCAST. Cette étape préliminaire est indispensable afin de vérifier que les souches n'ont pas de tolérance vis-à-vis des molécules triazolées. Les souches sont considérées résistantes à l'itraconazole et au voriconazole lorsque leur CMI est supérieure à

2 mg/l et résistantes au posaconazole lorsque leur CMI est supérieure à 0,5 mg/l [13, 14]. L'identification des souches a été vérifiée par séquençage du gène de la bêta-tubuline et l'absence de mutations sur le gène *cyp51A* par le séquençage du gène et de son promoteur [15, 16].

Afin de comparer l'influence de la structure des oligosaccharides, des milieux RPMI contenant des β CD ou de la MALTO ont également été produits avec un rapport de dix moles d'oligomères pour une mole de DIFENO. L'effet de l'interaction HP β CD-DIFENO, β CD-DIFENO et MALTO-DIFENO (rapports molaires 10:1) a été évalué pour les 20 souches d'*A. fumigatus*. Deux souches de référence ont également été utilisées, sur chaque plaque, comme contrôles (une souche résistante et une souche sensible aux antifongiques triazolés).

La méthodologie liée à la technique EUCAST (dilution de raison 2) ne permet pas d'avoir précisément l'augmentation de la tolérance de la moisissure vis-à-vis du fongicide lorsque celui-ci est en solution avec un oligomère. Ainsi, pour les souches ayant une CMI \geq 8 mg/l, des manipulations complémentaires d'évaluation de résistance, avec des dilutions de DIFENO intermédiaires (concentrations allant de 4 à 16 mg/l, par pas de 1 mg/l), ont été réalisées afin d'affiner la CMI.

Résultats

Nous avons d'abord réalisé une manipulation préliminaire pour fixer les conditions de nos expériences, en particulier le rapport molaire HP β CD/DIFENO et le temps de contact. Lorsque le milieu de culture contient une

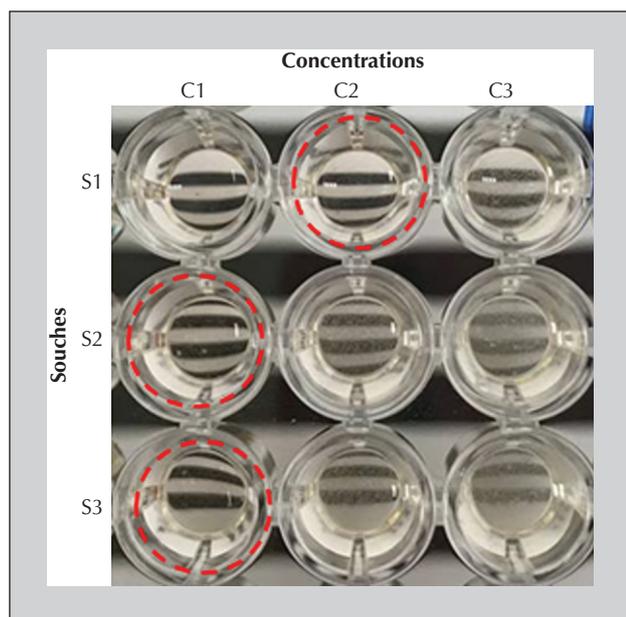


Figure 3. Photographie de neuf puits d'une microplaque pour la méthode EUCAST. Exemple des lectures des concentrations minimales inhibitrices (CMI). Les concentrations C en antifongiques ou fongicides sont déposées en colonnes, avec C1 = 2 x C2 = 4 x C3 ; les souches S sont déposées en ligne ; la CMI, entourée en rouge, est la plus petite concentration qui inhibe la pousse de la moisissure ; elle est repérée par une absence de turbidité dans le puits.

Figure 3. Photograph of nine wells of a microplate for the EUCAST method. Example of minimum inhibitory concentration (MIC) readings. Concentrations (C) of antifungals or fungicides are deposited in columns, with C1 = 2 x C2 = 4 x C3 ; strains (S) are deposited on line; the MIC, surrounded in red, is the smallest concentration that inhibits the growth of the mold; it is detected by an absence of turbidity in the well.

mole d'HP β CD pour une mole de DIFENO (à 16 mg/l), les CMI mesurées ne sont pas différentes par rapport au milieu de culture classique. En revanche, les CMI mesurées à partir d'un milieu de culture contenant dix moles d'HP β CD pour une mole de DIFENO sont systématiquement plus élevées. Ainsi, le rapport 10 moles/1 mole a été utilisé pour la suite des expérimentations. Les résultats de l'inoculation réalisée immédiatement, après 30 minutes, 1 heure ou 24 heures n'ont montré aucune différence de CMI. Nous avons donc choisi d'inoculer directement les souches d'*A. fumigatus* pour la suite des expérimentations.

Les CMI ont ensuite été évaluées avec un milieu uniquement composé de RPMI pour caractériser les souches. D'après les résultats rapportés dans le *tableau 1*, les 20 *A. fumigatus* étaient sensibles aux antifongiques triazolés médicaux comme en témoigne leur CMI. En effet, les valeurs obtenues étaient comme attendues pour des souches sensibles : ≤ 2 mg/l pour l'itraconazole et le

Tableau 1. Concentrations minimales inhibitrices pour les 20 souches d'*A. fumigatus* testées (exprimées en mg/l).

Table 1. Minimum inhibitory concentrations for the 20 strains of A. fumigatus (expressed in mg/l).

Souches*	CMI antifongiques médicaux			CMI
	Voriconazole	Itraconazole	Posaconazole	Difénconazole
B6	0,5	1	0,25	2
B7	0,25	0,5	0,25	1
B10	0,5	1	0,25	2
B15.1	0,5	0,5	0,25	2
B15.2	0,25	0,5	0,25	1
B15.3	0,5	1	0,25	2
B16	0,5	0,25	0,25	1
B17.2	0,25	0,25	0,25	1
B18	0,5	0,5	0,25	2
B19	0,5	0,25	0,25	2
B20	0,5	0,25	0,25	2
B28.2	2	0,25	0,25	4
B28.3	1	0,25	0,125	2
B28.4	1	0,5	0,125	4
B28.5	1	1	0,25	4
L12	0,25	0,25	0,5	1
L16	0,5	0,25	0,5	2
L18	0,5	0,25	0,125	4
L19	0,5	0,25	0,5	1
L22	0,5	0,25	0,5	2
L30	0,25	0,25	0,5	2
Sensible	0,5	1	0,5	4
Résistante	>16	4	1	16

* Souches isolées chez les maraîchers notés B et L. Pour chaque exploitation, 30 prélèvements ont été réalisés. Le nombre correspond au numéro de sol prélevé. Dans certains cas, plusieurs souches ont été isolées du même sol et ont été sous-numérotées (exemple B28.2, B28.3 etc.).

voriconazole, et $\leq 0,5$ mg/l pour le posaconazole. La manipulation a pu être validée par l'utilisation des deux souches de référence (une sensible et une résistante) dont les valeurs figurent à la fin du tableau. Parallèlement, les CMI pour le DIFENO sont présentées dans ce *tableau 1* et sont systématiquement supérieures à celles obtenues pour les antifongiques médicaux. Pour les 20 souches des maraîchers sensibles aux triazolés médicaux, les CMI DIFENO se situent entre 1 et 4 mg/l alors que la souche résistante présente une CMI égale à 16 mg/l.

Après ces étapes préliminaires, l'effet de la présence de MALTO (oligomère linéaire de glucose), β CD et HP β CD (oligomères cycliques) dans le milieu de culture, sur l'activité fongicide du DIFENO, a été évalué en adaptant la méthode de référence EUCAST. Quel que soit l'oligomère considéré, les CMI obtenues étaient identiques ou supérieures à celles obtenues avec le milieu RPMI seul (*figure 3*). En outre, les CMI observées pour la β CD et la MALTO n'étaient pas significativement plus

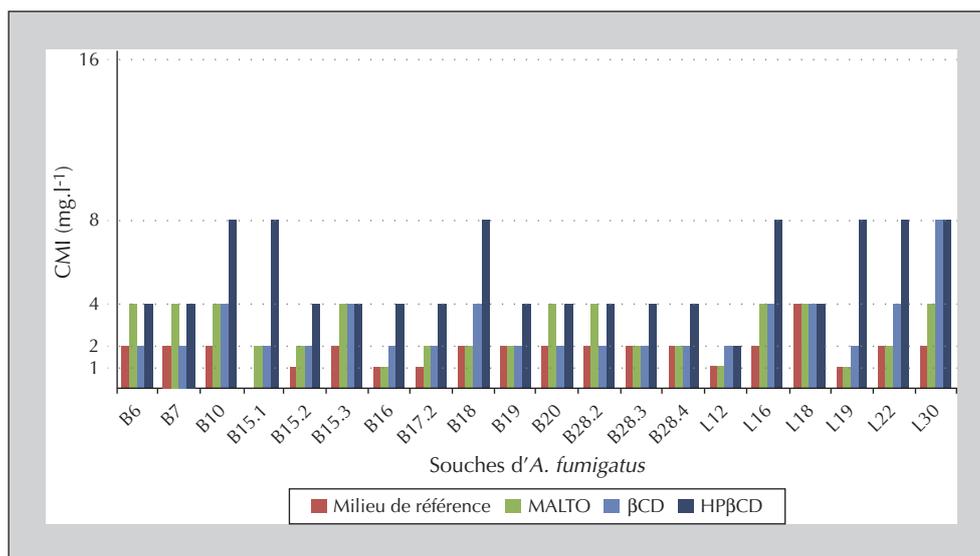


Figure 4. Histogramme comparatif des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues sur les 20 souches d'*A. fumigatus* sensibles en présence de difénoconazole, en milieu de référence (non supplémenté en oligomère), en milieu supplémenté par MALTO, βCD ou HPβCD (rapport une mole de difénoconazole pour dix moles d'oligomères).

Figure 4. Comparative histogram of minimum inhibitory concentrations (MIC) obtained with the 20 sensitive *A. fumigatus* strains in the presence of difenoconazole, in reference medium (not supplemented with oligomers), in medium supplemented with MALTO, βCD or HPβCD (ratio 1 mole of difenoconazole to 10 moles of oligomers).

importantes que celles obtenues pour le milieu RPMI seul (figure 3). De plus, ces deux oligomères entraînaient des CMI proches. En revanche, une différence significative des CMI a été observée lorsque le milieu était supplémenté en HPβCD (test de Friedman, p -value < 0,01).

Afin de confirmer l'augmentation de la tolérance des souches vis-à-vis du DIFENO en présence d'HPβCD, des dilutions intermédiaires de fongicides ont été réalisées pour les souches B10, B15.1, B18, L16, L19, L22 et L30 qui présentaient des CMI égales à 8 mg/l (figure 4). Les résultats concernant les dilutions intermédiaires (de 4 à 16 mg/l) sont présentés dans le tableau 2. Ainsi, l'ajout de HPβCD permet d'accroître la tolérance des *A. fumigatus* testés avec des augmentations de 2 à 5,5 fois la CMI mesurée avec le milieu de référence.

Discussion et conclusion

Les molécules triazolées ne semblent pour l'instant pas avoir d'équivalent en termes d'efficacité, ni en médecine humaine, ni dans les filières agricoles. Leur utilisation dans l'environnement doit toutefois être réduite afin de limiter, entre autres, leur impact non intentionnel sur des moisissures pathogènes pour l'homme, telles que *A. fumigatus*. Dans ce contexte, une solution semble être l'utilisation de CD. Les résultats de cette étude ont en effet démontré que la présence d'une substance naturelle comme l'HPβCD, en conditions

contrôlées, permet de diminuer significativement l'activité fongicide du difénoconazole.

En effet, nos résultats ont montré qu'en présence des différents oligomères testés, la plupart des souches ont une tolérance accrue vis-à-vis du fongicide. En d'autres termes, ceci traduit un effet d'inhibition de l'activité de

Tableau 2. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) en adaptant la technique EUCAST avec des dilutions intermédiaires (de 7 à 16 mg/l) pour les souches d'*A. fumigatus* ayant des CMI égales à 8 mg/l avec les dilutions standards.

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MIC), by adapting the EUCAST technique with intermediate dilutions (from 7 to 16 mg/L) for strains of A. fumigatus with MIC equal to 8 mg/L with standard dilutions.

Souches	CMI (mg/l)		
	DIFENO	DIFENO+ HPβCD Dilutions standard	DIFENO+ HPβCD Dilutions intermédiaires
B10	2	8	11
B15.1	2	8	10
B18	2	8	10
L16	2	8	6
L19	2	8	6
L22	2	8	6
L302	2	8	6

celui-ci en présence des oligosaccharides dans le milieu. Les oligomères β CD et MALTO entraînaient des CMI proches, ce qui suppose que la structure du glucose utilisé (linéaire ou cyclique) n'induit pas d'effet supplémentaire dans ce cas. Cependant, une fois associé à l'HP β CD, le DIFENO perd d'autant plus ses propriétés fongicides sur *A. fumigatus*. Dans ce cas, il semble qu'une interaction privilégiée puisse s'établir entre ce composé et le DIFENO, sans doute la formation d'un complexe d'inclusion.

L'une des perspectives de ce travail sera de démontrer cette formation de complexe d'inclusion entre la CD et le fongicide triazolé par des mesures de résonance magnétique nucléaire réalisées sur des solutions aqueuses de ces deux substances. Nous envisageons également d'étendre cette étude à l'utilisation d'autres maltodextrines et CD, de tailles différentes ou sous formes natives ou polymères, afin de préciser les interactions difénoco-

nazole/oligomère dans l'évaluation de l'activité fongique. L'utilisation des CD, en diminuant l'activité fongicide des résidus triazolés dans les sols, pourrait permettre une diminution de la pression de sélection, et donc de l'émergence de souche d'*A. fumigatus* résistant à ces fongicides. Il faudra donc aussi vérifier que la diminution de l'activité non intentionnelle du fongicide sur *A. fumigatus* soit suffisante pour ne pas entraîner de pression de sélection sur les populations fongiques des sols. ■

Remerciements et autres mentions

Financement : cette recherche a été financée par l'OSU Théta de Besançon, la région Bourgogne Franche-Comté et la Zone Atelier Arc Jurassien (ZAAJ) ; **liens d'intérêts** : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

Références

- Garcia-Rubio R, Cuenca-Estrella M, Mellado E. Triazole resistance in *Aspergillus* species: an emerging problem. *Drugs* 2017 ; 77 : 599-613.
- Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis* 2016 ; 62 : 362-8.
- Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog* 2013 ; 9 : e1003633.
- Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009 ; 9 : 789-95.
- Gisi U. Assessment of selection and resistance risk for demethylation inhibitor fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: a critical review. *Pest Manag Sci* 2014 ; 70 : 352-64.
- Berger S, El Chazli Y, Babu AF, Coste AT. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a consequence of antifungal use in agriculture? *Front Microbiol* 2017 ; 8 : 10-24.
- Snelders E, Camps SMT, Karawajczyk A, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2012 ; 7 : e31801.
- Rocchi S, Poncot M, Morin-Crini N, et al. Determination of azole fungal residues in soils and detection of *Aspergillus fumigatus*-resistant strains in market gardens of Eastern France. *Environ Sci Pollut Res Int* 2018 ; 25 : 32015-23.
- Rocchi S, Daguindau E, Grenouillet F, et al. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolate with the TR34/L98H mutation in both a fungicide-sprayed field and the lung of a hematopoietic stem cell transplant recipient with invasive aspergillosis. *J Clin Microbiol* 2014 ; 52 : 1724-6.
- Jeanvoine A, Rocchi S, Reboux G, Crini N, Crini G, Millon L. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in sawmills of Eastern France. *J Appl Microbiol* 2017 ; 123 : 172-84.
- Crini G, Saintemarie AE, Rocchi S, et al. Simultaneous removal of five triazole fungicides from synthetic solutions on activated carbons and cyclodextrin based adsorbents. *Heliyon* 2017 ; 3 : e00380.
- Morin-Crini N, Rocchi S, Jeanvoine A, Garcia C, Millon L, Crini G. Analysis of triazole fungicides in aqueous solutions and their removal on modified activated carbons. *Arabian J Sci Eng* 2018 ; 46 : 3493-501.
- Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Arendrup MC. EUCAST technical note on voriconazole and *Aspergillus spp.* *Clin Microbiol Infect* 2013 ; 19 : E278-80.
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope WW. EUCAST technical note on *Aspergillus* and amphotericin B, itraconazole and posaconazole. *Clin Microbiol Infect* 2012 ; 18 : E248-50.
- Alanio A, Sitterle E, Liance M, et al. Low prevalence of resistance to azoles in *Aspergillus fumigatus* in a French cohort of patients treated for haematological malignancies. *J Anti-microb Chemother* 2011 ; 66 : 371-4.
- Mellado E, Diaz-Guerra TM, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (*cyp51A* and *cyp51B*) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2001 ; 39 : 2431-8.