

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de l'Univers et de la terre  
Département de Biologie



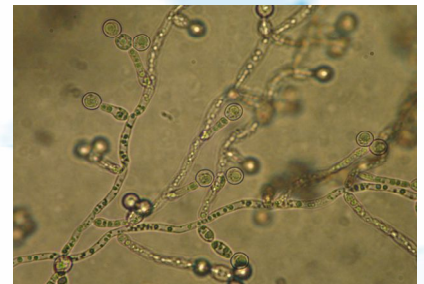
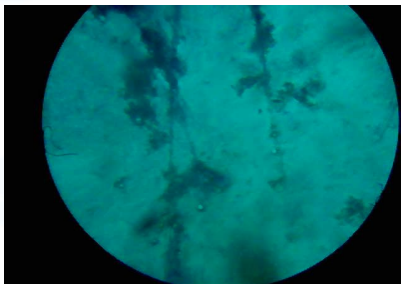
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
UNIVERSITE 8 MAI 1945 - GUELMA

# MYCOLOGIE

*Etude des Champignons d'Intérêt Médicale et Vétérinaires et des  
Méthodes d'Identification*

## Support de Cours

**Dr. KSOURI SAMIR**



Année universitaire : 2016/2017

# *AVANT-PROPOS*

Dès le début des années quarante, soit depuis la banalisation de l'antibiothérapie et l'émergence de facteurs dits « facteurs de risques », comme ceux aggravant la profondeur et la durée de l'immunodépression telle : l'apparition de nouvelles maladies comme le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), mais aussi la multiplication des facteurs iatrogéniques et l'extension des greffes d'organes ou de tissus (moelle osseuse), à l'origine de nombreuses infections nosocomiales, sont autant de circonstances qui expliquent l'extension actuelle des mycoses qui connaît une recrudescence constante. La liste des nouveaux champignons émergeant en médecine et en médecine vétérinaire ne cesse de s'augmenter. Beaucoup d'espèces, en particulier des champignons levuriformes appelés « levures », d'autres filamenteux appelés « moisissures », jadis inconnues du biologiste, ou qualifiées de « contaminants de laboratoire », sont réellement impliquées dans un processus pathologique.

Les levures sont des champignons microscopiques, unicellulaires, se multipliant par bourgeonnement et produisant parfois du mycélium ou du pseudomycélium. Comme tous les champignons, ce sont des organismes hétérotrophes ils ne peuvent se développer qu'en présence de matières organiques préformées. Certains d'entre eux (*Malassezia*) sont lipodépendants et nécessitent pour leur croissance l'apport d'huile en surface du milieu de culture. Les levures d'intérêt médical représentent une flore importante et variée issue essentiellement du milieu extérieur (sol, eau, fruits, céréales, ...). Chez l'homme et de nombreux animaux, certaines espèces vivent en commensales, colonisant le revêtement cutané, mais aussi les voies digestives ou génitales ; d'autres sont des saprophytes issus du milieu extérieur qui infectent l'homme et les animaux par voie alimentaire, aérienne ou transcutanée (traumatisme, corps étrangers, ...). Les champignons dimorphiques qui présentent un stade « levure » à l'état parasitaire et un stade filamenteux en culture, sont essentiellement d'origine exotique (*Histoplasma*, *Blastomyces*, *Paracoccidioides*, ...) et ne seront pas traités dans cet ouvrage.

Quand aux moisissures, les dermatophyties sont un motif fréquent de consultation en pratique dermatologique. De ce fait elles doivent être parfaitement connues des biologistes qui auront en charge le diagnostic au laboratoire. D'autres agents comme celles des *Aspergillus*, *Scedosporium*... sont redoutables.

Le présent document est réparti en trois chapitres : Généralités sur les champignons, Méthodes d'identification des moisissures et Méthodes d'identification des levures. De même, chaque chapitre comportant à l'intérieur des sous chapitres.

L'objectif de ce support de cours est d'apporter au futur biologiste parasitologue, confronté à un champignon détecté dans un échantillon destiné au laboratoire de parasitologie, une démarche diagnostique ainsi que les éléments morphologiques nécessaires à son identification.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Avant propos</b> .....	<b>i</b>
---------------------------	----------

## **Chapitre I : GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS**

I. Définitions, Champignons et Mycoses.....	1
II. Caractères morphologiques.....	2
II.1. Appareil végétatif (Thalle).....	2
III. Biologie.....	3
III.1. Nutrition.....	3
III.2. Croissance.....	3
III.3. Appareil reproducteur.....	3
III.3.1. Reproduction asexuée.....	4
III.3.2. Reproduction sexuée.....	8
IV. Classification des Champignons d'intérêt général.....	8
IV.1. Taxinomie.....	9

## **Chapitre II : ETUDE DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX OU LES MOISSURES**

I. CRITÈRES D'IDENTIFICATION.....	13
I.1. Examen macroscopique des cultures / morphologie macroscopique.....	13
I.2. Examen Microscopique des cultures / morphologie microscopique.....	14
I.2.1. Le thalle végétatif siphonné ou septé.....	14
I.2.2. La couleur des hyphes.....	14
I.2.3. L'origine endogène ou exogène des spores.....	14
I.2.4. L'aspect des spores.....	14
I.2.5. La présence de chlamydospores.....	15
I.2.6. Les différents modes de formation des conidies.....	15
I.2.7. Le mode de groupement des conidies.....	15
I.2.8. Le mode d'implantation des cellules conidiogènes.....	15
I.2.8.1. Cellules conidiogènes indifférenciées ou peu différenciées.....	15
I.2.8.2. Cellules conidiogènes différenciées.....	15
I.2.9- La présence de structures protectrices compactes, issues de la reproduction asexuée ou sexuée.....	16
I.2.9.1- D'origine asexuée.....	16
I.2.9.2. D'origine sexuée.....	16
II. DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE D'UNE MOISSURE D'INTÉRÊT MÉDICAL ET VÉTÉRINAIRE.....	16
III. ÉTUDE DES PRINCIPALES MOISSURES D'INTÉRÊT MÉDICAL ET VÉTÉRINAIRE.....	26
III.1. Les Mucorales.....	26
III.1.1. Épidémiologie.....	26
III.1.2. Pouvoir pathogène.....	26
III.1.3. Caractères culturels.....	26
III.1.4. Morphologie microscopique.....	26
III.2. Les Aspergillus.....	27

III.2.1. Épidémiologie.....	27
III.2.2. Pouvoir pathogène.....	28
III.2.3. Caractères culturels.....	28
III.2.4. Morphologie microscopique.....	29
III.2.5. Espèces par ordre d'importance en mycologie médicale et vétérinaire.....	29
III.3. Les autres Mucédinés ou Hyalohyphomycètes.....	32
III.3.1. Épidémiologie.....	32
III.3.2. Pouvoir pathogène.....	33
III.3.3. Caractères culturels.....	33
III.3.4. Morphologie microscopique.....	33
III.4. Les Dématiés (ou Phaéohyphomycètes) et les Coelomycètes.....	34
III.4.1. Epidémiologie.....	34
III.4.2. Pouvoir pathogène.....	34
III.4.3. Caractères culturels.....	34
III.4.4. Morphologie microscopique.....	34
III.5. Démarche diagnostique au laboratoire.....	34
III.5.1. Prélèvements.....	34
III.5.2. Examen direct.....	35
III.5.3 Culture.....	35
III.5.4. Incubation.....	35
III.5.5. Examen des colonies fongiques.....	35
III.5.6. Culture sur lame.....	36
III.5.7. Interprétation.....	36
III.6. Les Dermatophytes.....	37
III.6.1. Généralités sur les dermatophytes et les dermatophyties.....	37
III.6.1.1. Définition – Taxinomie.....	37
III.6.1.2. Origine des dermatophytes.....	38
III.6.1.3. Reproduction sexuée des dermatophytes.....	40
III.6.2. Facteurs favorisants.....	41
III.6.3. Aspects cliniques.....	42
III.6.4. Pathogénie.....	43
III.6.5. Diagnostic biologique des dermatophytes.....	44

## **Chapitre III : ETUDE DES CHAMPIGNONS LEVURIFORMES OU LES LEVURES**

I. GENERALITES SUR LES LEVURES D'INTERET MEDICAL ET VETERINAIRE.....	66
I.1. Définition – Taxinomie.....	66
I.2. Les agents des levuroses.....	68
I.2.1. Les Candida.....	68
I.2.2. Les cryptococques.....	74
I.2.3. Les Malassezia.....	79
I.2.4. Les Rhodotorula.....	79
I.2.5. Les Trichosporon.....	79
I.2.6. Les Saccharomyces.....	80
I.2.7. Les Geotrichum.....	80
I.3. Les principaux facteurs favorisants les candidoses.....	80
I.3.1. Facteurs liés à l'hôte.....	81



I.3.2. Facteurs extrinsèques et/ou iatrogènes.....	81
I.4. La cryptococcose.....	82
I.5. Les malassezioses.....	82
I.6. Les rhodotoruloses, les saccharomycoses, les trichosporonoses et les géotrichoses.....	82
II. Aspects cliniques des levures.....	83
III. Diagnostic biologique des levures.....	84
III.1. Diagnostic mycologique.....	84
III.1.1. Le prélèvement.....	84
III.1.2. L'examen direct.....	84
III.1.2.1. Examen direct des prélèvements superficiels.....	84
III.1.2.2. Examen direct des prélèvements profonds.....	85
III.2. Apport de l'examen anatomo-pathologique.....	89
III.3. La culture.....	90
III.3.1. Ensemencement.....	94
III.3.2. Milieux de culture.....	95
III.4. Identification des levures au laboratoire.....	99
III.4.1. Identification de <i>Candida albicans</i> .....	104
III.4.2. Identification des espèces non albicans.....	108
III.5. Techniques innovantes.....	114
III.5.1. Diagnostic des candidoses profondes.....	114
III.5.2. Méthodes d'identification.....	115
III.5.3. Méthodes de typage moléculaire.....	117
III.6. Diagnostic indirect.....	118
III.6.1. Recherche d'anticorps sériques.....	118
III.6.2. Recherche d'antigènes circulants.....	119
III.6.2.1. Les candidoses.....	120
III.6.2.2. La cryptococcose.....	122
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>123</b>

## LISTE DES FIGURE

Figure N°	Titre	Page
1	<b>Place des champignons dans le monde vivant</b>	1
2	<b>Principaux types d'hyphes</b>	2
3	<b>Origine des filaments mycéliens</b>	2
4	<b>Thalles levuriformes</b>	3
5	<b>Alternance des phases du cycle biologique des levures</b>	4
6	<b>Reproduction asexuée des champignons <i>fungi imperfecti</i></b>	7
7	<b>Spores sexués</b>	8
8	<b>Classification générale des champignons</b>	9
9	<b>Classification des Zygomycètes</b>	10
10	<b>Classification des Deutéromycètes</b>	12
11	<b>Démarche générale du diagnostic d'une moisissure</b>	17
12	<b>Clé d'identification des Mucorales</b>	18
13	<b>Clé d'identification des Mucédinés</b>	19
14	<b>Clé d'identification des Dématiés</b>	23
15	<b>Clé d'identification des Coelomycètes</b>	25
16	<b>Appareil reproducteur des Mucorales</b>	27
17	<b>Appareil reproducteur des Aspergillus</b>	30
18	<b>Clé d'identification des Aspergillus présentés</b>	30
19	<b>Organes de fructification des Aspergillus</b>	32
20	<b>Prélèvement d'une moisissure à l'aide de cellophane adhésive</b>	35
21	<b>Culture sur lame pour observation des organes de fructification</b>	36
22	<b>Mode d'invasion des cheveu ou des poils</b>	44
23	<b>Examen du cuir chevelu sous lampe de Wood</b>	45
24	<b>Matériel nécessaire au prélèvement des dermatophyties</b>	46
25	<b>Examen direct des squames et fragments d'ongles</b>	48
26	<b>Les différents types de parasitisme pilaire</b>	49
27	<b>Milieux de cultures</b>	51
28	<b>Les ornementations</b>	53
29	<b>Milieux d'identification</b>	55
30	<b>Démarche diagnostique des dermatophyties</b>	57
31	<b>Clé d'identification des dermatophytes</b>	60
32	<b>Systématique simplifiée des principales levures asexuées d'intérêt médical et vétérinaire</b>	67
33	<b>Systématique des levures d'intérêt médical et vétérinaire dont le stade sexué est connu (le nom du stade asexué est indiqué entre parenthèses)</b>	68
34	<b>Examen direct des prélèvements superficiels - muqueuses</b>	87
35	<b>Examen direct des prélèvements superficiels – peau et phanères</b>	88
36	<b>Examen direct des prélèvements superficiels - blastospores et pseudofilaments sur frottis buccal coloré au MGG</b>	91
37	<b>Examen direct des prélèvements superficiels - blastospores et filaments mycéliens sur frottis de lésion cutanée coloré au Gomori-Grocott</b>	91
38	<b>Examen anatomo-pathologique dans une candidose oesophagienne</b>	92
39	<b>Examen anatomo-pathologique de biopsies colorées à l'HES lors de cryptococcoses</b>	93

40	<b>Cryptococcose - Mise en évidence de la capsule à l'examen anatomo-pathologique par coloration au bleu alcian</b>	94
41	<b>Milieux de culture pour isolement et identification des levures</b>	97
42	<b>Démarche diagnostique d'une levure au laboratoire - Examen direct</b>	99
43	<b>Démarche diagnostique d'une levure au laboratoire - Cultures</b>	100
44	<b>Arbre d'identification devant une culture d'aspect levuriforme</b>	101
45	<b>Aspect macroscopique des principaux genres de levures sur milieu de Sabouraud</b>	102
46	<b>Aspect microscopique des principaux genres de levures en culture sur milieu de Sabouraud</b>	103
47	<b>Identification de <i>Candida albicans</i></b>	104
48	<b>Test de blastèse</b>	106
49	<b>Recherche de la chlamydosporulation</b>	106
50	<b>Bichro-latex<sup>®</sup> Albicans</b>	107
51	<b>Glabrata RTT<sup>®</sup></b>	109
52	<b>Détection de levures à partir des hémocultures positives à l'aide du kit Yeast Traffic Light PNA FISHTM</b>	116
53	<b>Détection des anticorps anti-Candida par immunofluorescence indirecte</b>	119
54	<b>Détection des anticorps anti-Candida par électrosynérèse</b>	119
55	<b>Détection des <math>\beta</math>-glucanes circulants</b>	121
56	<b>Principe du test CANDI-VAGI pour le diagnostic des candidoses vaginales</b>	122

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	<b>Principaux dermatophytes agents de zoonoses rencontrés chez l'homme</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>Caractéristiques biologiques des principaux dermatophytes - parasitisme pilaire et caractères culturels</b>	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>Spectre clinique habituel des espèces du genre Candida</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>Spectre clinique des levures</b>	<b>83</b>
<b>5</b>	<b>Modalités des prélèvements selon la localisation superficielle ou profonde des levures</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Caractéristiques des différentes galeries d'identification commercialisées</b>	<b>110</b>
<b>7</b>	<b>Caractéristiques morphologiques des principales levures d'intérêt médical et vétérinaire</b>	<b>112</b>

# CHAPITRE I :

## GÉNÉRALITÉS SUR LES CHAMPIGNONS

### I. Définitions, Champignons et Mycoses

Si aujourd'hui on admet que les champignons constituent un règne individualisé au sein du monde vivant (Figure 1). Les champignons sont des organismes eucaryotes, hétérotrophes, immobiles qui se nourrissent par absorption. Ils se distinguent ainsi des bactéries (organismes procaryotes), des plantes (organismes eucaryotes, immobiles mais autotrophes) et des animaux (organismes eucaryotes, mobiles se nourrissant par ingestion et digestion) (Chabasse et *al.*, 1999).

Les champignons, appelés aussi mycètes, sont des organismes eucaryotes uni ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes), d'aspect filamenteux ou levuriforme. Cosmopolites, ils sont retrouvés partout dans la nature. Ils jouent un rôle essentiel de recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir des sources carbonées externes (hétérotrophie). Leur particularité morphologique est d'être étroitement liés à leur substrat nutritif grâce à un réseau mycélien très développé.

Sur un plan biochimique, les champignons sont caractérisés par la présence d'une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, notamment des  $\beta$  glucanes et de la chitine. L'ergostérol constitue le principal stérol de leur membrane, et la synthèse de la lysine s'effectue par la voie de l'acide  $\epsilon$  amino-adipique.

Une autre de leur caractéristique remarquable est leur reproduction. Ils produisent en effet un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion (et de contamination) considérable. Ces spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui seront la base de leur classification. Le pouvoir pathogène des champignons peut s'exprimer de diverses façons. En produisant des toxines, ils peuvent être à l'origine d'intoxication alimentaire, ou de mycotoxicoses par l'accumulation de ces toxines dans des végétaux et leur consommation par l'homme ou l'animal. La colonisation, invasion ou dissémination du champignon dans l'organisme humain ou animal ; ce parasitisme est à l'origine de maladies appelées mycoses.

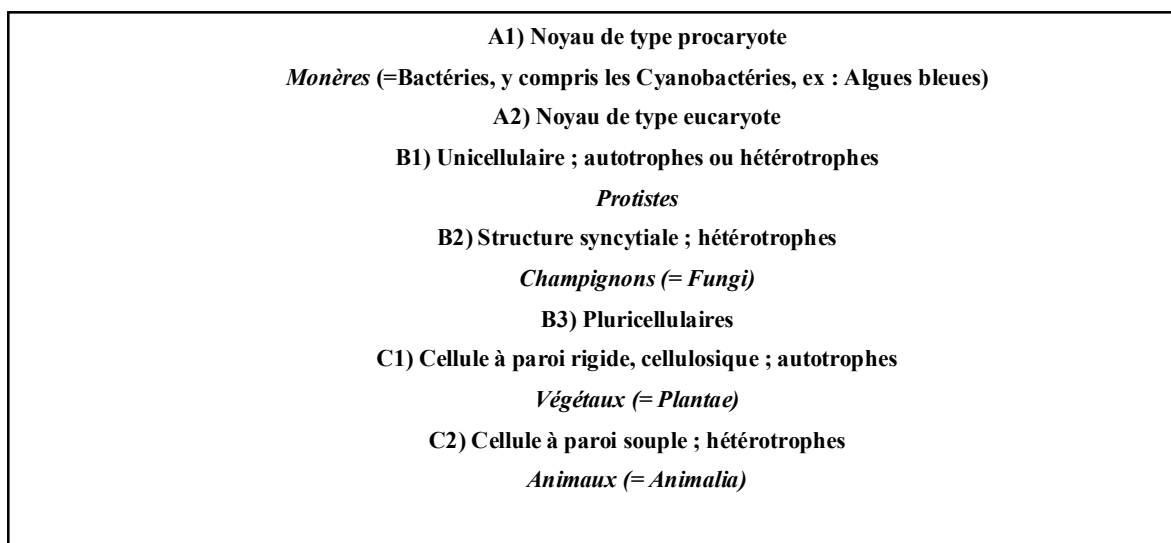


Figure 1 : Place des champignons dans le monde vivant (Chermette et Bussieras, 1993)

## II. Caractères morphologiques

C'est en vie saprobiotique, donc en culture, que les champignons montrent leurs formes les plus complètes, tandis qu'ils apparaissent toujours plus ou moins dégradés en vie parasites (Euzéby, 1992).

### II.1. Appareil végétatif (Thalle)

a) Le plus souvent il se présente sous forme d'un système tubulaire, de filaments ramifiés et parfois anastomotiques, appelés « **hyphes** ». On parle alors de champignons filamenteux.

➤ **Cœnocytaire (ou siphonné)** : les filaments sont sans cloisonnement interne, de diamètre irrégulier (5 à 20  $\mu\text{m}$ ) avec des ramifications à angle droit.

On parle alors de *siphomycètes* ou champignons inférieurs (Moulinier, 2003).

➤ **Septé (ou articulé)** : les filaments de diamètre régulier (2 à 10  $\mu\text{m}$ ), ramifiés à angle aigu, sont cloisonnés par des « **septa** » percés d'un orifice (pore) avec isolement de un, deux ou quelques noyaux dans chaque article ainsi formé. Mais il y a communication entre les articles par les pores.

On parle alors de *septomycètes* ou champignons supérieurs (Moulinier, 2003) (Figure 2).

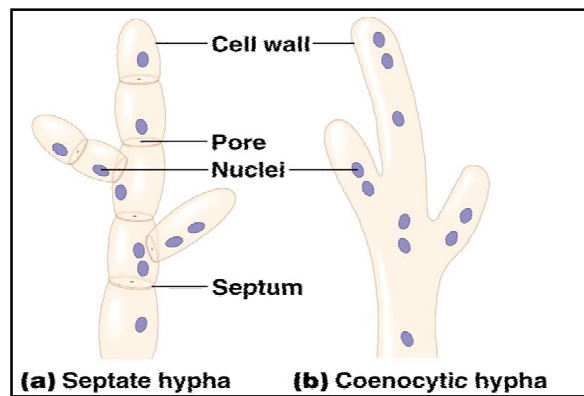


Figure 2 : Principaux types d'hyphes (Case, 2006)

Les spores assure l'apparition des filaments mycéliens, s'il y a des conditions qui permette le développement des ces spores (Figure 3) (Moulinier, 2003).

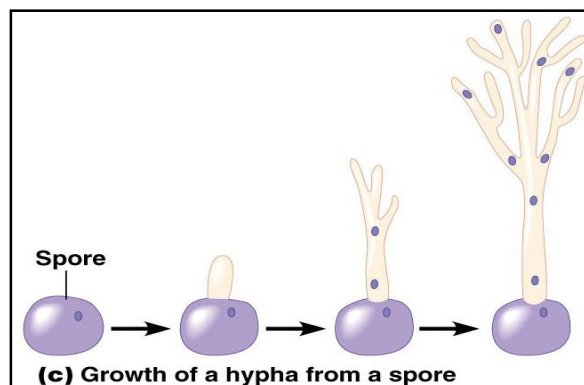


Figure 3 : Origine des filaments mycéliens (Case, 2006)

b) Le thalle est parfois réduit à une structure simplifiée, unicellulaire, sphérique ou sub-sphérique, uninucléée. Il n'y a pas formation d'un véritable mycélium, mais parfois d'un « **pseudomycélium** » par étirement des éléments cellulaires. Il s'agit dans ce cas d'un « **thalle dissocié** » (Moulinier, 2003) (Figure 4).

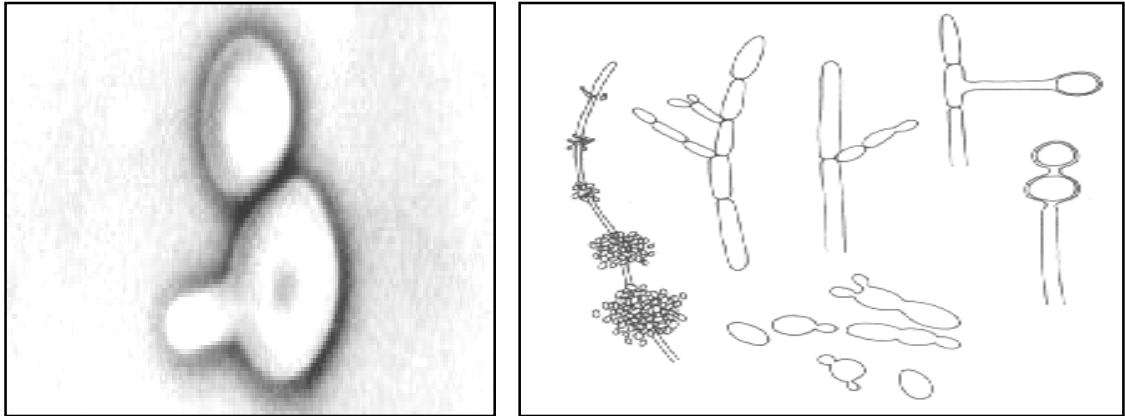


Figure 4 : Thalles levuriformes (Euzeby, 1992)

Les éléments étirés du pseudomycélium ont un diamètre irrégulier et présentent une striction basale, ce qui permet de différencier pseudomycélium et eumycélium ou mycélium vrai. On parle alors de champignons levuriformes ou levures (Moulinier, 2003).

### III. Biologie

#### III.1. Nutrition

Les champignons sont immobile, dépourvus de flagelles, et se nourrissent par absorption des principes nutritifs dissous dans le milieu qui les entoure.

Etant dépourvus de chlorophylle, ils doivent trouver dans ce milieu le carbone sous forme de composés organiques ; trois modes de vie seulement sont alors possibles :

- Utilisation de substances organiques mortes, = saprophytisme, ou mieux saprobiose (du radical bios, vie), car, les champignons n'étant plus reconnus comme des végétaux, on évite le radical « phyte » et l'on remplace alors l'adjectif saprophytique par saprobie.
- Utilisation de substances organiques vivantes, = parasitisme ; les champignons peuvent alors se comporter en parasites de végétaux ou en parasites d'animaux (y compris l'être humain).
- Symbiose avec un organisme chlorophyllien (algue), dans les lichens (Chermette et Bussieras, 1993).

#### III.2. Croissance

Le développement des champignons se fait à l'apex des filaments, d'où une extension centrifuge des colonies (Koenig, 1995).

#### III.3. Appareil reproducteur

Le champignon se reproduit sur mode asexué, on parle de champignons imparfaits (*Fungi imperfecti*), alors que les champignons se reproduisent sur le mode sexué ou, alternativement ou en concomitance (Figure 5), sur les deux modes, asexués et sexués, on parle de champignon parfait (*Fungi perfecti*) (Koenig, 1995).

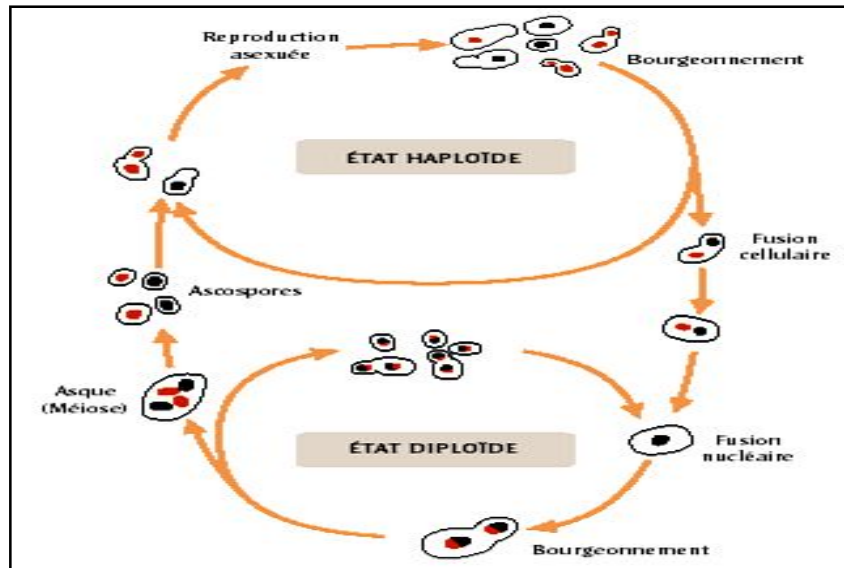


Figure 5 : Alternance des phases du cycle biologique des levures (Delorme et Robert, 1997)

### III.3.1. Reproduction asexuée (Figure 6)

La plus fréquente, caractérise les champignons imparfaits (*cœlomycètes*, *blastomycètes* et *hyphomycètes*).

#### a. Spores endogènes (endospores)

Formées dans un élément vésiculeux ou sacciforme appelé sporocyste porté par un sporocystophore, qui est un filament mycélien spécialisé et reproducteur issu du mycélium végétatif.

Ce mode de sporulation caractérise les *zygomycètes* chez lesquels la reproduction sexuée existe aussi et génère des zygospores.

La libération des spores s'effectue après gélification de la paroi (péridium) du sporocyste (Moulinier, 2003).

#### b. Spores exogènes (exospores)

Formation de spores libres directement à partir du substrat mycélien. Ce mode de sporulation intervient pour les *blastomycètes* (levuriformes) et les *hyphomycètes* (filamenteux).

Les spores ou conidies sont générées :

- à partir de cellules ou articles conidiogènes non différenciés morphologiquement ;
- à partir de cellules conidiogènes différenciées morphologiquement.

Cette conidiogenèse s'effectue selon 2 modes :

#### 1. Conidiogenèse thalique :

**1.1. thalique arthritique** : Le filament mycélien cesse de croître et un cloisonnement intervient entre chaque article. Puis le filament se fragmente et libère par désarticulation, les articles devenus alors des arthrospores (exemples : *Geotrichum sp.*, et *Scytilidium dimidiatum*...).

**1.2. thalique solitaire (holothalique)** : Un article (ou groupe d'articles) latéral ou terminal de l'hyphe s'individualise en une spore unicellulaire (ou pluricellulaire) appelée Micro ou macro aleurie (exemples: les dermatophytes et *Scedosporium*...).



**2. Conidiogénèse balstique (formation de blastospores ou blastoconidies) :** Dans ce cas, les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou non, puis une cloison se forme à l'émergence du bourgeon et la cellule fille (ou spore) se sépare de la cellule mère. Ce mode de conidiogénèse est le plus répandu. On en distingue également plusieurs variantes (Chabasse et *al.*, 2002 ; Moulinier, 2003) :

- **Blastique blastique solitaire** C'est l'exemple des levures appelées aussi blastospores. Une spore est produite à partir de la cellule mère par simple bourgeonnement (exemples : *Candida*, *Malasseia*, ...). Dans ce mode de conidiogénèse, chaque site de bourgeonnement ne fonctionne qu'une seule fois. Cependant une même blastospore peut produire plusieurs cellules filles, de manière successive et en des sites différents mais contigus.
- **Blastique acropète** : Chaque cellule mère bourgeonne une ou plusieurs conidies qui à leur tour produisent de nouvelles conidies et ainsi de suite. Les conidies restent accolées les unes aux autres formant une chaîne de spores dite acropète, la plus jeune des spores (dernière produite) étant située à l'extrémité de la chaîne. En outre, cette chaîne est plus ou moins ramifiée, puisqu'une même cellule mère peut bourgeonner plusieurs cellules filles de manière successive et en des sites différents, mais contigus (exemples: *Cladosporium*, *Alternaria*). On visualise facilement le point d'attache des conidies entre elles (cicatrices de bourgeonnement) lorsqu'elles sont libérées.
- **Blastique synchrone** : Il y a alors bourgeonnement simultané de plusieurs conidies à partir d'une cellule conidiogène qui est renflée à sa partie apicale (exemple: *Botrytis*).
- **Blastique sympodial** : Les conidies naissent toujours par bourgeonnement. mais après chaque bourgeonnement, la cellule conidiogène reprend sa croissance latéralement. Cette alternance de phénomènes de bourgeonnement terminal et de reprise de croissance latérale se traduit par un aspect en sympode ou en zig-zag de la cellule conidiogène où chaque angle correspond à un site de bourgeonnement (exemples : *Beauveria* et *Sporothrix schenckii*, agent de la sporotrichose).
- **Blastique régressif** : Ici les conidies sont formées à la fois d'éléments préexistants du thalle et d'éléments néoformés. Elles sont produites en effet l'une après l'autre par bourgeonnement au sommet de la cellule conidiogène. Mais ces bourgeonnements successifs s'accompagnent d'une fragmentation progressive et rétrograde de la cellule conidiogène. La cellule conidiogène se raccourcit au fur et à mesure de son fonctionnement. Les conidies apparaissent par ailleurs bicellulaires et disposées en grappes (exemple: *Trichothecium roseum*).
- **Blastique phialidique (phialide produit les phialoconidies)** : La cellule conidiogène, appelée phialide, apparaît souvent bien différenciée. Elle a une forme de bouteille renflée au milieu avec une base étroite et une partie apicale effilée, et se termine parfois par une collerette plus ou moins visible. Les phialides sont posées directement sur des hyphes végétatifs (exemple : *Phialophora*), ou au contraire, sur un filament spécialisé appelé conidiophore, plus ou moins ramifié. Les conidies formées par bourgeonnement sont accolées les unes aux autres en chaînes basipètes, la plus jeune étant à la base (exemples: *Aspergillus*, *Penicillium*), ou glissent les unes sur les autres pour se rassembler en amas ou « balle » au sommet de la phialide (exemple : *Acremonium*).

- **Blastique annélide (annellide produit les annelloconidies) ou blastique percurrent :** La cellule conidiogène (appelée annellide), parfois peu différenciée du filament, produit à son extrémité apicale une conidie, puis reprend sa croissance à son sommet. Elle forme ensuite une deuxième conidie qui repousse la première, et ainsi de suite. Les spores restent ainsi accolées les unes aux autres en chaînes basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne, chaîne non ramifiée puisque les spores sont issues d'une cellule conidiogène à site de bourgeonnement unique. Cependant, cet édifice est fragile, et se dissocie souvent au montage. De plus, les reprises de croissance successives induisent au sommet de la cellule conidiogène une succession d'anneaux peu visibles, l'élaboration de la nouvelle paroi s'effectuant lors de ces reprises de croissance seulement à partir des couches pariétales internes de la cellule conidiogène (exemple : *Scopulariopsis*).
- **Blastique porosporique ou porique :** La conidie quand elle se détache du filament porteur (conidiophore), laisse sur ce dernier une empreinte visible, en forme de dépression, le pore, d'où le terme de porospores donné aux spores ainsi produites (exemples : *Alternaria*, *Stemphylium*, *Bipolaris*, *Curvularia*...).

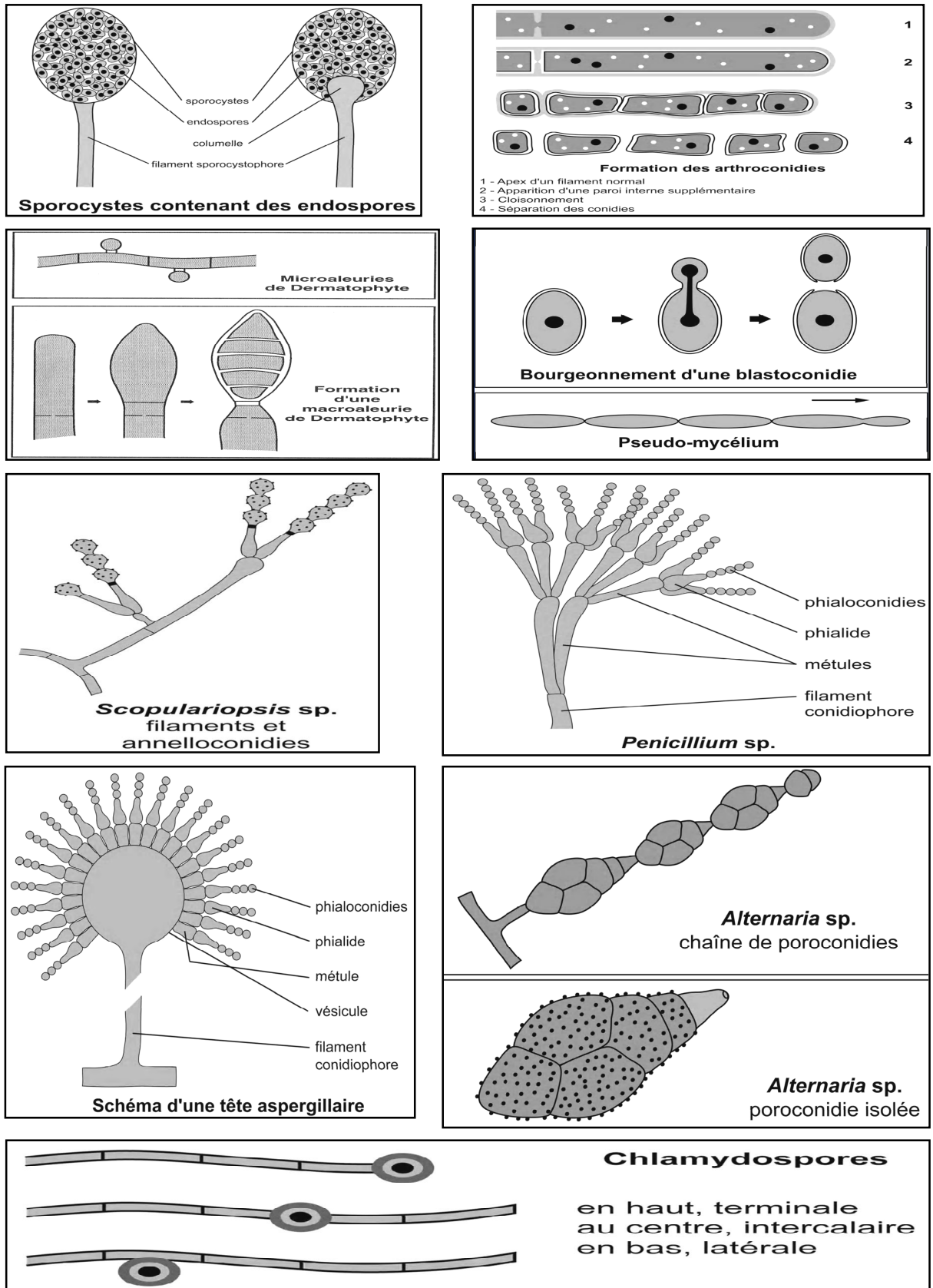


Figure 6 : Reproduction asexuée des champignons *fungi imperfecti* (C hermette et Bussieras, 1993)

### III.3.2. Reproduction sexuée

Caractérise les champignons parfaits (*Fungi perfecti*). Il y a conjugaison (caryogamie) de noyaux haploïdes, différents et compatibles, puis réduction chromatinienne (méiose) suivie d'une ou plusieurs mitoses et formation de spores.

- Noyaux contenus dans le même mycélium issu d'une seule spore (homothallisme). Deux filaments différents génèrent chacun un élément suspenseur. Les deux se joignent et à leur jonction s'effectue la fusion des noyaux, puis la formation d'une spore unique à paroi épaisse plus ou moins verruqueuse, la zygospore. Ce mode de reproduction caractérise les *zygomycètes*.
- Noyaux contenus dans des thalles différents issus de 2 spores différentes (hétérothallisme). La rencontre est alors aléatoire, obligatoirement précédée d'une phase de reproduction asexuée. Après fusion nucléaire et méiose, il se forme :
  - Soit un asque, formation sporogène qui caractérise les *ascomycètes*.
  - Soit une baside, formation sporogène qui caractérise les *basidiomycètes* (Figure 7) (Moulinier, 2003).

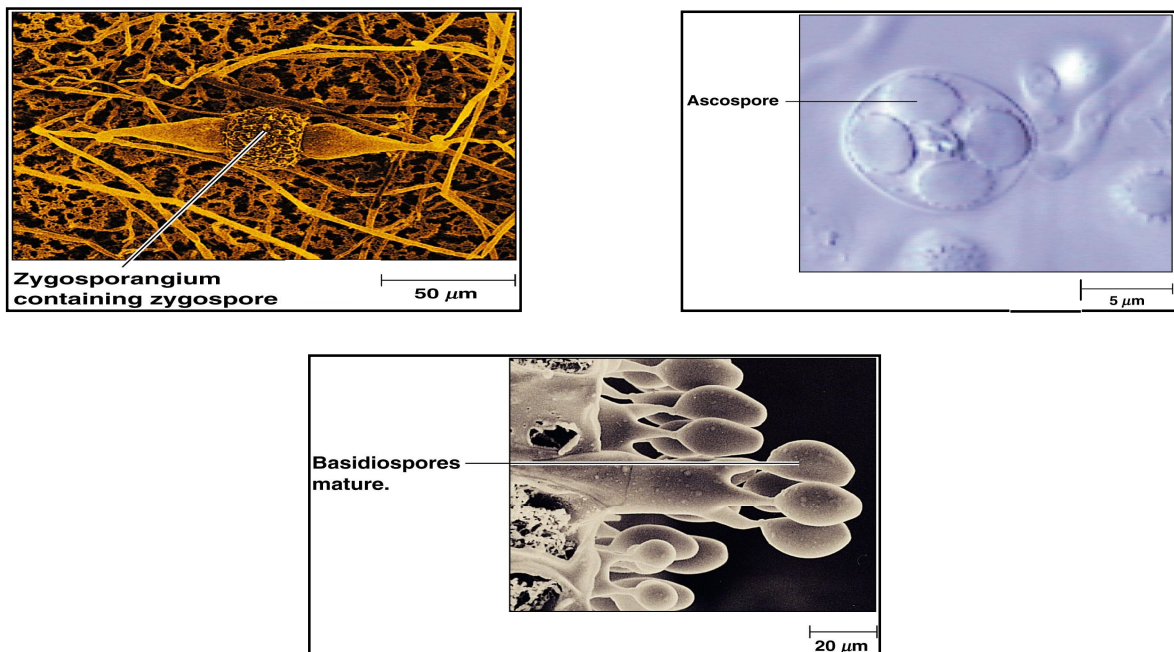


Figure 7 : Spores sexués (Case, 2006)

### IV. Classification des champignons d'intérêt général

Le règne des champignons comprend des divisions, elles-mêmes subdivisées en classes. Celles-ci englobent les ordres qui rassemblent les familles.

Les noms se terminent par : mycotina pour les divisions, mycètes pour les classes. Le suffixe -ale est employé pour désigner les ordres, le suffixe -aceae pour les familles et le suffixe -adeae pour les sous-familles. Une famille comprend des genres qui englobent des espèces, celles-ci peuvent se subdiviser en variétés. Chaque champignon porte un nom qui suit les règles de la nomenclature binomiale (genre et espèce) énoncées par Carl Von Linné au 18<sup>e</sup> siècle.

L'identification des champignons est essentiellement morphologique. Un micromycète peut parfois se présenter sous différentes formes : une forme sexuée ou **téléomorphe** et une forme asexuée ou **anamorphe**, les deux formes portant des noms différents. Lorsque plusieurs aspects coexistent pour la forme asexuée, on parle de **synanarmorphes**. Lorsque l'espèce fongique existe dans la même culture sous forme sexuée et asexuée, on parle d'**holomorphe**. En pratique, lorsqu'un champignon est découvert en culture, il portera le nom de la forme isolée. Lorsqu'il existe sous les deux formes (anamorphe et

téléomorphe), c'est le nom de la forme sexuée qui sera retenu en priorité (Koenig, 1995 ; Chabasse et *al.*, 2002 ; Moulinier, 2003).

#### IV.1. Taxinomie

La classification de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (1970) modifiée par Kwon Chung et Bennett (1992), puis par de Hoog (1995), est la plus utilisée actuellement (Figure 8).

On différencie quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée : les Mastigomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou Fungi imperfecti (Chabasse et *al.*, 2002).

##### a - Les Mastigomycotina

Les Mastigomycotina qui sont très rarement impliqués en pathologie humaine, se répartissent en deux classes: les Chytridiomycètes et les Oomycètes. Ils sont caractérisés par la présence de spores munies de flagelles (un pour les Chytridiomycètes, deux pour les Oomycètes). Cependant, aujourd'hui la nomenclature ne retient dans le règne des champignons que les Chytridiomycètes, en raison de la présence de chitine dans leur paroi et de leur nutrition qui se fait par absorption (Chabasse et *al.*, 2002).

- ❖ Domaine: Eucaryotes
- ❖ Règne: Champignons
- ❖ Division: ► Ascomycotina  
(Phylum) ► Basidiomycotina  
► Zygomycotina  
► Chytridiomycotina  
► (Deuteromycotina)

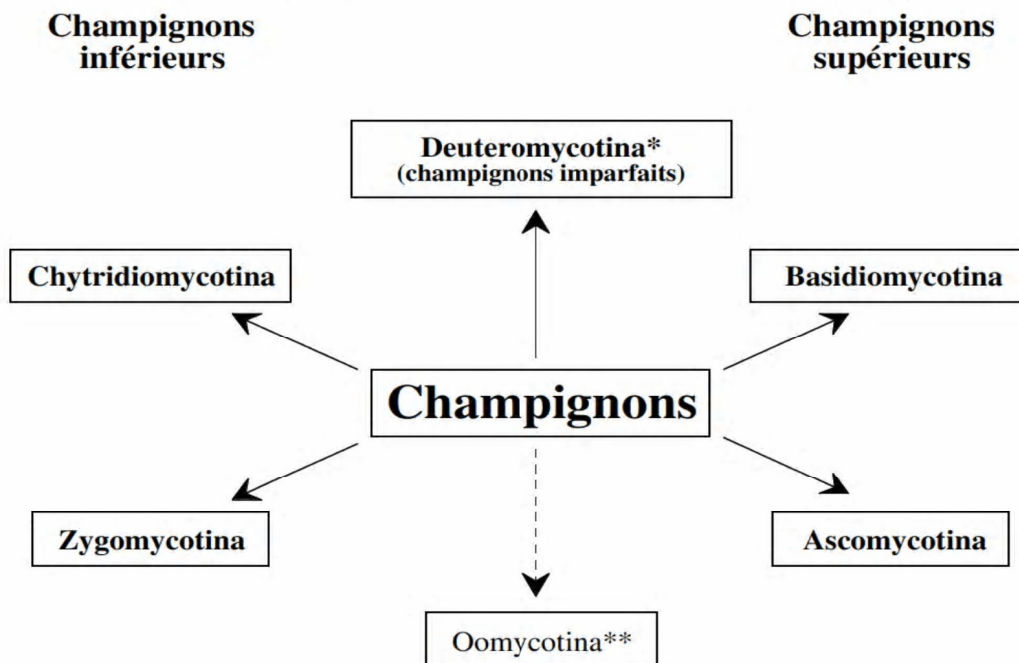


Figure 8 : Classification générale des champignons (Chabasse, 2001 ; Chabasse et *al.*, 2002)

\* Champignons connus seulement par leur stade asexué, en attente de classification.

\*\* Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les champignons vrais.

### b - Les Zygomycotina

Cette division qui est caractérisée par la production de spores sexuées appelées zygospores, comporte de nombreux pathogènes: les Mucorales, agents des mucormycoses et les Entomophthorales, agents des entomophthoromycoses (Figure 9). Ils sont considérés, avec les Mastigomycotina, comme des champignons inférieurs (Chabasse et *al.*, 2002).

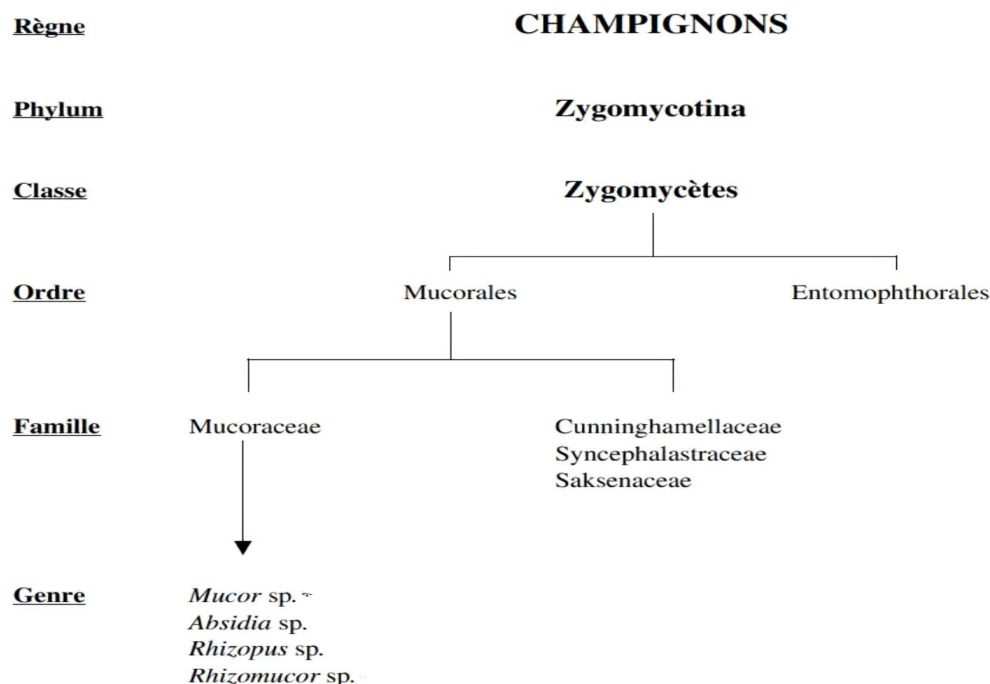


Figure 9: **Classification des Zygomycètes (Chabasse et *al.*, 2002)**

### c - Les Ascomycotina (Chabasse et *al.*, 2002)

Dans ce groupe qui comprend aussi un grand nombre de pathogènes de l'homme (levures ascospores, champignons filamenteux tels que les *Aspergillus*, les dermatophytes, ...), les spores issues de la reproduction sexuée (appelées ascospores) sont produites de manière endogène à l'intérieur d'un sac appelé asque. Ces asques, généralement octosporés, seront libres (levures ascospores ou Hémiascomycètes) ou produits à l'intérieur d'un organe protecteur de forme variable appelé ascocarpe (Ascomycètes vrais ou Euascomycètes). Les Hémiascomycètes (levures ascospores) et les Ascomycètes filamenteux se répartissent en six ordres différents au moins:

1. **Les Onygnéales** : Les ascospores sont produites principalement dans des gymnothèces et la reproduction asexuée s'effectue selon le type thallicque solitaire.
2. **Les Eurotiales** : Les ascospores sont produites dans des cléistothèces, et la reproduction asexuée s'effectue selon le type phialidique ou annellidique.
3. **Les Microascales** : L'ascocarpe est clos, il contient des asques et des ascospores brunes et la reproduction asexuée s'effectue selon le type annellidique.
4. **Les Ophiostomatales** : Les ascocarpes sont des périthèces et la reproduction asexuée s'effectue selon le type sympodial.
5. **Les Sordariales** : Les anamorphes sont hyalins. Les ascocarpes sont des périthèces et la reproduction asexuée s'effectue selon le type phialidique.

**6. Les Dothidéales :** Les anamorphes sont mélanisés. Les ascocarpes sont des cléistothèces ou des périthèces.

**NB :** *Pneumocystis carinii* forme (ou variété) *hominis* est actuellement rattaché aux Ascomycètes. Sa position taxinomique précise au sein de cette division est encore discutée.

**d - Les Basidiomycotina** (Chabasse et *al.*, 2002)

Ils sont caractérisés par la production de spores sexuées (appelées basidiospores) formées par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées, les basides. Les Basidiomycètes ont un thalle cloisonné avec présence de «boucles» au niveau des cloisons. Les cloisons des filaments mycéliens (« clamp connexion ») comportent le plus souvent un pore central unique de structure complexe appelé dolipore.

La plupart des Basidiomycètes sont des saprophytes de l'environnement ou parfois des pathogènes de plantes, mais ils sont peu impliqués en pathologie humaine. Ceux qui vivent en parasite chez l'homme et les animaux sont le plus souvent des Cryptococcus, notamment *C. neoformans* dont la forme parfaite appartient au genre *Filobasidiella*. D'autres levures appartenant aux genres *Malassezia*, *Rhodotorula* et *Trichosporon* dont les formes sexuées ne sont pas connues, ont des caractères communs avec les Basidiomycètes.

Les Basidiomycètes comprennent deux groupes principaux: les Hétérobasidiomycètes (Ustilaginales) à basides divisées ou ramifiées et les Holobasidiomycètes à basides simples.

Chez les Holobasidiomycètes qui sont essentiellement des macromycètes, deux ordres sont exceptionnellement impliqués en pathologie humaine: les Aphyllophorales et les Agaricales.

**e - Les Deuteromycotina (champignons imparfaits ou Fungi imperfecti)** (Chabasse et *al.*, 2002)

C'est dans cette division qu'on retrouvera le plus grand nombre de ces espèces d'intérêt médical et vétérinaire. Cet ensemble, très hétérogène, englobe toutes les espèces se multipliant sur le mode asexué. Des données récentes reposant d'une part sur la microscopie électronique, d'autre part sur la biologie moléculaire (comparaison des séquences d'ADN ribosomique par exemple), permettent d'établir des liens étroits avec de nombreux Ascomycètes ou Basidiomycètes. En pratique, le maintien de cette division s'avère utile car beaucoup d'espèces n'expriment pas en culture leur reproduction sexuée.

Les Deuteromycotina sont divisés en trois classes (Figure 10):

Les Blastomycètes qui regroupent l'ensemble des champignons levuriformes.

Les Hyphomycètes qui regroupent tous les champignons filamenteux à thalle septé dont les cellules conidiogènes (productrices de spores ou conidies) sont libres.

Les Coelomycètes qui rassemblent les champignons filamenteux dont les cellules conidiogènes sont contenues dans des organes protecteurs appelés pycnides ou acervules.

Schématiquement, on oppose deux types d'Hyphomycètes: les hyalins ou clairs (hyalohyphomycètes) appartenant à la famille des Moniliaceae et les foncés ou noirs appelés Dématiés ou phaéohyphomycètes appartenant à la famille des Dematiaceae.



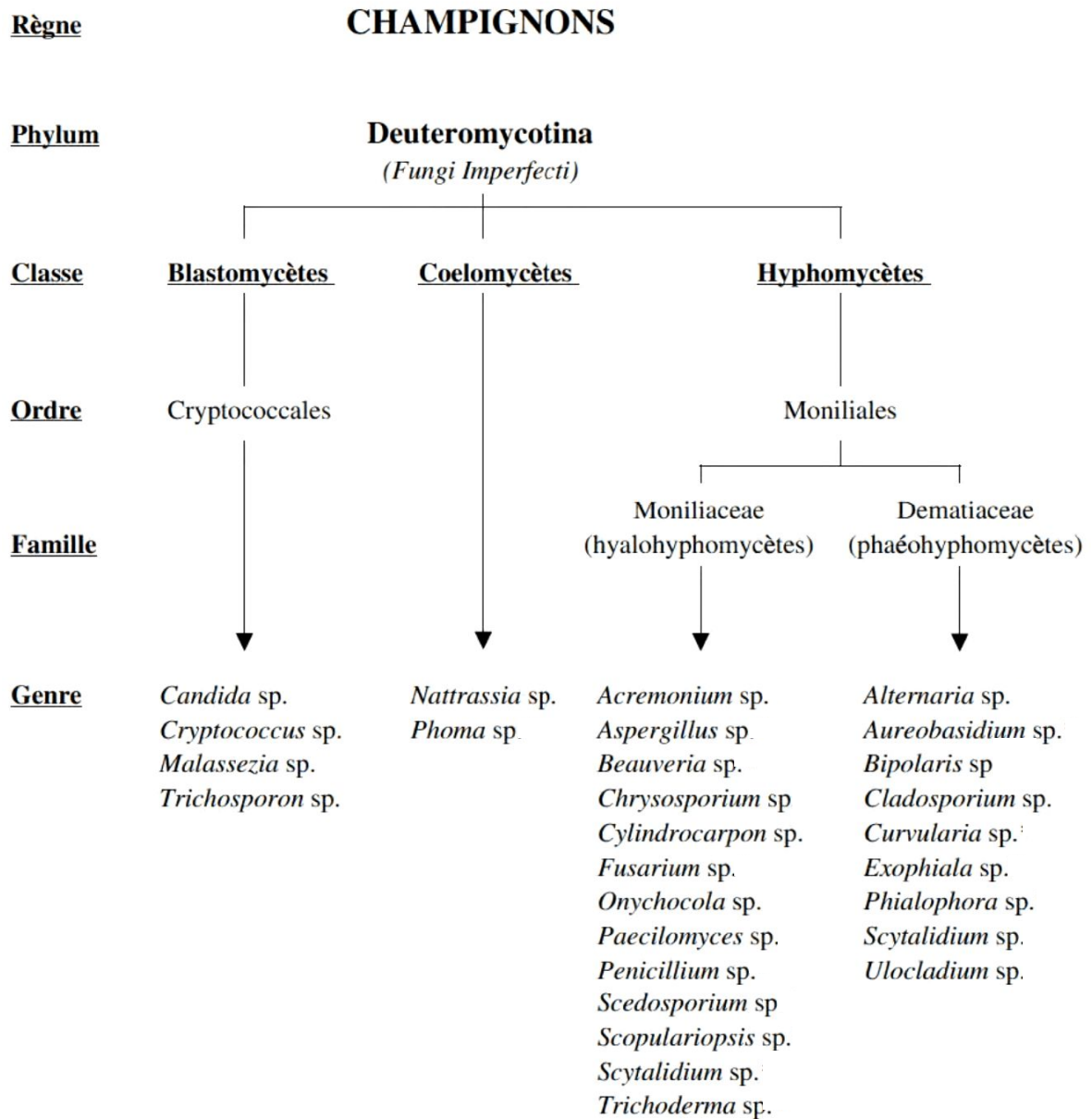


Figure 10: Classification des Deutéromycètes (Chabasse et al., 2002)



## CHAPITRE II :

# ETUDE DES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX OU LES MOISSISSURES

---

### I. CRITÈRES D'IDENTIFICATION

Schématiquement, l'identification d'une espèce repose sur des critères macroscopiques (aspect général des colonies) et microscopiques (étude des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores). Certaines données (température, vitesse de pousse, sensibilité au cycloheximide) seront des compléments utiles à l'identification (Chabasse et *al.*, 2002).

#### I.1. EXAMEN MACROSCOPIQUE DES CULTURES / MORPHOLOGIE MACROSCOPIQUE (Chabasse et *al.*, 2002)

La vitesse de pousse est déjà une bonne orientation. Elle peut être rapide comme chez les *Aspergillus* et les *Mucorales*, plus lente chez les dermatophytes et certaines *Dématiés*, ou même très lente comme chez *Onichocola canadensis*, agent d'onyxis. La vitesse de pousse varie aussi en fonction de la richesse de l'inoculum. Elle est en effet d'autant plus rapide que l'inoculum est important. Les cultures issues du revêtement cutané poussent habituellement bien à 25-30 °C, celles issues de prélèvements profonds à 37 °C. Une atmosphère humide est favorable à la pousse et l'aération des tubes ou des boîtes doit être correcte.

L'aspect des colonies est également un bon critère d'orientation. Les champignons lévuriformes donnent des colonies :

- ❖ lisses,
- ❖ glabres,
- ❖ humides,
- ❖ d'aspect brillant ou mat,
- ❖ parfois rugueuses.

A l'opposé, d'autres colonies ont une texture différente ;

- ❖ duveteuse,
- ❖ laineuse,
- ❖ cotonneuse,
- ❖ veloutée,
- ❖ poudreuse ou granuleuse.

Parfois certaines colonies de filamenteux peuvent avoir une apparence glabre en raison de l'absence ou de la pauvreté du mycélium aérien.

Le relief des colonies (plates, plissées, cérébriformes, ...), tout comme leur consistance, est aussi à observer. Elles peuvent en effet être :

- ❖ molles,
- ❖ friables,
- ❖ élastiques,
- ❖ cartonnées ou dures.

Il convient de préciser aussi la taille des colonies :

- ❖ petites,
- ❖ étendues,
- ❖ voire envahissantes comme chez les Mucorales.

La couleur de la colonie est également un élément pertinent d'orientation ainsi que la présence d'un pigment dans la gélose bien que ces derniers critères soient soumis aux conditions de culture. En général, les hyalohyphomycètes restent clairs : colonies blanches, mais aussi crèmes ou colorées (vertes, brunes, orangées, violettes, grises, ...). Par contre, les phaéohyphomycètes deviennent rapidement foncés ou noirs. Le pigment et sa couleur, diffusible ou non dans la gélose, doivent être notés.

Enfin l'observation macroscopique des cultures devra rechercher en surface, et surtout au centre de la culture, les structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) ainsi que des amas mycéliens ou mèches (corémies).

## **I.2. EXAMEN MICROSCOPIQUE DES CULTURES / MORPHOLOGIE MICROSCOPIQUE**

Un ou mieux plusieurs fragments de culture seront prélevés à l'oëse pour les cultures glabres, ou au scotch (test du drapeau) pour les cultures filamenteuses et poudreuses, et ensuite déposés dans une goutte de bleu lactique entre lame et lamelle.

Plusieurs prélèvements au centre et en périphérie de la colonie sont parfois nécessaires. De même, il faut savoir répéter les montages afin de saisir le meilleur moment (cultures ni trop jeunes, ni trop âgées) pour observer la conidiogénèse.

On analysera successivement:

### **I.2.1. Le thalle végétatif siphonné ou septé**

### **I.2.2. La couleur des hyphes**

La paroi des hyphes peut être mélanisée (ou foncée). Les Hyphomycètes dont les filaments restent clairs (ou hyalins) sont appelés Mucédinés ou hyalohyphomycètes. En revanche, les Hyphomycètes qui ont une paroi pigmentée ou foncée seront appelés Dématiés ou phaéohyphomycètes (Chabasse et *al.*, 2002).

### **I.2.3. L'origine endogène ou exogène des spores (voir chapitre I)**

### **I.2.4. L'aspect des spores**

La forme des spores et leurs modalités éventuelles de septation était initialement à la base de la classification des *Deutéromycètes*. Selon leur aspect, on distinguait cinq groupes de spores chez les champignons d'intérêt médical et vétérinaire :

- ❖ les amérospores : spores unicellulaires de petite taille (exemples : *Penicillium*, *Aspergillus*)
- ❖ les didymospores: spores bicellulaires (exemple : *Trichothecium*)
- ❖ les phragmospores: spores pluricellulaires à cloisons transversales (exemples: *Drecheslera*, *Bipolaris*, *Curvularia*)
- ❖ les dictyospores: spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (exemples : *Alternaria*, *Ulocladium*)
- ❖ les scolécospores: spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (exemple : *Fusarium*)

Ces critères ont aujourd'hui une importance secondaire dans la classification, et en pratique seul les termes de dictyospores, et à un degré moindre de phragmospores, restent utilisés.

**I.2.5. La présence de chlamydospores**

Les chlamydospores sont des spores de résistance qui sont formées à partir d'un article du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse.

Contrairement aux autres spores, elles ne possèdent pas de mécanisme de libération permettant leur dissémination à maturité.

Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent chez pratiquement toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables (culture trop âgée, appauvrissement du milieu nutritif).

**I.2.6. Les différents modes de formation des conidies (voir le chapitre I)****I.2.7. Le mode de groupement des conidies**

On peut observer plusieurs modalités de groupement des conidies à l'extrémité des cellules conidiogènes:

**a - En grappes**

Les grappes de spores résultent de la production de conidies solitaires par une cellule conidiogène qui s'accroît (type blastique sympodial ; exemple: *Beauveria*) ou se raccourcit (type blastique régressif; exemple: *Trichothecium roseuin*) au fur et à mesure de son développement.

**b - En masse**

Ce mode de groupement s'observe chez les espèces dont les conidies sont produites sur le type blastique synchrone (*Botrytis*).

**e - En têtes ou « balles »**

À l'extrémité apicale de certaines phialides, les conidies produites restent agglomérées par une substance adhésive qui maintient l'ensemble au sommet de la phialide (*Acremonium*, *Trichoderma*).

**d - En chaînes basipètes**

- ❖ Type blastique percurrent chez les hyalohyphomycètes (*Scopulariopsis*)
- ❖ Type blastique phialidique avec des phialides disposées en têtes aspergillaires (*Aspergillus*) ou organisées en pinceau (*Paecilomyces*, *Penicillium*)

**e - En chaînes acropètes**

Type blastique acropète chez les phaeohyphomycètes (*Cladosporium*, *Alternaria*)

**I.2.8. Le mode d'implantation des cellules conidiogènes**

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif.

**I.2.8.1. Cellules conidiogènes indifférenciées ou peu différenciées**

Certaines sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées en position terminale (*Aureobasidium*). D'autres naissent latéralement, mais restent peu différenciées des filaments végétatifs (*Exophiala*).

**I.2.8.2. cellules conidiogènes différenciées**

**a** - directement insérées sur les filaments végétatifs (*Acremonium*, *Fusarium*)

**b** - bien distinct des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif:

- ❖ regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête aspergillaire (*Aspergillus*)

- ❖ regroupées en verticille au sommet du conidiophore : pinceau (*Penicillium*) disposées en verticilles le long du conidiophore (*Verticillium*)
- c - bien distinct des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés:
  - ❖ conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère appelée corémie ou synnema (*Graphium*, *Scedosporium*)
  - ❖ conidiophores agrégés en coussinets superficiels appelés sporodochies (*Myrothecium*)

## 2.9- La présence de structures protectrices compactes, issues de la reproduction asexuée ou sexuée

### 2.9.1- D'origine asexuée

En pratique, seules les pycnides peuvent être observées sur les milieux de culture utilisés en mycologie médicale et vétérinaire, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal.

#### a - Les pycnides

Ce sont des nodules mycéliens (parfois visibles à l'oeil nu), creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée de conidiophores produisant des conidies. Les pycnides ont un petit orifice (ostiole) qui s'ouvre à maturité pour libérer les spores (*Phoma*). Ils caractérisent, au sein des Coelomycètes, les Sphaeropsidales.

#### b - Les acervules

Ce sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. A l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies. Ce mode de groupement des conidiophores caractérise, au sein des Coelomycètes, les Mélanconiales.

### 1.2.9.2. D'origine sexuée

Dans de rares cas, on peut observer pour les moisissures d'intérêt médical et vétérinaire, la forme parfaite du champignon. Si celle-ci apparaît dès l'isolement, le champignon prendra le nom de sa forme sexuée. Dans la plupart des cas, ce sont des Ascomycètes qui produisent des asques renfermant à maturité 8 ascospores. Une structure, l'ascocarpe, protège les asques. On en distingue plusieurs types:

#### a - Les gymnothèces

L'ascocarpe clos est entouré d'un réseau d'hyphes périidiens périphériques lâches : dermatophytes du genre *Nannizzia* (*Microsporium*) ou *Arthroderma* (*Trichophyton*). En pratique, ce type d'ascocarpe n'est pas rencontré chez les moisissures d'intérêt médical et vétérinaire.

#### b - Les cléistothèces

L'ascocarpe est arrondi et lisse, mais il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques. Il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer des asques sphériques contenant chacun 8 ascospores (*Emericella nidulans*, *Pseudallescheria boydii*).

#### c - Les périthèces

L'ascocarpe est voisin du cléistothèce, mais prend une forme de bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture appelée ostiole. Il renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unituniqués) ou à deux membranes (bituniqués) et contenant chacun 8 ascospores (exemples: *Chaetomium*, *Sordaria*) (Chabasse et al., 2002).

## II. DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE D'UNE MOISSISSURE D'INTÉRÊT MÉDICAL ET VÉTÉRINAIRE

Les clés d'identification qui vont suivre ont pour objet de faciliter la démarche du diagnostic morphologique afin d'arriver au genre (ou espèce) décrit par Chabasse et *al.* (2002).

Après un arbre décisionnel basé sur les caractéristiques des filaments mycéliens, sont présentées des clés d'identification correspondant aux différents groupes étudiés dans ce chapitre : Mucorales, Mucédinés, Dématiés et Coelomycètes (Figures 11 à 15).

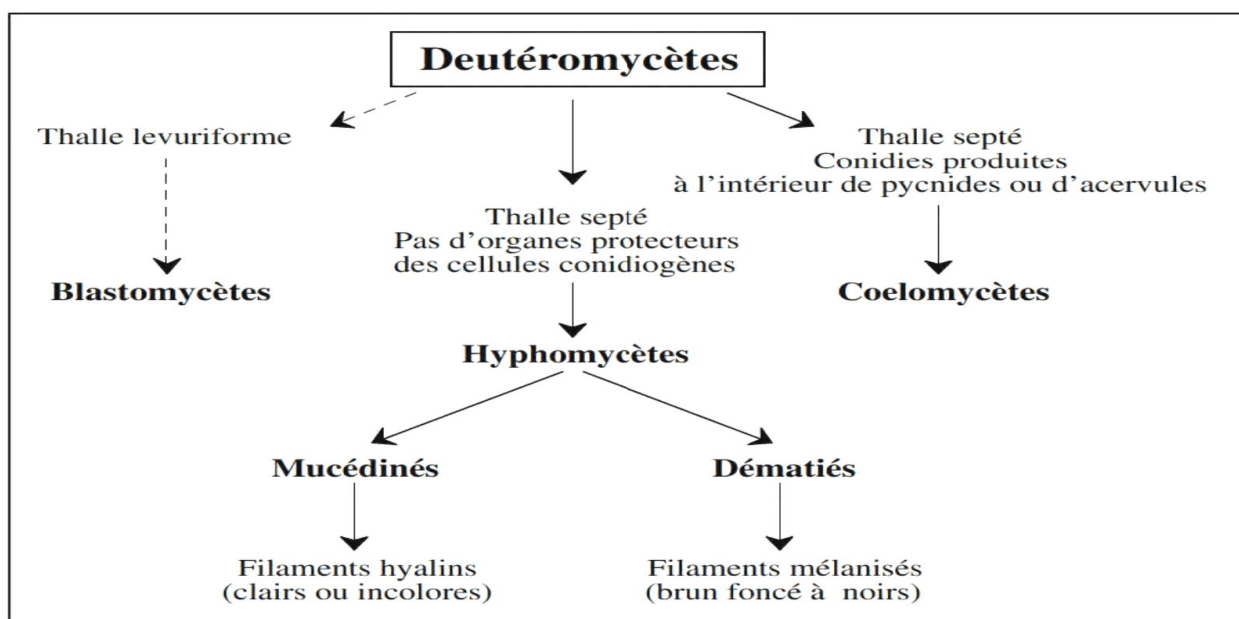
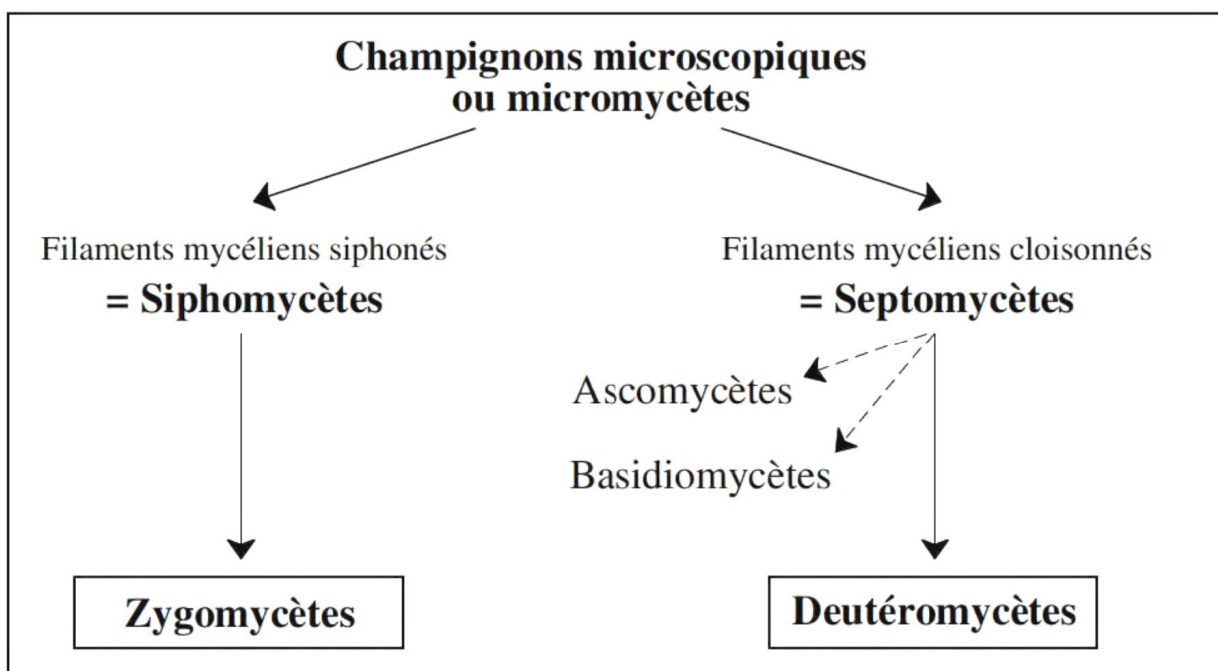


Figure 11: Démarche générale du diagnostic d'une moisissure (Chabasse et *al.*, 2002)

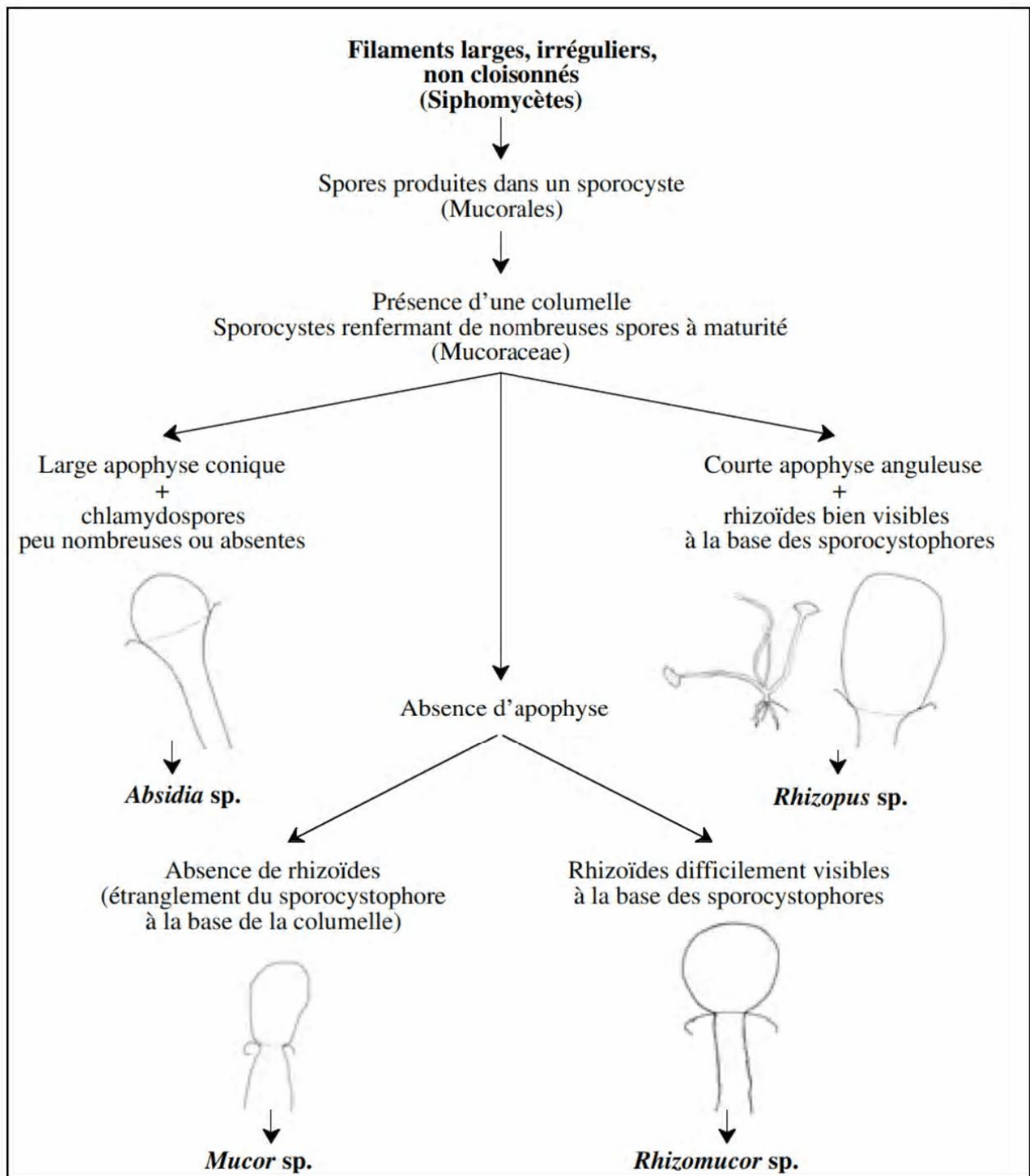


Figure 12: Clé d'identification des Mucorales (Chabasse et al., 2002)

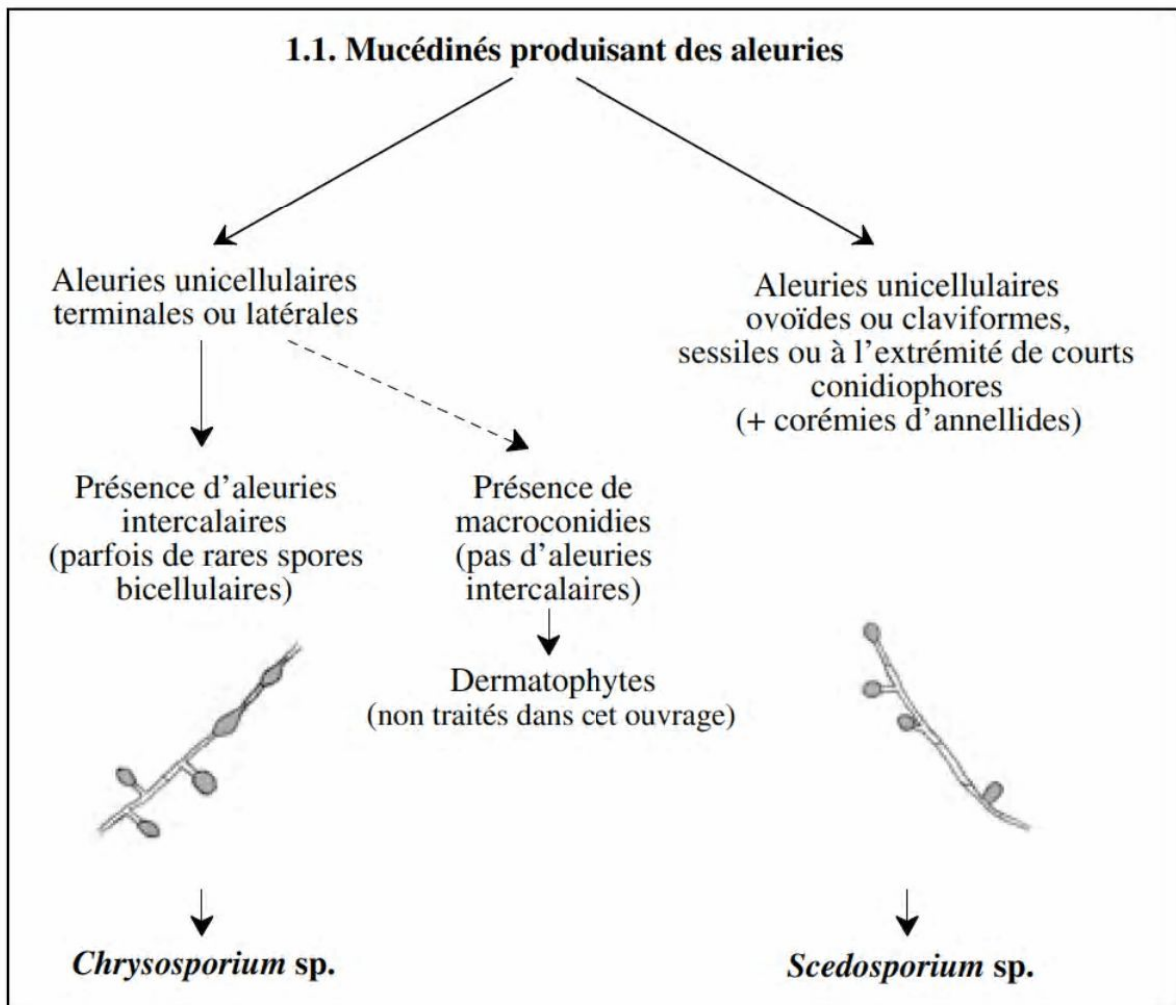
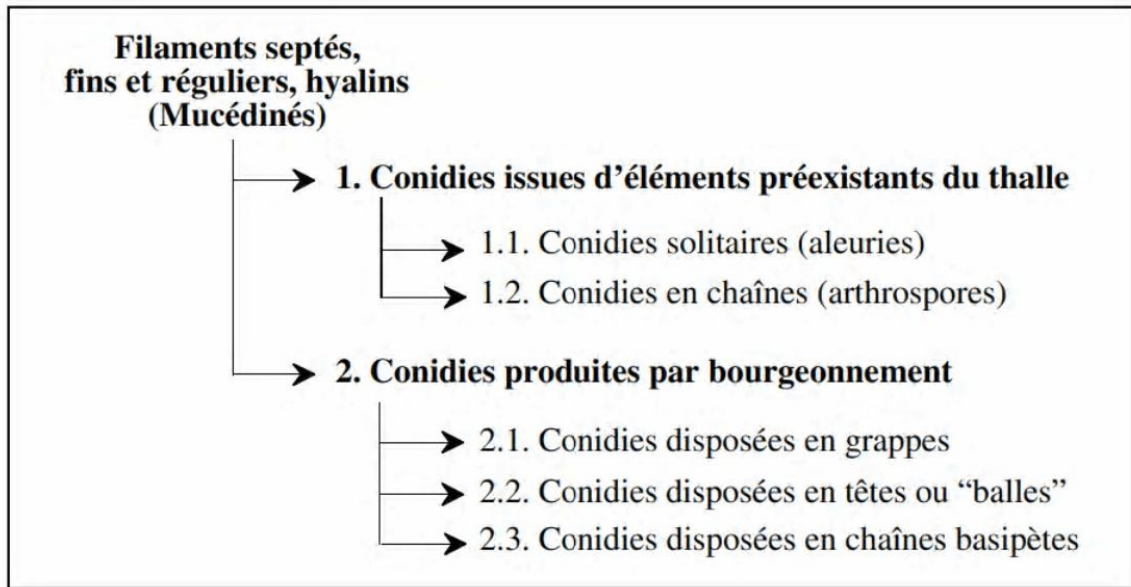


Figure 13: Clé d'identification des Mucédinés (Chabasse et al., 2002)



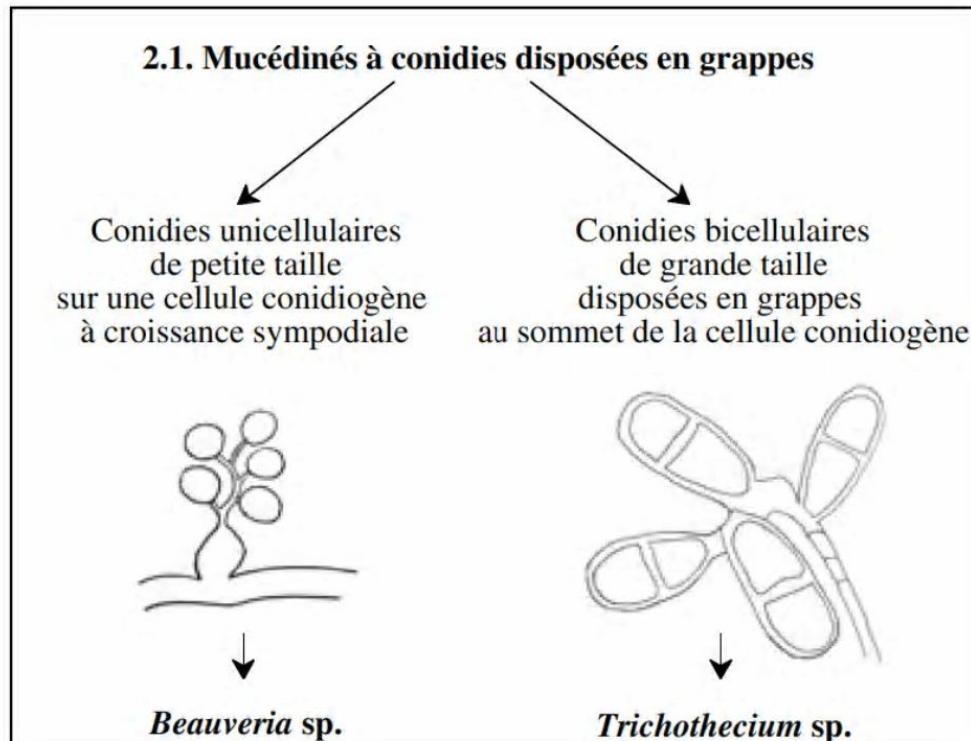
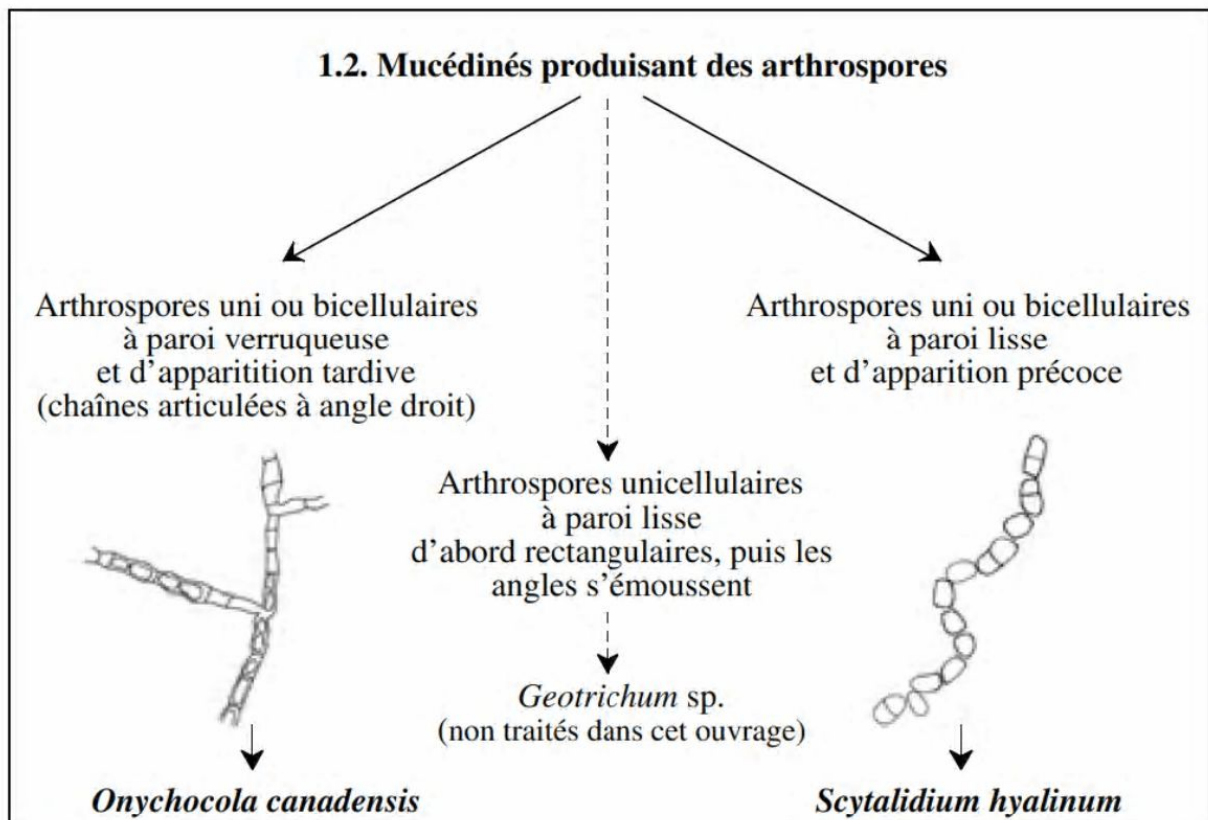


Figure 13 (suite): Clé d'identification des Mucédinés (Chabasse et *al.*, 2002)



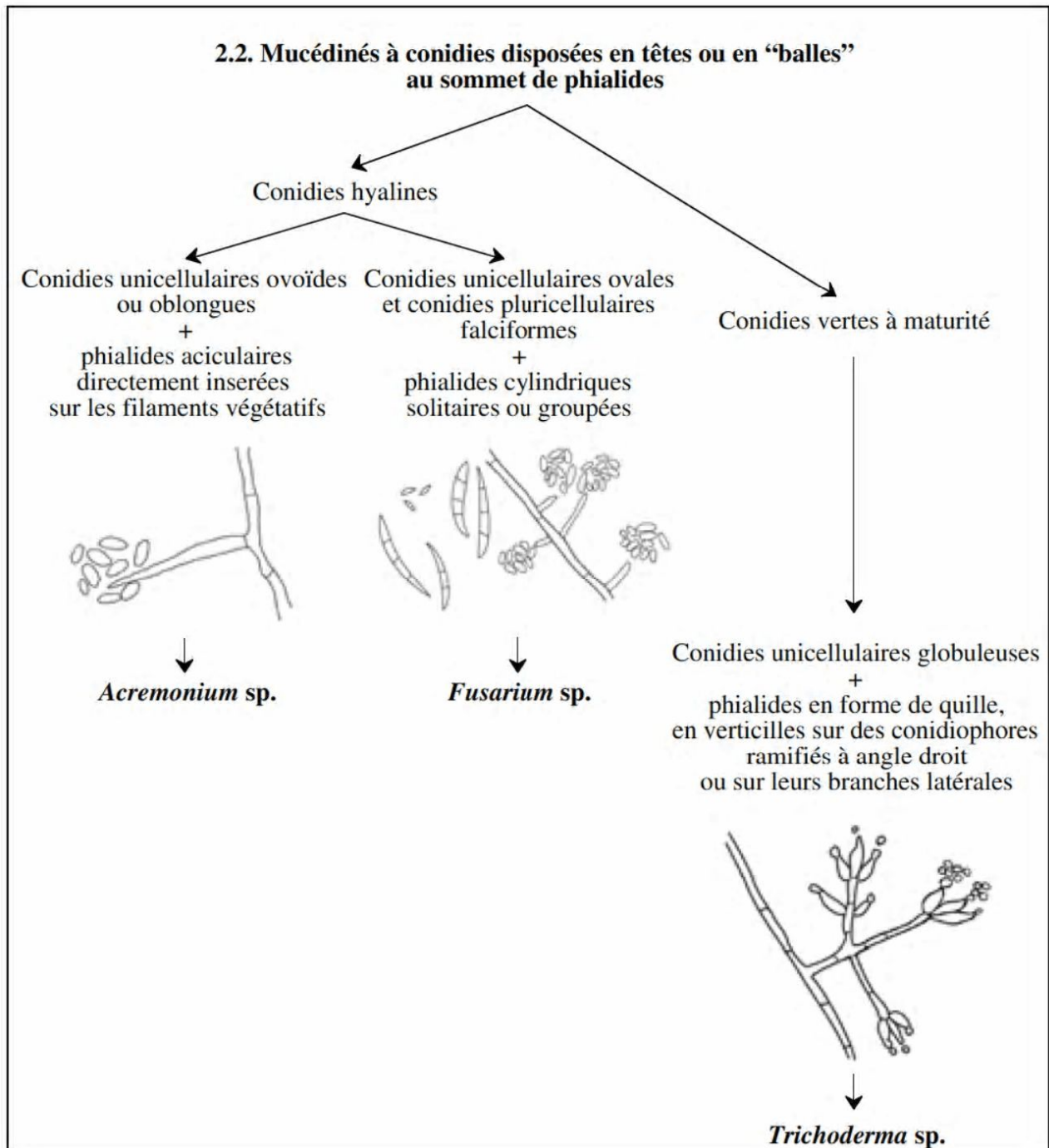
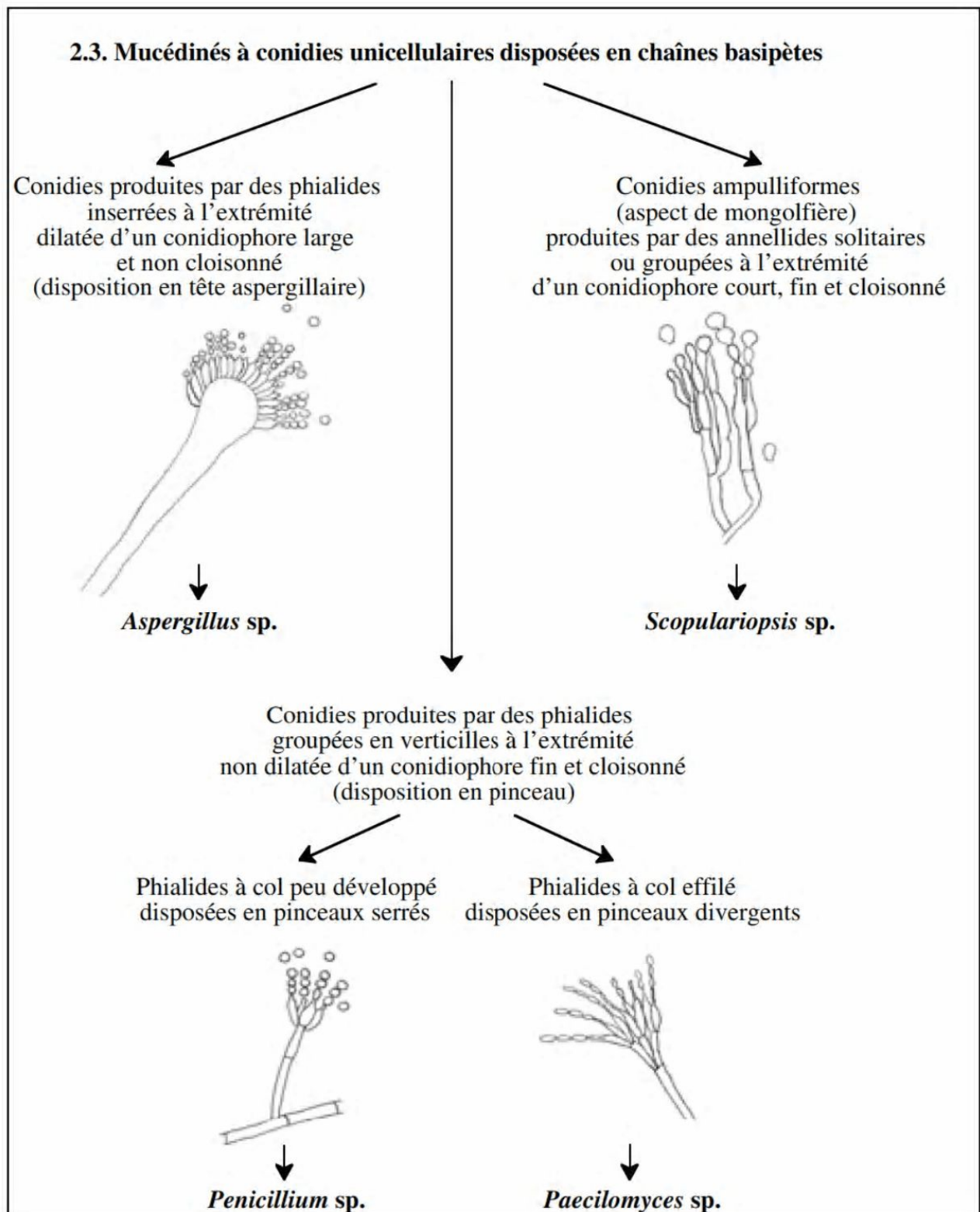


Figure 13 (suite): Clé d'identification des Mucédinés (Chabasse et *al.*, 2002)

Figure 13 (fin): Clé d'identification des Mucédinés (Chabasse et *al.*, 2002)

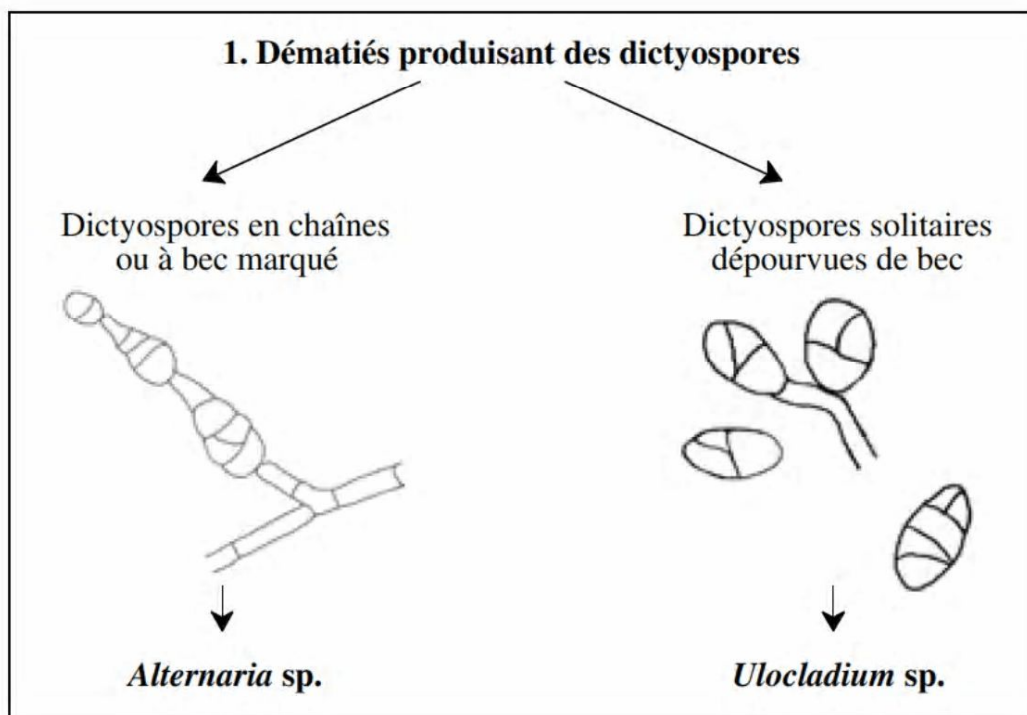
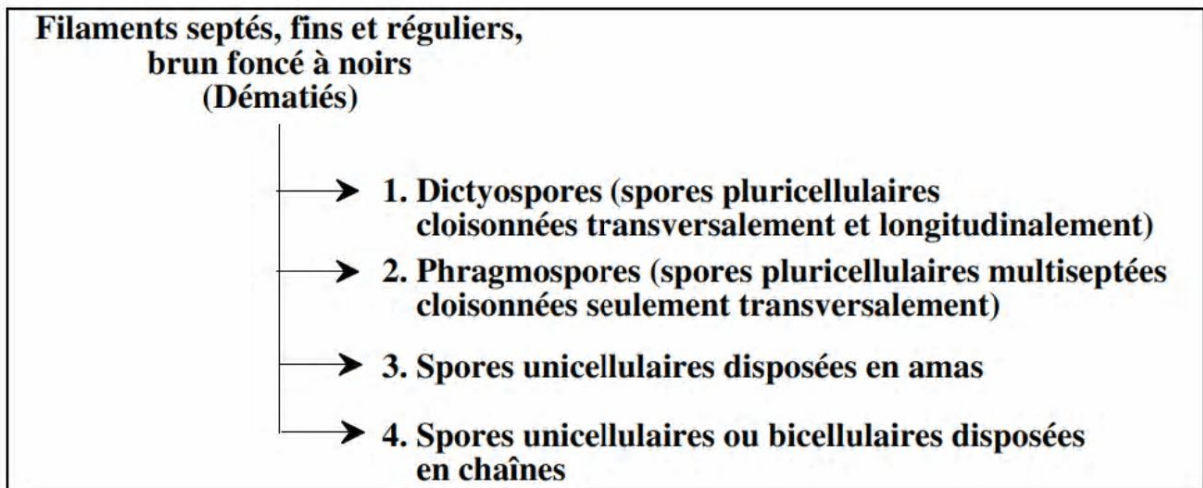


Figure 14: Clé d'identification des Dématiés (Chabasse et al., 2002)

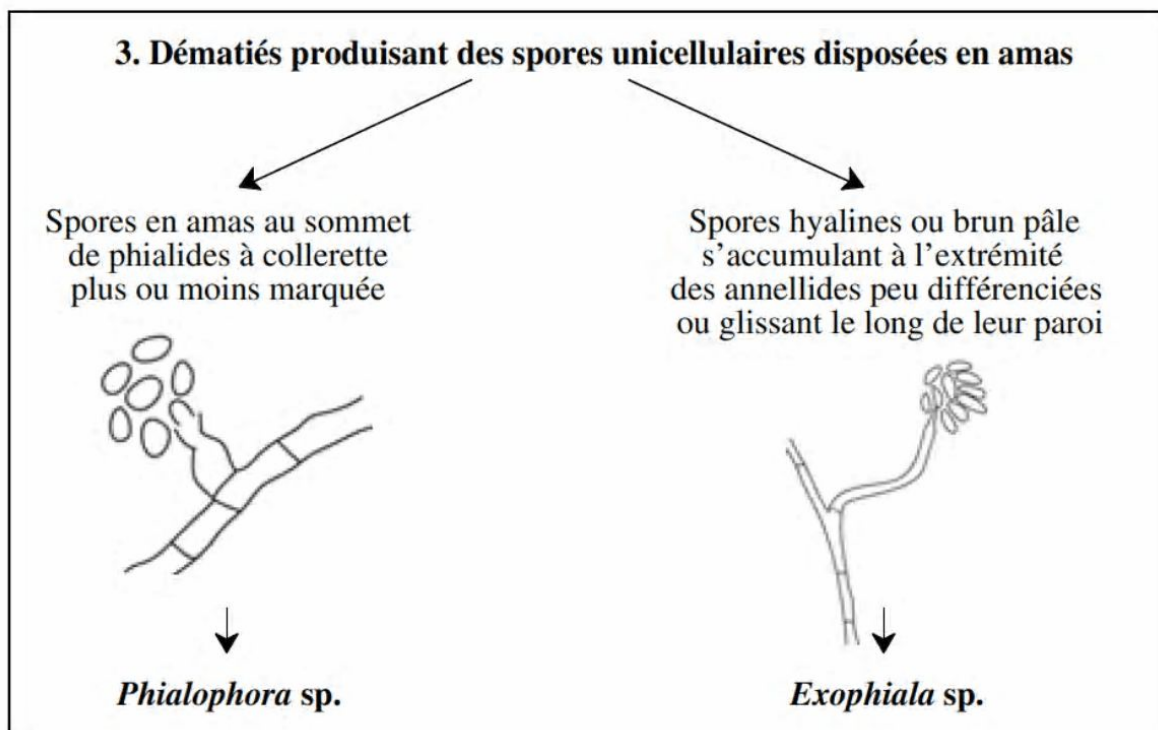
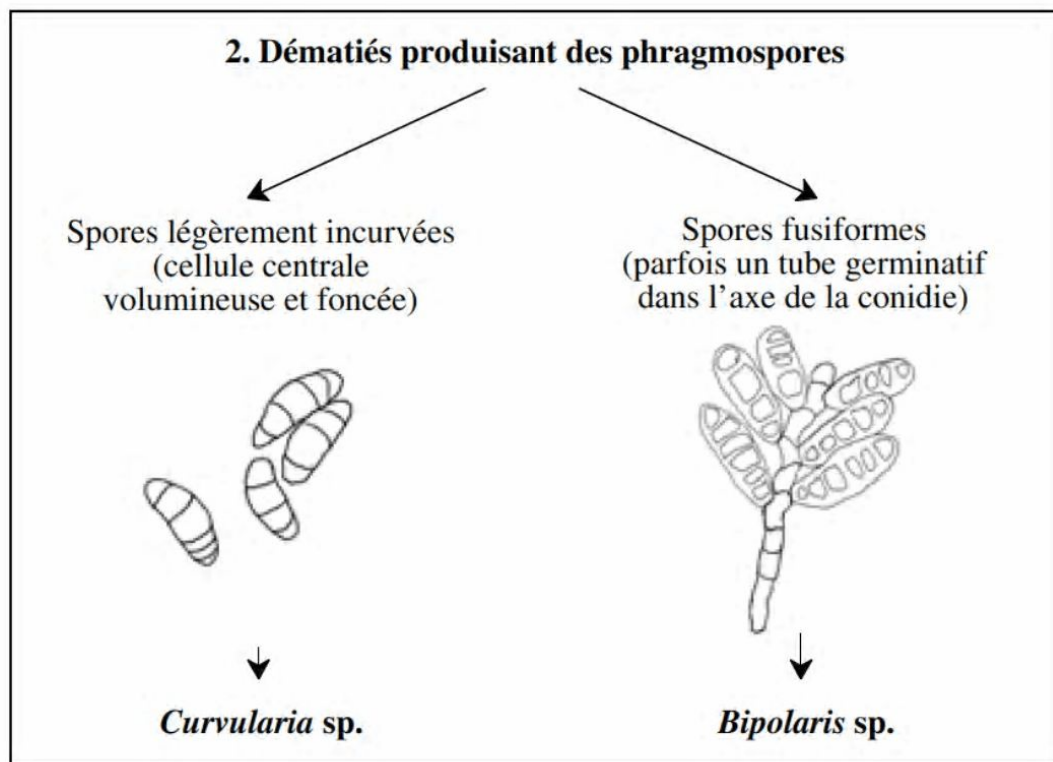


Figure 14 (suite): Clé d'identification des Dématiés (Chabasse et al., 2002)

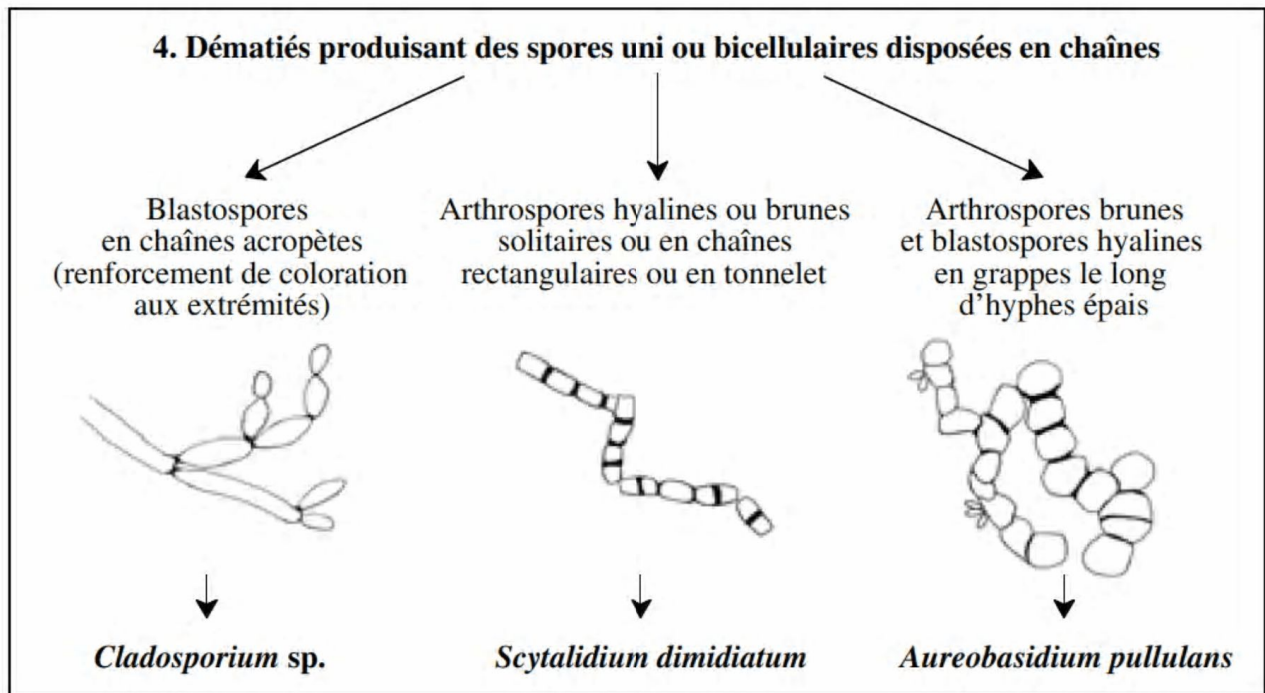


Figure 14 (fin): Clé d'identification des Dématiés (Chabasse et al., 2002)

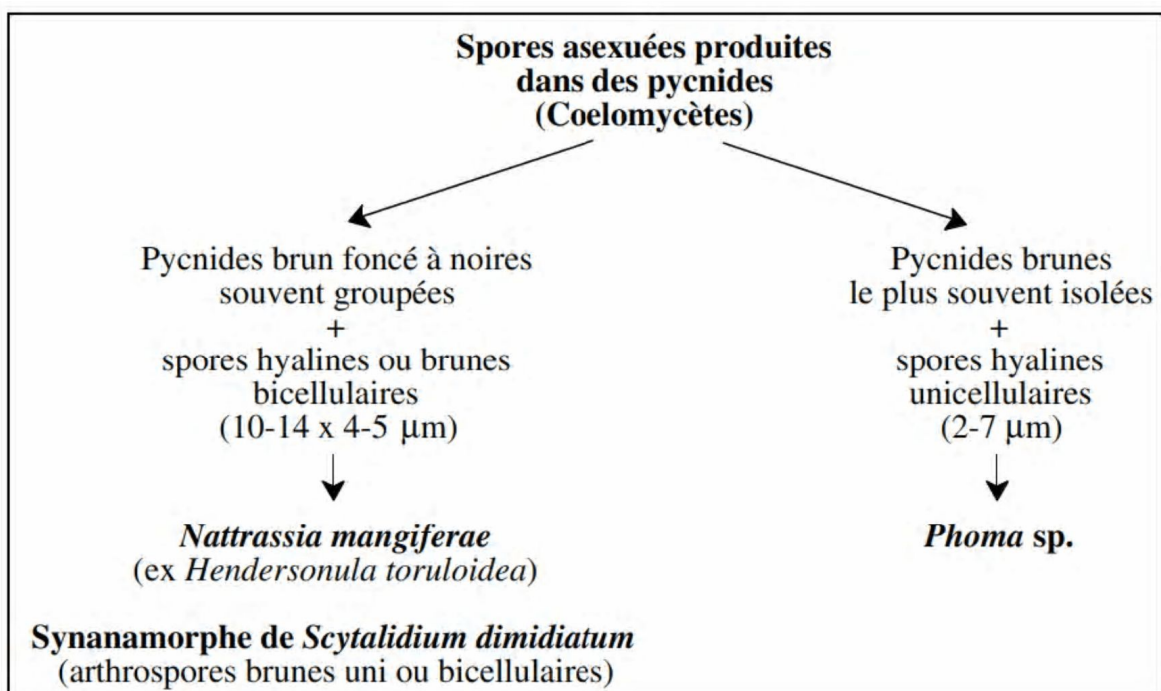


Figure 15: Clé d'identification des Coelomycètes (Chabasse et al., 2002)



### III. ÉTUDE DES PRINCIPALES MOISSURES D'INTÉRÊT MÉDICAL ET VÉTÉRINAIRE

Dans cette partie, nous avons présenté de façon synthétique les principaux genres et espèces de moisissures susceptibles d'être incriminées dans un processus pathologique.

#### III.1. LES MUCORALES

##### III.1.1. Épidémiologie

Les Mucorales sont des champignons cosmopolites très répandus. Saprophytes du sol où ils se nourrissent à partir de végétaux, des céréales ou des excréments, ils contaminent fréquemment les denrées alimentaires (fruits, légumes, ...). Certaines espèces sont pathogènes de plantes.

##### III.1.2. Pouvoir pathogène

Redoutables opportunistes, les Mucorales sont des agents de zygomycoses (*Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor pusillus*, *Absidia corymbifera*, *Mucor circinelloides*, ...), notamment chez les sujets diabétiques et les patients atteints d'hémopathies. Ils sont à l'origine d'atteintes rhinocérébrales, cutanées (chez les grands brûlés) et viscérales (pulmonaires, digestives, rénales, ...).

Chez les animaux, des localisations très variées sont possibles : digestives (ulcérations gastriques parfois intestinales, diarrhée...), respiratoires (broncho-pneumonies chroniques avec ulcération bronchiques...), génitales (avortements mycosiques chez la vache), ganglionnaires (chez les bovins : foyers +/- calcifiés dans les nœuds mésentériques), encéphaliques (petites abcès encéphaliques surtout chez le chien et l'homme) et des formes disséminées (à point de départ digestif, chez le veau notamment : lésions hépatiques quasi-constantes et atteinte possible des poumons, du cœur, de la rate, des nœuds lymphatiques, du cerveau et des reins) (Chermette et Bussieras, 1993).

##### III.1.3. Caractères cultureux

Ces zygomycètes se développent bien sur tous les milieux utilisés en mycologie. Leur croissance rapide est cependant inhibée par le cycloheximide (Actidione<sup>®</sup>). Les températures optimales de croissance varient de 20 °C pour les *Mucor* ou 20-25 °C pour les *Rhizopus*, à 36 °C pour les *Absidia*, mais les espèces incriminées dans les zygomycoses humaines sont très thermophiles et présentent des températures maximales de croissance plus élevées (40 °C). D'une manière générale, la croissance en culture est rapide et extensive sur gélose de Sabouraud ou PDYA (Peptone-Dextrose-Extrait de levure-Agar). Les colonies présentent un développement aérien souvent important, en particulier chez les *Rhizopus*, et envahissent de manière quasi-totale les boîtes de culture en 5 à 7 jours.

##### III.1.4. Morphologie microscopique

Le thalle est constitué de filaments siphonnés (coenocytiques), non (ou peu) cloisonnés, de diamètre large (5-15 µm) et irrégulier. Le champignon émet généralement des stolons qui courent à la surface du support gélosé et adhèrent au substrat par des sortes de racines appelées rhizoïdes (Figure 16). Des stolons partent des filaments dressés, les sporocystophores (aussi appelés sporangiophores), filaments porteurs des organes de reproduction, les sporocystes (ou sporanges). La partie apicale du sporocystophore se dilate en une vésicule, appelée columelle, qui fait saillie à l'intérieur du sporocyste d'aspect globuleux ou piriforme selon les espèces. Ce sont dans ces sporocystes que sont produites les spores (spores internes parfois appelées sporocystospores ou sporangiospores). Ces spores à surface lisse, striée ou granuleuse selon les espèces, sont libérées à maturité par déchirement de la paroi du sporocyste. La paroi peut cependant, persister autour de l'apex du sporocystophore (au niveau de la columelle) sous forme d'une collerette. Chez certains genres (*Absidia*, *Rhizopus*,...), le sporocystophore présente à son extrémité un élargissement plus ou moins marqué juste au-dessous du sporocyste, qu'on appelle apophyse. À l'inverse, chez les *Mucor*, un étranglement du sporocystophore est souvent observé sous la columelle. On observe parfois des chlamydo-spores, terminales, intercalaires ou en chaînes.

La différenciation des familles au sein de cet ordre se fera sur un ensemble de critères l'existence ou non de ramifications sur les sporocystophores, la forme des sporocystes, la présence d'une columelle faisant saillie dans le sporocyste et l'abondance des spores dans les sporocystes à maturité. Quant à la différenciation des genres au sein de la famille des Mucoraceae (qui comprend la plupart des Mucorales d'intérêt médical et vétérinaire), elle se fera sur l'aspect des sporocystophores et leur groupement éventuel, sur la forme de la columelle et les caractéristiques de sa surface, mais surtout sur la présence ou non d'une apophyse et sa taille, la présence ou non de rhizoïdes, et l'abondance des chlamydo-spores (Chabasse *et al.*, 2002).

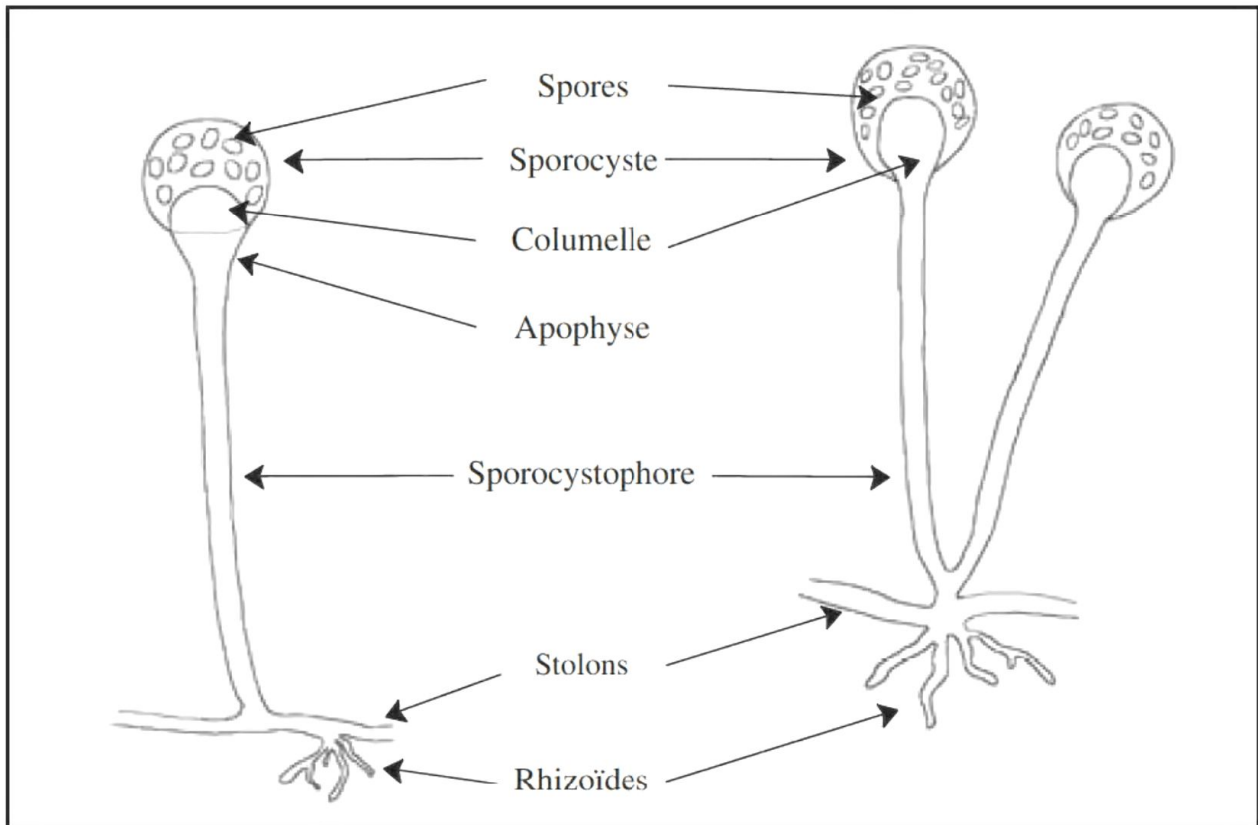


Figure 16 : Appareil reproducteur des Mucorales (Chabasse *et al.*, 2002)

## III.2. LES ASPERGILLUS

### III.2.1. Épidémiologie

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes, on les rencontre aussi bien en milieu rural (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matières organiques en décomposition) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations (poussières accumulées derrière les meubles, cadres, faux plafonds, conduits d'aération, plantes en pots, ...).

Les différentes enquêtes aéromycologiques révèlent que les spores aspergillaires se situent au 4<sup>ème</sup> rang des spores fongiques de l'air (après les spores d'*Alternaria*, de *Cladosporium* et de *Penicillium*) (Chabasse *et al.*, 2002).

### III.2.2. Pouvoir pathogène

Que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, l'aspergillose est un problème préoccupant lors de défaillance des systèmes de défense immunitaire et représente une cause de mortalité importante à l'heure actuelle (Lagneau et Houtain, 2001). Les trois espèces pathogènes majeures sont encore *A. fumigatus*, *A. clavatus* et *A. flavus*. Alors que les trois espèces pathogènes mineures sont encore *Aspergillus de groupe glaucus*, *A. restrictus*, *A. terreus* (Jacquet et Boutibonnes, 1967).

*Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus pathogène, responsable d'environ 80 à 90 % des aspergilloses humaines. D'autres espèces sont aussi impliquées. Les *Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes. Leur développement chez l'hôte nécessite l'existence de conditions favorables, locales (caverne tuberculeuse, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathie chronique obstructive, emphysème, dilatation des bronches, mucoviscidose,...) ou générales (corticothérapies prolongées, hémopathies malignes, chimiothérapie aplasante, SIDA,...). En outre, des facteurs environnementaux (abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalé lors de la manipulation du fumier, du foin moisi) ou liés au champignon (taille des spores aspergillaires, thermotolérance, facteurs de virulence) contribuent à la fréquence de la pathologie aspergillaire.

Les *Aspergillus* sont ainsi à l'origine de diverses mycoses : des otomycoses, des kératites, des onyxis, des atteintes cutanées, ou encore des mycoses profondes résultant d'une inoculation traumatique des spores. Toutefois, les *Aspergillus* sont principalement des pathogènes respiratoires, l'infestation s'effectuant par inhalation des conidies véhiculées par le vent. On les rencontre à l'origine de sinusites ou de surinfections bronchiques au cours des broncho-pneumopathies chroniques obstructives et de la mucoviscidose. Mais la pathologie aspergillaire chez le sujet non immunodéprimé est dominée par l'aspergillome, qui est lié au développement du champignon dans une bronche ou dans le parenchyme pulmonaire, sous forme d'une boule fongique appelée truffe aspergillaire. Le développement du champignon s'effectue alors dans une cavité le plus souvent préexistante (caverne tuberculeuse, bulle d'emphysème, ...) et se traduit par des troubles respiratoires avec hémoptysies et sur le plan radiologique, par l'image classique en grelot (cloche).

Les formes les plus graves sont cependant observées chez les patients fortement immunodéprimés, notamment chez les patients sous chimiothérapie aplasante pour préparation à la greffe de moelle osseuse. L'infection revêt alors un caractère invasif, et présente une évolution très rapide et souvent fatale (Chabasse et al., 2002).

Fort tropisme des *aspergillus*, comme des mucorales, pour les vaisseaux sanguins, qui explique (thrombose et ischémie locales, ulcérations nécrotiques et dissémination par la voie hématogène). Rôle éventuel des toxines fongiques telles que la gliotoxine, cytotoxique. De même, une hémolysine produite par *A. fumigatus* chez des souris expérimentalement infectées. Rôle immunosuppresseur de certains antigènes (galactomannane) ou de toxine (gliotoxine) fongiques. Importance particulière des polynucléaires neutrophiles dans l'immunité (Chermette et Bussieras, 1993).

### III.2.3. Caractères cultureux

Ces champignons présentent une croissance rapide sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Ils sont cependant, pour la plupart, inhibés par le cycloheximide. Après 24 à 48 h de culture, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est en effet avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 h selon les espèces) que ces colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces.

La couleur de la culture permet ainsi une orientation rapide du diagnostic d'espèce. Au recto, les colonies sont gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaunes et roses pour *A. versicolor*, jaunes puis noires pour *A. niger*. Elles restent blanches pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore à jaune, il peut aussi brunir ou rougir avec l'âge (*A. nidulans*).



Les *Aspergillus* se développent habituellement bien sur les milieux classiques de mycologie comme le milieu de Sabouraud. Si nécessaire, leur fructification peut être stimulée par repiquage de la colonie sur gélose au malt ou sur milieu de Czapek qui constituent les milieux de référence pour ces champignons. Enfin, les *Aspergillus* poussent à 22-25 °C et à 37 °C pour les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) (Chermette et Bussieras, 1993).

### III.2.4. Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique des colonies. Sur les filaments végétatifs, prennent en effet naissance des filaments dressés, non cloisonnés. Ces derniers, qu'on appelle conidiophores, se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. La conidiogénèse s'effectue en effet sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de spores ou conidies qui restent accolées les unes aux autres en chaînes non ramifiées, basipètes, la plus jeune étant à la base de la chaîne.

Les spores, toujours unicellulaires, sont de formes variables, globuleuses, subglobuleuses ou elliptiques. Divercement pigmentées, elles peuvent être lisses ou recouvertes d'aspérités plus ou moins marquées.

Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées), ou portées par des petits articles insérés sur la vésicule, les métules (têtes bisériées).

L'ensemble vésicule ( $\pm$  métules) + phialides + conidies constitue la tête aspergillaire qui caractérise le genre *Aspergillus*.

Quant au diagnostic d'espèce, il sera porté sur un ensemble de critères macroscopiques et microscopiques (Figures 17 à 19).

- ❖ critères macroscopiques:
  - la vitesse de pousse
  - l'aspect des colonies à maturité surface (duveteuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse), relief (colonies planes ou surélevées), couleur au recto et au verso
- ❖ critères microscopiques:
  - la taille du conidiophore, la présence ou non d'une pigmentation ou d'échinulations
  - la taille et la forme de la vésicule
  - l'aspect général de la tête aspergillaire qui est lié à l'implantation des phialides sur la vésicule : tête en colonne si les phialides sont disposées seulement sur la partie supérieure de la vésicule ; tête ronde, radiée, si elles sont insérées sur tout le pourtour de la vésicule
  - la présence ou non de métules
  - la pigmentation. la taille et la surface des conidies
  - l'existence ou non d'une reproduction sexuée : présence ou non de cléistothèces, et de **cellules en noisette** ou « **Hulle-cells** ».

En effet, pour certaines espèces, apparaissent parfois en culture des formations sexuées (stade téléomorphe). Ce sont des cléistothèces contenant des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores. Les « Hulle-cells », ou cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes à paroi épaisse qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais qu'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée (Chabasse et *al.*, 2002).

### III.2.5. Espèces par ordre d'importance en mycologie médicale et vétérinaire

- *Aspergillus fumigatus*
- *Aspergillus flavus*

- *Aspergillus niger*
- *Aspergillus terreus*
- *Aspergillus nidulans*
- *Aspergillus versicolor*
- *Aspergillus* du groupe *glaucus*
- *Aspergillus candidus*

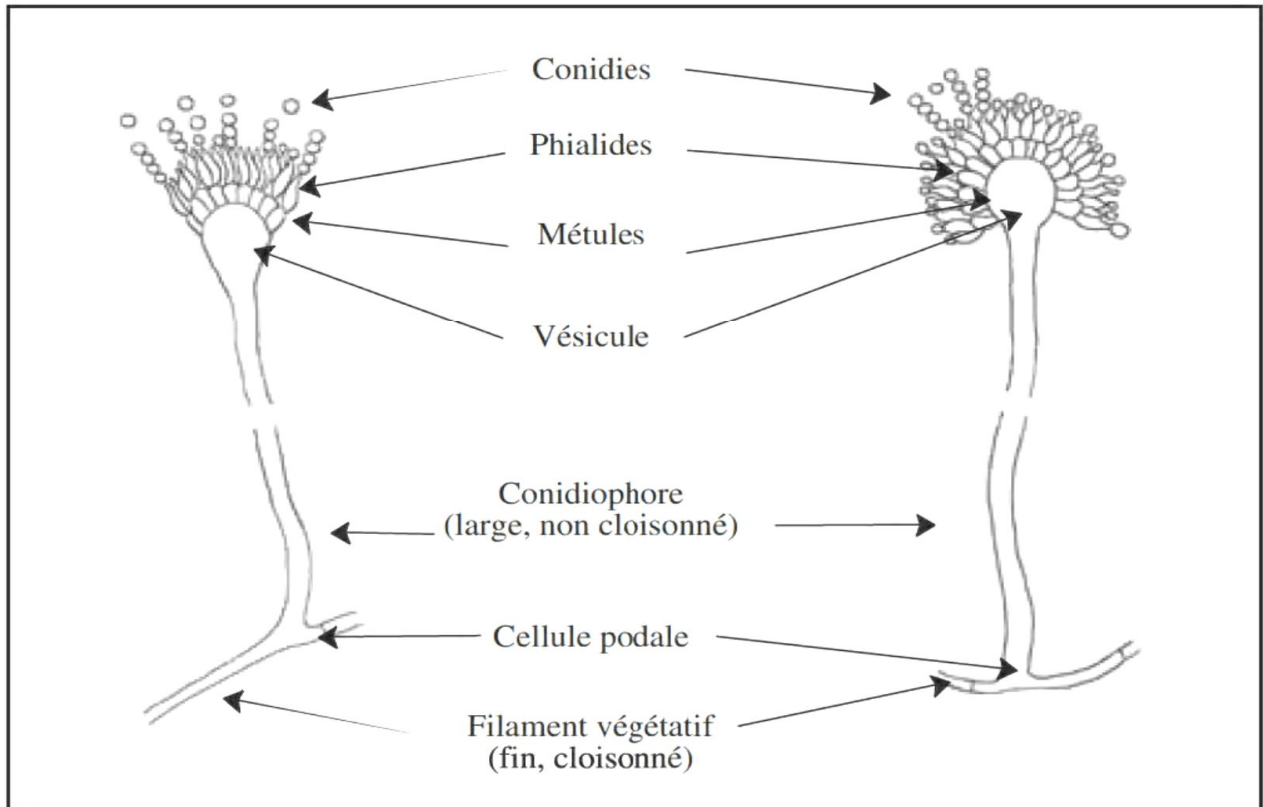


Figure 17 : Appareil reproducteur des *Aspergillus* (Chabasse et al., 2002)

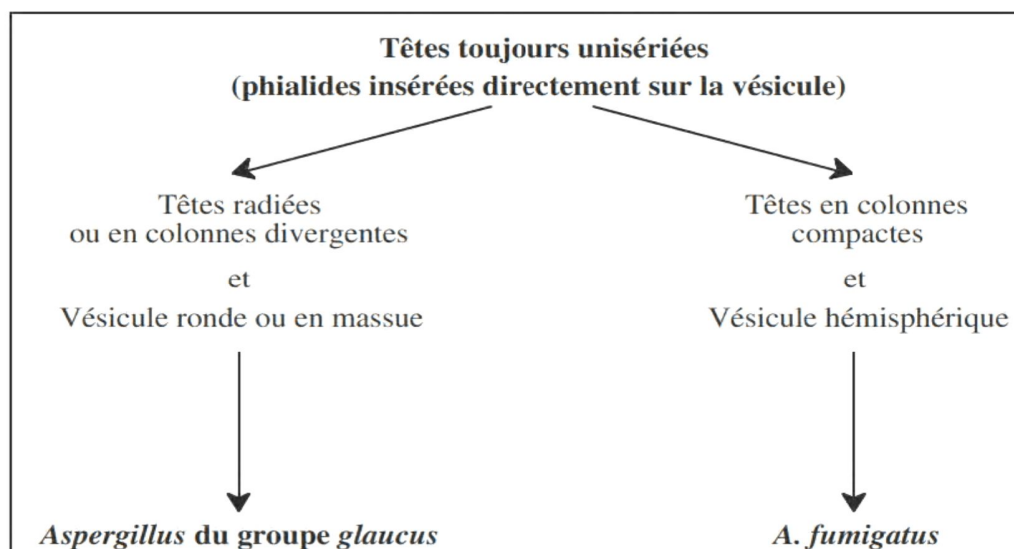


Figure 18: Clé d'identification des *Aspergillus* présentés (Chabasse et al., 2002)

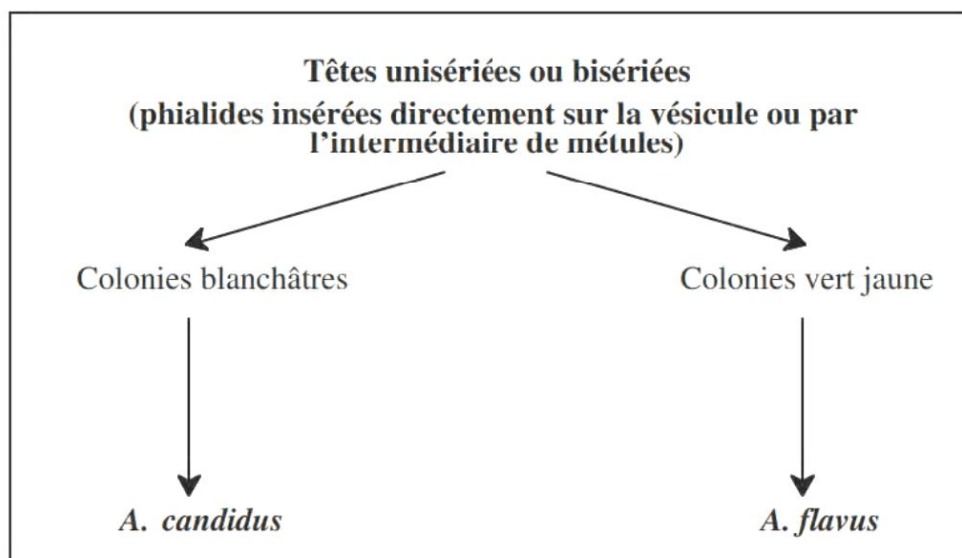
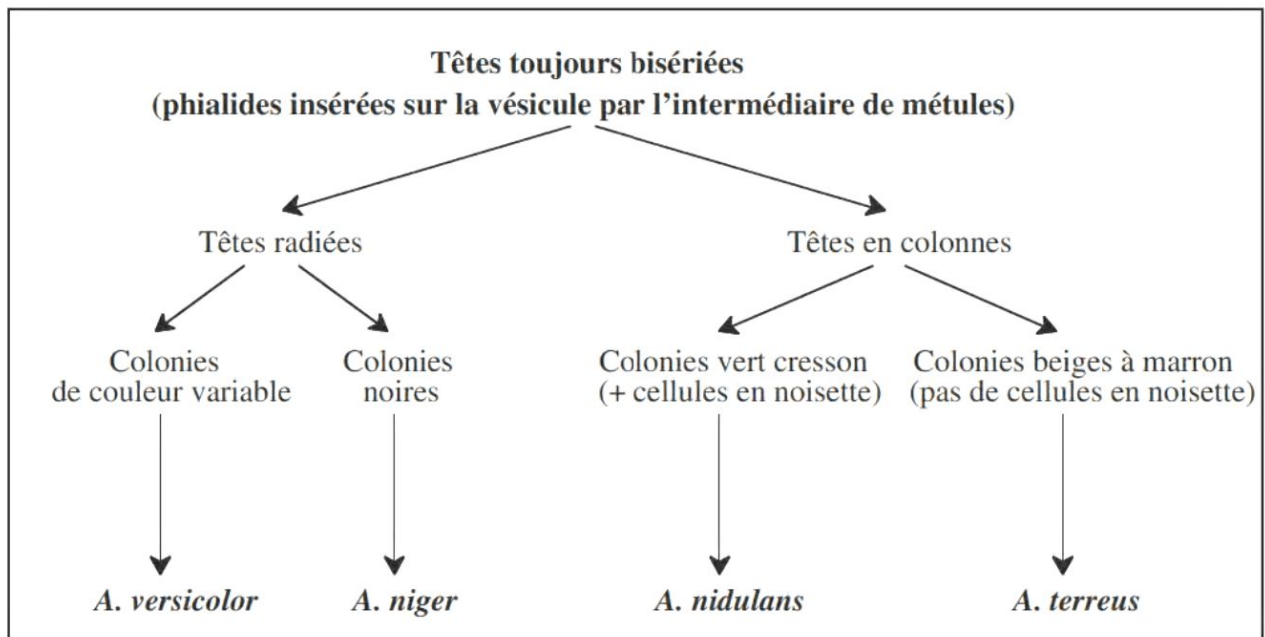


Figure 18 (suite): Clé d'identification des *Aspergillus* présentés (Chabasse et *al.*, 2002)

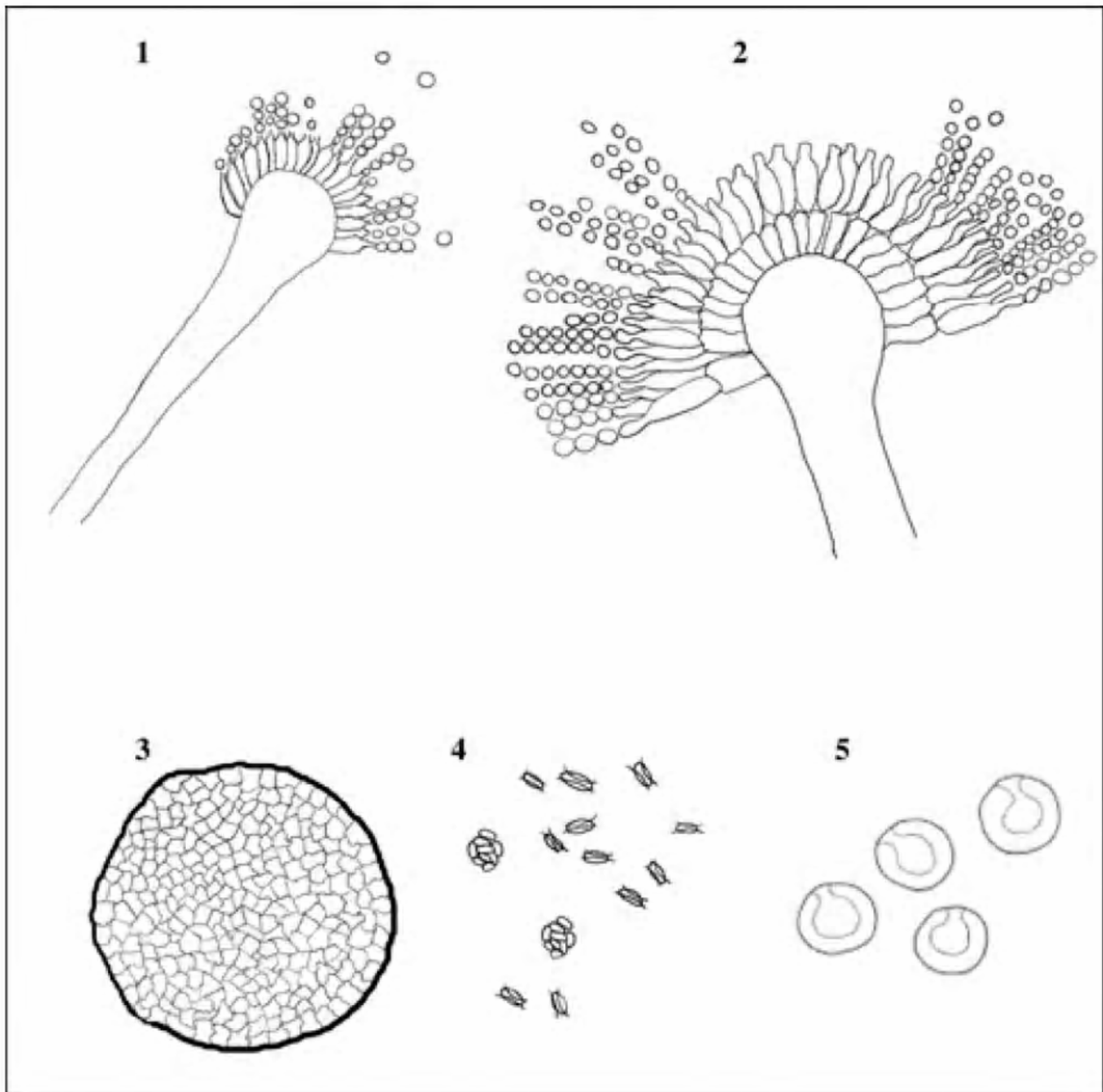


Figure 19: **Organes de fructification des Aspergillus (Chabasse et *al.*, 2002)**

1 et 2 Morphologie des têtes aspergillaires. En fonction des modalités d'implantation des phialides sur la vésicule, on distingue des têtes unisériées (1) ou bisériées (2), et des têtes en colonne (1) ou radiées (2). 3-5 : organes de reproduction sexuée chez *Emericella nidulans* (téléomorphe d'*Aspergillus nidulans*): cléistothèce (3), asques et ascospores (4) et cellules en noisette (5).

### III.3. LES AUTRES MUCÉDINÉS OU HYALOHYPHOMYCÈTES

#### III.3.1. Épidémiologie

Les hyalohyphomycètes sont des micromycètes cosmopolites appartenant à la famille des Moniliaceae. Ils vivent pour la plupart en saprophytes, dans le sol ou sur des végétaux en décomposition. D'autres espèces colonisent plus volontiers des substrats telluriques divers comme les débris kératiniques pour les *Chrysosporium*. Enfin, certains sont des pathogènes de plantes (surtout les espèces appartenant au genre *Fusarium*), ou d'insectes comme *Beauveria bassiana*.

A partir de leur habitat naturel, ces champignons dispersent leurs spores qui, véhiculées par le vent, seront présentes dans l'air de manière permanente. C'est le cas, par exemple, des spores de *Penicillium* qui se situent en 3<sup>ème</sup> position des spores fongiques atmosphériques.

### III.3.2. Pouvoir pathogène

Le biologiste sera souvent confronté à ces champignons fréquents dans l'environnement, qui seront donc avant tout des «contaminants des cultures». C'est le cas des *Beauveria*, des *Trichoderma*, des *Cylindrocarpon*, mais aussi de *Chrysosporium* (*Geomyces*) *pannorum* et de *Trichothecium roseum*. On ne décrit pour ces champignons telluriques que de très rares atteintes cutanées (intertrigos inter-orteils ou herpès circiné déterminés par *Chrysosporium keratinophilum*), des onyxis à *Chrysosporium pannorum*, et des kératites à *Beauveria bassiana*. L'intérêt de leur étude réside en fait dans leurs ressemblances morphologiques avec des pathogènes classiques comme les dermatophytes.

Les *Penicillium*, qui sont rencontrés habituellement comme simples contaminants des cultures, sont eux aussi exceptionnellement responsables de mycoses systémiques. Seul *Penicillium marneffeii*, champignon dimorphique, s'avère un redoutable opportuniste chez l'immunodéprimé, notamment le patient atteint de SIDA en Asie du Sud-Est.

Les champignons du genre *Acremonium* ou du genre *Fusarium* présentent un pouvoir pathogène plus marqué. Ces espèces opportunistes sont de plus en plus fréquemment signalées dans la littérature médicale comme agents de mycoses humaines. Ils peuvent déterminer des onyxis, principalement des leuconychies superficielles, ainsi que des atteintes oculaires (kératites, endophtalmies) ou cutanées (mycétomes à grains blancs) résultant de l'inoculation traumatique de spores. Les gommes constituent une autre forme clinique de la pathologie cutanée à *Acremonium*. Il s'agit de nodules siégeant principalement au niveau de la face ou du cou qui vont s'ulcérer, et dans lesquels le développement du champignon s'effectue sous forme de filaments libres. On rencontre également les *Fusarium* comme agents de surinfection de plaies et de brûlures ou d'atteintes disséminées chez des patients fortement immunodéprimés (leucémiques en aplasie).

D'autres hyalohyphomycètes présentent aussi un pouvoir pathogène chez le sujet non immunodéprimé. Ainsi *Scopulariopsis brevicaulis*, espèce type du genre *Scopulariopsis*, est souvent isolé d'atteintes sous-unguéales distales comparables à celles déterminées par les dermatophytes. Cependant, son rôle dans la constitution de ces lésions unguéales reste discuté, notamment en cas de présence simultanée avec un dermatophyte. D'autres espèces ont également un pouvoir kératinophile assez marqué pouvant entraîner, comme les dermatophytes, des lésions superficielles de la peau et des phanères (ongles) il s'agit des pseudodermatophytes, *Scytalidium hyalinum* et *Onychocola canadensis* (Chabasse et al., 2002).

### III.3.3. Caractères cultureux

Ces hyalohyphomycètes se développent bien sur tous les milieux utilisés en mycologie. Leur croissance rapide est cependant inhibée généralement par le cycloheximide. La température optimale de croissance varie selon les espèces entre 20 et 30 °C. Seules les espèces isolées de prélèvements profonds poussent à 37 °C.

### III.3.4. Morphologie microscopique

- ❖ Le mycélium végétatif reste clair ou hyalin.
- ❖ Les filaments sont identiques à ceux des *Aspergillus*, seule l'organisation conidiogène change et varie selon les espèces.
- ❖ On observe parfois une reproduction sexuée (cléistothèces chez *Pseudallescheria boydii*), ou asexuée (pycnides de *Nattrassia mangiferae*).

### III.4. LES DÉMATIÉS (ou PHAÉOHYPHOMYCÈTES) ET LES COELOMYCÈTES

#### III.4.1. Epidémiologie

Les Dématiés sont des moisissures issues du sol, de la terre ou de végétaux en décomposition. Ils sont parfois parasites de plantes et certains sont de véritables opportunistes chez l'homme, mais aussi chez le chien, le chat, le cheval, les ruminants, des oiseaux, des poissons et des amphibiens.

Leur caractéristique commune est de produire des pigments de type mélanine qui imprègnent la paroi des filaments, d'où l'aspect foncé ou noir des colonies en culture et des filaments dans les tissus parasités. Nombreuses espèces incriminées (71 espèces appartenant à 39 genres) (Chermette et Bussieras, 1993).

#### III.4.2. Pouvoir pathogène

Certaines espèces de Dématiés sont adaptées au parasitisme et révèlent in vivo une morphologie parasitaire aisément reconnaissable, comme les cellules fumagoïdes des agents de chromomycose ou les grains noirs des mycétomes fongiques. Beaucoup en revanche ne montrent que des filaments mycéliens à paroi plus ou moins pigmentée, visibles à l'examen direct du prélèvement ou sur coupes anatomo-pathologiques, associés ou non à des éléments levuriformes. C'est dans cette dernière situation qu' Ajello a proposé le terme de phaéohyphomycoses (en grec, phaeo = sombre) pour désigner les mycoses superficielles ou profondes causées par ces champignons «noirs» appartenant le plus souvent au groupe des Dématiés. Parmi les espèces d'intérêt médical et vétérinaire, citons :

- ❖ Le genre *Cladosporium* avec notamment *Cladosporium carrionii* qui est un des principaux agents de chromomycose. Son caractère opportuniste est par contre limité. *Cladosporium bantianum* est en revanche plus redoutable. Thermophile et neurotrope, il détermine des abcès cérébraux au pronostic sombre.
- ❖ Le genre *Alternaria* (*A. alternata*, *A. tenuissima*, ...) qui donne les phaéohyphomycoses les plus fréquentes. Les atteintes cutanées et sous-cutanées sont les plus nombreuses.
- ❖ Le genre *Phialophora verrucosa*.
- ❖ Le genre *Exophiala*, avec *E. jeanselmei*, principale espèce incriminée dans des lésions sous-cutanées, est présent dans les pays tropicaux, mais aussi tempérés. *Exophiala dermatitidis* s'avère aussi un redoutable Dématié. Jadis agent classique de chromomycose, il est de plus en plus incriminé dans des atteintes superficielles (consécutives à un traumatisme) ou profondes, notamment cérébrales, cardiaques et pulmonaires, chez l'immunodéprimé.

#### III.4.3. Caractères cultureux

Les phaéohyphomycètes se développent bien sur tous les milieux utilisés en mycologie. Leur croissance rapide est le plus souvent inhibée par le cycloheximide. Les températures optimales de croissance sont comprises entre 25 et 30 °C. Seules quelques espèces isolées de prélèvements profonds poussent à 37 °C.

#### III.4.4. Morphologie microscopique

Les filaments végétatifs, initialement hyalins, brunissent en vieillissant, mais certains restent incolores. Ces champignons se reproduisent en général seulement sur le mode asexué, et l'organisation conidiogène varie selon les espèces. En outre, si les spores sont souvent foncées ou noires pour ces champignons, d'autres produisent des spores hyalines.

### III.5. DÉMARCHE DIAGNOSTIQUE AU LABORATOIRE

#### III.5.1. Prélèvements

Squames, ongles, cheveux, fragments de biopsies, sécrétions, produits d'expectorations, de lavages et autres liquides biologiques.

### III.5.2. Examen direct

L'utilisation d'un éclaircissant facilite souvent la visualisation des éléments fongiques pour les prélèvements de peau ou de phanères.

### III.5.3. Culture

Les produits pathologiques sont déposés sur le milieu de culture en plusieurs points distincts et enfoncés légèrement dans la gélose. Outre un ensemencement plus aisé, l'utilisation de géloses en boîtes de Pétri facilite l'isolement de l'agent pathogène et les montages à partir des colonies obtenues. Des repiquages sur milieux spéciaux sont parfois nécessaires pour favoriser la conidiogénèse et la pigmentation.

### III.5.4. Incubation

Habituellement à 22-25 °C pour les prélèvements de peau ou de phanères, à 37 °C pour les prélèvements issus des liquides biologiques et des tissus profonds.

### III.5.5. Examen des colonies fongiques

#### a - Avec un vaccinostyle

Un fragment de la colonie est prélevé avec un peu de gélose à l'aide d'un vaccinostyle et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant (bleu coton, bleu à l'eau,...). Il est ensuite dissocié, puis recouvert d'une lamelle couvre-objet qui écrase la préparation.

#### b - Avec un morceau de cellophane adhésive transparente ou scotch

Un petit morceau de scotch est appliqué par sa face collante sur la colonie à l'aide d'une pince (Figure 20), puis déposé sur une goutte de bleu coton sur une lame porte-objet. Une deuxième goutte (plus réduite) est alors déposée sur la face supérieure du scotch qui est ensuite recouvert d'une lamelle couvre-objet. Il convient d'éliminer l'excès de colorant autour de la lamelle avec une feuille de papier buvard.

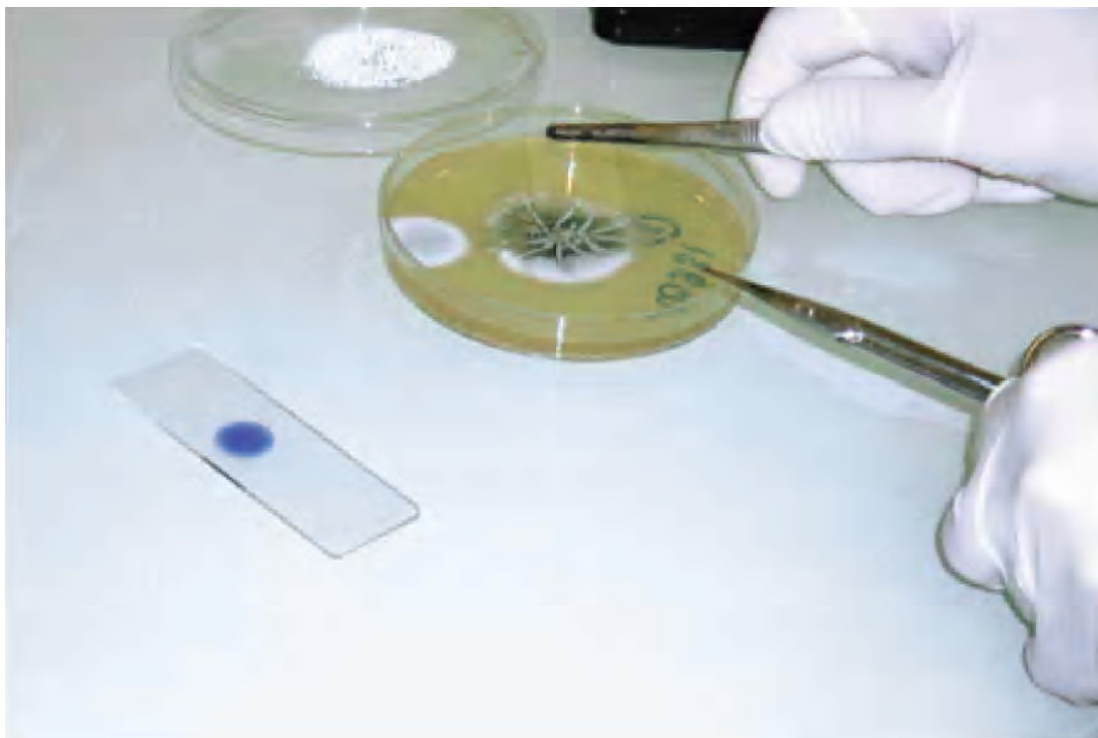


Figure 20: Prélèvement d'une moisissure à l'aide de cellophane adhésive (Chabasse et *al.*, 2002)

### III.5.6. Culture sur lame

#### a - Objectif

Examiner les organes de fructification, souvent difficiles à observer sur les montages classiques.

#### b - Préparation du matériel

Déposer une tige de verre en U dans le fond d'une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. Sur ce chevalet, placer une lame porte-objet stérile et fixer dessus un petit carré de gélose de Sabouraud d'environ 5 mm d'épaisseur.

#### c - Ensemencement

Inoculer les côtés du bloc de gélose avec de petits fragments de la culture à examiner. Recouvrir l'ensemble d'une lamelle couvre-objet stérile. Puis, verser un peu d'eau distillée stérile dans le fond de la boîte, refermer la boîte de Pétri et placer le tout à l'étuve, habituellement à 20-25 °C (Figure 21).

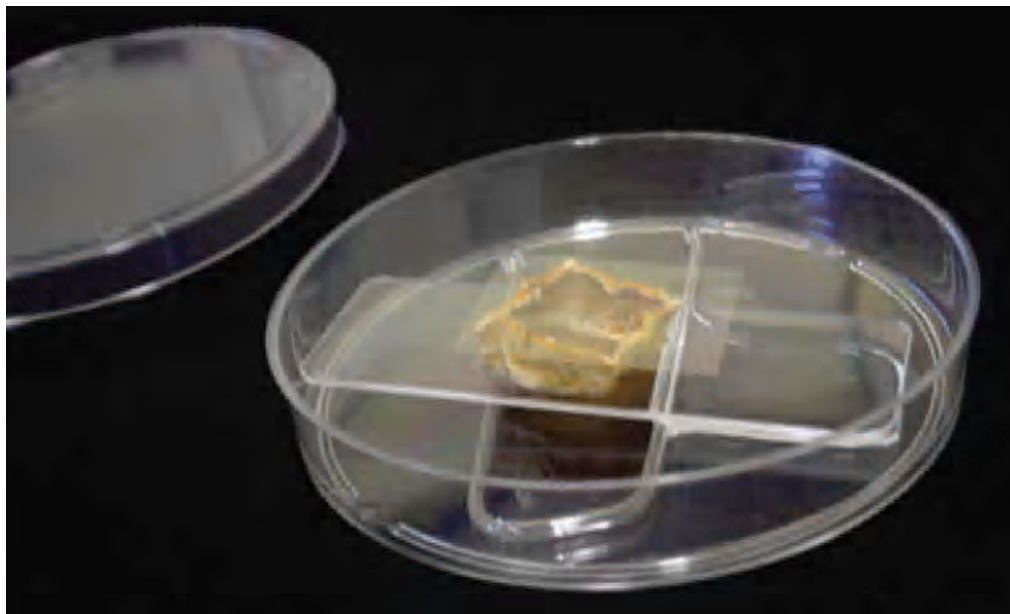


Figure 21: Culture sur lame pour observation des organes de fructification (Chabasse et *al.*, 2002)

#### d - Lecture

Lorsque la culture est sporulée, prélever la lamelle couvre-objet et la déposer sur une goutte de bleu coton posée sur une lame porte-objet. Si la culture est optimale, éliminer le bloc de gélose ; déposer alors sur la lame une goutte de bleu et recouvrir le tout d'une lamelle. Pour une meilleure conservation, les préparations entre lame et lamelle peuvent être scellées avec du vernis à ongle.

### III.5.7- Interprétation

Elle revient toujours au biologiste. En dehors d'un prélèvement profond ou de l'isolement d'un pathogène classique à partir d'un prélèvement superficiel, les critères de pathogénicité sont actuellement bien codifiés:

1. Examen direct positif (présence du champignon dans le prélèvement à l'état parasitaire).
2. Isolement du champignon à plusieurs reprises à partir d'un même site.
3. Isolement du champignon en culture pure et/ou à partir de plusieurs points d'ensemencement.
4. Réponse à une thérapeutique spécifique. Toutefois, ce critère n'est pas obligatoire pour affirmer le caractère pathogène de l'isolat.



Dans toutes les situations, l'interprétation sera facilitée par la lecture et l'analyse du dossier médical du patient. La confrontation clinico-biologique, et donc le dialogue avec le clinicien (médecin ou vétérinaire), prennent ici toute leur valeur (Chabasse et *al.*, 2002).

### III.6. Les Dermatophytes

Les dermatophyties sont un motif fréquent de consultation en pratique dermatologique. De ce fait elles doivent être parfaitement connues des biologistes qui auront en charge le diagnostic au laboratoire. Au XX<sup>ième</sup>, les teignes du cuir chevelu dues à des espèces anthropophiles, très contagieuses et responsables de nombreuses épidémies en milieu urbain, notamment scolaire. C'est toujours le cas aujourd'hui pour les pays économiquement pauvres où ces mycoses non traitées sont largement répandues. A partir des années soixante, et ceci grâce à l'amélioration de notre niveau de vie et à l'efficacité de la griséofulvine (le traitement de référence), ces teignes anthropophiles autochtones ont pratiquement disparu. Elles ont laissé la place aux teignes d'origine animale (zoophiles). C'est ainsi que *Microsporum canis*, parasite du chien et du chat, par exemple est devenu dans les années quatre vingt le premier responsable des teignes autochtones en France métropolitaine. D'autres teignes ou épidermophyties inflammatoires sont signalées en milieu rural dans les régions d'élevage (*Trichophyton verrucosum*). Cependant on assiste, au cours de ces dernières années, à une recrudescence des teignes anthropophiles d'importation dues principalement à *Microsporum audouinii* var. *langeronii*, *Trichophyton soudanense* et *Trichophyton violaceum* dans les populations d'émigrés venues d'Afrique Noire, des pays du Maghreb et à un degré moindre des continents latino-américain ou asiatique.

A côté des teignes classiques rencontrées surtout dans nos grandes villes où vit une forte population étrangère, il faut mettre l'accent sur les dermatophyties de la peau et des plis, mais surtout des ongles. Les onychomycoses occupent en effet une place prépondérante en dermatologie puisqu'elles représentent la moitié des onychopathies. Elles sont déterminées principalement par des dermatophytes au niveau des ongles du pied, les levures prédominant au niveau des ongles des mains.

Ces dermatophytes sont les principaux parasites des pieds, que ce soit des ongles ou des espaces interdigitaux plantaires (pied d'athlète). Selon des enquêtes menées à grande échelle dans la population européenne, la prévalence des onychomycoses à dermatophytes oscillerait entre 15 et 20%. Parmi les facteurs favorisant, outre les troubles trophiques des membres inférieurs et le ralentissement de la pousse des ongles (fréquent chez les sujets âgés), il convient de mettre l'accent sur l'excès de transpiration que favorise le port de chaussures mal fermées et mal aérées (baskets) et la pratique de certains sports (natation, judo, marathon, ...). On peut ainsi résumer le spectre clinique des dermatophytes à l'échelon mondial au sud et dans la ceinture de pauvreté du monde les teignes anthropophiles, au nord, parmi les populations économiquement aisées où la pratique sportive est répandue, le pied d'athlète. Mais les dermatophytes ont un spectre clinique varié, simulant de nombreuses affections dermatologiques (eczéma, lichen, psoriasis, ...). La durée du traitement varie de 3-6 semaines à plusieurs mois en particulier en cas d'onyxis. Le laboratoire sera souvent sollicité, et son intervention est en fait indispensable pour confirmer ou établir le diagnostic avant la mise en place du traitement (Chabasse et *al.*, 2004).

### III.6.1. GÉNÉRALITÉS SUR LES DERMATOPHYTES ET LES DERMATOPHYTIES

#### III.6.1.1. Définition – Taxinomie

Les dermatophytes constituent un groupe de champignons adaptés à la kératine humaine et animale. Chez l'homme, la peau et les phanères (ongles, cheveux, poils) sont les sites privilégiés de ces champignons qualifiés de kératinophiles et kératinolytiques.

Sur le plan taxinomique, il s'agit de champignons microscopiques appartenant à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des Onygnales et au genre *Arthroderma*. Ce sont donc des champignons

filamenteux à thalle septé se multipliant sur le mode sexué, et produisant des ascospores (spores endogènes produites dans des asques disposées sans ordre précis dans des gymnothèces). En pratique courante de laboratoire, il est toutefois difficile d'obtenir la forme sexuée de ces champignons. C'est pourquoi leur classification repose classiquement sur la reproduction asexuée. Les dermatophytes sont alors classés dans le Phylum des Deutéromycètes et la classe des Hyphomycètes.

La reproduction asexuée s'effectue, pour les dermatophytes, sur le mode thalique solitaire, et conduit à la production de deux types de spores ou conidies (également appelées, pour les dermatophytes, aleuries car elles sont produites sur le mode thalique solitaire) des spores unicellulaires appelées microconidies ou microaleuries, et des spores pluricellulaires, à base tronquée et cloisonnées transversalement, les macroconidies ou macroaleuries. Selon l'abondance respective de ces deux types de spores, et leur morphologie, on distingue parmi ces champignons trois genres:

- ❖ Le genre *Epidermophyton* (Sabouraud, 1907) qui ne comprend qu'une seule espèce, *Epidermophyton floccosum*, est caractérisé par l'absence de microconidies et par la présence de macroconidies à paroi mince en forme de massue. Cette espèce n'attaque jamais les cheveux, les poils ou les ongles.
- ❖ Le genre *Microsporum* (Gruby, 1843) qui regroupe une dizaine d'espèces dont 5 en pratique métropolitaine peuvent être retrouvées chez l'homme et la animaux. Elles parasitent la peau et les cheveux, mais attaquent rarement les ongles. Ce genre se définit par la présence de macroconidies fusiformes à paroi verruqueuse ou échinulée, et de microconidies le plus souvent piriformes, mais parfois rondes.
- ❖ Le genre *Trichophyton* (Mamsten, 1845) dont est issue la majorité des dermatophytes (plus d'une vingtaine d'espèces répertoriées), peuvent parasiter la peau et les phanères de l'homme et les animaux. Sur le plan taxinomique, le genre *Trichophyton* se définit par la présence de macroconidies à paroi lisse, et de microconidies rondes ou piriformes selon les espèces (Chabasse et al., 2004).

### III.6.1.2. Origine des dermatophytes

L'origine de la contamination par un dermatophyte est triple: le sol, l'animal et l'homme. Ainsi, selon leur habitat naturel, on distingue trds groupes (Tableau 1):

- ❖ Les espèces anthropophiles: issues exclusivement de l'homme, leur isolement implique une contamination interhumaine. Certaines espèces anthropophiles peuvent exceptionnellement être pathogènes pour des animaux ex : *T. rubrum* (Chermette et Bussieras, 1993).
- ❖ Les espèces zoophiles: issues de l'animal, leur transmission à l'homme nécessite un contact, direct ou indirect, avec un animal infecté (ou porteur sain). L'engouement croissant pour les animaux familiers (chien, chat, ...) explique l'augmentation de la fréquence de certaines espèces, en particulier *M. canis*, mais il convient aussi de souligner la contamination accidentelle à partir d'animaux de loisirs, de rente ou d'élevage (chevaux, bovins).
- ❖ Les espèces géophiles ou telluriques : elles parasitent accidentellement l'homme à la suite d'une blessure tellurique (Chabasse et al., 2004). Certaines espèces géophiles sont parfois pathogènes pour les humains ou pour les animaux ex : *M. gypseum*, *M. nanum* et *T. ajelloi* (Chermette et Bussieras, 1993).

#### ⇒ Origine humaine

Les dermatophytes anthropophiles, bien adaptés à l'homme, donnant des lésions discrètes habituellement bien tolérées ou ignorées, sont très fréquent en pathologie humaine. La contamination se fait par les spores (arthrospores), très résistantes, qui sont présentes sur les lésions elles-mêmes, mais également dans les débris d'ongles, de squames, de cheveux. Ces spores peuvent survivre des mois voire

des années dans le milieu extérieur, en particulier dans l'environnement des malades, ce qui contribue à leur recontamination.

La contamination peut être directe ou indirecte, ce qui est le plus fréquent, par l'intermédiaire des sols souillés de squames parasitées (salle de bains familiale, salles de sports, tatamis, piscines, etc.). Linge de toilette, vêtements et chaussures peuvent également transporter des spores. La quantité de spores infestantes dans l'environnement est proportionnelle au nombre de sujets infectés.

Les espèces anthropophiles les plus fréquentes en pathologie proviennent d'infections des pieds (pied d'athlète). Il s'agit en écrasante majorité de *T. rubrum* suivi de *T. mentagrophytes var. interdigitale* et d'*Epidermophyton floccosum* beaucoup plus rarement. Les dermatophytes responsables des teignes anthropophiles (*T. schoenleinii*, *T. violaceum*, *T. soudanense*, *Microsporum audouinii* et sa variété *langeronii*), fréquents dans des familles originaires d'Afrique ou des pays du Maghreb. La contamination est le plus souvent intrafamiliale.

La contagiosité au sein des familles ou de collectivités d'enfants nécessite des contacts répétés avec la source infestante. Des objets contaminés (peignes, brosses, foulard, etc.), sont souvent à l'origine des épidémies. Les poux, en se déplaçant d'une tête d'enfant à une autre tête, emportent avec eux des spores fongiques et participent à la contamination. Certains sports comme la lutte, favorisant le contact de la tête avec différentes parties du corps sont aussi des facteurs de dissémination des dermatophytes anthropophiles (*T. tonsurans*). Des adultes peuvent être porteurs de spores de dermatophyte de façon infraclinique et contaminent leurs enfants parfois dès la maternité (*M. audouinii var. langeronii*).

Les espèces les plus fréquentes sont *T. soudanense*, *M. audouinii var. langeronii* (toutes deux endémiques en Afrique) et *T. violaceum* (pays du Maghreb essentiellement).

### ⇒ Origine animale

Les dermatophytes zoophiles sont des espèces pu ou pas adaptées à l'homme. Ils donnent des lésions plutôt bruyantes (inflammatoires) et mal supportées.

La contamination provenant des animaux est cependant rare. Elle se fait de façon accidentelle dans un contexte professionnel, chez les éleveurs, vétérinaires, personnels des abattoirs (*T. verrucosum* est transmis par les bovins atteints de dartre).

Les animaux sauvages sont rarement impliqués, ils contaminent les enfants lors de jeux dans la nature ou les adultes pendant les travaux de jardinage. Le plus souvent l'infection se fait par l'intermédiaire des poils infestants déposés sur le sol (*T. mentagrophytes* et *M. persicolor* transmis par les petits rongeurs). Les animaux sauvages peuvent être asymptomatiques ou malades avec des plaques de teigne.

Les animaux de compagnie, très nombreux en France (10 millions de chats et autant de chiens), sont sujets aux teignes à *M. canis*. Ils présentent des lésions (plaques d'alopécie prédominant sur la face, les pattes) ou sont très souvent porteurs sains. Les animaux malades vont entraîner des épidémies familiales (teignes tondantes du cuir chevelu chez les enfants, associées à des épidermophyties bien dessinées, folliculites, sycosis de la barbe chez les adultes, rarement des teignes du cuir chevelu chez des femmes âgées).

Les espèces les plus fréquemment pathogènes sont *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *M. persicolor* et *T. verrucosum*. D'autres espèces, *M. praecox*, *T. erinacei*, *T. equinum*, *M. equinum*, *T. gallinae*, *M. nanum* sont rarement rencontrées du fait d'une moindre virulence, d'une moins bonne affinité pour la kératine humaine (la plupart des dermatophytes ont un substrat privilégié) et des conditions de rencontre beaucoup plus limitées (Tableau 1) (Chabasse et al., 1999).

### ⇒ Origine tellurique

Sur certains sols enrichis en kératine animale (cours de ferme, étables, etc.), on trouve des dermatophytes qui dégradent la kératine déposée par les animaux (poils, fragments de corne, de sabots, plumes, etc.). Peu agressifs, ils sont rarement impliqués en pathologie humaine mais entraînent des

manifestations inflammatoires intenses favorisant leur élimination. Ce sont essentiellement *M. gypseum*, *M. fulvum* et *T. mentagrophytes*. Certaines espèces, fréquentes dans le sol, ne sont jamais pathogènes (*T. ajelloi*).

### III.6.1.3. Reproduction sexuée des dermatophytes

Les dermatophytes isolés au laboratoire, comme la plupart des micromycètes kératinophiles issus du sol, appartiennent à la classe des Ascomycètes, à la sous-classe des Euascomycètes et à l'ordre des Onygnéales. Ce sont des Gymnoascaceae appartenant au genre *Arthroderma*. Le genre *Nannizzia* qui correspondait aux formes sexuées (téleomorphes ou formes parfaites) des espèces du genre *Microsporum*, est abandonné et les espèces qui appartenaient à ce genre sont aujourd'hui classées dans le genre *Arthroderma*.

Les dermatophytes étant des espèces hétérothalliques, la production de spores sexuées dépend de la rencontre de deux souches complémentaires, l'une dite de polarité (+), l'autre de polarité (-). La probabilité d'isoler d'un produit pathologique deux souches de polarités différentes est si rare qu'il est en pratique impossible de retrouver les formes parfaites des dermatophytes dans nos primocultures. C'est donc sur la reproduction asexuée que repose l'identification au laboratoire d'analyses (Chabasse et al., 2004).

Tableau 1 : Principaux dermatophytes agents de zoonoses rencontrés chez l'homme (Chabasse et al., 1999).

Dermatophytes Fréquence chez l'homme	Chien	Chat	Bovin	Ovin	Cheval	Porc	Rongeurs Mammifères sauvages	Oiseau
<b>Fréquemment rencontrés</b>								
<i>Microsporum canis</i>	++	+++	±	±	±	±	±	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	++	+	++	++	+	+	++ (mulot)	+
<i>Trichophyton verrucosum</i>	±	±	+++	++	±	±		
<i>Microsporum persicolor</i>	+	+					+++ (campagnol)	
<b>Rarement rencontrés</b>								
<i>Microsporum gypseum</i>	+	+	+	+	+		+	
<i>Trichophyton erinacei</i>	+	+					+++ (hérisson)	
<i>Trichophyton equinum</i>	±	±	±		++		±	
<i>Microsporum praecox</i>	±	±			++			
<b>Exceptionnellement rencontrés</b>								
<i>Microsporum equinum</i>					+++			
<i>Trichophyton gallinae</i>	±	±						
<i>Trichophyton quickeaneum</i>	+	+					++ (souris grise)	++
<i>Microsporum nanum</i>						+		

± : rare, + : peu fréquent, ++ : fréquent, +++ : très fréquent.

#### a- Conséquences de l'adaptation au parasitisme

Il est largement admis que les dermatophytes qui parasitent aujourd'hui l'homme et l'animal sont issus du sol. Si certains restent des saprophytes du sol (*T. ajelloi*, *T. terrestre*, *M. cookei*, ..), beaucoup ont évolué vers le parasitisme, d'abord chez l'animal, puis chez l'homme. Le cheminement unidirectionnel sol-animal-homme semble être l'évolution phylogénique habituelle de ces kératinophiles (Chabasse et al., 2004). Les conséquences pratiques de l'adaptation au parasitisme des dermatophytes sont les suivantes:

### 1. Sur le plan épidémiologique

- Les espèces telluriques touchent accidentellement l'homme et la contamination interhumaine, ensuite, est quasi nulle.
- Les espèces zoophiles contaminent plus facilement l'homme, et ceci d'autant plus qu'il vit en promiscuité avec l'animal contamineur. La transmission interhumaine, possible ensuite, reste cependant très limitée.
- Les dermatophytes anthropophiles, bien adaptés à l'homme, diffusent en revanche très bien dans l'espèce humaine (Chabasse et *al.*, 2004).
- Certains dermatophytes bien adaptés à l'homme, contaminent parfois les animaux. On cite des cas d'infection du dromadaire en Afrique du Nord, par *T. schoenleini* ; de même quelques cas de teigne à *T. rubrum* sont connus chez des chiens, contaminés par leurs propriétaires atteints du syndrome « Pied de l'Athlète », déterminé par ce champignon. De même, on signale la présence chez le cheval, le chien, la chèvre d'*Epidermophyton floccosum*, agent de l'« eczéma marginé » de Hebra, chez l'homme avec, chez les animaux. Les animaux infectés par ces champignons peuvent les rendre à l'homme (Euzeby, 1984).

### 2. Sur le plan clinique

Il est intéressant d'observer que les espèces peu adaptées à l'homme (géophiles ou zoophiles) sont plus facilement à l'origine de réactions inflammatoires. En revanche, les espèces les mieux adaptées (anthropophiles) évoluent généralement sur un mode chronique avec des réactions de défense limitées, voire nulles (Chabasse et *al.*, 2004).

### 3. Sur le plan biologique

Parallèlement à l'adaptation au parasitisme, on assiste à une disparition progressive de l'aptitude à la reproduction, d'abord sexuée, puis asexuée. En revanche, à l'état parasitaire se développent des structures de diffusion communes à toutes les espèces qui seront à l'origine de la contamination de l'homme: il s'agit des arthrospores issues de la fragmentation des filaments mycéliens présents sur le revêtement cutané ou les phanères et des spores issues du parasitisme pileaire (Chabasse et *al.*, 2004).

### III.6.2. Facteurs favorisants

Ils sont nombreux, d'ordre physiologique ou pathologique pour certains, mais le plus souvent liés au mode de vie (profession, habitudes vestimentaires, loisirs, ...) (Chabasse et *al.*, 2004).

Il convient de souligner en effet le rôle:

- *Des facteurs hormonaux*: les teignes surviennent principalement chez l'enfant, et guérissent spontanément à la puberté pour la plupart,
- *Des facteurs immunologiques* comme l'immunodépression liée à un SIDA, une corticothérapie, un traitement immunosupresseur, ou une chimiothérapie,
- *De la profession* : agriculteurs, éleveurs de bovins et vétérinaires sont particulièrement exposés à une contamination par une espèce zoophile (*T. verrucosum*, *M. praecox*, ...). De même, les maître-nageurs sont fréquemment sujets à des intertrigos interdigito-plantaires déterminés par des espèces anthropophiles (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, ...),
- *De la macération* (chaleur et humidité) qui joue un rôle majeur dans le développement des dermatophytes, en particulier au niveau des pieds et des grands plis (chaussures en matière plastique, vêtements en tissus synthétiques empêchant l'évaporation, ...),
- *De la pratique des sports* équestres, de la natation, des sports en salle (arts martiaux, gymnastique, ...),
- *De certaines habitudes* en matière de coiffure chez les africains (rasage des garçons, nattage des filles), à l'origine de la transmission de teignes anthropophiles (*M. audouinii* var. *langeronil*, *T. soudanense*, ...),
- Et des microtraumatismes, sources d'onyxis des pieds chez les sportifs et de pachydermie palmaire chez le travailleur manuel (Chabasse et *al.*, 2004).

### III.6.3. Aspects cliniques

Les dermatophyties (parfois appelées dermatophytoses ou Tinea chez les anglo-saxons) sont des mycoses superficielles provoquées par les dermatophytes. Compte tenu de leur affinité pour la kératine humaine et animale, ces champignons attaquent la peau, en particulier l'épiderme, et les phanères. Habituellement, ils n'envahissent pas les tissus profonds, sauf dans les cas exceptionnels de maladie dermatophytique ou de mycétomes. Par ailleurs, comme d'autres champignons, les dermatophytes peuvent être à l'origine de réactions allergiques dont certaines à expression cutanée sont appelées dermatophytides ou trichophytides (Chabasse et *al.*, 2004).

#### a. Epidermophytie circinée (ancien herpès circiné)

Intervient en peau « libre » dite « glabre » mais peut envahir le duvet.

#### b. Epidermophytie des grands plis (ancien eczéma marginé de Hébra)

- \* inguino-crurale<sup>+++</sup>
- \* interfessière,
- \* axillaire,
- \* sous-mammaire,

#### c. Epidermophytie des petits plis (intertrigo)

- \* interdigito plantaire<sup>+++</sup> (pied d'athlète),
- \* interdigito palmaire

#### d. Folliculite granuloineuse de la jambe

Envahissement des poils (femmes)<sup>+++</sup>.

#### e. Mentagre (ou folliculite agminée ou sycosis fongique)

Atteinte des poils avec réaction inflammatoire et suppuration :

- \* de la barbe,
- \* de la moustache.

#### f. Teignes du cuir chevelu

- \* Teigne tondante =    Microsporique  
                                  Trichophytique
- \* Teigne suppurée inflammatoire: kérion de Celce.
- \* Teigne favique : favus.

**g. Tokelau :** Epidermophytie en cocarde (*Trichophyton concentricum*). Quelques foyers en Océanie, Asie du Sud-Est, Amérique centrale, très rare en Afrique.

#### h. Granulome trichophytique de Majocchi

Réaction granulomateuse autour d'un poil parasité incarcéré accidentellement sous la peau.

#### i. Mycétome à dermatophyte (Exceptionnel).

#### j. Maladie dermatophytique

Au cours de déficits immunitaires. Extension du parasitisme localement dans le tissu cellulaire sous-cutané et focalement avec adénopathies et envahissement viscéral possible par septicémie.

#### k. Maladie dermatophytique ou maladie de Hadida et Schousboë

Elle survient sur un terrain familial particulier (consanguinité) avec déficit de l'immunité cellulaire. Sur ce terrain, le dermatophyte acquiert, à partir d'un foyer cutané, la possibilité d'envahir les tissus profonds où on ne trouve pas de kératine. *Trichophyton violaceum*, *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans* ont été incriminés, les deux premiers sont les plus fréquemment en cause. Affection très rare, elle existe surtout en Afrique du Nord. Elle a été décrite également en Australie chez des aborigènes. Les dermatophytes impliqués sont des espèces anthropophiles ou zoophiles: L'infection dermatophytique débute dès l'enfance, le terrain sur lequel survient cette affection est plus important que l'espèce de dermatophyte en cause.

La maladie débute souvent au cuir chevelu (*T. violaceum*, *T. schoenleinii*) ou sur la peau (*T. rubrum*). Les lésions cutanées s'étendent progressivement se transforment en nodules pouvant s'ulcérer (atteinte du derme et de l'hypoderme) puis les ongles sont contaminés. Une généralisation se fait aux ganglions et au système nerveux. D'autres localisations peuvent se voir, foie, aponévrose, thymus, os. Parfois les lésions restent superficielles mais s'étendent progressivement sur tout le corps.

Le diagnostic différentiel se pose avec les mycétomes à dermatophytes. Ces derniers surviennent chez des patients ayant eu une corticothérapie au long cours. Autour des grains, il existe une réaction cellulaire avec histiocytes et cellules géantes. Cette réaction cellulaire n'existe pas dans la maladie dermatophytique (Chabasse et al., 1999).

## I. Dermatophytides

Lésions secondaires à distance, d'expressions allergiques diverses (dysidrose, eczéma, urticaire, péri-artérite, etc.). Absence du champignon au niveau des lésions qui disparaissent après traitement du foyer fongique originel (Moulinier, 2003).

### III.6.4. PATHOGENIE

#### A. Mode de végétation sur la peau

L'inoculation du champignon est favorisée par une lésion cutanée préexistante ou une excoriation, si minime soit-elle. Une spore ou un fragment de mycélium pénètre dans la couche cornée de l'épiderme et s'étend de façon circulaire et centrifuge. Au contact des filaments et de la peau saine, se forment des vésicules qui se dessèchent en donnant des squames. Les lésions réalisées sont arrondies; le champignon est actif à la périphérie de la lésion alors qu'il tend à disparaître du centre.

#### B. Mode de végétation dans le cheveu ou le poil (Figure 22)

L'atteinte du cheveu est secondaire à l'atteinte cutanée; le filament arrivant à un orifice pileux progresse dans la couche cornée jusqu'à l'infundibulum. Au contact avec le cheveu le champignon soulève la cuticule et pénètre dans le cheveu qu'il envahit de haut en bas. Sa progression s'arrête au niveau du collet du bulbe pileux où il n'y a plus de kératine et forme une ligne appelée « frange d'Adamson ». L'évolution du champignon dans le cheveu dépend de l'espèce responsable:

- ❖ les filaments se multiplient peu dans le cheveu qui reste relativement long (teigne favique);
- ❖ les filaments se multiplient au point d'envahir entièrement le cheveu. Très fragile, celui-ci se casse au ras du cuir chevelu (teigne endothrix);
- ❖ les filaments ressortent du cheveu et forment autour de lui une gaine de petites spores très compactes (teigne microsporique), ou dissociées en chaînettes (teigne microïde) ou de spores plus grosses (teigne mégaspore).

#### C. Mode de végétation dans l'ongle

L'atteinte de l'ongle est secondaire à la pénétration du champignon dans la couche cornée de l'hyponychium et du lit unguéal. La pénétration se fait volontiers dans un ongle déjà malade ou est favorisée par les microtraumatismes de l'ongle (par exemple ; atteinte de l'ongle du gros orteil chez le footballeur). L'envahissement est progressif de la partie distale vers la partie proximale.

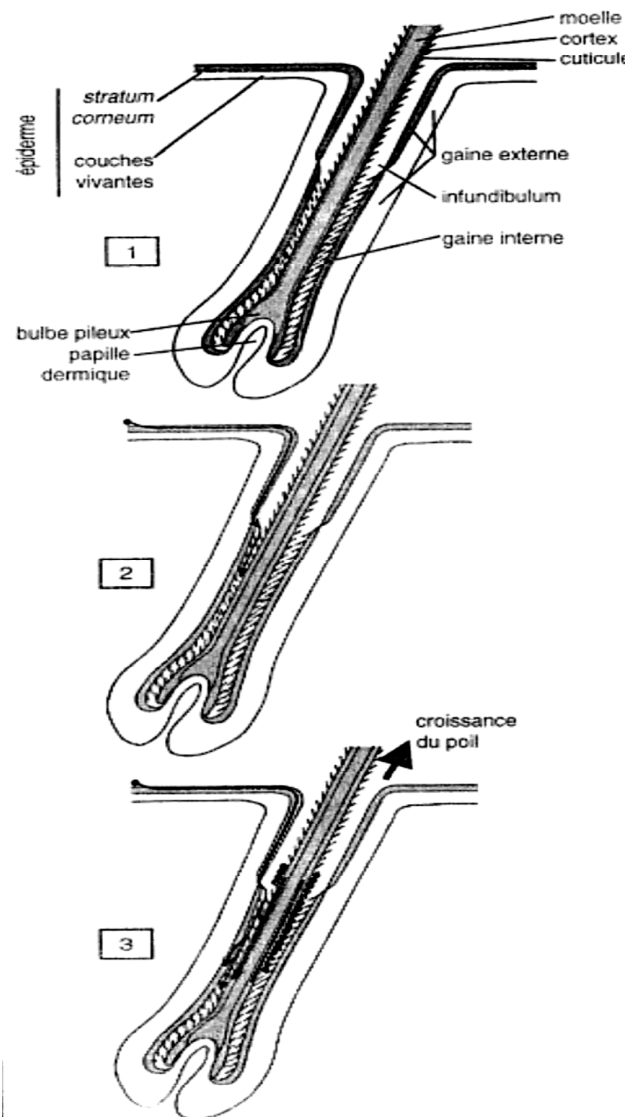


Figure 22 : Mode d'invasion des cheveux ou des poils (Chermette et Bussi ras, 1993)

### III.6.5. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES DERMATOPHYTIES

#### A. Prélèvement

Le prélèvement doit être réalisé avant tout traitement spécifique, qu'il soit local ou général (per os). Dans le cas contraire, une abstention thérapeutique est nécessaire, d'au moins 15 jours pour les lésions de la peau ou des cheveux et de deux mois pour les ongles. Le préleveur (clinicien ou biologiste) doit connaître parfaitement la sémiologie des dermatophyties afin de réaliser le prélèvement approprié aux lésions observées (Chabasse et *al.*, 2004).

Pour les teignes du cuir chevelu, le prélèvement sera précédé d'un examen sous lampe de Wood dans une pièce où l'obscurité est totale (Figure 23). Une fluorescence verte orientera le diagnostic vers une teigne fondante microsporique ou une teigne favique. Le développement de certaines espèces (essentiellement des *Microsporum* tels que *M. canis*) dans les poils en croissance (donc in situ dans les follicules) entraîne la production de métabolites du tryptophane, ayant la particularité d'être fluorescents lors d'exposition à certains rayonnements ultra-violets (Chermette et Bussieras, 1993).



Enfin, le prélèvement s'accompagnera d'un interrogatoire du patient pour préciser son origine et son mode de vie (habitat, profession, loisirs, animaux de compagnie, ...), et rechercher d'éventuels facteurs favorisants (terrain, traitements médicamenteux, ...) (Koenig, 1995 ; Chabasse et *al.*, 2004).



Figure 23: Examen du cuir chevelu sous lampe de Wood (Chabasse et *al.*, 2004)

### B. Le matériel

Le prélèvement des lésions dermatophytiques nécessite un matériel réduit (Figure 24) curette de Brocq ou grattoir de Vidal, ciseaux, vaccinostyle et écouvillons. L'ensemble de ce matériel doit bien entendu être stérile.

Une pince à épiler sera par ailleurs nécessaire devant une folliculite, une teigne ou un sycosis. Ces deux dernières lésions pourront également être prélevées à l'aide d'un carré de moquette préalablement stérilisé.

Enfin, des boîtes de Pétri stériles en polystyrène, ou mieux en verre (moins d'électricité statique) seront utilisées pour recueillir les squames, fragments d'ongle, cheveux ou poils (Koenig, 1995 ; Chabasse et *al.*, 2004).

### C. Modalités du prélèvement

Chaque lésion doit être prélevée séparément avec du matériel stérile.

- **Lésions cutanées** : elles seront grattées avec une curette, un grattoir ou un scalpel mousse, en périphérie de la lésion (sur le bourrelet inflammatoire) sur laquelle on appliquera ensuite un écouvillon préalablement humidifié avec de l'eau distillée stérile.
- **Folliculites et sycosis**: les poils et les duvets seront prélevés à la pince à épiler, puis un écouvillon préalablement humidifié sera appliqué sur les lésions suintantes.
- **Onyxis**: dans les atteintes distales ou latérodistales, la périphérie de l'ongle sera coupée à la pince ou aux ciseaux, et éliminée, puis on prélèvera avec une curette ou un vaccinostyle la zone unguéale pathologique, à la lisière de la partie saine et de la partie malade (où le dermatophyte est le plus actif). Le lit de l'ongle sera alors raclé pour recueillir la poudre. En cas de leuconychie, on grattera l'ongle à sa surface. L'étude

histologique de l'ongle s'avère utile devant l'isolement d'une moisissure afin d'affirmer son caractère pathogène.

- **Teignes:** le prélèvement sera précédé par un examen du cuir chevelu sous lampe de Wood à la recherche d'une fluorescence verte qui orientera le diagnostic vers une teigne endo-ectothrix de type microsporique ou une teigne favique. Aucune fluorescence n'est observée dans les teignes endo-ectothrix de type microïde ou mégaspore, ni dans les teignes endothrix.

On prélèvera ensuite dans la zone d'alopecie les squames, les cheveux cassés et les croûtes avec une curette et une pince à épiler. Un écouvillon préalablement humidifié avec de l'eau distillée stérile sera ensuite appliqué sur la plaque d'alopecie (Chabasse et *al.*, 2004).



Figure 24: **Matériel nécessaire au prélèvement des dermatophyties (Chabasse et *al.*, 2004)**

- **Intertrigos:** le prélèvement sera réalisé à la périphérie des lésions par grattage à la curette. Puis les bords de la lésion seront écouvillonnés (Chabasse et *al.*, 2004).

Le prélèvement peut également être effectué par la technique de la moquette ou du vénilia adhésif. Cette technique est utilisée pour des enquêtes épidémiologiques, ou pour prélever de grandes surfaces de pelage chez les animaux, en l'absence de lésion clinique évidente. En effet, ce type de prélèvement très superficiel ne permet pas de faire un examen direct.

Découper des carrés de moquette de laine ou de venilia adhésif de 5 cm de côté qui seront lavés, emballés dans du papier kraft puis autoclavés. Frotter énergiquement la surface à prélever avec ces carrés et les apposer directement sur une boîte de Petri contenant le milieu d'isolement.

Si les écouvillons doivent êtreensemencés le plus rapidement possible, les squames, les ongles et les cheveux, par contre, se conservent facilement plusieurs jours et peuvent être envoyés au laboratoire par la poste sans inconvénients (Koenig, 1995).

#### **D. Examen direct**

On utilise habituellement des produits éclaircissant la kératine afin de bien observer les éléments fongiques. On peut utiliser:

### ✚ La Potasse à 10, 20 ou 30%

Déposer quelques squames ou cheveux sur une lame porte objet avec 2 à 3 gouttes de potasse. Mettre une lamelle. Chauffer très doucement à la veilleuse du bec bunsen. Contrôler la transparence du prélèvement au microscope. Recommencer si nécessaire.

Cette méthode est très rapide et donne d'excellents résultats surtout pour l'observation des squames ou fragments d'ongle un peu épais. Mais il faut regarder la lame de suite et il n'est pas possible de garder les préparations. Pour les cheveux, très fragilisés, la technique suivante est préférable (Koenig, 1995) (Figure 25A). De même, l'utilisation du contraste de phase facilitera leur observation (Figure 25B).

### ✚ Le Chlorallactophénol

La technique est la même. L'éclaircissement est très progressif. Il faut donc attendre 1 à 2h avant d'examiner la lame. Mais il est possible de conserver la préparation plusieurs jours ou plus, si l'on prend soin de luter la lamelle. Pour l'examen des ongles, souvent épais, la potasse est préférable (Koenig, 1995).

### ✚ Le liquide au noir chlorazole (ou encre Parker bleue ou noire)

Le noir chlorazole, ajouté à la potasse à 5 % colore électivement les éléments fongiques en noir et supprime les artefacts (Koenig, 1995).

### ✚ L'examen direct en fluorescence

L'examen direct se fait après avoir déposé et chauffé une goutte d'un réactif contenant un fluorochrome dérivés du stilbène (Blankophor, Calcofluor, Uvitex 2B) qui se lie spontanément aux polysaccharides à liaisons b présents chez les champignons (et les végétaux), peuvent faciliter le repérage des éléments fongiques (Figure 25 C et D). Ils s'associent volontiers aux agents éclaircissants (Koenig, 1995 ; Chabasse et al., 2004). L'examen est rapide, visualise parfaitement les éléments fongiques. Mais il faut disposer d'un microscope à fluorescence.

## b- Résultats (Chabasse et al., 2004)

### ❖ Dans les squames ou les fragments d'ongle

On observera, pour les dermatophytes, la présence de filaments mycéliens hyalins, plus ou moins réguliers, septés, d'aspect en bois mort.

### ❖ Dans les cheveux ou les poils

Le développement des dermatophytes dans les cheveux ou les poils se traduit, à l'examen direct, par différents aspects.

### 1. Le parasitisme endo-ectothrix

L'attaque du cheveu se traduit par la présence de quelques filaments mycéliens intrapilaires. Mais surtout, on observe autour du cheveu, la présence de spores (arthrospores résultant de la dissociation de filaments mycéliens) sur toute la longueur de la zone parasitée. En fonction de la taille de ces spores et de leur abondance, on distinguera trois types de parasitisme pileire endo-ectothrix. Chez les animaux, seul, le mode d'invasion endo-ectothrix est connu (Guillot, 1999).

- **Le type microsporique:** les spores qui mesurent environ 2 µm de diamètre sont très nombreuses et forment autour du cheveu (ou du poil) une gaine dense et épaisse (Figure 26A). En relation avec l'abondance des éléments fongiques à leur surface, les cheveux parasités sont fluorescents sous lampe de Wood, Ce type de parasitisme pileire s'observe exclusivement pour certaines espèces du genre *Microsporum*: *M. canis*, *M. audouinii*, et plus rarement *M. ferrugineum*.

- **Le type microïde :** la gaine de spores est lâche et les spores mesurent environ 2 µm de diamètre (Figure 26B). Les champignons en cause sont *T. mentagrophytes* et *T. erinacei*.

• **Le type mégaspore** : dans ce type de parasitisme pileux qui oriente le diagnostic vers *T. verrucosum* et *T. equinum*, la gaine de spores est continue, et les spores sont plus grosses, de 4 à 5 µm de diamètre (Figure 26C).

## 2. Le parasitisme endothrix

Les filaments mycéliens envahissent le cheveu et se dissocient à maturité en arthrospores qui finissent par casser le cheveu (image classique en sac de noisettes, Figure 26D). Le cheveu cassé très court apparaît, à l'œil nu, comme un point noir au milieu des squames. Au microscope (objectif 20), il se réduit à l'image d'un petit fragment enroulé simulant un chiffre ou une lettre. Seules des espèces anthropophiles du genre *Trichophyton* (*T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense*, ...) produisent ce type de parasitisme pileux.

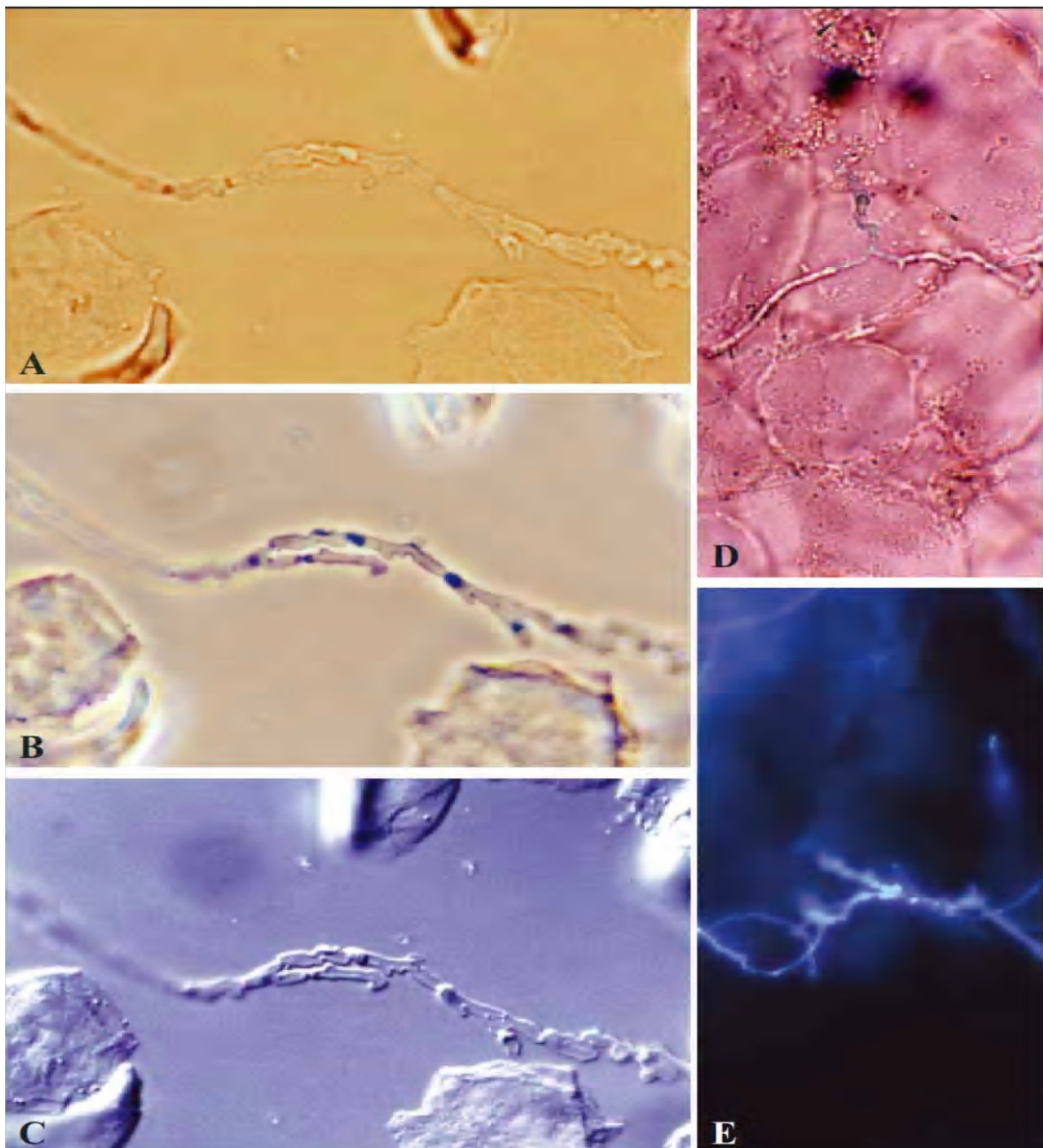


Figure 25 : Examen direct des squames et fragments d'ongles (Chabasse et al., 2004)



Montage des squames dans du chloral-lactophérol et observation en lumière ordinaire (A), en contraste de phase (B) ou en interférentiel (C). Visualisation des éléments fongiques à l'aide de noir chlorazole (D) ou de calcofluor White (E, observation au microscope à fluorescence).

### 3. Le parasitisme favique

Dans ce type de parasitisme pileaire qui est spécifique de *T. schoenleinii*, les filaments mycéliens intrapilaires sont assez nombreux. Cependant, dans la partie distale du cheveu parasité, non cassé, les filaments mycéliens morts laissent dans le cheveu des galeries qui apparaîtront brunes à l'examen microscopique (Figure 26E). Ce type est très rare chez les animaux (Guillot, 1999).

**NB:** Le parasitisme des poils issus de sycosis ou de folliculites est moins typique, et il n'est pas toujours aisé de différencier le type microïde du type mégaspore. En outre, il faut signaler que certains dermatophytes n'attaquent jamais les cheveux ou les poils (*E. floccosum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *M. percolor*).

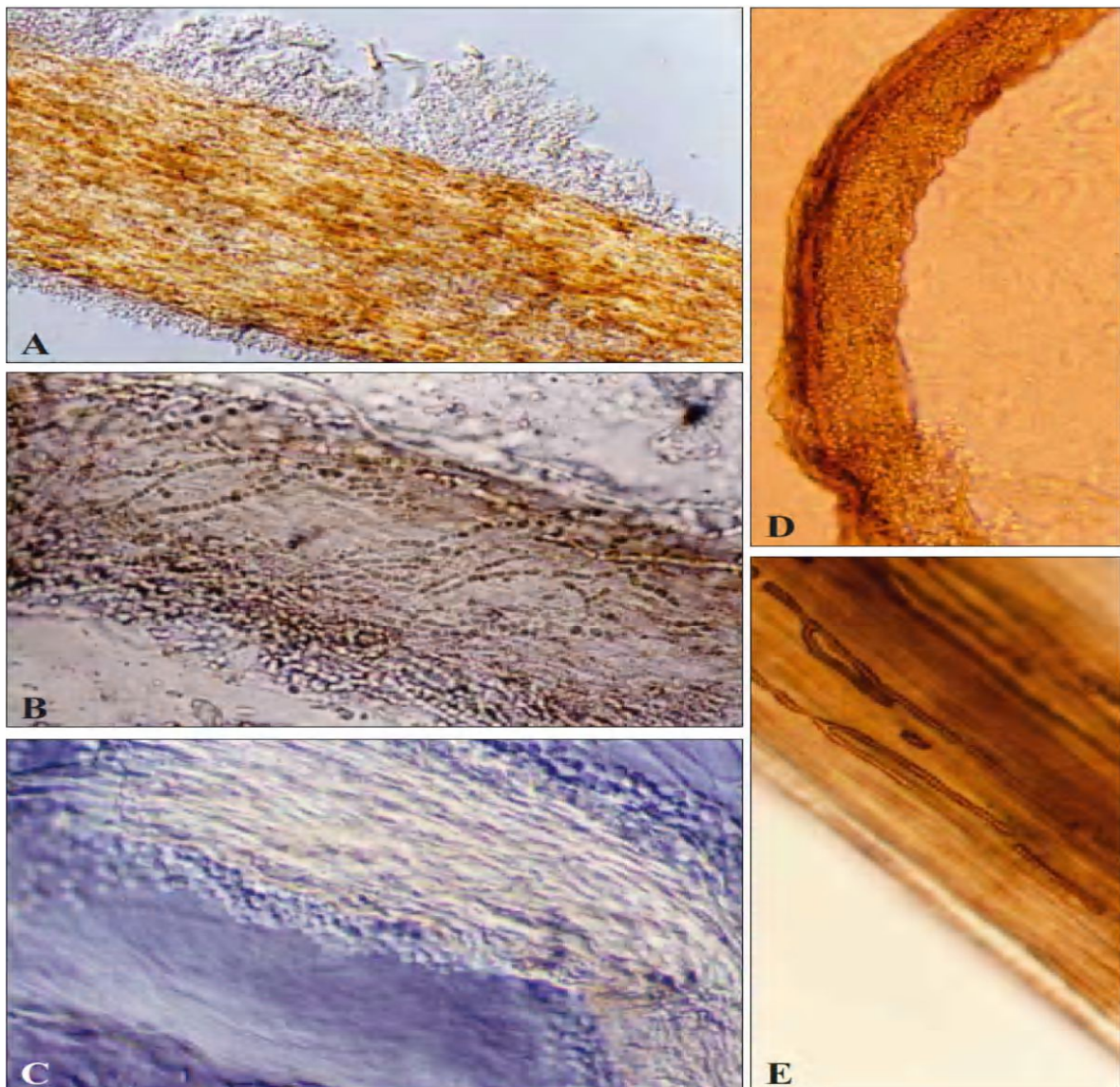


Figure 26: Les différents types de parasitisme pileaire (Chabasse et al., 2004)

Type microsporique (A), microïde (B), mégaspore (C) endothrix (D) et favique (E).

## E. Cultures

### a- Milieux de culture et ensemencement

Le milieu de référence pour les dermatophytes est le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques et de cycloheximide (Actidione<sup>®</sup>). Ce dernier inhibe la croissance de la plupart des moisissures et aide ainsi à l'isolement des dermatophytes.

Ce milieu de culture est commercialisé par différentes sociétés sous forme de géloses présentées en boîtes de Pétri ou en tubes. L'usage des boîtes de Pétri semble cependant préférable, au moins pour les primocultures. Leur manipulation est en effet plus aisée tant pour l'ensemencement que pour la réalisation des montages nécessaires à l'observation microscopique. Par ailleurs, elles permettent d'individualiser les points d'ensemencement, ce qui peut être extrêmement utile, compte tenu de la présence possible lors du prélèvement de spores de moisissures telluriques sur les téguments (figure 27 A et B). Ces moisissures poussent, bien souvent, plus rapidement que les dermatophytes et pourraient donc masquer leur présence. Toutefois, si des géloses en tubes sont préférées car les géloses en boîtes de Pétri desséchant très rapidement à l'étuve (Koenig, 1995), il conviendra de ne pas visser complètement les tubes, les dermatophytes étant aérobies.

Les cultures seront incubées à 20-25°C (ou 27° selon Koenig, 1995) pendant au moins 3 semaines car certains dermatophytes comme *T. verrucosum* ont une croissance très lente. Elles seront examinées deux fois par semaine, car les aspects macroscopiques caractéristiques sont transitoires. Selon Euzeby (1994), 6 à 20 jours de culture et il faudra en tenir compte et ne jamais rendre les résultats d'une culture apparemment négative avant un délai de 2 mois. Par ailleurs, certains laboratoires proposent, pour l'ensemencement des prélèvements, le milieu de Taplin commercialisé en tubes ou sous forme de lames gélosées (Figure 27 C et D). Ce milieu contient un indicateur coloré, et la croissance des dermatophytes entraînerait son virage au rouge. Il faut cependant signaler que certaines moisissures, strictement non pathogènes dans notre contexte, peuvent également faire virer le milieu de culture (Chabasse et *al.*, 2004).

### b- Démarche de l'identification au laboratoire (Chabasse et *al.*, 2004)

L'identification repose sur un ensemble de critères, notamment la vitesse de croissance, mais surtout sur les aspects macroscopique et microscopique des colonies sur la primoculture.

#### 1. Examen macroscopique des cultures

L'examen macroscopique comporte :

- l'analyse de la couleur des colonies (au recto et au verso),
- de leur forme (rondes, étoilées, ...),
- de leur relief (plates, plissées, ...),
- des caractéristiques de leur surface (duveteuse, poudreuse, granuleuse, glabre, ...),
- de leur consistance (molle, élastique, cartonnée, ...)
- et de leur taille (réduite ou au contraire étendue).

On recherchera également la présence d'un pigment diffusant dans la gélose.

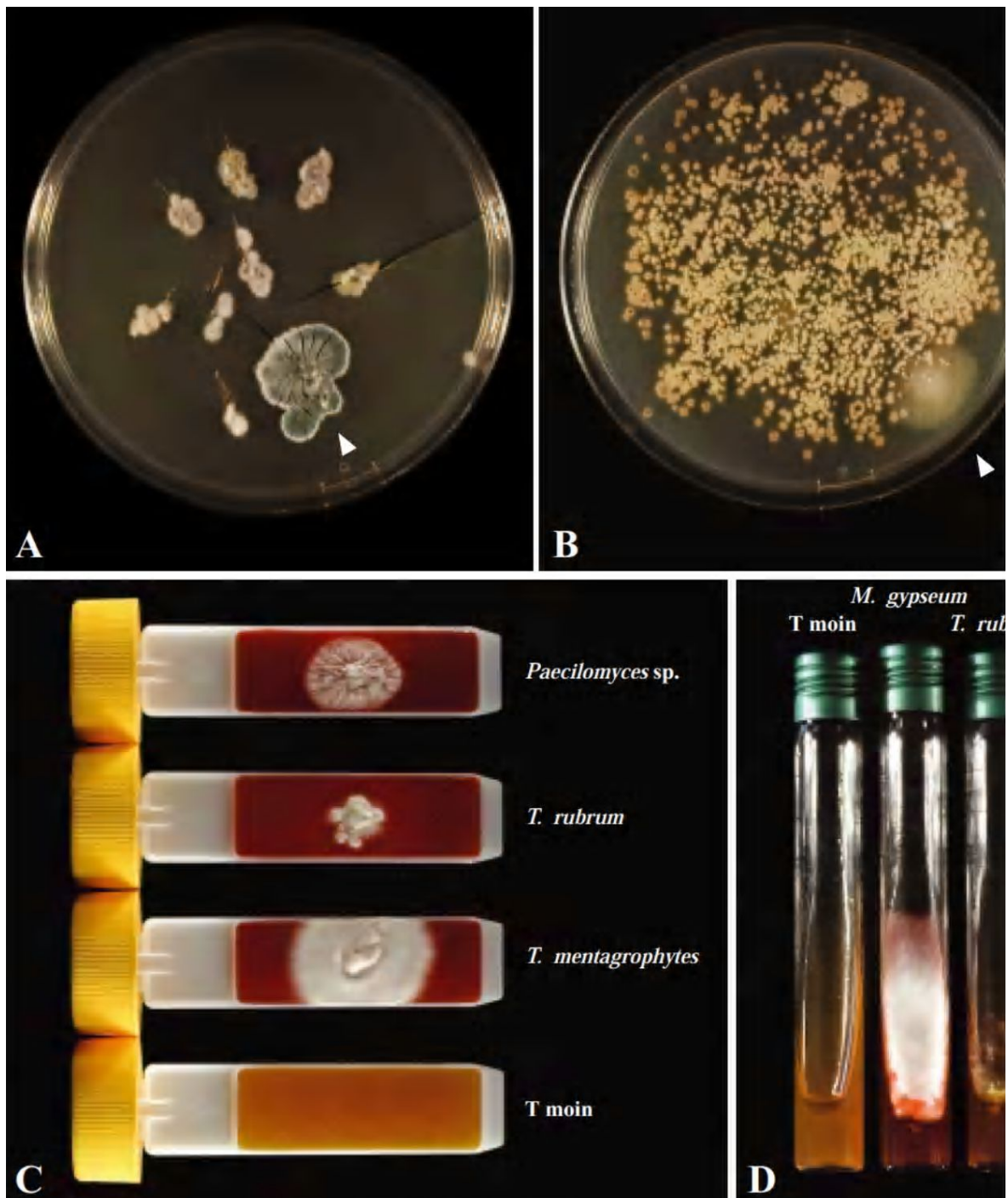


Figure 27 : Milieux de cultures (Chabasse et *al.*, 2004)

Cultures sur gélose de Sabouraud: A, ensemencement de la gélose par piqûres avec présence simultanée de colonies de *T. rubrum* et de *Penicillium* sp. B, prélèvement du cuir chevelu par la technique du carré de moquette montrant la présence simultanée de *T. soudanense* et de *M. audouinhi* var. *langeronhi*.

Cultures sur gélose de Taplin: C, Culture de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* et *Paecilomyces Iilacinus* sur lames gélosées à côté d'une lame non ensemencée. D, Culture de *M. gypseum* et de *T. rubrum* en tubes à côté d'un tube non ensemencé.

## 2. Examen microscopique des cultures

La culture en boîte de Pétri permet d'observer au microscope par transparence (objectif 10) les filaments mycéliens et de rechercher certains aspects particuliers (aspect en « fil de fer barbelé » chez *T. soudanense*, organes en « bois de cerf » chez *T. schoenleinii*).

Un montage entre lame et lamelle sera ensuite réalisé dans du bleu lactique, à l'aide de cellophane adhésive transparente (ou scotch), ou par dissociation d'un fragment de colonies au vaccinostyle. On étudiera:

- L'aspect des filaments mycéliens. Les dermatophytes sont des Septomycètes, les filaments mycéliens sont donc cloisonnés, de diamètre habituellement régulier, mais ils présentent parfois des dilatations successives (images en raquette),
- La présence de chlamydospores parfois disposées en chaînettes (filaments toruloïdes chez *T. verrucosum*, *T. violaceum* et *T. schoenleinii*), ou au contraire isolées et terminales (*M. audouinii*),
- L'abondance et la morphologie des microconidies (toujours unicellulaires, rondes ou piriformes, solitaires ou disposées en acladium, voire en buissons),
- La présence et la morphologie des macroconidies (toujours pluricellulaires et cloisonnées seulement transversalement, à paroi lisse chez les Trichophyton, ou rugueuse chez les Microsporum),
- Et la présence d'autres éléments que l'on appelle ornementations (Figure 28):
  - excroissances triangulaires caractéristiques de *T. rubrum* (ébauches de macroconidies naissant latéralement sur les filaments, et de forme triangulaire, Figure 28 A),
  - organes pectinés (en forme de peigne) chez *M. audouinii* et *T. schoenleinii* (Figure 28 B),
  - vrilles chez *M. persicolor* et *T. mentagrophytes* (Figure 28 C),
  - clous et chandeliers favigues (Figure 28 D) de *T. schoenleinii*,
  - structures proliférantes de *T. erinacei* (observées surtout dans la profondeur de la gélose), (Figure 28 E),
  - et organes nodulaires de *T. schoenleinii* ou des souches dites « nodular » de *T. mentagrophytes*.

En cas de difficultés d'identification, il conviendra de repiquer l'isolat sur d'autres milieux.



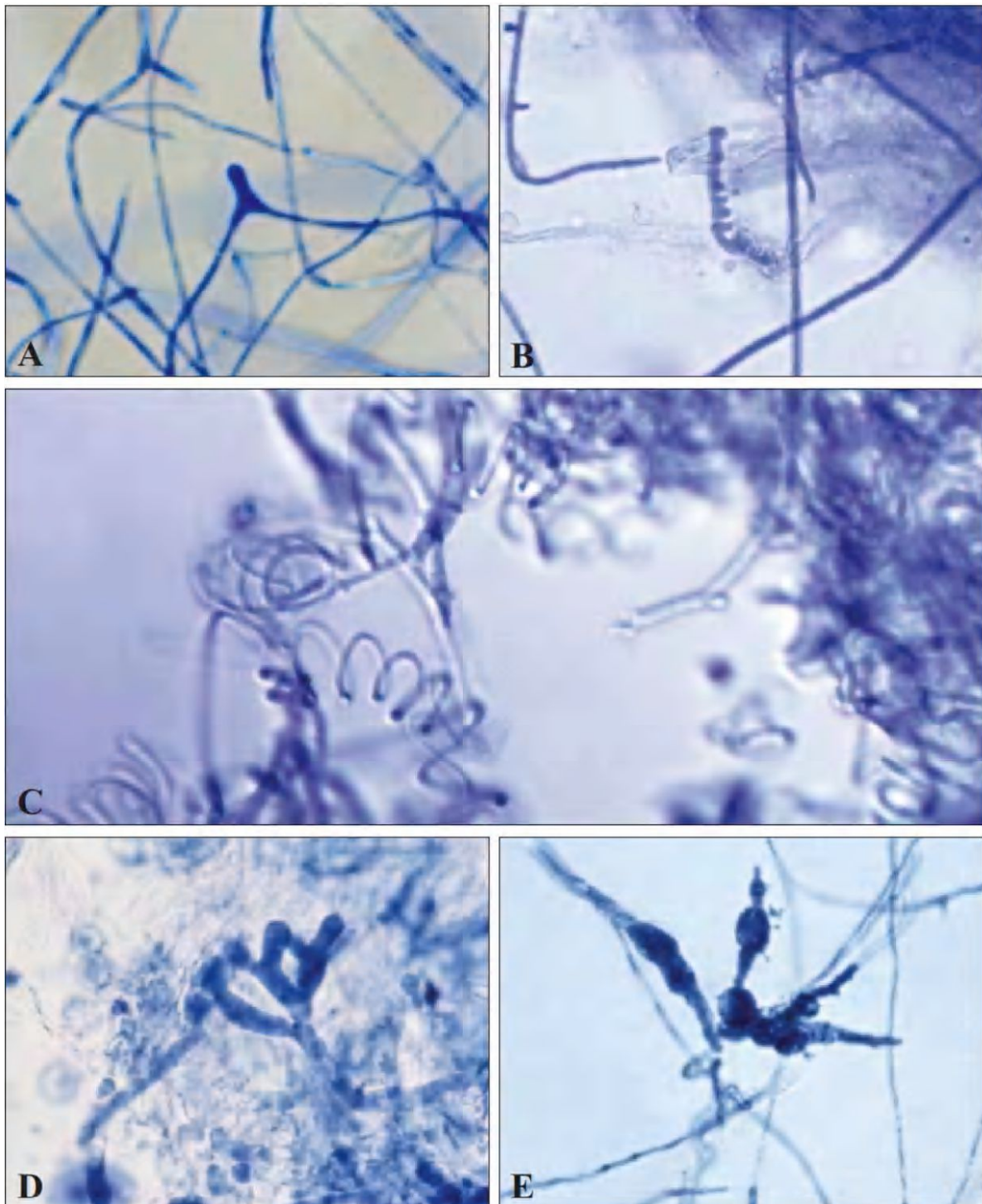


Figure 28 : Les ornementsations (Chabasse et *al.*, 2004)

*Excroissance triangulaire (A), organe pectiné (B), vrille (C), chandelier favique (D) et structure proliférante (E).*

### 3. Milieux d'identification (Chabasse et *al.*, 2004)

Ils sont indispensables quand une souche reste stérile sur milieu de Sabouraud. Pour la plupart, ces milieux favorisent la sporulation et la production de pigment. A cet égard, le plus couramment utilisé en

première intention est le milieu Lactrimel de Borelli (Figure 29 A). D'autres permettent de différencier des espèces morphologiquement proches par le virage d'un indicateur coloré.

- **Milieu Lactrimel de Borelli:**

Il stimule la sporulation des dermatophytes et la production de pigment (rouge ou violet pour *T. rubrum*, jaune-orangé pour *M. canis*).

- **D'autres milieux favorisent également la sporulation:**

Le milieu PDA ou potato-dextrose-agar (Figure 29 B), le milieu de Baxter et le milieu de Takashio (Sabouraud dilué) peuvent être utilisés en cas de suspicion de dermatophyte.

De même, la gélose au malt et l'eau gélosée peuvent s'avérer utiles pour faire fructifier les moisissures.

- **Milieu peptoné à 3% (Sabouraud conservation):**

Il permet de différencier *M. persicolor* qui devient rose en 8 jours, de *T. mentagrophytes* qui reste blanc sur ce milieu (Figure 29 C).

- **Milieu urée-indole ou gélose à l'urée de Christensen:**

Ce milieu contient un indicateur de pH dont le virage traduit l'alcalinisation du milieu par suite de la décomposition de l'urée. Il permet de différencier les souches autochtones de *T. rubrum* qui sont uréase négatives de celles de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* qui sont uréase positives.

La technique consiste à ensemercer avec une oëse un fragment de la culture dans un tube d'urée-indole ou d'urée de Christensen (Figure 29 D). Le test est positif si le milieu de culture vire au rose fuchsia en 2 jours pour le milieu urée-indole, en 6 jours pour le milieu de Christensen.

- **Milieu au Bromocrésol pourpre (ou BCP caséine):**

La couleur de ce milieu initialement gris n'est pas modifiée pour *T. rubrum*, ni pour *M. persicolor*. Il vire par contre au bleu-violacé avec *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (Figure 29 E). Par ailleurs, il contient de la caséine qui est hydrolysée en quelques jours par *T. verrucosum* et *T. violaceum* var. *glabrum*.

- **Milieu Brain-Heart gélosé:**

Ce milieu riche favorise, tout comme les géloses au sang, la croissance de *T. verrucosum*. Une incubation à 32°C est toutefois préférable pour cette espèce.

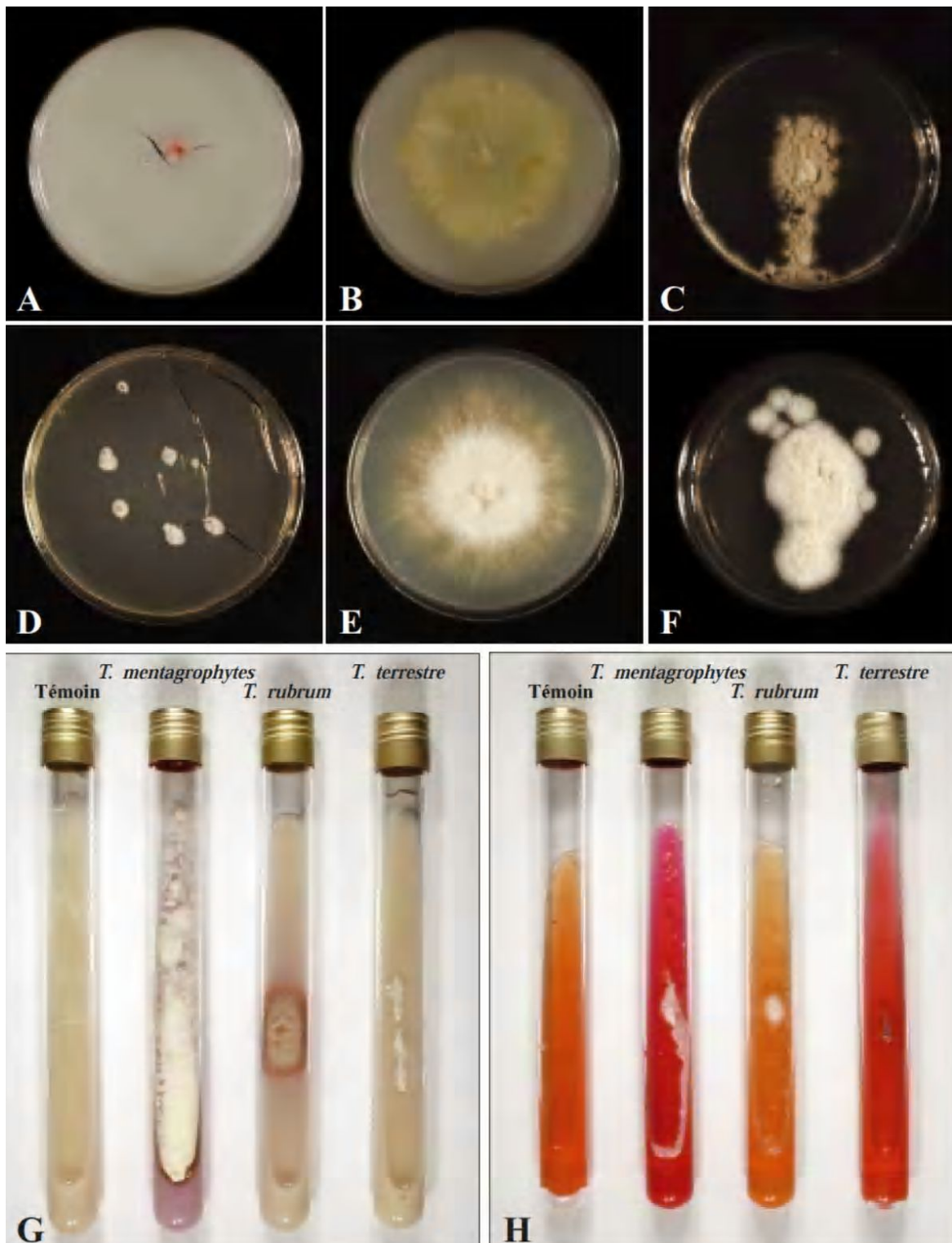


Figure 29: Milieux d'identification (Chabasse et *al.*, 2004)

Milieux d'identification :

Cultures de *T. rubrum* (A) et *M. canis* (B) sur géloses de Borelli, de *M. persicolor* (C) sur gélose peptonée. D à F: mêmes champignons sur gélose de Sabouraud.

Cultures sur gélose au bromocrésol pourpre (G) ou à l'urée (H) de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* et *T. terrestre* à côté d'une gélose non ensemencée.

**Remarque**

L'inconvénient est que très peu de ces milieux d'identification sont commercialisés. Il faut pouvoir les préparer soi-même au laboratoire. Dans ce cas, certaines précautions sont indispensables. Il faut sélectionner les agars utilisés. En effet, les agars sont d'origines diverses et plus ou moins pures. Des essais comparatifs nous ont montré que les résultats obtenus dépendaient directement de l'agar utilisé, et dans un même agar, du lot de fabrication. Par exemple, le pigment rouge de *T. rubrum* n'est obtenu de façon constante sur milieu AT (agar tween 80) qu'avec de rares agars. De même, certains agars favorisent-ils indiscutablement la Sporulation sur milieu E.G. (eau gélosée) 2 %.

Le pH du milieu est très important et doit être soigneusement contrôlé. La température maximum d'autoclavage doit être strictement respectée (Koenig, 1995).

**4. Recherche des exigences nutritionnelles (Chabasse et al., 2004)**

Certains dermatophytes exigent pour leur croissance la présence de vitamines. Ainsi, *T. verrucosum* nécessite la présence de thiamine. D'autres comme *T. tonsurans* ont un besoin partiel en vitamines. Pour rechercher ces exigences nutritionnelles, on comparera la croissance de la souche à l'étude sur milieu basal (absence de pousse ou croissance restreinte) et sur milieux additionnés de vitamine.

Toutefois, cette recherche des exigences nutritionnelles n'est que rarement réalisée, et uniquement dans des laboratoires spécialisés.

La démarche du diagnostic des dermatophyties est schématisée sur la figure 30, et les caractéristiques biologiques des principaux dermatophytes sont résumées dans le tableau 2.

**F. Techniques complémentaires****a- Recherche de la formation d'organes perforateurs in vitro**

Cette technique est utile pour différencier les souches autochtones de *T. rubrum* d'aspect duveteux (absence d'organes perforateurs) des souches pléomorphisées de *T. mentagrophytes var. interdigitale* (formation d'organes perforateurs en 8 à 15 jours).

Cette recherche peut être réalisée selon différentes modalités : dans la technique du Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS, Baarn, Pays-Bas), 10 ml environ d'eau distillée stérile sont déposés dans une petite boîte de Pétri stérile. Puis des fragments de cheveux préalablement stérilisés y sont déposés, ainsi qu'un fragment de la culture à l'étude.

Une variante consiste à déposer sur une gélose pauvre (eau gélosée à 2%) des cheveux stériles, puis des fragments de la culture à l'étude. Pour notre part, nous déposons directement les cheveux stériles en surface de la colonie.

Dans tous les cas, les cheveux sont prélevés 10 jours après, et examinés entre lame et lamelle dans une goutte de chloral-lactophénol ou de bleu lactique. Les organes perforateurs se présentent comme des encoches perpendiculaires à l'axe du cheveu (Figure 34).

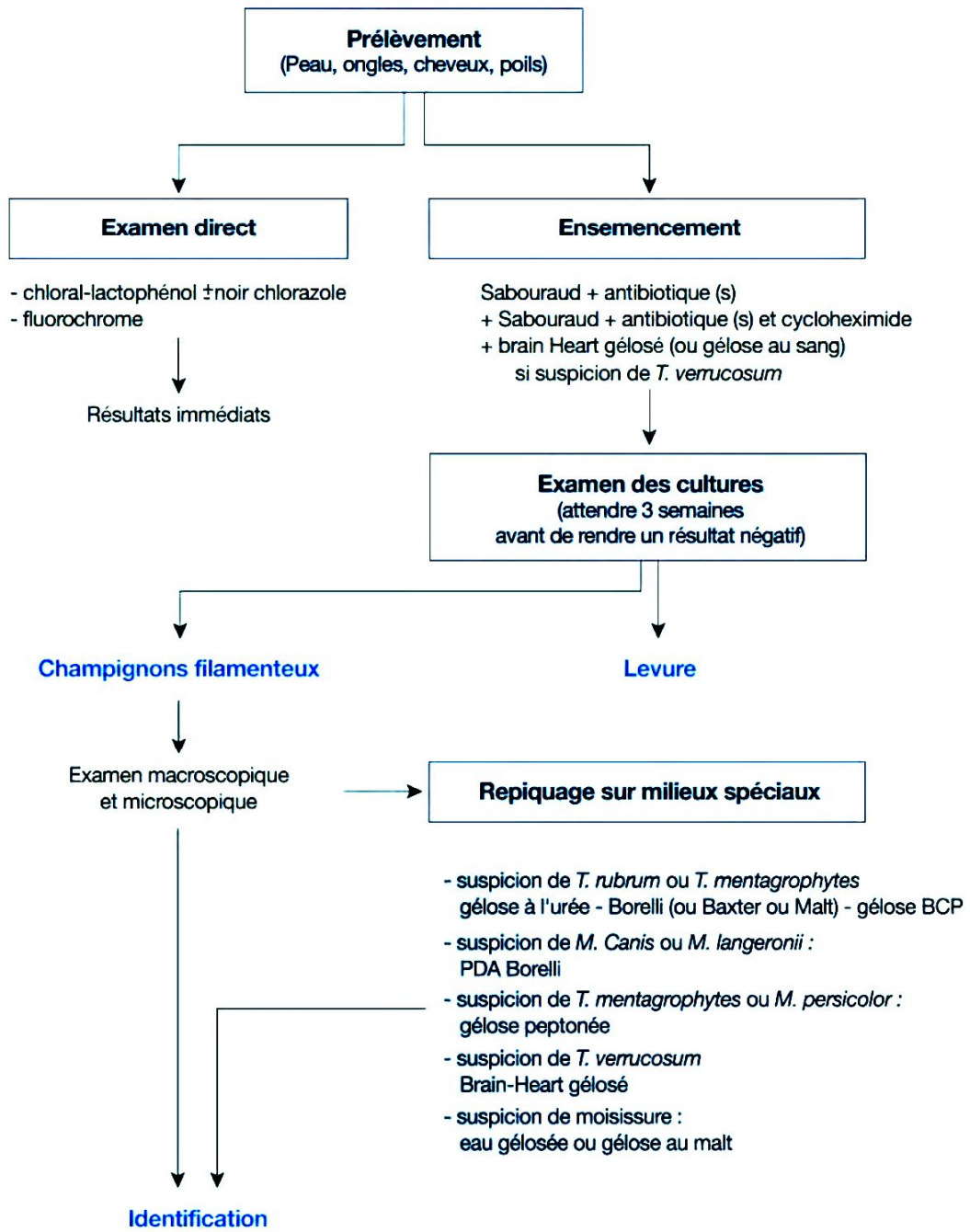


Figure 30 : Démarche diagnostique des dermatophytes (Chabasse et al., 2004)



Tableau 2 : Caractéristiques biologiques des principaux dermatophytes - parasitisme pileaire et caractères cultureux (Chabasse *et al.*, 2004).

Dermatophytes	Parasitisme pileaire	Caractères cultureux	
		Vitesse de pousse	Aspect des colonies
<i>E. floccosum</i>	absence	rapide (5 à 6 jours)	poudreuses, jaunes verdâtre (pléomorphise rapidement)
<i>M. canis</i>	microsporique	rapide (5 à 6 jours)	duveteuses, blanches, (aspect étoilé) pigment jaune-orangé au verso
<i>M. gypseum</i>	favique ou endo-ectothrix	rapide (5 à 6 jours)	platreuses, beiges, puis chamois
<i>M. langeronii</i>	microsporique	lent (8 à 10 jours)	duveteuses, blanches à grises, verso beige saumoné
<i>M. persicolor</i>	absence	rapide (5 à 6 jours)	aspect de feutre, blanches à beiges, puis rosées, verso rose lilas
<i>T. mentagrophytes</i>	microïde pour la variété <i>mentagrophytes</i>	rapide (5 à 6 jours)	poudreuses, duveteuses blanc-crème, verso incolore ou brun rougeâtre
<i>T. rubrum</i>	très rare, endothrix ou endo-ectothrix	rapide (6 à 7 jours)	duveteuses, blanc-crème ou violacées, verso incolore ou brun
<i>T. schoenleinii</i>	favique	très lent (15 jours)	cireuses, jaunâtres, évoquant une morille
<i>T. soudanense</i>	endothrix	lent (10 à 15 jours)	glabres et plissées, aspect étoilé, couleur "abricot sec"
<i>T. tonsurans</i>	endothrix	lent (10 à 15 jours)	poudreuses ou veloutées, de consistance cartonnée, blanches à jaune soufre
<i>T. verrucosum</i>	mégaspore	très lent (3 semaines)	verruqueuses, blanc-crème, verso brun
<i>T. violaceum</i>	endothrix	lent (10 à 15 jours)	petites, bombées, glabres, violette (parfois blanches)

Tableau 2 (suite) : **Caractéristiques biologiques des principaux dermatophytes – morphologie microscopique (Chabasse et *al.*, 2004).**

Dermatophytes	Micronidies	Macronidies	Particularités
<i>E. floccosum</i>	pas de microconidies	nombreuses, lisses (parfois échinulées) "en régime de bananes"	mycélium en raquette
<i>M. canis</i>	inconstantes, piriformes	en "quenouille" échinulées (parois et cloisons épaisses)	
<i>M. gypseum</i>	rare, piriformes	en "cocon", nombreuses, échinulées	
<i>M. langeronii</i>	piriformes	rare, déformées (paroi épaisse et échinulée)	chlamydospores, mycélium en raquette, organes pectinés
<i>M. persicolor</i>	nombreuses, arrondies en "bout d'allumette"	plus rare, lancéolées, finement échinulées (parois minces)	vrilles, filaments articulés à angle droit
<i>T. mentagrophytes</i>	nombreuses, arrondies, disposées en buissons	plus rare, en massue, lisses (parois minces)	vrilles, filaments articulés à angle droit
<i>T. rubrum</i>	inconstantes, piriformes, disposées en accladium	habituellement très rare, lisses, allongées (parois minces)	organes triangulaires
<i>T. schoenleinii</i>	absentes	absentes	chlamydospores, clous, chandeliers faviques
<i>T. soudanense</i>	exceptionnelles, piriformes	exceptionnelles, lisses	filaments rétrogrades ("fil de fer barbelé")
<i>T. tonsurans</i>	nombreuses, piriformes à base large	rare, lisses, allongées (parois minces)	chlamydospores
<i>T. verrucosum</i>	absentes	absentes	chlamydospores, filaments toruloïdes
<i>T. violaceum</i>	absentes	absentes	filaments toruloïdes

### G. Prophylaxie

Les dermatophyties, en particulier les atteintes localisées aux pieds, sont volontiers récidivantes, voire désespérément chroniques. Il convient de respecter rigoureusement la durée du traitement. Ce dernier est parfois long comme celui des onychomycoses qui nécessite plusieurs mois.

Afin de limiter le risque de contamination au niveau des pieds, il est recommandé à titre individuel:

- ❖ de se laver les pieds soigneusement après chaque entraînement sportif ou chaque compétition, surtout dans les endroits où l'on marche pieds nus;
- ❖ d'essuyer la peau entre les orteils après le lavage;
- ❖ de changer de chaussettes chaque jour et de préférer le coton aux matières synthétiques; de n'utiliser que des sandalettes personnelles;
- ❖ de ne pas échanger de serviettes de toilettes dans les salles de sports;
- ❖ d'éviter de marcher longtemps pieds nus sur les sols (le port de sandalettes protectrices est conseillé);
- ❖ de consulter son médecin en cas de démangeaisons ou d'irritation locale (Chabasse et *al.*, 1999).

### H. Clé d'identification des dermatophytes (Figure 31)

Elle repose sur un nombre limité de critères, les premiers étant la présence ou non de microconidies et de macroconidies à l'examen microscopique de la culture, et l'aspect lisse ou échinulé des macroconidies éventuellement présentes. Une même espèce pourra donc, selon les souches, être retrouvée plusieurs fois au cours de cette clé.

Il convient également de rappeler que le diagnostic in fine est le résultat de la confrontation des différents arguments, épidémiologiques, cliniques et morphologiques (Chabasse et *al.*, 2004).

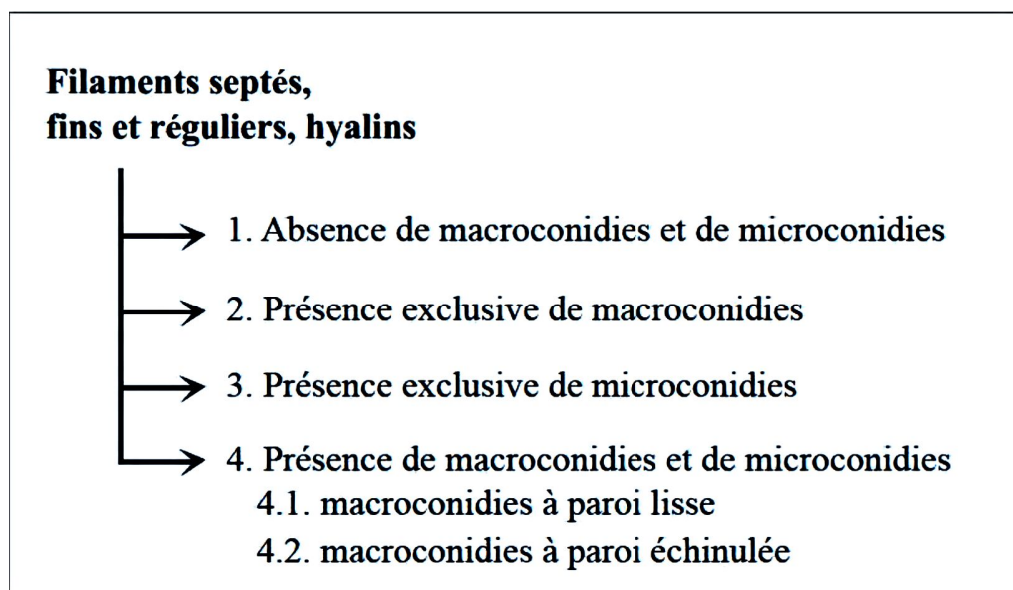


Figure 31 : Clé d'identification des dermatophytes (Chabasse et *al.*, 2004)



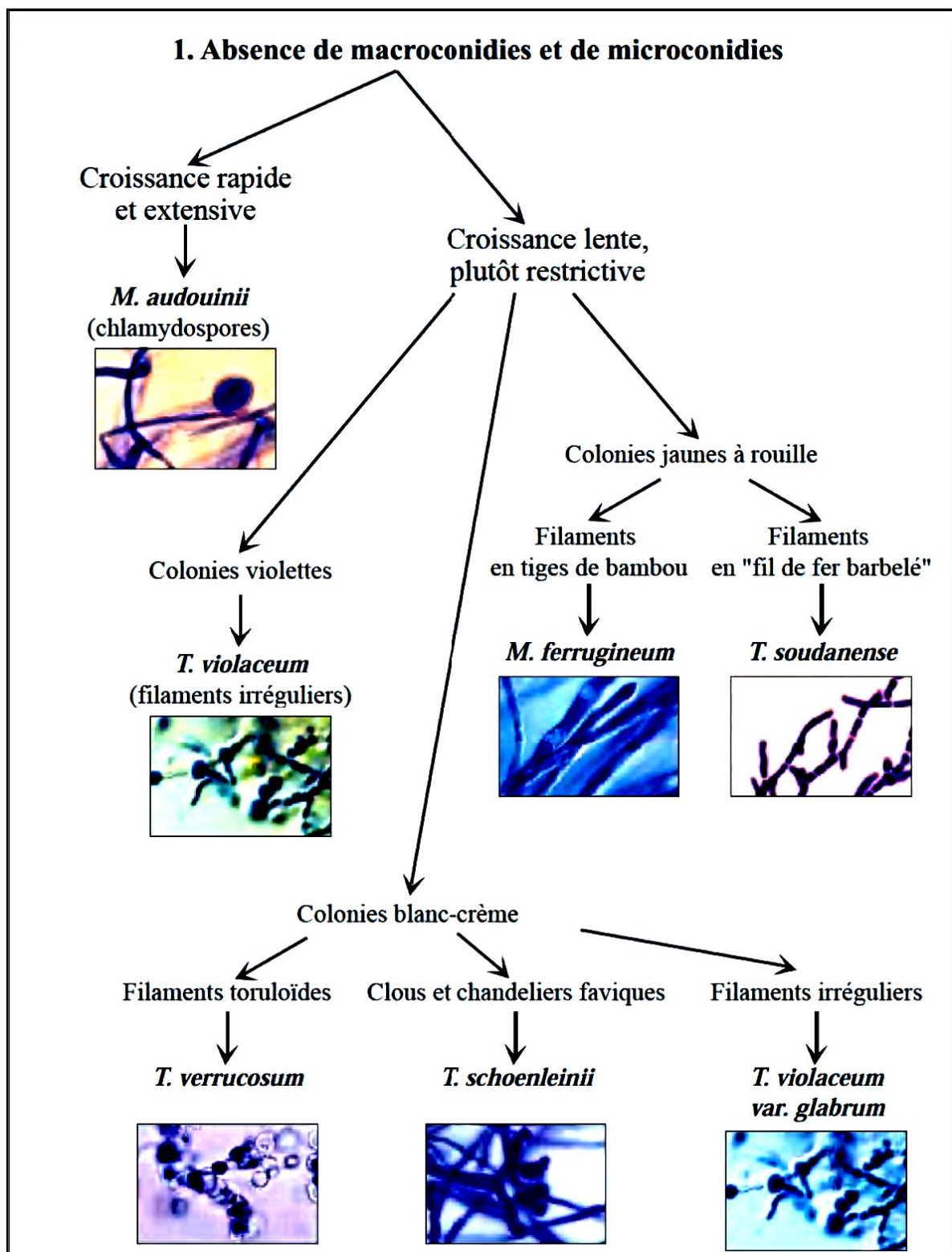


Figure 31 suite : Clé d'identification des dermatophytes (Chabasse et al., 2004)

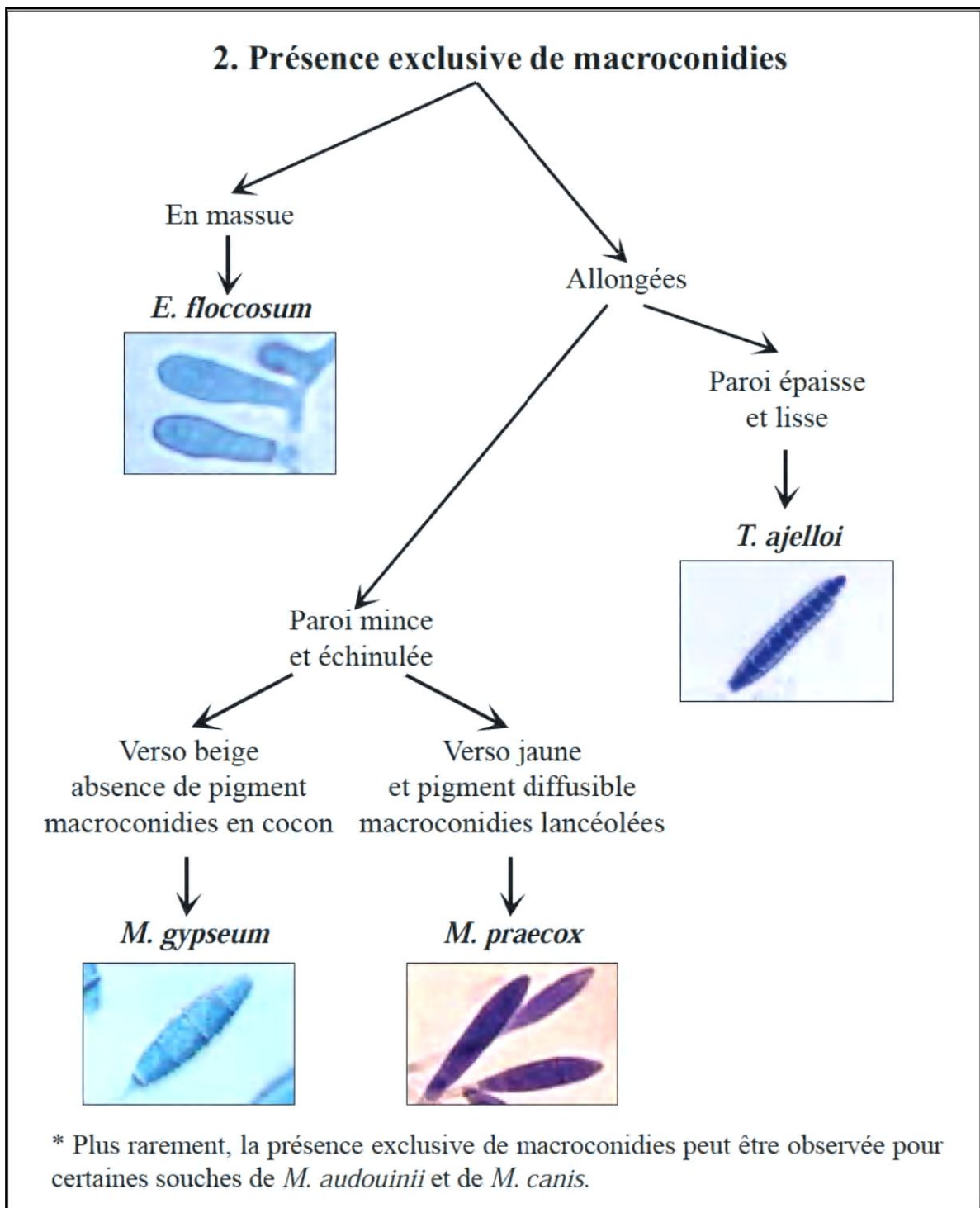


Figure 31 suite : Clé d'identification des dermatophytes (Chabasse et al., 2004)

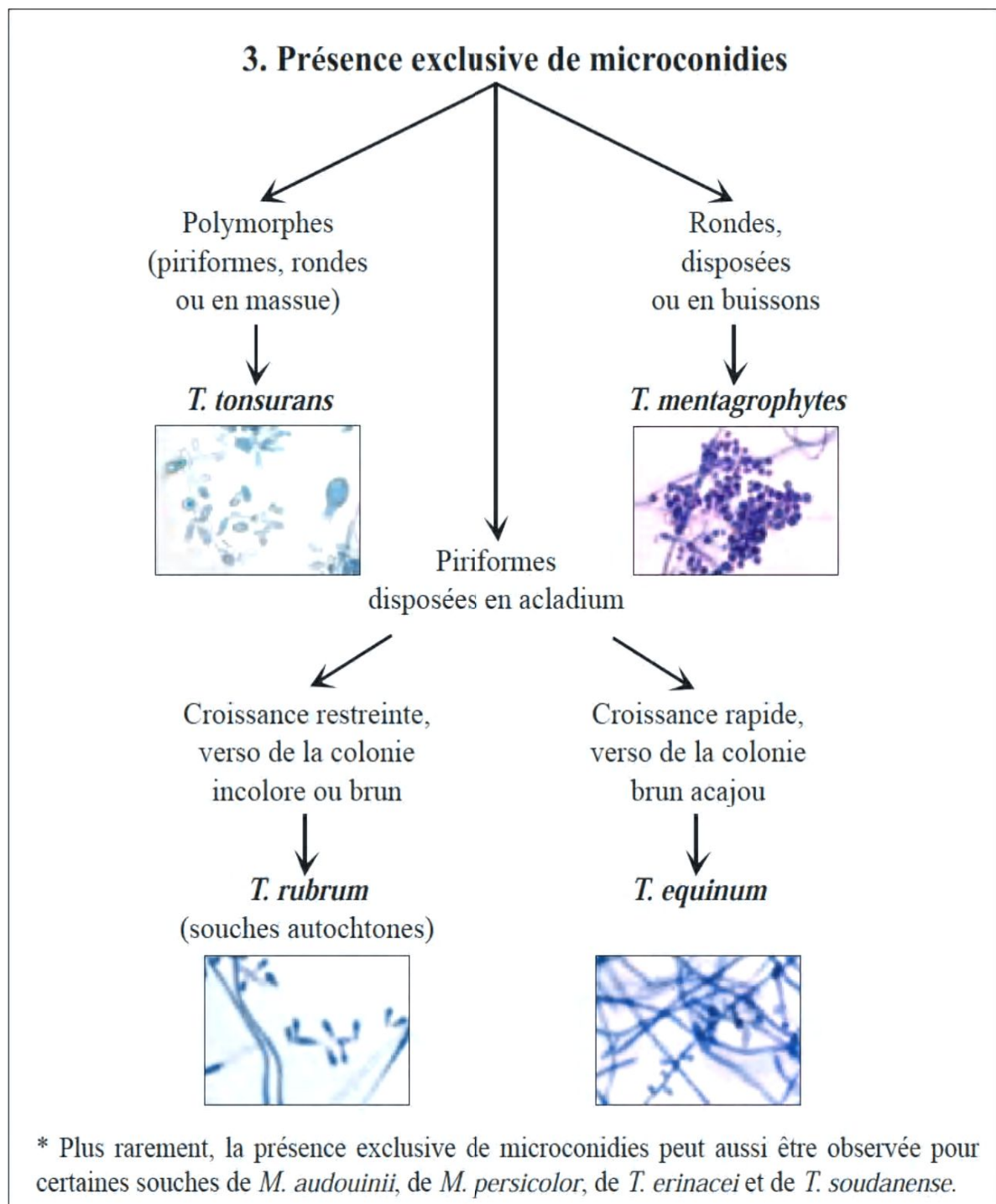


Figure 31 suite : Clé d'identification des dermatophytes (Chabasse et al., 2004)

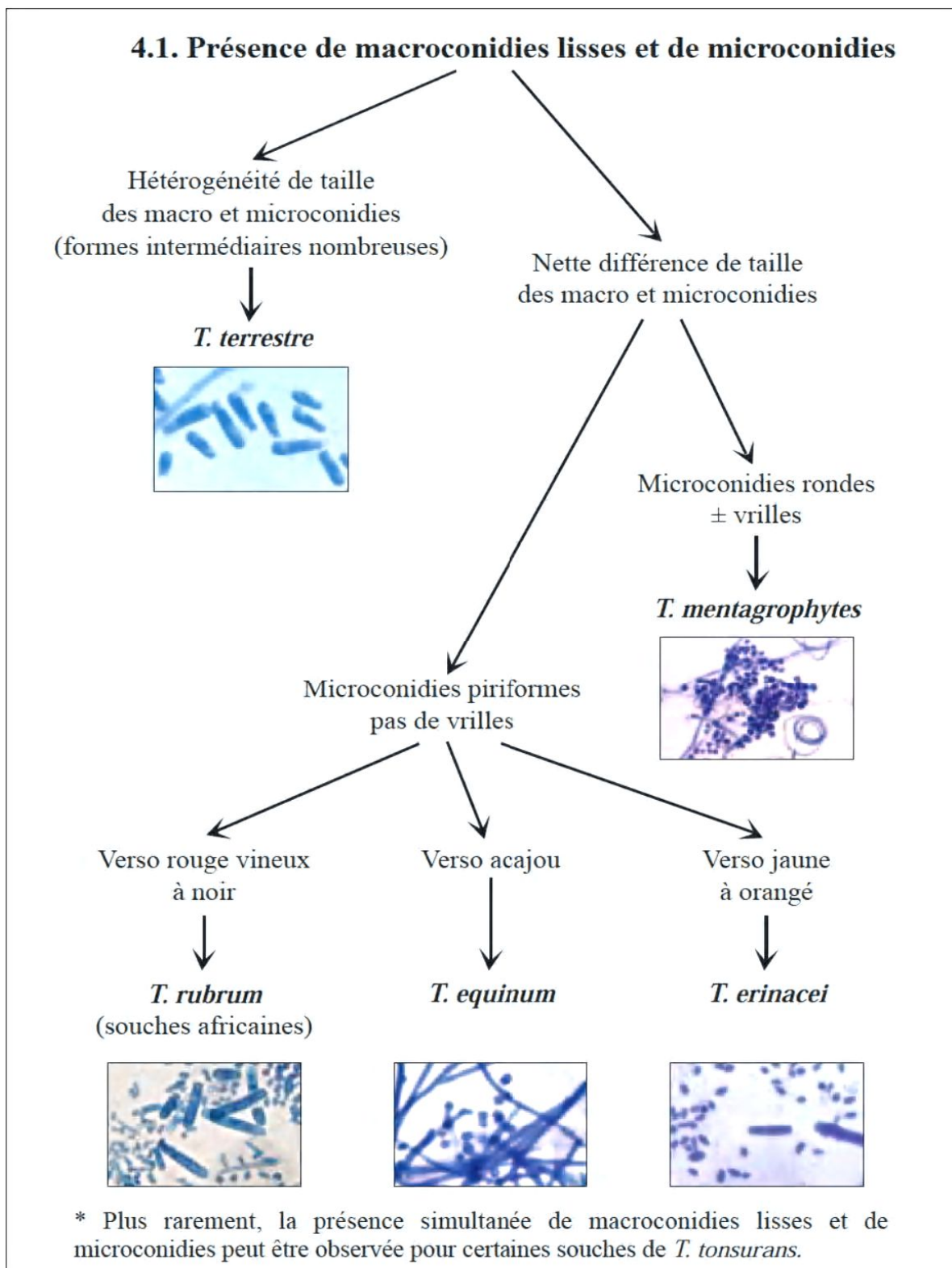


Figure 31 suite : Clé d'identification des dermatophytes (Chabasse et al., 2004)

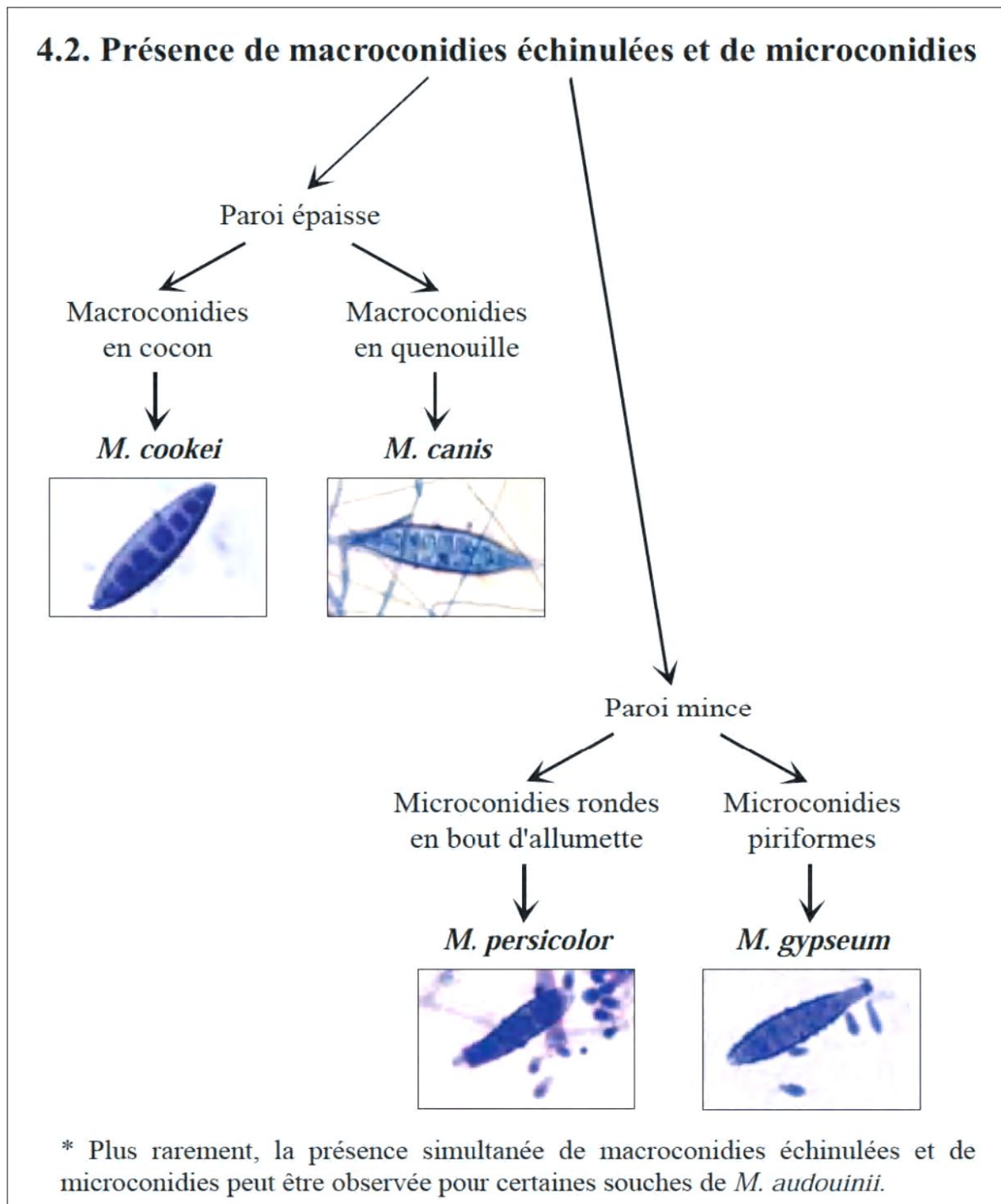


Figure 31 suite : Clé d'identification des dermatophytes (Chabasse et *al.*, 2004)



## CHAPITRE III :

# ETUDE DES CHAPIGNONS LEVURIFORME OU LES LEVURES

### I. Généralités sur les levures d'intérêt médical et vétérinaire

#### I.1. Définition – Taxinomie

Une levure est un champignon unicellulaire se reproduisant par bourgeonnement ou par fission. Les levures sont répandues dans la nature. Plus de 500 espèces sont connues, En pathologie humaine, une trentaine d'espèces seulement sont habituellement retrouvées. Par ailleurs, les champignons filamenteux qui présentent une phase parasitaire levure dans certaines conditions ; par exemple, *Histoplasma capsulatum* ou *Blastomyces dermatitidis* (Koenig, 1995).

Ce que l'on appelle communément « levures » se définit comme le stade asexué (imparfait) de champignons unicellulaires appartenant aux Ascomycètes ou aux Basidiomycètes. Sur les milieux usuels de mycologie, la forme sexuée est rarement obtenue il est donc habituel de regrouper ces levures asexuées parmi les Deutéromycètes (champignons imparfaits se multipliant sur le mode asexué). Au sein des Deutéromycètes, les levures constituent la classe des Blastomycètes, champignons se multipliant sur le mode asexué et présentant un thalle unicellulaire avec production de spore par bourgeonnement (blastospores), ce qui les distingue des autres Deutéromycètes, les Hyphomycètes et les Coelomycètes, dont le thalle est constitué de filaments mycéliens cloisonnés, fins et réguliers (Figure 32).

La très grande majorité des levures dont le stade sexué est connu, fait partie des Ascomycètes Hémiascomycètes (Ascomycètes à thalle unicellulaire) et, pour celles rencontrées en mycologie, de la famille des Saccharomycetaceae où l'on retrouve notamment les levures du genre *Saccharomyces* (Figure 33). Parmi les Basidiomycètes, la principale levure pathogène est un *Filobasidiella* (*F. neoformans*) dont le stade asexué est *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans*.

De nombreuses espèces de levures n'ont pas de forme sexuée connue. Néanmoins, les études moléculaires révèlent qu'elles ont pour la plupart des affinités avec les Ascomycètes (exemple : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, ...). Certaines espèces, comme celles appartenant aux genres *Rhodotorula* ou *Trichosporon*, ont cependant des affinités avec les Basidiomycètes.

Par ailleurs, en mycologie médicale et vétérinaire, il est habituel d'assimiler aux levures les *Geotrichum*. Il s'agit de champignons filamenteux arthrosporés (Deutéromycètes Hyphomycètes se multipliant sur le mode thallique arthrique avec production d'arthrospores) dont la reproduction sexuée n'est connue que pour deux d'entre eux : *Geotrichum candidum* et *Geotrichum capitatum* dont les formes sexuées respectives, *Galactomyces candidum* et *Dispodascus capitatus*, sont des Ascomycètes (Bouchara et al., 2010). La culture des *Geotridum* est facile sur milieu de Sabouraud, enrichi en glucose (2 %), avec, pour l'isolement, addition d'antibiotiques anti-bactériens ; mais l'actidione n'est pas nécessaire, car les *Geotrichum* poussent très rapidement, avant les champignons contaminants. En 2 à 4 jours, se développent des colonies larges, à surface irrégulière, farineuse, de coloration blanc-grisâtre ou crème (Euzeby, 1994).

#### Ultrastructure de la paroi et des cloisons:

Les ascomycètes ont une paroi formée de 2 membranes: l'une, externe, fine et sombre, l'autre, interne, large et claire. Les basidiomycètes ont une paroi formée de plusieurs membranes. L'épaisseur et le nombre de couches varient avec l'âge de la cellule.

Les cloisons des ascomycètes ont un pore simple avec quelques corps de Woronin; celles des basidiomycètes ont un dolipore avec une cape de réticulum endoplasmique bien développée (Koenig, 1995).

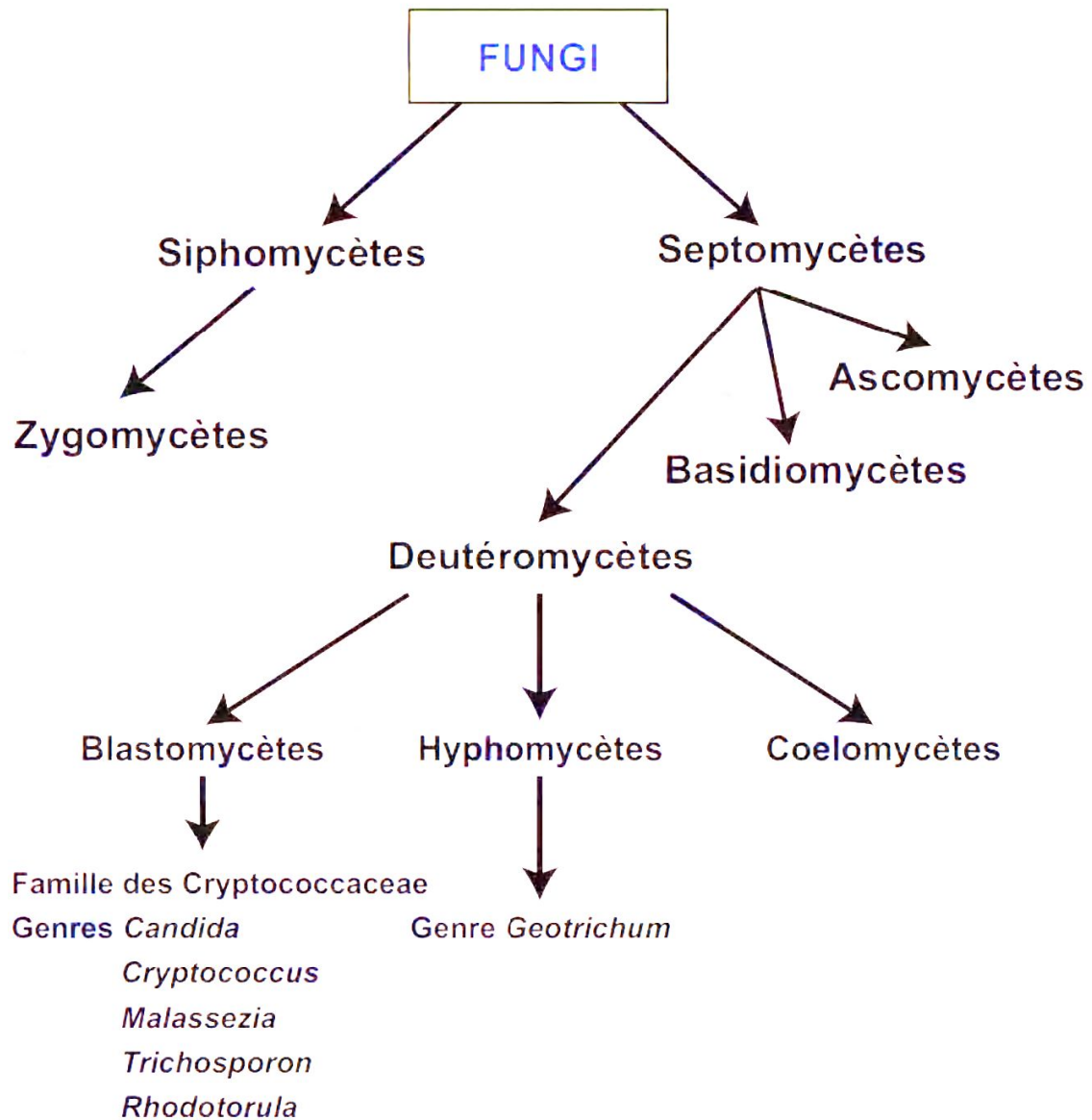


Figure 32: **Systématique simplifiée des principales levures asexuées d'intérêt médical et vétérinaire (Bouchara et al., 2010)**

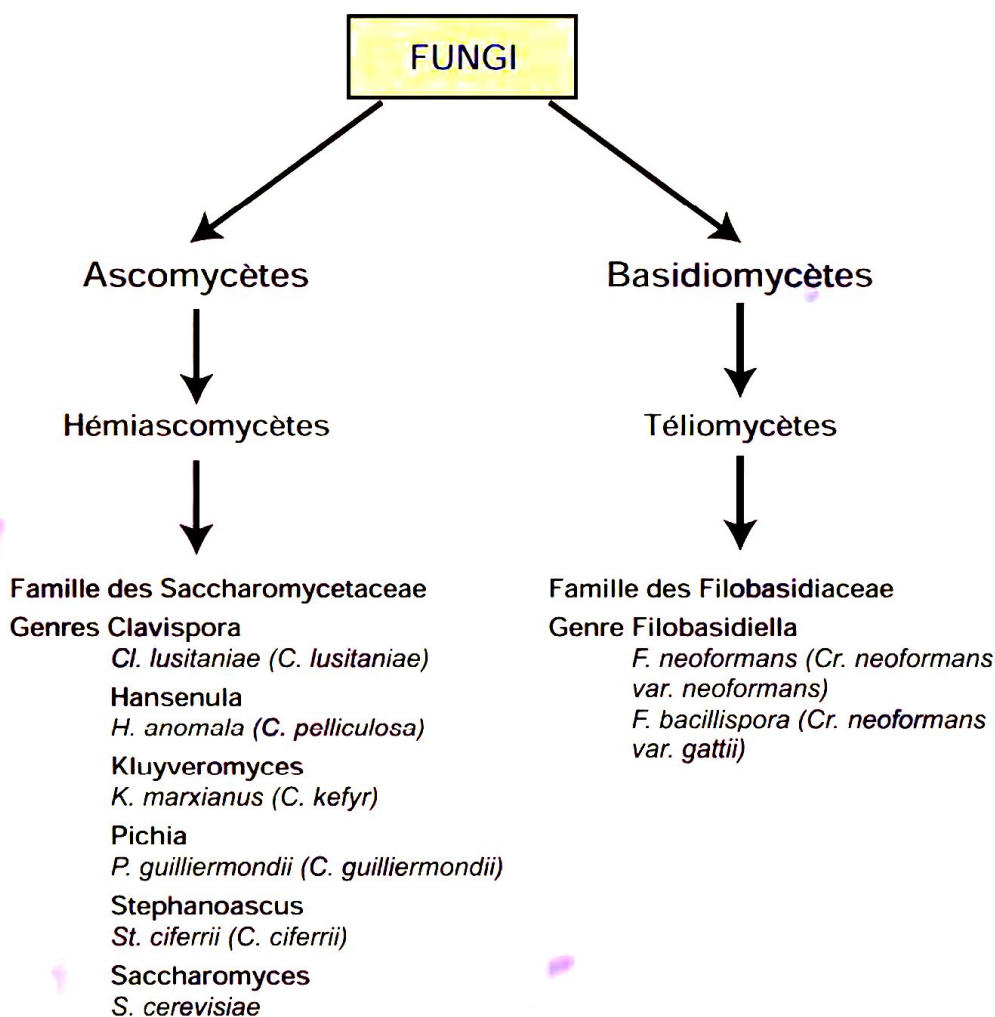


Figure 33 : Systématique des levures d'intérêt médical et vétérinaire dont le stade sexué est connu (le nom du stade asexué est indiqué entre parenthèses) (Bouchara et *al.*, 2010)

## I.2. Les agents des levures

Les levures sont des champignons cosmopolites et ubiquitaires fréquemment isolés de l'environnement humain ou animal (air, fruits, sol, produits alimentaires, produits laitiers, céréales, viandes, ...). Il n'est pas étonnant dans ces conditions que l'homme et les animaux puissent, dès leur naissance, être colonisés par des levures.

Ces levures vont vivre et se multiplier à l'état commensal sur le revêtement cutané ou dans les voies aériennes, digestives ou génito-urinaires (Bouchara et *al.*, 2010).

### I.2.1. Les Candida

Le genre *Candida* comprend plus de deux cents espèces, mais un nombre restreint (environ une vingtaine) peut être responsable de manifestations pathologiques (Bouchara et *al.*, 2010) (Tableau 3).



Tableau 3: Spectre clinique habituel des espèces du genre *Candida* (Bouchara et al., 2010).

Espèces les plus fréquentes	
<i>C. albicans</i>	Infections cutanées ou muqueuses (œsophagites, infections oropharyngées et vaginales) Infections profondes (pyélonéphrites, péritonites) Infections hémotogènes (candidémies, méningites, atteintes hépato-spléniques)
<i>C. glabrata</i>	Candidoses systémiques, candidémies, infections du tractus urinaire Sensibilité aux azolés de type intermédiaire
<i>C. krusei</i>	Candidémies, endophtalmies, diarrhées chez le nouveau-né Résistance naturelle au fluconazole
<i>C. parapsilosis</i>	Candidémies, infections profondes en relation avec la présence de dispositifs médicaux ou d'un soluté injectable contaminé Majorité des candidémies chez le nouveau-né
<i>C. tropicalis</i>	Candidémies et candidoses systémiques chez le patient immunodéprimé
Espèces plus rarement isolées	
<i>C. ciferrii</i>	Onychomycoses
<i>C. dubliniensis</i>	Infections oropharyngées chez les patients VIH+
<i>C. guilliermondii</i>	Candidoses systémiques, endocardites chez le toxicomane par voie intra-veineuse Sensibilité aux azolés variable
<i>C. haemulonii</i>	Candidémies, infections cutanées
<i>C. inconspicua</i>	Candidoses oropharyngées, digestives et candidémies chez le patient immunodéprimé
<i>C. kefyr</i>	Candidoses systémiques
<i>C. lipolytica</i>	Candidémies sur cathéter intravasculaire
<i>C. lusitanae</i>	Candidémies et infections disséminées Résistance possible à l'amphotéricine B
<i>C. norvegensis</i>	Infections chez le transplanté rénal Sensibilité diminuée au fluconazole
<i>C. pulcherrima</i>	Infections disséminées chez le patient immunodéprimé
<i>C. rugosa</i>	Candidémies sur cathéter intra-vasculaire Plus fréquente chez les grands brûlés Sensibilité inconstante à l'amphotéricine B
<i>C. viswanathii</i>	Méningites
<i>C. zeylanoides</i>	Candidémies, arthrites

L'espèce la plus pathogène est indiscutablement *C. albicans*. Au laboratoire, *C. albicans* exerce une très forte pathogénicité sur les cellules épithéliales de rein de souris en culture et c'est la seule espèce dont 100 % des souches déterminent, après inoculation par voie veineuse, la mort du lapin.

Cependant, en clinique, on observe, de plus en plus, la pathogénicité d'espèces autres que *albicans* ; on classe ces espèces par ordre de pouvoir pathogène décroissant: *C. stellatoïdea*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr* (= *pseudotropicalis*), *C. guilliermondii*, *C. krusei*. Chez l'espèce *C. albicans* elle-

même, des génotypes et, même, des phénotypes, sont plus pathogènes que d'autres. On étudie actuellement, le typage des ADN ribosomal et mitochondrial pour l'identification des souches responsables des candidoses localisées et de celles déterminent des candidoses envahissantes. Une autre méthode de différenciation de ces souches est possible par électrophorèse d'un lysat de *Candida* ( $\alpha$ -mannosidase et ultra-sonification), suivie d'une réaction ELISA sur les bandes isolées.

D'autre part, il résulte d'observations cliniques et de données expérimentales, que si les levures sont les formes infectantes des *Candida*, les éléments pathogènes essentiels sont les formes filamenteuses, capables de dissocier les cellules de l'hôte et de pénétrer au sein des tissus. C'est précisément parce que *C. albicans* est capable de produire des hyphes que cette espèce est la plus pathogène et si au niveau, de la peau, elle est toujours douée de pathogénicité, c'est par l'aptitude des filaments à digérer la kératine. On a même observé que les premières phases de l'infection candidienne, au moins avec *C. albicans*, sont intracellulaires, les filaments ayant pénétré dans les cellules (observations ultra structurales).

L'aptitude à la disruption des cellules d'un tissu et à la pénétration de ces cellules est liée à l'activité d'une phospholipase et d'une lysophospholipase, celle-ci protégeant le champignon contre l'effet lytique de sa propre phospholipase.

D'autres enzymes hydrolytiques interviennent dans la pathogénicité des *Candida* : phospho-monoestérase, protéase acide ; les souches déficientes en ces enzymes sont moins virulentes que celles qui en sont pourvues.

Dans tous les cas, il semble bien que les reins soient les premières cibles des *Candida*, qui y parviennent par voie sanguine. Cependant, tous les organes peuvent être affectés.

Un autre élément de la pathogénicité des *Candida* est la présence, à la surface des levures et des pseudo-filaments, de molécules capables de se fixer aux opsonines et d'inhiber, ainsi, la phagocytose : les espèces non pathogènes n'ont pas cette capacité. De même, l'élaboration par certaines espèces de *Candida* d'une protéase acide (*Candida* Acid Protease), capable de détruire les macrophages qui les ont phagocytées, est un facteur de la virulence de ces espèces.

Outre leur action pathogène propre, les *Candida* peuvent avoir une activité immuno-suppressive, exercée par leurs mannanes: hyperplasie des lymphocytes T suppresseurs ; chez la souris, cette activité est neutralisée par le lipide monophosphoryle A produit par des salmonelles: *S. minnesota* et *S. typhimurium*.

Mais la pathogénicité est d'abord conditionnée par la fixation des parasites sur les cellules épithéliales des muqueuses ou sur les cellules des endothéliums vasculaires et il y a une relation entre la pathogénicité d'une espèce et d'une souche et son pouvoir d'adhérence.

Cette fixation est assurée par la phospholipase précédemment évoquée, ainsi que par une protéase carboxylique. Ces enzymes sont rares ou absentes dans les souches non pathogènes des *Candida*.

Outre les enzymes précitées, l'adhérence des *Candida* à leur substrat est favorisée, au moins chez *C. albicans*, par la chitine de la paroi du champignon. En effet, la polyoxine (produit de fermentation de certains *Streptomyces*), un inhibiteur de la chitine-synthétase, ajoutée à un milieu de culture de cellules épithéliales et de levures de *C. albicans*, inhibe l'adhésion. Mais le phénomène d'adhésion n'est pas limité aux levures ; il intéresse aussi tubes germinatifs et les hyphes. C'est pourquoi *C. albicans*, dont on sait l'aptitude à la formation de filaments, est l'espèce la plus pathogène: les mutants de cette espèce, qui ont perdu cette aptitude sont moins virulents. Dans le processus de fixation, interviennent, en fait, 2 mécanismes :

- 1) un mécanisme non spécifique, lié aux charges de surface et aux forces hydrophobes : mécanisme lâche, réversible
- 2) et un mécanisme spécifique: configuration stérique complémentaire des molécules réceptrices et ligands : mécanisme serré irréversible. Les molécules d'adhésion peut être portées par les deux surfaces, celle du parasite et celle des cellule de l'hôte. Dans les 2 mécanismes l'interaction hôte-parasite est directe. In vivo, ces 2 mécanismes interviennent successivement. On peut aussi envisager un lien bipolaire réalisant un "pont" entre ces deux éléments: interaction indirecte.

✚ **Interaction directe:** Le mécanisme non spécifique est démontré par la capacité des *Candida*, principalement *C. albicans*, d'adhérer à des substrats synthétiques tels que les polystyrènes, notamment le matériel de prothèse dentaire, les lentilles de contact souples, les valvules cardiaques artificielles, les cathéters. Tous les corps étrangers ci-dessus mentionnés se recouvrent de composants plasmatiques (fibrinogène) ou cellulaires (plaquettes) constituant des substrats d'adhérence et sur lesquels se fixent les tubes germinatifs, plus que les levures. Dans ces phénomènes d'adhérence, les antigènes polysaccharidiques des *Candida* (mannoprotéines de PM 60 kD et jusqu'à 200 kD) jouent rôle essentiel. Le mécanisme spécifique a été bien étudié avec *C. albicans* et les cellules épithéliales et endothéliales et les polynucléaires neutrophiles. Après une 1<sup>ère</sup> phase de fixation lâche, l'adhérence irréversible est réalisée par un contact intime entre les cellules épithéliales et les couches pariétales profondes du champignon, comme l'ont révélé les images de microscopie électronique.

1. Les éléments d'origine fongique permettant l'adhérence sont un ligand glucidique, un mannane et des "adhésines", parmi lesquelles des mannoprotéines de 60-70 kD et jusqu'à 200 kD. Ces protéines adhésives sont présentes à la surface des levures et des hyphes et on les trouve, aussi, dans les milieux de culture de *C. albicans*. Ces molécules, qui ont une particulière affinité pour le fibrinogène, constituent le Facteur Fixant le Fibrinogène (F F F) de ROBERT et al. (Euzeby, 1994). Ce facteur est beaucoup plus abondant dans le mycélium que dans les levures et plus abondant sur les souches récemment isolées que sur les souches de collection ; or, les souches d'isolement récent sont plus athogènes que les souches entretenues au laboratoire. Le F F F est aussi observé sur les levures d'autres espèces que *C. albicans* et en quantité proportionnelle à la pathogénicité de ces espèces. Il est intéressant de noter que chez *C. albicans* possède, outre le F F F, une autre mannoprotéine, de 45 kD, située sur les tubes germinatifs, fixant le complexe plaquettaire GP-IIb-IIIa et la thrombospondine et favorisant, ainsi, son adhérence aux plaquettes est, en partie, responsable des endocardites à *Candida*. Enfin, l'enrobage des *Candida* par le F F F, dissimule le parasite aux défenses immunitaires.
2. Les éléments liés à l'hôte sont des glucides, des lipides et une association de ces deux composants présents à la surface des cellules épithéliales. En conséquence, les glucides et lipides extraits des cellules épithéliales, mis en contact avec des levures préalablement à l'infection, inhibent l'adhérence aux épithéliums: cas des glycopeptides (méconium des nouveau-nés), des stérols, des phospholipides, des esters stéryliques.

✚ **Interaction indirecte:**

Ce processus fait intervenir des bactéries ou des champignons, agissant comme éléments intermédiaires, des cellules de l'hôte ou divers ligands produits par l'hôte. L'action des bactéries et des cellules de l'hôte a été étudiée chez la souris. Les ligands fournis par l'hôte sont la fibronectine et des protéines plasmatiques (la fibronectine est une glycoprotéine présente à la surface des cellules et dans le plasma) ; une autre protéine la laminine, facilite aussi l'attachement des *Candida* aux épithéliums et aux endothéliums. Un autre ligand dépendant de l'hôte est le mucus recouvrant les cellules épithéliales: la fixation au mucus est un préalable à l'adhérence aux épithéliums et à la pénétration dans les muqueuses. Mais il faut observer que si l'adhérence aux épithéliums et endothéliums est un élément essentiel de la pathogénicité des *Candida*, l'adhérence aux cellules phagocytaires est un processus de défense de l'hôte, ... ou un acte suicidaire du champignon: l'irradiation, l'action de la cortisone et de la cyclophosphamide qui sensibilisent les sujets infectés à l'action pathogène des *Candida* inhibent aussi l'adhérence aux cellules immunocompétentes.

❖ **Pouvoir toxigène:**

Dès 1952, SALVIN a décrit, chez la souris, un syndrome toxique déterminé par l'inoculation intrapéritonéale de levures candidiennes tuées et a constaté l'analogie de ce syndrome avec celui que provoquent les endotoxines bactériennes. WINNER et al. ont aussi étudié ces toxines. Plus récemment, a

été observé chez le lapin, le pouvoir pyrogène, voire létal, des extraits de levures complètes et de leur paroi. La nature des substances toxiques en cause a d'abord été établie par IWATA, qui a isolé une "candidoxine", de nature protéique, formée de deux carboxy-peptidases, une phospho-monoesterase et une protéine non identifiée. Des souches pathogènes de *C. albicans*, a été isolée une carboxyl protéase acide (C.A.P). Certaines souches candidiennes exercent un pouvoir cytotoxique à l'encontre des monocytes qui ont phagocyté les parasites, des cellules épithélioïdes (nées de la métamorphose des macrophages) et des fibroblastes. On a pu évaluer cette cytotoxicité par l'addition à une suspension de cellules cultivées en milieux spéciaux, d'une suspension de levures candidiennes dans une solution de rouge neutre à 0,04 %. Le colorant n'est fixé que par les cellules vivantes, De même, ces protéases pouffaient rendre compte de l'action hémolysante de la candidoxine. D'autre part, *C. albicans* renferme des glyco-protéines toxiques, dont la pathogénicité est liée à la fraction glucidique de la molécule. En effet, les extraits de *Candida* déterminent souvent une importante irritation, pouvant aller de l'érythème à la dermatite pustuleuse et l'inoculation intraveineuse de ces extraits peut provoquer un choc mortel. Une autre glycoprotéine, de P. M. élevé, oit cause de lymphopénie et de neutropénie et doit jouer un rôle dans la réceptivité et la sensibilité organiques à l'infection candidienne. Comme on l'a vu pour les cryptocoques, et comme nous en ferons état à propos d'autres levures, les *Candida* élaborent des exotoxines glyco-protéiques, actives sur d'autres levures "système tueur" : ces toxines sont adsorbées sur des récepteurs pariétaux des cellules-cibles. Elles ont une importance épidémiologique: marquage des souches. Par utilisation d'anticorps monoclonaux actifs sur les toxines, on peut localiser les sites de production de ces toxines par les levures "tueuses" ; il s'agit de particules cytoplasmiques analogues à des particules virales, à base d'ARN. Il est intéressant d'observer que les anticorps anti-idiotypiques des toxines tueuses (K-anti Ids) exercent, in vitro, une action "antibiotique, sur les souches correspondantes de *Candida albicans* (anticorps pseudo-tueurs). In vivo, ils ont une action protectrice contre l'infection par les souches correspondantes de ce champignon (Euzéby, 1994).

#### ❖ Caractères antigéniques:

Les levures et, le cas échéant, les filaments du genre *Candida* élaborent des substances antigéniques d'origine pariétale et d'origine cytoplasmique. On peut obtenir des antigènes bruts par broyage des champignon ou par filtration de cultures en milieu liquide (candidine) ; mais ce sont les antigènes purifiés qui ont fait l'objet des principales études. Les principaux composants antigéniques pariétaux sont des peptido-mannanes et des glycoprotéines (mannoprotéines), essentiellement localisés dans la couche superficielle des levures, mais qu'on trouve aussi dans le cytoplasme. Outre les mananes, la paroi des blastospores des *Candida* renferme des polymères de glucanes, dont l'antigénicité est inférieure à celle des mananes. Les antigènes cytoplasmiques sont :

- des antigènes somatiques, obtenus à partir des extraits de levures lysées par ultra-sons ou par congélation - décongélation.
- des antigènes métaboliques, présents dans les filtrats de cultures (candidine) ; ces antigènes sont de nature protéique.

En réalité, la composition des antigènes cytoplasmiques est mal connue. Certains, si on en juge par leur activité enzymatique sont des antigènes métaboliques : oxydases, ribonucléases, déhydrogénases, hydrolases et, notamment, une énoïase, dont nous exposerons l'importance pour le diagnostic immunologique de la candidose envahissante.

Enfin, il existe des communautés antigéniques entre les *Candida* et certains tissus de leurs hôtes tel est le cas de *C. albicans* et du tissu rénal, ce qui peut expliquer l'affinité toute particulière de ce champignon pour le rein. De même, il existe, sur la paroi des *Candida*, des récepteurs pour le fragment C3 du complément, qui gênent la reconnaissance des champignons par les neutrophiles et inhibent la phagocytose (Euzéby, 1994).

### ✚ La résistance des Candida

Dans le milieu extérieur est très longue pour les espèces où ces champignons y vivent en saprophytes, d'autant plus que certaines de ces espèces ont une reproduction sexuée.

La résistance de *C. albicans* est plus faible, mais cette espèce peut survivre pendant 8 à 10 jours sur les substrats pollués, et même en milieu salé, à la température de 20°C (sable des plages). En eau distillée stérile, la vitalité des levures se maintient pendant 5 et même 10 ans ; cette propriété est à la base de la conservation des Candida en laboratoire. La résistance aux agents physiques a été étudiée en ce qui concerne:

- ✓ la chaleur température létale 70°C
- ✓ les radiations ultra-violettes: la lumière ultraviolette est candidacide : 250  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  en 5 minutes, 8000  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  en 2 minutes.
- ✓ La désinfection par les agents chimiques, du matériel souillé exige un contact prolongé : plus de dix minutes en eau formolée à 10% d'aldehyde formique.

#### a. *Candida albicans*

Parmi les levures, *C. albicans* est la principale espèce d'intérêt médical et vétérinaire puisqu'elle représente au moins 60% des isollements de levures en pratique de laboratoire. *Candida albicans* est avant tout un commensal des cavités naturelles de l'homme, en particulier du tube digestif de l'homme. On le retrouve aussi dans la flore intestinale de divers mammifères et oiseaux. Chez l'homme, cette levure est aussi isolée des voies génito-urinaires. Dans ces sites, *C. albicans* est en équilibre avec les flores bactériennes locales qui maintiennent la population de levures à une faible densité. *Candida albicans*, en revanche, ne fait pas partie de la flore cutanée de l'individu sain, Il peut se développer par contre sur un épithélium lésé. Levure opportuniste par excellence, *C. albicans* profitera d'un déséquilibre de la flore endogène ou d'un déficit immunitaire pour se multiplier et se comporter en véritable pathogène pouvant envahir un certain nombre de tissus. *Candida albicans* est responsable d'environ 50 à 60% des candidoses invasives. Cependant, son importance relative décroît depuis quelques années au profit des autres espèces groupées sous le terme de levures non albicans (Bouchara et al., 2010).

#### b. *Candida glabrata*

*Candida glabrata* vit aussi en commensal dans les voies digestives et génito-urinaires de l'homme. Son incidence a augmenté ces dernières années sous la pression des antifongiques azolés. *Candida glabrata* représente 10 à 20% des isollements de levures en pratique médicale, mais 20% des candidoses invasives. Considérée classiquement comme résistante au fluconazole, cette espèce présente en fait une sensibilité de type intermédiaire aux azolés. Elle est dite sensible dose-dépendante, et la survenue d'isolats de *C. glabrata* résistants aux azolés lors d'un traitement par fluconazole est devenue beaucoup plus rare depuis que l'on préconise d'augmenter la posologie (Bouchara et al., 2010).

#### c. *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* est un saprophyte du milieu extérieur (sol, eau, air). Il peut aussi se comporter comme un commensal des voies digestives et génito-urinaires chez l'homme, mais aussi de la peau saine. Son incidence en Europe ne dépasse pas 10%. La virulence de cette levure est voisine de celle de *C. albicans*. On la rencontre plus fréquemment chez l'adulte que chez l'enfant. *Candida tropicalis* est à l'origine d'environ 10% des candidoses invasives, en particulier en onco-hématologie, chez les patients neutropéniques et les greffés de moelle osseuse (Bouchara et al., 2010).

#### d. *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* est une levure commensale de la peau et des phanères où elle peut être parfois à l'origine de lésions, notamment d'onyxis. Après *C. albicans*, c'est la levure en fréquence dans des états de septicémies provoquées par des implants intra-vasculaires, par la nutrition parentérale, ou par des



cathéters souillés. Ces fongémies s'observent principalement chez les patients non cancéreux, et plus particulièrement chez l'enfant, mais la létalité associée aux fongémies à *C. parapsiosis* reste toutefois inférieure à celle des fongémies engendrées par les autres espèces du genre *Candida* (Bouchara et al., 2010).

#### e. *Candida krusei*

*Candida krusei* est un saprophyte du milieu extérieur. L'émergence de cette levure d'origine alimentaire a été attribuée à la pression de sélection exercée par les antifongiques azolés (fluconazole). Elle est à l'origine de septicémies, surtout chez les patients cancéreux neutropéniques. Paradoxalement, son incidence reste faible chez les patients infectés par le VIH et soumis à une chimioprophylaxie antifongique à base d'azolé (Bouchara et al., 2010).

#### f. *Candida dubliniensis*

Cette espèce émergente, très proche de *C. albicans*, a été décrite à la suite de l'apparition du sida où elle est impliquée dans des candidoses oropharyngées. Son incidence au cours des candidémies reste cependant faible. L'amélioration des outils d'identification de cette nouvelle espèce devrait permettre de mieux cerner sa prévalence en dehors du sida (Bouchara et al., 2010).

#### g. *Candida lusitanae*

*Candida lusitanae* colonise le tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (mammifères, oiseaux). C'est une levure considérée comme émergente, notamment chez les patients immunodéprimés (cancéreux, greffés de moelle) ou hospitalisés dans des Unités de Soins Intensifs où elle est à l'origine de petites épidémies. De nombreux isolats présentent une résistance primaire à l'amphotéricine B (Bouchara et al., 2010).

#### h. *Candida kefyr* (ex *C. pseudotropicalis*)

*Candida kefyr* qui est issu de produits laitiers fermentés (fromages, ...) est un commensal des muqueuses digestives et respiratoires. Cette levure peut être à l'origine de septicémies. Sa sensibilité au fluconazole est très variable (Bouchara et al., 2010).

#### i. *Candida guilliermondii*

*Candida guilliermondii* est une levure commensale de la peau et des muqueuses (principalement digestives). Son pouvoir pathogène ne s'exprime habituellement que chez le patient sévèrement immunodéprimé (Bouchara et al., 2010).

#### j. Autres *Candida non albicans*

D'autres espèces non *albicans* sont plus rarement ou exceptionnellement rencontrées (Tableau 4). Il s'agit de *C. humicola*, *C. inconspicua*, *C. lipolytica*, *C. puicherrima*, *C. noivegensis*, *C. famata*, *C. ciferrii*, *C. rugosa*, *C. haemulonii* et *C. zeylanoides* (Bouchara et al., 2010).

### 1.2.2. Les cryptocoques

Sur le plan morphologique:

- Leur forme arrondie ou ovale,
- leurs dimensions de 4 à 6  $\mu$ .
- La présence d'une capsule d'enveloppe plus ou moins épaisse surtout développée chez les champignons cultivés sur gélose maltosée, 37°C.
- Une capsule peut contenir plusieurs levures.
- L'irradiation  $\gamma$  peut provoquer la formation de mutants dépourvus de capsule.

- ☒ L'aspect de leurs colonies sur milieu de Sabouraud; crémeuses, de coloration d'abord blanche, avant de virer au jaune pâle, puis au brun ocracé ; leur bourgeonnement généralement unique, mais parfois multiple ; les bourgeons sont réunis à la levure-mère par un col étroit et peuvent former des pseudo filament.
- ☒ Outre les levures, certaines souches de cryptocoques émettent des ébauches de filaments vrais

Du point de vue biologique:

- ☒ Leur sensibilité à l'actidione.
- ☒ L'élaboration d'une uréase : hydrolyse de l'urée, Cette hydrolyse aboutit à la formation de carbonate d'ammonium, qui alcalinise le milieu : virage au rose du rouge de phénol, normalement jaune en milieu acide. La positivité de l'épreuve de l'uréase. Cependant, il est des souches atypiques, non productrices d'uréase, notamment chez les malades du SIDA.
- ☒ L'assimilation de l'inositol ; la capacité d'assimilation des autres sucres permet l'identification des espèces
- ☒ L'absence de fermentation des sucres, à l'exception de l' inositol.
- ☒ La capacité d'amylogénèse à partir du glucose, en milieu synthétique renfermant du sulfate d'ammonium, du sulfate de magnésium, du phosphate monopotassique et de la vit. B1, à pH 4,5: épreuve d'Aschner. Après 8 à 15 jours d'incubation, à 25°C, la polymérisation du glucose avec production de substances amyloïdes est vérifiée par le développement d'une coloration bleue, suite à l'addition au milieu, de quelques gouttes de lugol.
- ☒ L'aptitude de quelques espèces à l'assimilation de la créatinine (mais pas de la créatine).
- ☒ L'élaboration d'une phénoxydase, capable d'oxyder des composés diphenoliques, comme l'acide cafféique, un ortho-diphénol présent les graines de Niger (*Guizotia abyssinica*, composée tubuliflore sous-famille des hélianthées), ou la dioxy-phényl-alanine (DOPA), en produisant de la mélanine, qui confère, après 4 à 5 jours d'incubation, une coloration brune aux colonies du champignon. L'élaboration de la phénoloxydase est mise en évidence en milieu gélosé-glucosé à la créatinine et à la farine de Niger (qu'on préfère à l'extrait de graines de *G. abyssinica*). La tyrosine et la glycine favorisent l'action de la phénoloxydase, tandis qu'une forte concentration, du milieu en glucose, l'inhibe. La phénoloxydase du sérotype C de *Cryptococcus neoformans* est susceptible d'une meilleure adaptation, par rapport à celle des autres sérotypes (Euzéby, 1994).

#### a. *Cryptococcus neoformans*

Essentiellement monomorphe, ayant le même aspect en lésions et en cultures. Il se présente sous la forme de levures isolées, de forme arrondie ou ovoïde, de 4 à 7  $\mu$  (mais pouvant atteindre 15  $\mu$ ), à bourgeonnement le plus souvent unique, relié à la cellule-mère par un col étroit et enveloppées d'une capsule plus ou moins épaisse, de 4 à 10  $\mu$

Cette capsule apparaît bien lorsque le champignon est examiné sur fond noir (encre de Chine) et elle forme un halo vide autour de la cellule ; elle est, cependant, colorable par le mucicarmine. Une même capsule peut envelopper deux ou plusieurs levures, Dans les cultures, la capsule est généralement plus mince que in vivo (2-4  $\mu$ ), mais elle devient plus épaisse dans les sub-cultures en gélose maltosée, incubées à 37°C. D'après BOTTONE et al. (1985) (cité par Euzéby, 1994), les cryptocoques isolés de sujets atteints de SIDA n'ont qu'une capsule très mince et ce caractère pourrait permettre de différencier la cryptococcose consécutive au SIDA, des autres facteurs étiologiques de la maladie. Cependant, cette assertion n'est pas admise par tous les auteurs (Euzéby, 1994). Les mutants dépourvus de capsule se multiplient abondamment et peuvent déterminer une infection généralisée; c'est ce caractère qui a laissé croire à une relation de cause à effet entre SIDA et cryptocoques dépourvus de capsule, alors que, au contraire, c'est parce les mutants primitivement non encapsulés sont très pathogènes qu'on les observe chez les sujets atteints de SIDA. La synthèse des polysides capsulaires est favorisée par le manque de fer

et par le CO<sub>2</sub> dans les milieux de culture (Euzeby, 1994). Parmi les cryptocoques, *C. neoformans* est l'espèce la plus fréquemment isolée en pathologie humaine. Il existe trois variétés (Bouchara et al., 2010):

- ***Cryptococcus neoformans var. neoformans***, qui correspond au sérotype D, est une levure rencontrée principalement en Europe, et notamment en France. Elle infecte surtout les patients immunodéprimés (sida, hémopathies sévères, maladie de Hodgkin, corticothérapie, greffes d'organes, ...). Cette levure vit en saprophyte sur les fientes de pigeons ou le guano de chauve-souris. La contamination de l'homme se fait par inhalation de poussières infectantes contenant les spores issues du stade sexué de cette levure: *Filobasidiella neoformans* (Bouchara et al., 2010).
- ***Cryptococcus neoformans var. gattii***, qui correspond aux sérotypes B et C. Sa forme sexuée, qu'on appelle *Filobasidiella bacillispora*, est rencontrée en zone tropicale. Cette forme sexuée vit en saprophyte, et elle est inféodée à certaines plantes (Eucalyptus). Cette variété est plus rarement retrouvée chez les immunodéprimés (Bouchara et al., 2010). En France, le sérotype B a été isolé de malades ayant séjourné en Afrique subsaharienne, notamment au Cameroun (Euzeby, 1994).
- **Et la variété *grubii***, qui correspond au sérotype A. Cette variété cosmopolite individualisée récemment n'a pas de forme sexuée connue (Bouchara et al., 2010). Le sérotype A est isolé dans pratiquement 100 % des cas mortels de cryptococcose (Euzeby, 1994).

La coloration n'est pas toujours nécessaire pour la mise en évidence de *C. neoformans* dans les produits pathologiques tels que expectorations, pus, liquide céphalo-rachidien ; l'examen direct après éclaircissement par le lacto-phénol ou la potasse à 10 % ou la dilution du matériel dans de l'encre de Chine sont généralement suffisants.

Cependant, CHENG-HUEI LEE et al. (1988) (cité par Euzeby, 1994) recommandent l'usage de la coloration de Riu (dérivée de la méthode de Wright) : (1) séchage naturel de l'étalement ; (2) coloration pendant 30 secondes par deux ou trois gouttes d'une solution à 0,18 % d'éosine + 0,07 % de bleu de méthylène dans du méthanol absolu; (3) addition de deux ou trois gouttes d'une solution à 0,14 % de bleu de méthylène, + 0,14 % de bleu d'azur, + 1,25 % de phosphate monopotassique + 2,5 % de phosphate disodique, en eau distillée: action de une minute; (4) rinçage à l'eau courante. Les cryptocoques, encapsulés, apparaissant avec une coloration bleue.

L'avantage de ce procédé de coloration, d'après CHENU-HUE LEE et al., réside en ce qu'il est couramment utilisé en cytologie et que, par conséquent, il peut révéler la présence de cryptocoques au cours d'examens de routine pour le diagnostic de lésions pulmonaires, tandis que, si on ne pense pas à la cryptococcose, on risque de ne pas utiliser les colorations spécifiques des champignons pour découvrir le parasite.

Plus récemment, P. RAVISSE et al. (cité par Euzeby, 1994), utilisent le rouge sirius, qui confère à la capsule de *C. neoformans* une coloration rouge et une biréfringence en lumière polarisée, avec images en croix de Malte. Il peut arriver que la fixation provoque une déformation en étoile de la capsule. Ajoutons que les cryptocoques intracellulaires ne sont pas colorés par le lugol ; cette particularité permet, dans la substance nerveuse, de les différencier des corps amyloïdes.

Si *C. neoformans* se présente essentiellement sous une forme levure, il peut aussi produire, en lésions comme en culture, des ébauches de filaments: variants filamenteux. Ces variants sont plus particulièrement liés à certaines souches et leur formation paraît due à un phénomène de chimio-résistance du champignon. Ils ont, aussi, retrouvés ces formes filamenteuses en cultures de tissus. En vérité, il s'agit plus de tubes de germination que de filaments véritables (Euzeby, 1994).

Les anamorphes du champignon (*Cryptococcus neoformans*) survivent sur le sol, et en localisations exosaprotiques et endo-saprotiques (tractus digestif) chez les êtres vivants. C'est pourquoi, ils deviennent très fréquemment parasites et pathogènes chez les sujets immuno-déprimés: la



cryptococcose est une des mycoses opportunistes les plus fréquentes, notamment au cours du SIDA le cryptocoque passe, alors, selon l'expression d' Ajello, de l'état de "géant endormi" à celui de "géant réveillé".

La vie endo-saprophytue du champignon est particulièrement observée dans le jabot du pigeon (mais pas du poulet) et le cryptocoque se développe bien dans les fèces de cet oiseau, qui permettent la genèse des formes sexuées.

Ces formes sexuées sont surtout observées chez les isolats du séro-type D. Les séro-types A et D peuvent se croiser, tout comme les séro-types B et C. En revanche, il n'y a pas de possibilité de croisement entre A et D d'une part et B et C d'autre part et cette incompatibilité est contrôlée par deux allèles, respectivement  $\alpha$  et  $a$ .

Chez le pigeon, le cryptocoque du jabot peut, au moment de l'allaitement, passer chez les pigeonneaux ainsi, le pigeon non seulement ensemece le sol de ses biotopes par les cryptocoques rejetés avec ses matières fécales mais encore entretient le parasite en le transmettant à ses petits pendant la période de reproduction. Ainsi, les sols souillés de fèces de pigeons sont-ils des sources de *Cryptococcus neoformans* et de *Filobasidiella neoformans*. Cependant, en milieux humides et riches en matières organiques le champignon est relativement peu abondant, car il est victime de la prédation exercée par des amibes libres. Cependant, les pigeons ne sont pas les seuls oiseaux dont les déjections permettent la culture du parasite, qui a, aussi, été mis en évidence chez la poule, l'hirondelle, les canaris. Quoiqu'il en soit, c'est dans les sols ombragés qu'abonde *C. neoformans*, car le soleil exerce sur ce champignon une action destructrice. En général, la survie de *C. n. neoformans*, sous sa forme parfaite, est, naturellement, très longue : plus de 10 années dans un biotope contaminé. Mais divers micro-organismes présents dans les fèces ou dans les sols peuvent détruire le champignon: *B. subtilis*, *B. auruginosa*, *Acanthamaeba sp.*

Outre les sols, les fruits, les jus de fruits, le lait peuvent véhiculer *C. n. neoformans*. Il faut, encore, noter que des insectes coprophages et détriticoles, tels que les blattes, peuvent absorber et disperser le champignon qui a, aussi, été mis en évidence dans le tractus digestif des chevaux.

Contrairement à *C. n. neoformans*, la variété *C. n. gattii* n'a, à ce jour, pas été isolée du sol. Sa niche écologique est constituée par les forêts d'eucalyptus, *E. camaldulensis*, dont les inflorescences portent le champignon. La nature de ce biotope particulier permet de comprendre l'isolement de *C. gattii* des fèces des koalas, dont les feuilles d'eucalyptus sont l'aliment exclusif.

Chez les mammifères, la localisation initiale des cryptocoques est le poumon, où le parasite parvient par inhalation. Les cryptocoques sont libres dans les bronchioles et alvéoles ; mais peuvent être phagocytés par des macrophages. De plus, MERKEL et al. (1992) cité par Euzeby (1994) ont montré qu'un processus de phagocytose épithéliale dans les alvéoles peut assurer la diffusion des cryptocoques à partir des poumon.

La culture de *C. neoformans* est possible sur milieu d'épreuve de Sabouraud ou, pour les hémocultures (sang + anticoagulant), sur bouillon de coeur ou de cerveau (8-10 ml de sang dans 50 ml de bouillon). Pour l'isolement, à partir de lésions ouvertes et exposées à des contaminants (pus, expectorations) il faut ajouter au milieu des antibiotiques anti-bactériens et du diphényle, (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) à la concentration de 1 /100.000, qui inhibe le développement des moisissures (l'actidione n'est pas utilisable car elle empêche, aussi, la croissance du cryptocoque). Ces précautions sont inutiles pour les hémocultures.

Pour l'isolement à partir des fèces (notamment de celles des pigeons), du sol (enquêtes épidémiologiques) et même du matériel prélevé sur des lésions, on utilise aussi le milieu de Staib et Seeliger, gélose glucosée renfermant de la créatinine et de la farine de Niger (mise évidence d'une phénol-oxydase, productrice de mélanine). RUBIO et al. (cité par Euzeby, 1994) ajoutent, au milieu, du violet de gentiane, pour le rendre plus productif. L'incubation des cultures est réalisée à 25° et à 37°C. Il est important d'incuber à 37°C, qui est l'optimum thermique et permet le développement de *C. neoformans* à l'exclusion des autres espèces du genre. *C. n. gattii* pousse électivement à 30°C. En aucun

cas le développement n'est possible à des températures supérieures à 39°C. Mais un mutant obtenu par irradiation  $\gamma$ , peut proliférer à 5°.

En milieu de Sabouraud, la croissance est rapide et, au terme de 48 heures, apparaissent des colonies d'aspect crémeux, ou mucoïde, de coloration d'abord blanc-ivoire, puis crème vanille et virant au brun-ocracé environ le 7<sup>ème</sup>-8<sup>ème</sup> jour. Ces colonies ne tardent pas à confluer pour former une nappe irrégulière à la surface de la gélose.

En bouillon de coeur ou de cerveau, ainsi qu'en liquide de Raulin, et à la température du laboratoire, le développement est plus lent (3 semaines) et il se forme des petits flocons, qui sédimentent. Sur tous ces milieux, les cryptocoques sont monomorphes et ne produisent pas de filaments. Outre les substrats inertes classiques, on a pu entretenir *C. neoformans* sur des cultures de fibroblastes de souris. On peut, au laboratoire, conserver *C. neoformans* en milieu gélosé à l'extrait de carottes.

L'auxanogramme de *C. neoformans neoformans* révèle la sensibilité de cette variété, non seulement à l'actidione, mais aussi à la canavanine, acide aminé basique isolé du haricot *Canavalia ensiformis*, c'est pourquoi sur milieu canavanine + glycine + bleu de bromothymol (milieu C.G.B.) il n'y a pas d'alcalinisation du substrat, et, donc, pas de virage au bleu du milieu (Euzeby, 1994).

Les caractères ci-dessus évoqués permettent la distinction de *C. n. neoformans* et de *C. n. gattii*. Cette variété du champignon:

- ✓ est surtout répandue en Australie, où on a mis en évidence son habitat, naguère encore inconnu : forêts d'eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*), en Extrême-Orient, en Afrique équatoriale et a été récemment isolée en Californie.
- ✓ Est moins souvent en cause que *C. n. neoformans* dans les cas de cryptococcose; et est moins pathogène.
- ✓ a des levures plus souvent ovalaires que circulaires, et parfois bacilliformes (les levures de *C. n. neoformans* sont toujours rondes, in vivo).
- ✓ pousse mal à 37° C; optimum thermique: 30°C.
- ✓ n'utilise, comme source de carbone et d'azote, que la glycine ; elle assimile peu la créatinine et pas du tout les acides dicarboxyliques.
- ✓ résiste à la canavanine.
- ✓ Ces deux dernières caractéristiques sont mises en évidence, en milieu C.G.B. ; sur ce milieu, les colonies du champignon sont entourées, en 24 heures d'un pigment bleu foncé dû à l'accumulation d'ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; tel n'est pas le cas pour *C. n. neoformans*, sensible à la canavanine (milieu C.G.B.).

Par contre, les acides gras à longue chaîne de *C. n. neoformans* et *C. n. gattii* sont identiques. Cette identité, ajoutée au fait qu'existe entre ces deux champignons une compatibilité sexuelle, autoriserait à considérer comme synonymes *C. n. neoformans* et *C. n. gattii* si les spores résultant du croisement n'étaient, le plus souvent, stériles et si leurs téléomorphes n'étaient comme on l'a vu, différents.

Quant à *C. n. shangai*, isolé en Chine en 1983, elle est identifiée à *C. n. neoformans*.

#### Toxigénèse:

Les propriétés toxigènes de *C. neoformans* ont été peu étudiées. Il semble qu'existe une endotoxine, qui, plus que la multiplication du parasite lui-même, serait responsable de la mort ; ceci explique les délais relativement longs au terme desquels survient la mortalité, même après inoculation par des voies sévères. KOBAYASHI et FRIEDMAN (1964) (Cité par Euzeby, 1994) ont, en effet, attribué à une toxine, dont la pathogénicité évoque celle des endotoxines des bactéries gram négatif, la fièvre consécutive à l'inoculation intra-veineuse de levures de *C. neoformans* ; cependant, dans les conditions naturelles, la cryptococcose ne comporte que peu ou pas de réaction fébrile. Plus tard, KOBAYASHI et al. (1974) (Cité par Euzeby, 1994) ont isolé des levures, une substance de nature

endotoxinique. Cette endotoxine est indépendante des polysaccharides capsulaires car, contrairement à ces derniers, elle n'inhibe pas la phagocytose de *C. neoformans* par les macrophages.

Sans qu'il s'agisse de toxine, notons que l'activité uréasique de *C. neoformans* est génératrice d'ammoniac, capable de perturber l'action du complément.

Parmi les toxines élaborées par *C. neoformans*, il faut citer des substances protéiques et glyco-protéiques pouvant avoir une action nocive, inhibitrice ou destructrice, sur d'autres levures, C'est le "phénomène tueur" (killer), découvert en 1963 chez *Saccharomyces cerevisiae*, puis chez diverses levures *Candida* etc et *Cryptococcus*. Les variations de sensibilité des levures aux toxines tueuses permettent de typer les souches des levures productrices de ces toxines. Nous étudierons avec plus de précision le phénomène "tueur" à propos des levures du genre *Candida* (Euzéby, 1994).

## b. Les autres cryptocoques

Il existe d'autres espèces de Cryptocoques dont on ne connaît pas la forme sexuée ni l'habitat dans le milieu extérieur. Il s'agit de *C. laurentii*, *C. albidus* et *C. uniguttulatus*. Ces cryptocoques, qui ne poussent pas à 37°C, peuvent cependant être impliqués dans des lésions superficielles (onyxis) et plus exceptionnellement dans des mycoses profondes (septicémies) (Bouchara et al., 2010).

### I.2.3. Les Malassezia

Ce sont des levures globuleuses, ellipsoïdales à cylindriques de petite taille. Reproduction par bourgeonnement unipolaire sur une base large. Présence de filaments bien développés en culture, dans certaines conditions, mais facilement observés dans les squames de peau. Pas de fermentation des sucres (Koenig, 1995).

Ces levures de genre *Malassezia* sont cosmopolites. Elles font partie de la flore cutanée habituelle des mammifères et des oiseaux. Elles sont assimilées aux Basidiomycètes. *Malassezia furfur* n'est plus l'espèce dominante chez l'homme, où on isole surtout *M. globosa*, *M. sympodialis* et *M. restricta*. D'autres espèces sont aussi retrouvées chez l'homme : *M. sloofiae* (issue du porc) et *M. pachydermatis* (issue du chien) qui est en fait, parmi les levures du genre *Malassezia*, la seule espèce non lipo-dépendante (Bouchara et al., 2010). *M. pachydermatis* est très fréquemment et abondamment retrouvées lors d'otites externes ou lors de dermatites séborrhéiques et prurigineuses chez les carnivores (Guillot, 1999). Chez l'homme, les *Malassezia* sont particulièrement abondants sur les régions du corps où la peau est grasse, riche en glandes sébacées (thorax, visage, cuir chevelu, oreilles). Ces levures lipophiles, quand elles sont abondantes et en présence de facteurs favorisants, sont à l'origine de mycoses. La contagiosité est négligeable pour ces levures (Bouchara et al., 2010).

### I.2.4. Les Rhodotorula

Les levures du genre *Rhodotorula* qui se caractérisent par des colonies de couleur rouge corail, sont classées parmi les Deutéromycètes Blastomycètes. Néanmoins, elles ont des affinités avec les Basidiomycètes. Ces levures cosmopolites sont très répandues dans le milieu extérieur, notamment dans l'eau.

Trois espèces sont retrouvées à l'état commensal dans l'intestin et sur la peau chez l'homme : *R. mucilaginosa* (ex *R. rubra*), *R. glutinis* et *R. minuta*.

Elles peuvent être à l'origine d'infections superficielles (kératites) ou profondes. La porte d'entrée peut être cutanée (cathéters intra-veineux souillés) ou digestive par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés (Bouchara et al., 2010).

### I.2.5. Les Trichosporon

Les levures du genre *Trichosporon* sont issues du milieu extérieur (sol, eau, ...), mais certaines espèces sont aussi retrouvées à l'état commensal sur le revêtement cutané (peau, phanères) et sur les

muqueuses digestives de l'homme. Comme les *Rhodotorula*, les *Trichosporon* sont affiliés aux Basidiomycètes.

Environ 7 espèces (toutes cosmopolites et issues de la peau) peuvent être impliquées dans des mycoses humaines. Il s'agit de *T. mucoides*, *T. asahii*, *T. inkin*, *T. asteroides*, *T. cutaneum*, *T. ovoides* (= *T. beigeli*) et *T. filamenta*.

*Trichosporon mucoides* qui est l'espèce la plus fréquemment isolée chez l'homme, est retrouvée sur des ongles et dans les espaces interdigitaux plantaires. *Trichosporon inkin*, hôte habituel de la muqueuse anale et des plis inguinaux, est l'agent de la piedra blanche. *Trichosporon asahii* est isolé surtout des ongles, aussi bien au niveau des pieds que des mains. *Trichosporon ovoides*, quant à lui, est davantage retrouvé au niveau du cuir chevelu, de la barbe et de la moustache. À ces niveaux, *Trichosporon ovoides* est responsable de lésions de piedra blanche.

Les lésions superficielles dues aux *Trichosporon* sont favorisées par l'humidité, la chaleur et une mauvaise hygiène. Vraisemblablement, des modifications de la flore cutanée dues à un déficit immunitaire local favorisent également la survenue de ces mycoses. La présence de ces levures sur la peau et dans l'intestin explique la survenue, en cas d'immunodépression sévère, de formes profondes ou disséminées (Bouchara et al., 2010).

### 1.2.6. Les Saccharomyces

Levures globuleuses, ellipsoïdales ou cylindriques. Pseudofilamentation courte ou rudimentaire. Ascospores globuleuses, à paroi lisse, au nombre de 1 à 4 par asque. Fermentation vigoureuse. Pas d'assimilation du nitrate. Parmi les 7 levures référencées dans ce genre, seule *Saccharomyces cerevisiae*, utilisée dans l'industrie agroalimentaire, est souvent isolée chez l'homme (Koenig, 1995).

Les levures du genre *Saccharomyces* sont classées parmi les Ascomycètes Hémiacomycètes. Elles sont largement répandues dans l'alimentation (pain, vin, bière, fruits, légumes, ...). L'Ultralevure<sup>®</sup> qui est utilisé dans le traitement des diarrhées, contient de fortes concentrations de *Saccharomyces boulardii* (proche de *S. cerevisiae*). En relation avec leur fréquence dans les produits alimentaires, ces levures sont souvent isolées à l'état commensal à partir des prélèvements digestifs. Les infections à *Saccharomyces* sont en général rares. Ces levures ne peuvent diffuser dans le sang et les urines que chez des patients très affaiblis ou immunodéprimés, à l'occasion d'un déséquilibre de la flore intestinale et/ou d'une utilisation mal contrôlée de médicaments anti-diarrhéiques contenant la levure (Bouchara et al., 2010).

### 1.2.7. Les Geotrichum

Les *Geotrichum* sont des champignons filamenteux à thalle septé hyalin appartenant aux Deutéromycètes Hyphomycètes Mucédinés. La reproduction sexuée, avec production d'asques et d'ascospores, n'est connue que pour deux espèces: *G. candidum* et *G. capitatum*. En conséquence, les *Geotrichum* sont rattachés dans les classifications récentes aux Ascomycètes.

Deux espèces de *Geotrichum* sont rencontrées à l'état commensal dans le tube digestif et les voies aériennes de l'homme et de nombreux mammifères: *G. capitatum* et *G. clavatum*. Une 3<sup>ème</sup> espèce, d'origine alimentaire, peut être isolée du tractus digestif chez l'homme. Il s'agit de *G. candidum*, que l'on retrouve dans de nombreux produits laitiers (notamment dans des fromages à pâte molle ou à croûte fleurie), mais aussi dans le sol, les eaux usées et les fruits. Les affections humaines liées aux *Geotrichum* restent toutefois rares (Bouchara et al., 2010).

## 1.3. Les principaux facteurs favorisant les candidoses

Les *Candida* sont des levures opportunistes, c'est-à-dire qu'à la faveur d'une altération des barrières anatomiques locales, d'un déséquilibre de la flore endogène ou d'un déficit immunitaire, ces levures peuvent se comporter en pathogènes et présenter un caractère invasif. Schématiquement, on distingue les facteurs favorisant liés à l'hôte (ou intrinsèques) et des facteurs extrinsèques (ou exogènes) qui sont le plus souvent d'origine iatrogène (Bouchara et al., 2010).

### **I.3.1. Facteurs liés à l'hôte**

#### **a. Facteurs physiologiques**

Parmi les facteurs intrinsèques, il faut citer les âges extrêmes de la vie. En effet, le nouveau-né est particulièrement vulnérable, de même que les individus âgés porteurs de prothèse dentaire. Chez la femme enceinte, surtout à partir du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse, la fréquence des candidoses vaginales est 3 à 4 fois plus élevée.

La transpiration, la macération, la chaleur et l'humidité, de même que l'altération de la trophicité des muqueuses, favorisent le développement des candidoses (Bouchara et *al.*, 2010).

#### **b. Terrain ou maladies sous-jacentes**

Les hémopathies malignes et les cancers, ainsi que toutes les maladies qui entraînent un affaiblissement de l'état général ou une altération profonde et durable de l'immunité, sont susceptibles de générer une candidose. Parmi ces affections, citons le sida, le diabète et autres endocrinopathies (maladie de Cushing, ...) (Bouchara et *al.*, 2010).

### **I.3.2. Facteurs extrinsèques et/ou iatrogènes**

#### **a. Traitements médicamenteux**

L'antibiothérapie à large spectre, surtout si elle est prolongée au-delà du 8e jour, augmente la colonisation digestive par les *Candida* et peut être dans un deuxième temps à l'origine d'une candidose digestive. Les traitements immunosuppresseurs (antimitotiques, corticoïdes, ...) peuvent avoir le même effet. Les ulcères digestifs générés par les traitements cytolytiques et colonisés par les levures commensales sont une porte d'entrée classique des *Candida*. Ils se compliquent d'une candidose chronique disséminée en cas de neutropénie profonde et prolongée (Bouchara et *al.*, 2010).

#### **b. Traitements et/ou manoeuvres chirurgicales**

Les chirurgies digestives constituent un facteur de risque de candidoses à *C. albicans* ou à *C. glabrata*. La mise en place de cathéters centraux, de dispositifs intra-vasculaires, de prothèses ou de sondes expose au risque de septicémie à *Candida* (principalement à *C. parapsilosis*, commensal de la peau) (Bouchara et *al.*, 2010).

#### **c. Risque nosocomial lié aux *Candida***

Les septicémies à *Candida* surviennent préférentiellement dans les Unités de Soins Intensifs (Services de Réanimation Médicale ou Chirurgicale). Les levures du genre *Candida* se situent à la 4<sup>ie</sup> place parmi les microorganismes responsables de septicémies. Le Tableau 7 présente les espèces impliquées.

Certains facteurs généraux, comme les âges extrêmes de la vie et les facteurs de co-morbidité (pathologies associées, ...), sont des facteurs de risque de candidose systémique en réanimation. Il faut également signaler les séjours prolongés en Unités de Soins Intensifs. Certains patients appartiennent à des catégories à risque accru de candidose:

Les grands brûlés, les polytraumatisés, les patients neutropéniques, les transplantés, les patients présentant un déficit immunitaire, ... Les interventions de chirurgie digestive lourde, compliquées de perforations intestinales, ou de fuites d'anastomose digestive, biliaire ou pancréatique, constituent également un facteur de risque de candidose systémique. Parmi les pratiques médicales corrélées avec un risque accru de candidémie, notamment en réanimation, il convient de souligner le port prolongé d'un cathéter veineux central. La nutrition parentérale, et l'épuration extra-rénale sont aussi associées à une majoration du risque de candidose invasive ou de candidémie.

Concernant les facteurs extrinsèques d'origine médicamenteuse, il faut souligner le rôle de l'antibiothérapie à large spectre qui, en permettant la multiplication des levures digestives, expose au risque de candidose invasive. De même, la colonisation secondaire de sites autres que le tube digestif

précède classiquement l'apparition d'une candidémie. Plus le nombre de sites colonisés augmente, plus important est le risque de survenue d'une candidose systémique (Bouchara et *al.*, 2010).

#### **I.4. La cryptococcose**

La voie respiratoire: inhalation de basidiospores et de levures, de diamètre < 10 µ. SMITH et *al.* (1964) (cité par Euzeby, 1994) ont observé que, les levures présentes dans les sols se rétrécissent en milieu sec et deviennent assez réduites pour pouvoir être inhalées. Il arrive que ces éléments infectieux soient dispersés par les climatiseurs, lorsque ceux-ci ont été pollués par des débris organiques.

L'adhérence des cryptocoques aux cellules épithéliales pulmonaires est conditionnée par divers facteurs, notamment par un développement initial à la température de 37°C. D'où l'hypothèse que l'infection des poumons est consécutive à une phase de multiplication du parasite dans la cavité buccale et les voies aérifères supérieures. Plus rarement, les cryptocoques pénètrent dans l'organisme par des solutions de continuité de la peau et des muqueuses superficielles. Cette possibilité rend compte de l'éventuelle infection par voie digestive, observée chez la souris et chez les singes marmousets. Chez la vache et, plus généralement, les femelles laitières, l'infection est possible par le canal du trayon. Mais à côté de ces infections exogènes, la cryptococcose peut aussi procéder de cryptocoques vivant jusqu'alors en saprophytes sur la peau ou dans le tube digestif origine exo- ou endo-saprobioïque. Cette notion, admise par certains auteurs, est niée par d'autres, notamment par EMMONS (1963-1970) cité par Euzeby (1994). Quant à l'incidence sur l'infection de l'homme d'un contact avec les pigeons, elle n'est observée que de façon épisodique ; ce fait confirme l'absence de contamination directe de l'homme à partir du pigeon. Il n'en reste pas moins que la manipulation de fèces de pigeons ou de sol souillé de ces fèces élève les chances de contaminations. WALTER et *al.* (1966) cité par Euzeby (1994) ont observé un taux d'anticorps spécifiques nettement plus élevé chez les éleveurs de pigeons que chez les autres catégories sociales.

La cryptococcose survient préférentiellement en cas d'immunodépression, plus précisément en cas de déficit de l'immunité à médiation cellulaire. Les patients séropositifs pour le VIH avec un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 100/mm<sup>3</sup> sont particulièrement exposés. Depuis l'arrivée de la trithérapie, la cryptococcose au cours du sida est devenue plus rare (sauf en cas d'échappement aux antirétroviraux). La corticothérapie prolongée, la sarcoïdose, la maladie de Hodgkin et certains lymphomes favorisent aussi la survenue d'une cryptococcose. À l'inverse de ce qui est observé pour les candidoses, la granulopénie et l'agammaglobulinémie ne sont pas des facteurs favorisants. Dans bon nombre de cas, la cryptococcose peut aussi survenir sans que l'on puisse déceler un quelconque facteur prédictif (Bouchara et *al.*, 2010).

#### **I.5. Les malassezioses**

Les malassezioses ne sont pas des infections transmissibles. La survenue d'un pityriasis versicolor, d'un pityriasis capitis, d'une dermatite séborrhéique ou d'une folliculite semble être la conséquence du passage de la levure d'un état commensal à l'état parasitaire. Ce passage serait favorisé par une teneur élevée en acides gras libres et en triglycérides. Une réceptivité individuelle est aussi évoquée (peau séborrhéique, transpiration, hypercorticisme, immunosuppresseurs). L'application de corps gras (cosmétique ou huile corporelle) sur la peau favorise le développement de ces levures. De même, la multiplication de ces levures est favorisée par la chaleur et l'humidité. Le pityriasis versicolor est donc plus fréquent durant l'été.

Enfin, les septicémies à *Malassezia* ont souvent pour origine la colonisation des implants vasculaires chez les prématurés ou les adultes immunodéprimés recevant une alimentation parentérale riche en lipides (Bouchara et *al.*, 2010).

#### **I.6. Les rhodotoruloses, les saccharomycoses, les trichosporonoses et les géotrichoses**

Les facteurs favorisants de ces mycoses sont voisins ou identiques à ceux des candidoses. Les champignons incriminés (*Rhodotorula sp.*, *Saccharomyces sp.*, *Tnchosporon sp.* et *Geotrichum sp.*) ne

deviennent pathogènes - ou n'expriment leur pathogénicité - que dans des conditions de grande fragilité du patient.

Il convient de préciser:

- ❖ que l'utilisation prolongée d'un cathéter représente la principale source de contamination, dans les rhodotoruloses.
- ❖ et que les fongémies à *Saccharomyces* peuvent être occasionnées par l'absorption d'anti-diarrhéiques à base de levures lyophilisées (*S. cerevisiae* variété *boulardi*). Mais la contamination peut aussi se faire par l'intermédiaire du personnel soignant ou par voie aérienne, à l'ouverture des sachets de levures, par souillure du site d'insertion d'un cathéter (Bouchara et al., 2010).

## II. Aspects cliniques des levuroses

Le spectre clinique des levuroses, présenté dans le Tableau 4, est extrêmement varié, allant d'affections strictement superficielles comme le pityriasis versicolor, le pityriasis capitis ou la piedra blanche, à des mycoses profondes ou systémiques (Bouchara et al., 2010).

Tableau 4: Spectre clinique des levuroses (Bouchara et al., 2010).

Levuroses	Manifestations cliniques (localisation) et principales espèces en cause	
Candidoses	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Intertrigos</li> <li>- Onyxis et périonyxis</li> <li>- Candidoses oropharyngées</li> <li>- Candidoses digestives et génitales</li> <li>- Septicémies</li> <li>- Candidoses profondes ou viscérales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Candida albicans</i></li> <li>- <i>C. glabrata</i></li> <li>- <i>C. tropicalis</i></li> <li>- <i>C. parapsilosis</i></li> <li>- <i>C. krusei</i></li> <li>- <i>C. lusitaniae</i></li> <li>- <i>C. famata</i></li> <li>- <i>C. guilliermondii</i></li> </ul>
Cryptococcoses	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cryptococcoses neuroméningées</li> <li>- Cryptococcoses viscérales</li> <li>- Cryptococcoses cutanées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Cr. neoformans</i></li> </ul>
Malassezioses	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pityriasis versicolor (peau, thorax)</li> <li>- Dermite séborrhéique</li> <li>- Pityriasis capitis (cuir chevelu)</li> <li>- Septicémies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Malassezia furfur</i></li> <li>- <i>M. globosa</i></li> <li>- <i>M. sympodialis</i></li> <li>- <i>M. pachydermatis</i></li> </ul>
Trichosporonoses	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Piedra blanche (poils et cheveux)</li> <li>- Trichosporonoses cutanées</li> <li>- Onyxis</li> <li>- Septicémies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Trichosporon mucoides</i></li> <li>- <i>T. asahii</i></li> <li>- <i>T. inkin</i></li> <li>- <i>T. ovoides</i></li> </ul>



### III. Diagnostic biologique des levures

Le diagnostic mycologique d'une levure s'inscrit dans le cadre de la démarche habituelle du diagnostic en microbiologie. Il comporte trois étapes:

1. le prélèvement, qu'il s'agisse d'un prélèvement superficiel, d'un liquide biologique ou d'un tissu profond,
2. l'examen direct et/ou anatomo-pathologique du produit biologique ou de la pièce d'exérèse
3. et la culture du produit pathologique qui permettra d'isoler, éventuellement de dénombrer, puis d'identifier (genre, espèce) les levures.

À côté de l'identification mycologique, la biologie moléculaire s'avère être un outil complémentaire, particulièrement remarquable dans la surveillance épidémiologique (génotypage).

Les techniques sérologiques, basées sur la recherche d'anticorps sériques et/ou d'antigènes circulants, sont aussi contributives pour le diagnostic des levures profondes et/ou systémiques (Bouchara et *al.*, 2010).

#### III.1. Diagnostic mycologique

##### III.1.1. Le prélèvement

Le diagnostic d'une levure repose sur un prélèvement de qualité, c'est-à-dire adapté à la demande. Le prélèvement qui sera recueilli dans un récipient stérile, devra être acheminé rapidement au laboratoire.

A défaut, il sera conservé pendant 24 h à 48 h au réfrigérateur, Il est impératif de réaliser les prélèvements à distance de toute thérapeutique antifongique locale ou générale. Les modalités de prélèvement, d'acheminement et de conservation varient selon les localisations (Tableau 5) (Bouchara et *al.*, 2010).

##### III.1.2. L'examen direct

L'examen direct est la première étape du diagnostic au laboratoire. Il permet en effet de constater la présence à l'état parasitaire de la levure au niveau du site prélevé, d'orienter éventuellement le diagnostic et de débiter une thérapeutique appropriée.

On doit distinguer l'examen direct de prélèvements superficiels de celui des prélèvements profonds (Bouchara et *al.*, 2010).

##### III.1.2.1. Examen direct des prélèvements superficiels

L'examen direct s'effectue soit directement à l'état frais dans du sérum physiologique stérile, soit en utilisant un colorant qui facilitera la visualisation des éléments fongiques (blastospores, filaments, pseudofilaments). Différents colorants peuvent être utilisés (Figures 34 et 35) : May-Grünwald-Giemsa (MGG), solution de lugol à 2%, bleu de toluidine, bleu au lactophénol, noir chlorazole, ou rouge congo (MycetColor). L'examen direct des ongles peut nécessiter un éclaircissement préalable dans la potasse (KOH à 30%) ou à l'aide de chloral-lactophénol. Lorsque l'on dispose d'un microscope équipé en fluorescence avec des jeux de filtres adéquats (filtre bleu 400-440 nm), on peut utiliser des fluorochromes tels que le Calcofluor white (Sigma) ou le Blankophor® (Bayer) à 0,1% qui permettent une lecture rapide (Figure 33).

L'examen direct permet de mettre en évidence les blastospores et autres éléments fongiques éventuels, filaments mycéliens et pseudofilaments. Ces derniers sont en faveur d'un rôle pathogène de la levure, alors que la présence de blastospores seules peut signifier un simple portage.

La sensibilité de l'examen direct dans ces sites superficiels reste toutefois faible et sa négativité ne doit pas faire écarter un diagnostic de levure (Bouchara et *al.*, 2010).

L'examen en lumière de *wood* permet aussi le diagnostic clinique et le dépistage des formes latentes de malassézirose: fluorescence jaune, parfois obtenue après plusieurs minutes d'illumination. Au laboratoire, on met le parasite en évidence dans des prélèvements effectués à la curette ou par la méthode de la cellophane adhésive, sans avoir lavé la peau depuis au moins 24 h (le lavage et enlève les champignons). La cellophane adhésive est collée, sans préparation, sur une lame ; le produit de raclage est délayé dans de la potasse à 10 % ou dans la potasse au blancophor, ou dans du lactophénol au bleu C4B. L'examen à G= 100 (en microscopie à fluorescence si on a utilisé le blancophor) révèle la présence de courts filaments et, surtout, de levure rassemblées en grappes de raisins (Euzeby, 1994).

### III.1.2.2. Examen direct des prélèvements profonds

Des étalements sur lame seront réalisés à partir du pus d'abcès, des liquides de ponction (liquide pleural, articulaire, ...), ou des produits de raclage des lésions. De même, le liquide de lavage broncho- ou bronchiolo-alvéolaire (LBA) sera cytocentrifugé. Enfin, des appositions sur lame seront réalisées à partir des fragments biopsiques (Bouchara et *al.*, 2010).

Les coupes histologiques sont colorées par les méthodes habituelles; les autres prélèvements sont examinés directement, entre lame et lamelle, dans un liquide éclaircissant : après dilacération des débris solides et étalement du matériel liquide et des fèces (squames, débris d'ongles ou griffes), on éclaircit par la potasse à 20 ou 30%; pour les liquides divers et exsudats, on utilise le lacto-phénol ou la potasse à 10%. Si une coloration s'avérait utile, il faudrait utiliser le bleu de toluidine, le bleu coton acétique, ou le lugol, sans fixation préalables en mélange avec le liquide d'éclaircissement. La coloration du matériel fixé utilise le gram ou le Giemsa (Euzeby, 1994).

Tableau 5: Modalités des prélèvements selon la localisation superficielle ou profonde des levures (Bouchara et al., 2010).

Clinique et localisation	Prélèvement	Conditionnement (volume minimal)	Conservation en cas d'acheminement différé
<b>Lésions superficielles</b>			
Lésions cutanées sèches et ongles (périorionyx secs)	Curette de Brocq, vaccinostyle, ciseaux (Scotch®-test pour une recherche de pityriasis versicolor)	Recueil du produit de raclage en flacon stérile	1-3 jours à + 4°C
Lésions suintantes : plis, périorionyx avec pus, muqueuses et orifices naturels	Écouvillonnage	Plusieurs écouvillons stériles	< 24 h à + 4°C
Pustules, abcès	Curette (gratter) et écouvillonnage	Recueil du pus d'abcès en flacon stérile, écouvillons stériles	< 24 h à + 4°C
<b>Lésions sous-cutanées ou profondes</b>			
Nodules sous-cutanés, lésions sous-cutanées ou cavités (sinus,...), liquides biologiques ou produits de sécrétions	Biopsie	Recueil en flacon stérile	< 24 h à + 4°C
Broncho-pulmonaires	Lavage bronchiolo-alvéolaire (LBA), aspiration bronchique	Recueil en flacon stérile (20 ml)	< 24 h à + 4°C
Pleurales	Liquide de ponction	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Articulaires	Liquide de ponction	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Péritonéales	Liquide de dialyse, redons, drains	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Cérébrales	LCR	Recueil en flacon stérile (1 ml)	Traitement immédiat (< 2 h)
Tissus profonds (foie,...)	Biopsie	Partage en 2 flacons, un pour la mycologie, l'autre pour l'anatomo-pathologie	< 24 h à + 4°C
Septicémies	Sang, cathéters	Hémocultures Flacons stériles (5 à 10 ml)	< 24 h à température ambiante

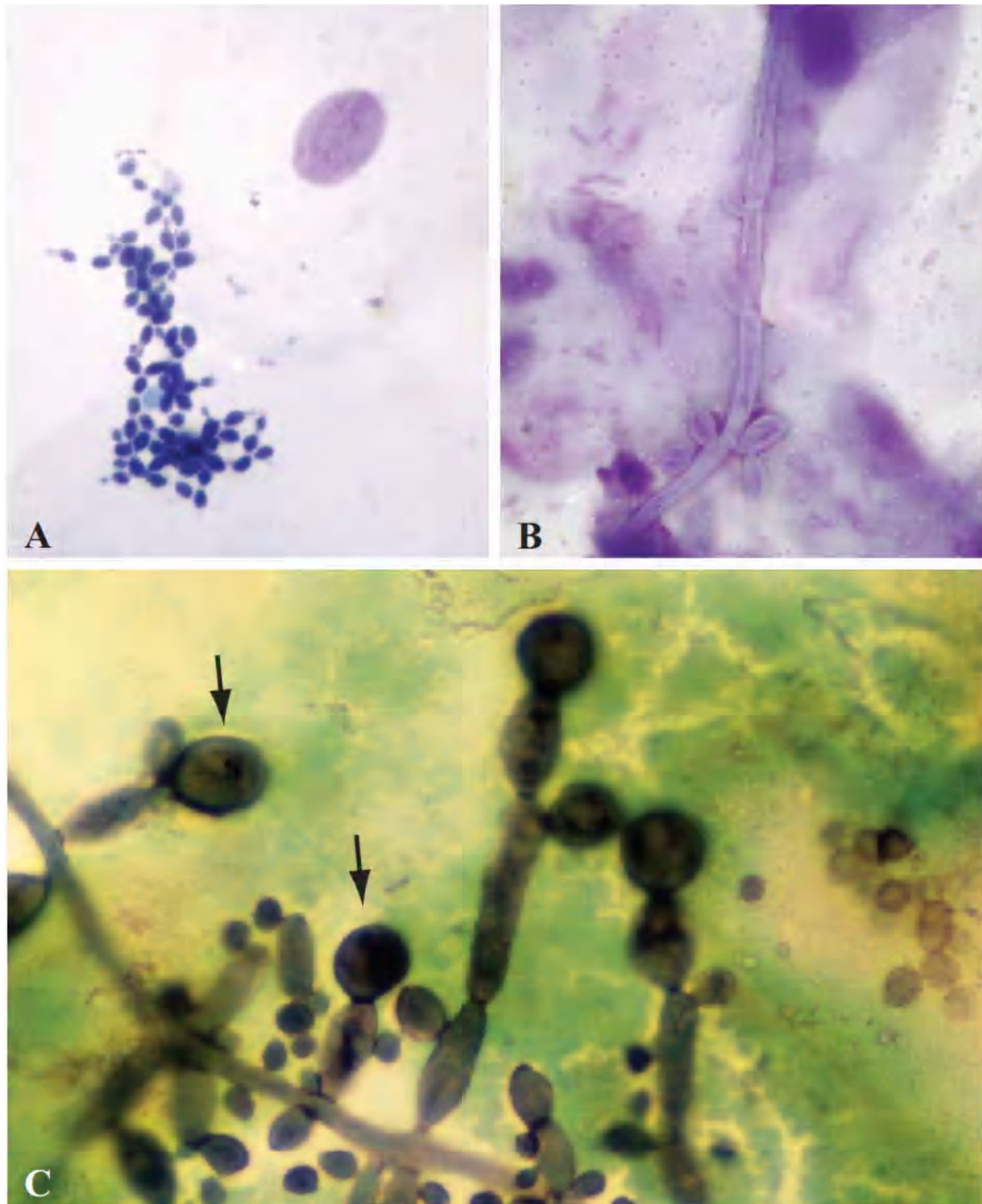


Figure 34 : Examen direct des prélèvements superficiels – muqueuses (Bouchara *et al.*, 2010).

Coloration de May-Grunwald Giemsa sur frottis buccal (A) montrant des amas de blastospores ovales, parfois bourgeonnantes.

Coloration de May-Grünwald Giemsa sur frottis vaginal (B) montrant des filaments mycéliens septés, avec formation de blastospores au sommet des articles. Imprégnation argentique de Gomori-Grocott sur prélèvement buccal (C). Noter la présence de filaments mycéliens réguliers desquels naissent des blastospores organisées en pseudofilaments, se terminant parfois par des chlamydospores (flèches).



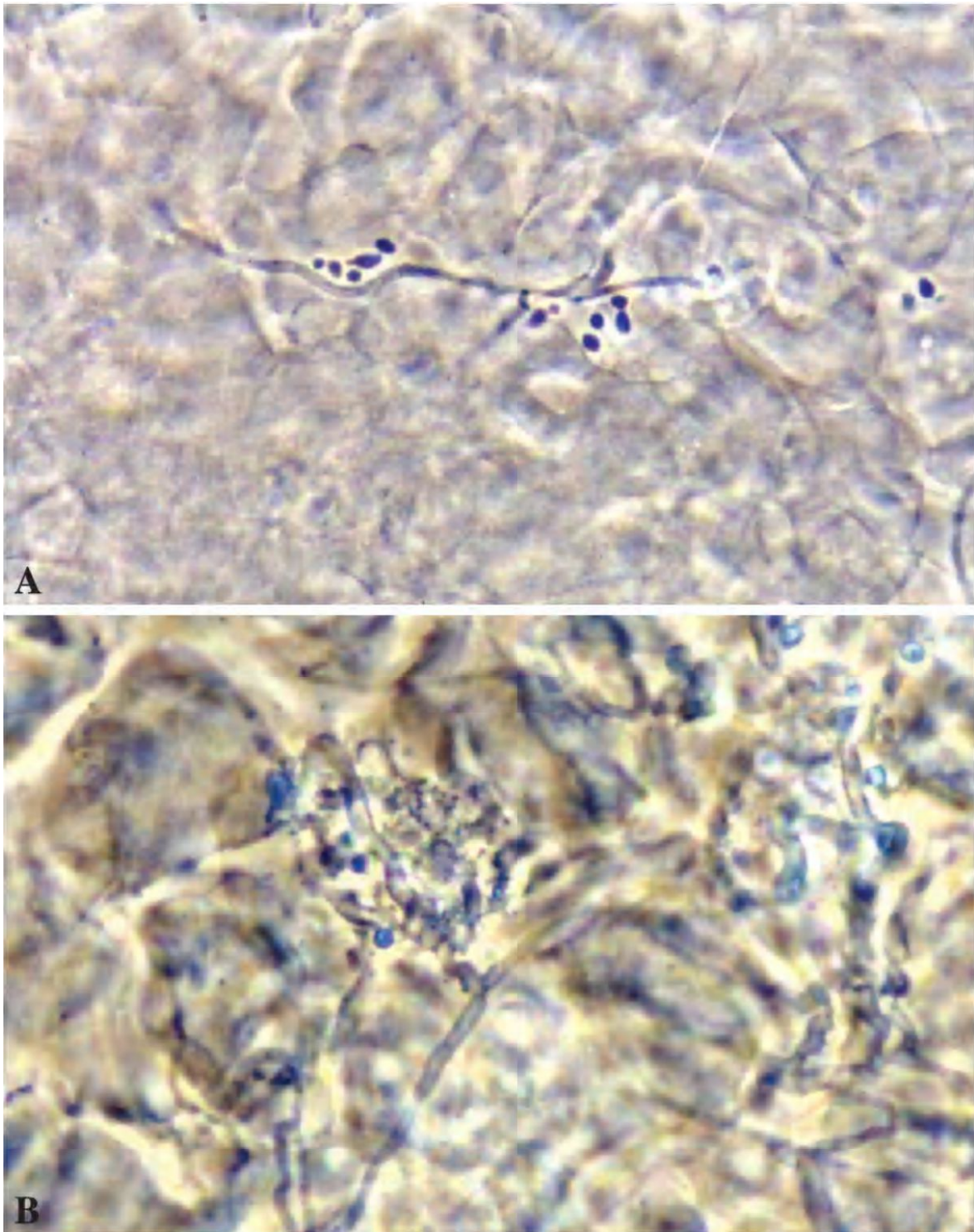


Figure 35 : Examen direct des prélèvements superficiels – peau et phanères (Bouchara et *al.*, 2010).

*A* : Prélèvement sous-ombilical chez un nouveau-né présentant une lésion érythémateuse du siège s'étendant au périnée et à la région sous-ombilicale. On observe à l'examen direct la présence de blastospores ovoïdes, parfois bourgeonnantes, et de filaments mycéliens septés. La mise en culture a permis l'isolement d'un *Candida albicans*.

*B* : Prélèvement d'ongle chez une personne âgée diabétique présentant un onyxis à *Candida kefyr*. L'examen direct montre la présence de filaments mycéliens septés.

Les frottis, fixés à la chaleur ou l'alcool, sont colorés au MGG (Figure 36) ou selon la technique d'imprégnation argentique de Gomori-Grocott (Figure 37). La mise en évidence de levures avec ou sans filaments au sein de ces produits pathologiques normalement stériles permet d'affirmer le statut parasitaire de ces levures.

Un examen direct doit également être réalisé, parallèlement aux cultures, sur le liquide de conservation des greffons conformément à la réglementation (Bouchara et *al.*, 2010).

#### Pour l'examen direct des cryptocoques:

La mise en évidence directe du parasite est possible: en cas de lésions ouvertes: par examen de frottis confectionnés par apposition ou des exsudats accessibles (jetage, sérosité des ulcères...). En l'absence de telles lésions, on examinera, selon la symptomatologie observée :

1. les expectorations (prélevées par écouvillonnage, ou par lavage trachéal et broncho-alvéolaire); ou, encore, provoquées par inhalation d'un aérosol de sérum salé hypertonique (3 %) après avoir nettoyé la bouche (sérum salé) pour éviter la pollution du matériel recueilli, par des germes banals de la cavité buccale ;
2. les urines et le liquide céphalo-rachidien, le sang et chez les vaches, le lait, apparemment normal ou la sécrétion mammaire modifiée. Tous ces liquides sont soumis à centrifugation et c'est dans le culot de centrifugation qu'on effectue la recherche. Eventuellement, des biopsies ou ponctions-biopsies pourront être effectuées.
3. Les expectorations et le pus peuvent être examinés sans coloration, simplement dilués en lactophénol ou dans l'encre de Chine à 33 %. En ce qui concerne la cryptococcose pulmonaire, une bonne méthode de mise en évidence du parasite serait la coloration de frottis recueillis par bronchoscopie, par biopsie trans-bronchique, ou par aspiration trans-thoracique à l'aiguille, en utilisant le colorant de Riu.
4. Les urines sont examinées de façon semblable, en opérant sur des quantités pouvant aller jusqu'à un litre, et filtrées sur membrane. L'examen du sang, du liquide céphalo-rachidien, du lait, se fait, après centrifugation, par mélange au culot, d'encre de Chine: les levures apparaissent enveloppées d'un halo réfringent, correspondant à la capsule (Euzeby, 1994).

### III.2. Apport de l'examen anatomo-pathologique

L'examen anatomo-pathologique est indispensable pour les prélèvements tissulaires. La coloration par l'acide periodique-Schiff (PAS) et l'imprégnation argentique selon Gomori-Grocott sont les techniques de coloration les plus utilisées. La coloration par l'hématéine-éosine-safran (HES) permet d'apprécier, en plus, la réaction tissulaire de l'hôte vis-à-vis du champignon (Figures 38 et 39). Le mucicarmin et le bleu alcian (Figure 40) sont particulièrement indiqués pour mettre en évidence la capsule de *C. neoformans*.

L'immunohistochimie peut aussi être contributive au diagnostic pour préciser la nature de la levure dans les tissus. Elle fait appel à des techniques d'immunofluorescence ou immunoenzymatiques (peroxydase) réalisées à l'aide d'immunsérums polyclonaux ou d'anticorps monoclonaux (anti-Candida, anti-Cryptococcus) (Bouchara et *al.*, 2010).

Pour l'ensemble des *Candida* parasites de l'homme et des animaux, on peut observer, dans les lésions, 3 aspects morphologiques:

- levures isolées, arrondies ou ovalaires de 2 à 4  $\mu$  et jusqu'à 5-7  $\mu$  de longueur dans leur grand axe, à paroi mince, non encapsulées et facilement identifiables par la présence sur la plupart d'entre elles, d'un bourgeon polaire "petites levure".
- pseudo-mycélium courtes chaînettes de 5 à 10 levures, alignées bout à bout et présentant des formes de bourgeonnement terminales ou latérales allongées, avec, à l'union des bourgeons, une constriction, dans ce dernier cas, on peut observer une ramification (rare en lésions). La pseudo-filamentation des levures du

genre *Candida* est, d'après LANGERON et TALICE cité par Euzeby (1994), caractérisée par des chaînes de blastopores naissant à la jonction de cellules pseudo-hyphales adjacentes. La présence de ces pseudo-filaments est intéressante à noter, pour deux raisons, ils sont très caractéristiques, au moins par leur abondance, de l'espèce *C. albicans*; ils signent une activité pathogène élevée du parasite.

- mycélium vrai (hyphes candidiens), résultant d'abord de la germination d'une levure en un court tube germinatif (phénomène de blastèse), puis de l'allongement de cette ébauche filamenteuse pour former un hyphe dont la longueur atteint de 120 à 180  $\mu$  et à l'origine duquel, il n'y a pas de constriction. La blastèse est caractéristique de *C. albicans*; sous la forme filamenteuse, ce parasite est très pathogène. Les autres espèces de *Candida* ne filamentent pas ou ne produisent qu'un court tube germinatif. Le mécanisme de la filamentation réside dans l'inhibition de l'enzyme régissant la multiplication cellulaire, une disulfure-réductase, qui réduit les ponts disulfures - S-S- à l'état de sulfhydriles -S H. La multiplication de la levure est, alors interrompue, tandis que la croissance se poursuit et engendre un tube germinatif.

- Dans les prélèvements épidermiques, l'invasion des follicules pileux est parfois constatée: confusion possible avec les dermatophytes (Euzeby, 1994).

### III.3. La culture

À l'exception des *Malassezia* lipodépendants, les levures rencontrées chez l'homme peuvent pousser sur les milieux de culture utilisés en bactériologie (gélouses ordinaires, gélouses au sang, bouillon coeur-cerveille...). Toutefois, le milieu de Sabouraud est le plus adapté. Les boîtes de Pétri offrent une surface d'ensemencement plus importante que les tubes, elles permettent de bien isoler les colonies et facilitent la détection des associations de levures. Par contre, elles comportent, lors de l'ensemencement et de la manipulation des boîtes, un risque de contamination par des spores aéroportées de moisissures environnementales. Il convient de souligner que les gélouses en boîte de Pétri se dessèchent assez rapidement et ne permettent pas une incubation prolongée. Leur utilisation est déconseillée si la culture excède 3 semaines (recherche de cryptocoques) (Bouchara et al., 2010).

En général pour les *Candida*:

- ☒ S'il s'agit d'ensemencer des productions pathologiques souillées, on utilise:
  - soit le milieu de Raulin; deux passages
  - soit le milieu d'épreuve de Sabouraud, glucosé à 2% et renfermant des antibiotiques antibactériens et de l'actidione ; celle-ci a l'avantage d'inhiber les moisissures et aussi d'orienter la diagnose en raison de son action retardatrice sur le développement de certaines espèces de *Candida*.
  - soit, encore le milieu liquide "Y-M-B" de Wickerham (extrait de levure de bière, extrait de malt, peptone et glucose) ; ce milieu est utilisé à pH 5-6 (l'abaissement du pH à 3,7 lui confère des propriétés enichissantes).
- ☒ s'il s'agit d'hémoculture, ou de culture du liquide céphalo-rachidien, avec ensemencement de matériel prélevé aseptiquement, on utilise le milieu de Sabouraud liquide, auquel il est recommandé, pour faciliter le développement, d'ajouter 10 % d'une solution glucosée à 20 %. Il faut ensemencer un volume sanguin de l'ordre de 5 à 10 ml de sang ditraté dans 100 ml de substrat, dans un ballon. Pour l'hémoculture, on utilise aussi une gélouse au sang.
  - L'ensemencement en milieu solide est exécuté en un tracé sinusoïdal s'il s'agit d'un matériel liquide, ou de façon parcellaire, s'il s'agit de squames ou de débris d'ongles.
  - L'ensemencement en milieu liquide s'effectue par dépôt du matériel à la surface du milieu.
  - L'incubation est opérée à 25°C ou à 37°C (cas des hémocultures) pendant 48 heures.
  - L'aération est nécessaire au développement des *Candida* ne pas capuchonner les tubes et, si on utilise des tubes à bouchon vissé, ne pas serrer les bouchons (Euzeby, 1994).



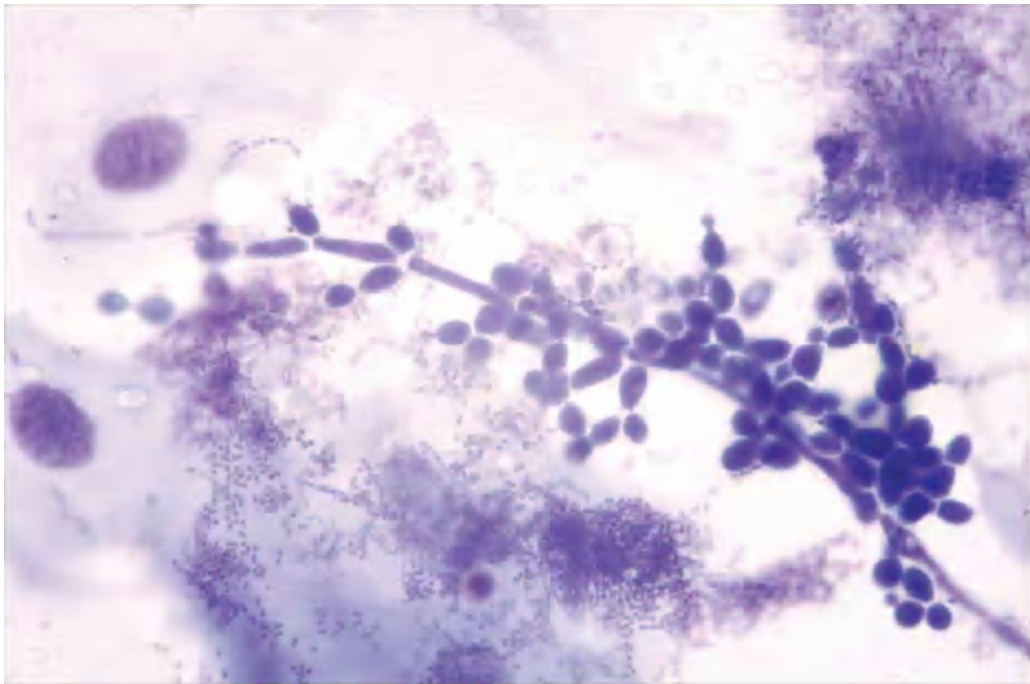


Figure 36 : Examen direct des prélèvements superficiels - blastospores et pseudofilaments sur frottis buccal coloré au MGG (Bouchara et *al.*, 2010)



Figure 37: Examen direct des prélèvements superficiels - blastospores et filaments mycéliens sur frottis de lésion cutanée coloré au Gomori-Grocott (Bouchara et *al.*, 2010)

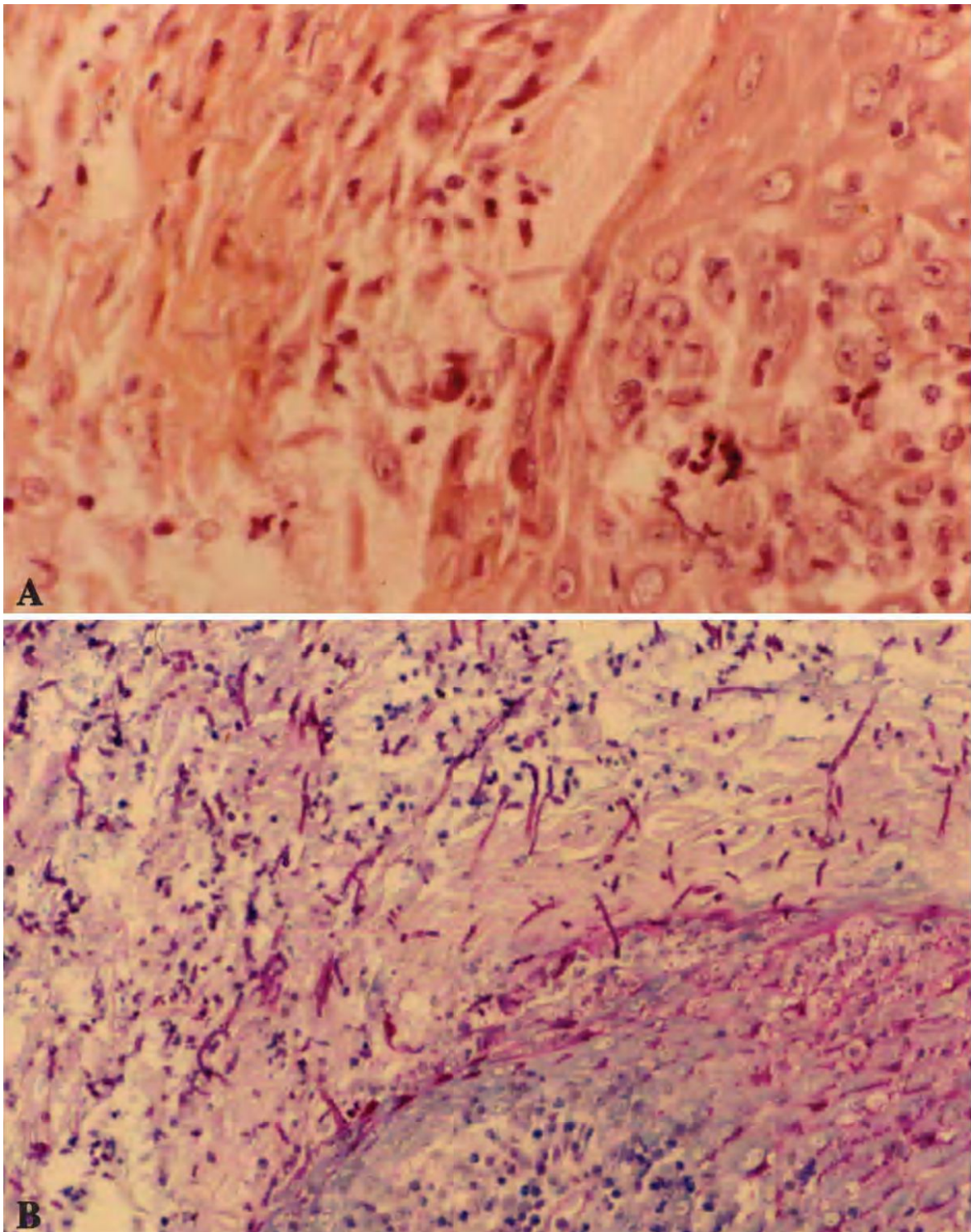
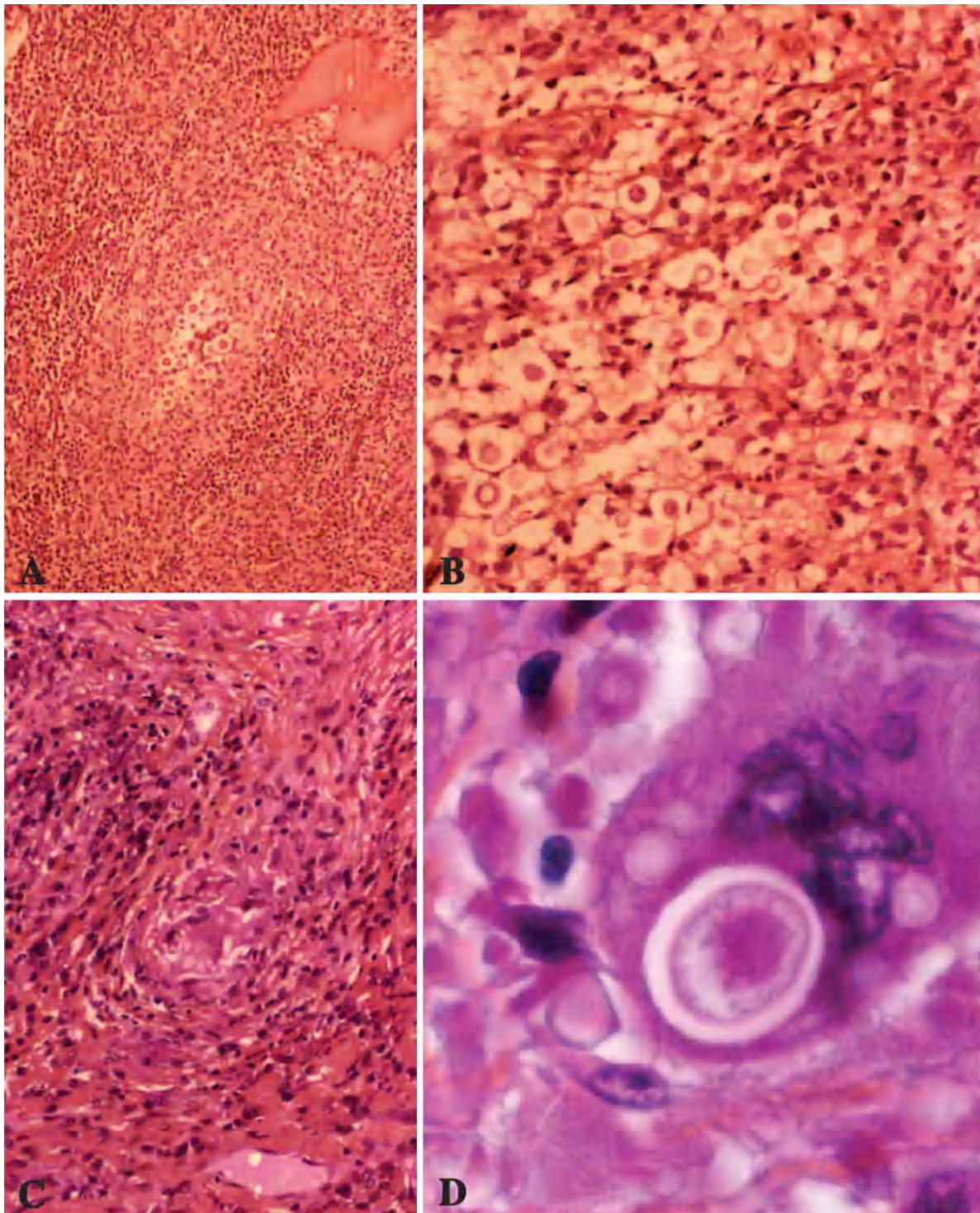


Figure 38 : Examen anatomo-pathologique dans une candidose oesophagienne (Bouchara et *al.*, 2010)





**Figure 39: Examen anatomo-pathologique de biopsies colorées à l'HES lors de cryptococcoses (Bouchara et al., 2010)**

*Prélèvement ganglionnaire, objectif 10 (A) et 40 (B) : Le sinus marginal est envahi par des éléments extracellulaires, de taille variable, parfois bourgeonnants, entourés d'une capsule souvent épaisse (3 à 5  $\mu\text{m}$ ). On note l'absence de réaction inflammatoire.*

*Prélèvement pulmonaire, objectif 10 (C) et 100 (D) : Le tissu est le siège d'une réaction inflammatoire histiocyttaire à cellules géantes qui renferment des éléments arrondis, de taille variable, entourés d'une très fine capsule réfringente.*

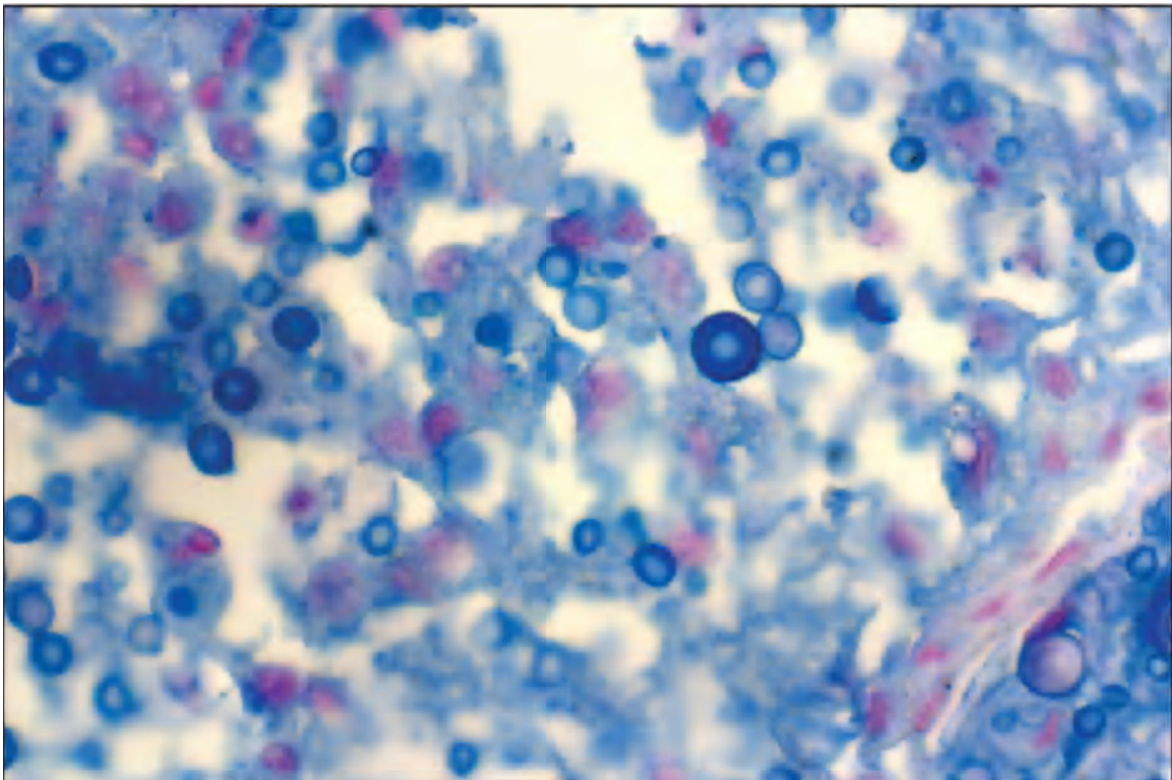


Figure 40: Cryptococcose - Mise en évidence de la capsule à l'examen anatomo-pathologique par coloration au bleu alcian (Bouchara et al., 2010)

### III.3.1. Ensemencement

Pour les produits biologiques liquides, l'ensemencement se fait de façon stérile, par épuisement progressif du liquide (en quadrants ou en étoile). La calibration de l'inoculum (par exemple 100  $\mu$ l pour les urines) permet de dénombrer les levures. Les produits biologiques plus épais tels que le liquide bronchique (aspiration), gastrique ou synovial, et les crachats doivent être préalablement fluidifiés à l'aide d'un agent mucolytique (digest-EUR<sup>®</sup>, Eurobio).

Après broyage des prélèvements biopsiques au potter stérile, des fragments seront déposés sur la gélose.

Le sang est le plus souvent recueilli directement dans les flacons d'hémoculture. La technique de lyse-centrifugation (Isolator<sup>®</sup>, Oxoid) est parfois utilisée pour concentrer les éléments fongiques. Elle permet de libérer les levures contenues dans les cellules phagocytaires de l'hôte, et d'inactiver le complément et autres agents antimicrobiens qui pourraient freiner la croissance du champignon. Cette technique, de réalisation délicate, expose au risque de contamination du manipulateur par les produits sanguins. Elle est donc essentiellement utilisée pour la recherche des formes « levures » d'*Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* (Bouchara et al., 2010).

- ✚ **Croissance à 37°C:** La majorité des levures se développe à une température comprise entre 20 et 28°C. Certaines peuvent pousser jusqu'à 46°C (parmi les genres *Kluyveromyces* ou *Hansenula*). La possibilité de croissance à 37°C pour une levure est un facteur de pathogénicité pour l'espèce humaine. On peut donc tester la croissance d'une levure à 37°C pour vérifier son pouvoir pathogène (Koenig, 1995).



### III.3.2. Milieux de culture

#### a. Milieux standard

Le milieu gélosé de Sabouraud additionné de chloramphénicol et/ou de gentamicine est le plus utilisé (Figure 41). On y associe parfois le cycloheximide (Actidione<sup>®</sup>) qui empêche la croissance de nombreuses moisissures susceptibles de contaminer les cultures. Mais ce produit peut inhiber ou freiner aussi la pousse de certaines espèces du genre *Candida* telles que *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. famata*.

La température d'incubation dépendra du site de prélèvement. Pour les prélèvements superficiels, les boîtes de Pétri (ou tubes) seront incubées à température comprise entre 20 et 25°C. Pour les prélèvements profonds, les géloses sont incubées à 37°C. Une durée d'incubation de 24 à 48 h est généralement suffisante pour isoler la majorité des levures appartenant aux genres *Candida* ou *Trichosporon*.

Cependant, pour les produits biologiques issus de prélèvements profonds, et pour les cryptocoques en particulier, une durée d'incubation supérieure à 5 jours, voire d'une à 4 semaines, sera parfois nécessaire (Bouchara et *al.*, 2010).

Cette épreuve consiste à étudier le développement de la levure à identifier, sur milieu renfermant de l'actidione à la concentration (de 0,5 ‰). Cet antibiotique inhibe le développement de certaines levures pendant 24 heures, tandis qu'il n'exerce aucun effet inhibiteur sur d'autres espèces : l'examen des tubes de culture doit être fait après 24 heures d'incubation à 27-30°C seul le résultat de 24 heures à une importance taxonomique car, plus tard, l'inhibition peut cesser (Euzeby, 1994).

Il faut repiquer les cultures provenant des milieux d'isolement sur des milieux spéciaux capables de révéler tel ou tel caractère des *Candida* à étudier:

- ✚ Milieux propres à la formation de chlamydo-spores (caractéristiques de *C. albicans*) ces milieux sont des milieux pauvres, de faible valeur nutritive : rapport C/N élevé. Parmi les plus utilisés de ces substrats, citent: le milieu PCB à l'extrait de pommes de terre, carottes et bile de bœuf, le milieu gélosé à la farine de maïs, le milieu de Taschdjian ou RAT à la crème de riz (Rice Agar Tween) ce milieu est inhibé par la lumière l'addition de tween 80, agent tensioactif, favorise l'étalement de la culture et la mise en évidence des éventuelles chlamydo-spores. L'ensemencement est opéré en tubes en sinusoïde profonde. Le résultat de l'épreuve est vérifié au terme de 48 heures d'incubation à 27°C. Mais on peut aussi utiliser des boîtes de Petri, avec dépôt d'une suspension de blastospores à la surface du milieu ; après le temps d'incubation nécessaire, on recouvre la culture formée, d'une lamelle et on observe la boîte in situ. Il est intéressant de noter que les facteurs favorisant la formation de mycélium favorisent aussi celle des chlamydo-spores; le glucose inhibe cette formation, tandis que la N-acétyl glucosamine la favorise les chlamydo-spores peuvent, ensuite, germer, tout comme les levures. Cependant leur longévité est peu élevée ce qui laisse à penser qu'elles sont plus le produit d'une différenciation des filaments sous l'effet d'une carence alimentaire que des spores véritables. Les chlamydo-spores ont la particularité d'être acidophiles et acido-résistantes Euzeby (1969-1994).
- ✚ milieux propres à la formation de pseudo-filaments notamment gélose à la farine de maïs. Ce milieu favorise aussi la formation des chlamydo-spores, mais celles-ci peuvent être dissimulées sous l'abondance des pseudo-filaments. Les conditions d'incubation sont semblables à celles qui assurent la chlamydo-sporeulation. En règle générale, les polysaccharides (glycogène, amidon) utilisés comme seules sources de carbone favorisent la formation de pseudo-filaments, tout comme le maltose, tandis que le lactose favorise les levures.

- ✚ Milieux de blastèse ce sont des milieux riches en protéines. Le plus commun est le sérum une goutte de suspension de culture de 24 à 48 heures dans 0,5 ml de sérum frais de provenances diverses: Homme, chien, cheval, cobaye, lapin, boeuf, porc. L'épreuve de la filamentation en sérum est réalisée en tubes à hémolyse ou sur lame; germination des levures avec formation de tubes germinatifs de 20 à 30  $\mu\text{m}$  de longueur. Le sérum peut être substitué par du blanc d'oeuf, du glucose à l'extrait de boeuf, du Sabouraud liquide glucosé à 1% ou du milieu Y.M.B à l'isoconazole, celui-ci étant ajouté au milieu après 3 heures d'incubation (100  $\gamma$  par ml). Le meilleur substrat pour l'épreuve de blastèse est le sérum de porc, dont le facteur de filamentation paraît être une albumine, la transferrine plasmatique ; au contraire, la cystéine inhibe le phénomène. Divers liquides organiques pouvant être colonisés in vivo par *C. albicans* sont favorables à la filamentation: salive, liquide céphalo-rachidien ; mais les globulines anticorps contenus dans ces liquides et dans le sang des sujets infectés s'opposent au processus. Au cours du phénomène, le champignon passe de l'aérobiose à un processus métabolique fermentatif. La filamentation est une manifestation de la nature saprophytique des *Candida*, mais elle est aussi en rapport avec leur pathogénicité: les souches pathogènes filamentent plus rapidement que les souches non pathogènes. En sérum, à 37°, les filaments formés s'agglomèrent, mais ils se dispersent s'ils sont transportés dans un immun-sérum ; l'activité "dispersante" d'un immun-sérum est en rapport avec les lésions de la candidose Euzeby (1969-1994).

Pour les *Candida*: macroscopiquement en milieux liquides, le développement s'accomplit dans la masse et les colonies forment un louche dans les tubes. De plus, il peut se développer, en surface, une nappe plus ou moins épaisse, formant un voile. Ce voile est qualifié de:

- membraneux lorsqu'il est épais et continu,
- aéré: lorsqu'il est plus mince et discontinu,
- annelé lorsqu'il est très mince, pelliculaire.

Lorsqu'aucun voile n'est visible à la surface du liquide, c'est que la nappe superficielle s'est fragmentée et est tombée dans le fond du tube, où se dépose, alors, un sédiment (Euzeby, 1994).

#### **b. Milieux fluorogéniques pour isolement et identification des levures**

Le milieu Fluoroplate<sup>®</sup> *Candida* (Merck) permet, après 24 à 48 heures d'incubation, la détection et l'identification directe de *C. albicans* par la fluorescence bleutée des colonies lorsque les boîtes sont examinées sous lumière ultra-violette à 366 nm (Bouchara et al., 2010).

#### **c. Milieux chromogéniques**

Comme dans le domaine de la bactériologie médicale, la mycologie a bénéficié d'importants progrès en matière de milieux d'isolement et d'identification avec la mise à disposition de géloses chromogéniques (Figures 41). Ces milieux confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière, variable en fonction de l'espèce. Cette coloration repose sur l'hydrolyse d'un substrat chromogénique sous l'effet d'une enzyme de type hexosaminidase plus ou moins spécifique de telle ou telle espèce (exemple N-acétyl- 3-D-galactosaminidase spécifique de *C. albicans*) (Bouchara et al., 2010).

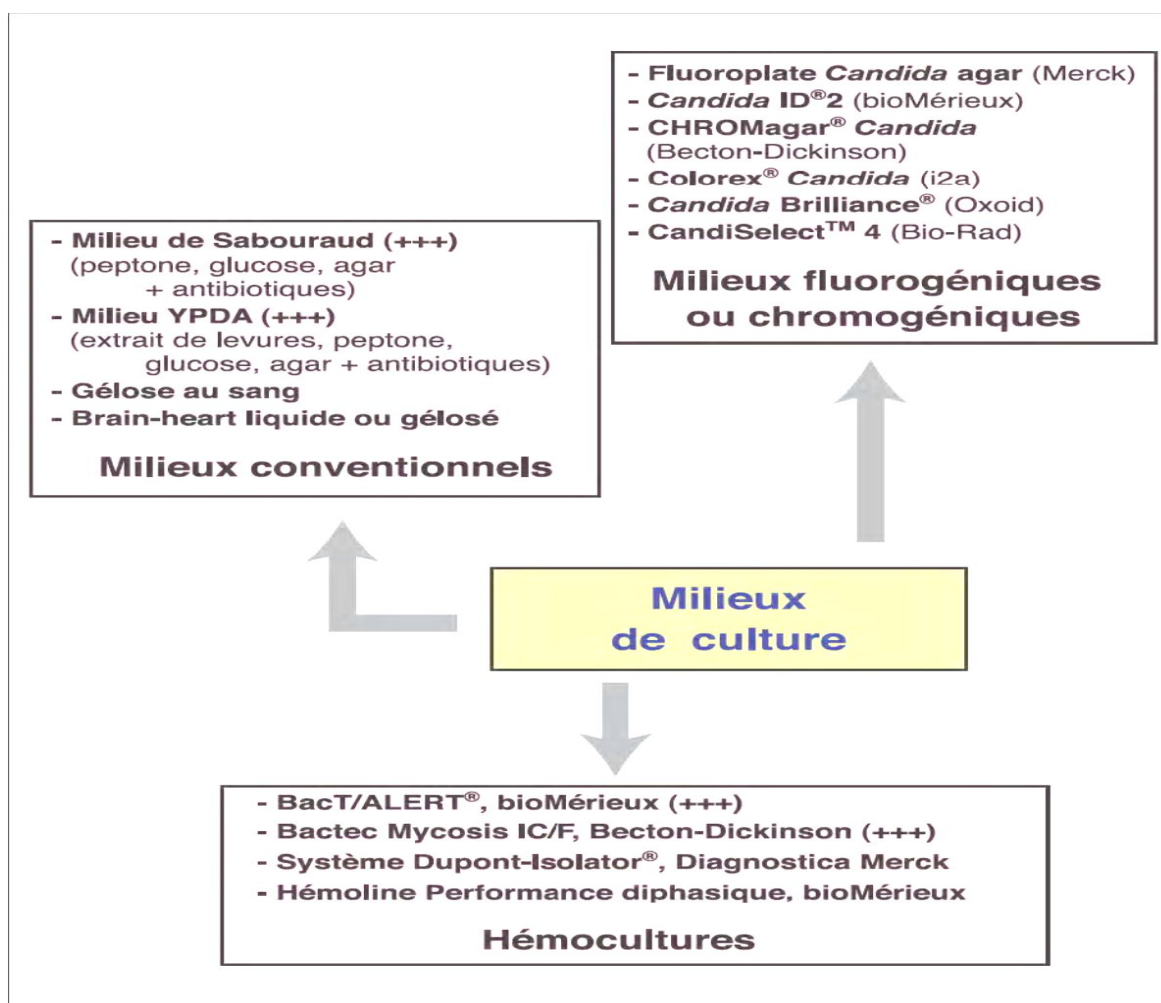


Figure 41: Milieux de culture pour isolement et identification des levures (Bouchara et al., 2010)

Les milieux chromogéniques sont particulièrement indiqués pour le diagnostic des candidoses, Ils permettent d'identifier directement *C. albicans* dont les colonies se colorent en bleu (*Candida* ID<sup>®</sup>2, bioMérieux), en vert (CHROMagar<sup>®</sup> *Candida*, BectonDickinson *Candida* Brilliance<sup>®</sup>, Oxoid) ou encore en rose violet (CandiSelect4, Bio- Rad). Sur CHROMagar<sup>®</sup> *Candida*, des nuances dans l'intensité de la coloration verte sont signalées, et *C. dubliniensis* qui est très proche de *C. albicans*, produit aussi des colonies vertes sur ce milieu. De même, les colonies de *C. dubliniensis* ne sont pas différenciables de celles de *C. albicans* sur les autres milieux chromogéniques.

Ces milieux de culture ne permettent donc pas de différencier *C. dubliniensis* de *C. albicans*. En revanche, ils permettent l'identification présomptive d'autres espèces de levures. Ainsi, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. krusei* forment des colonies bleues d'aspects différents sur le milieu CandiSelecttM4 ; *Candida tropicalis*, *C. lusitaniae* et *C. kefyr* forment des colonies roses sur *Candida* ID<sup>®</sup> 2. Sur le milieu *Candida* Brilliance<sup>®</sup>, *C. tropicalis* forme des colonies bleutées et *C. krusei* des colonies roses irrégulières ; sur CHROMagar *Candida*, *C. tropicalis* forme des colonies bleu métallique et *C. krusei* des colonies rose pâle, plutôt rugueuses. L'identification des espèces « non-albicans » sur ces milieux chromogéniques reste cependant présomptive, et il est nécessaire de recourir dans un second temps à des tests complémentaires.



Même si ces milieux sont plus onéreux que les milieux standards, ils permettent une identification directe du complexe *C. albicans/C. dubliniensis* (après 24 à 48 heures de culture) et ils facilitent la détection des associations de levures (Figure 41). À noter que la société ElitechGroup commercialise également un milieu chromogénique (Candichrom II) sur lequel *C. albicans* (et *C. dubliniensis*) produisent des colonies bleues, se différenciant ainsi des autres espèces pour lesquelles les colonies restent incolores (Bouchara et al., 2010).

#### d. Autres milieux

Pour les levures lipodépendantes appartenant au genre *Malassezia*, il convient d'utiliser soit les milieux de Leeming ou de Dixon ou de Caprilli avec de l'huile d'olive, soit le milieu de Sabouraud qu'on recouvrira avant l'ensemencement d'une fine couche d'huile d'olive (Bouchara et al., 2010), ou 10 ml d'huile d'olive par litre de Sabouraud (Guillot, 1999 ; Bouchara et al., 2010). Les *Malassezia* ne se développent pas sur milieux banals. Leur culture exige des huiles végétales ; habituellement on utilise de l'huile d'olive, qui apporte les acides gras de longue chaîne (C12 à C24) dont les champignons assimilent le carbone ; la présence de glucose dans le milieu favorise la culture. Pratiquement, les *Malassezia* sont isolés et entretenus sur milieu de Sabouraud recouvert de 10 % d'huile d'olive mais l'excès d'huile est nocif (Euzeby, 1994).

Les colonies de *Malassezia* poussent en 8 jours. Toutes les espèces poussent à 30°C. Seuls *M. furfur*, *M. sympodialis* et *M. slooffiae* poussent à 37°C pour les espèces lipodépendantes, de même que *M. pachydermatis* qui est le seul *Malassezia* non lipodépendant. En général, pouvoir eutrophisant que les colonies de staphylocoques.

En règle générale, la conservation des cultures sur milieu de Dixon modifié et ne comportant plus de mono-oléate et glycérol. Après 10 jours de croissance à 37°, le tube, bien bouché, et maintenu à la température ambiante : le champignon est encore vivant après 14 mois. En revanche, la conservation, à 4°C est très difficile (Euzeby, 1994).

Pour les *Cryptococcus*, on utilisera le milieu de Sabouraud standard sans cycloheximide (Actidione®), mais la gélose à l'inositol peut s'avérer intéressante pour la recherche de ces levures dans des prélèvements polymicrobiens (Bouchara et al., 2010).

Pour la conservation des souches de genre *Candida*, on peut mettre en suspension les levures dans de l'eau distillée stérile (méthode de Castellani), où elles peuvent survivre pendant 5 à 20 ans ou davantage, à la température ambiante (à l'exception de *C. krusei*). Une autre méthode consiste en l'ensemencement sur gélose simple, sous huile minérale, avec maintien à 10°C: 76 % des souches sont encore viables après 17 ans et 56 % après 20 années. Au moment de les remettre en culture, il faut ensemercer les milieux et les incuber à 37°C (Euzeby, 1994).

#### e. Hémocultures

Pour les hémocultures, il est recommandé d'utiliser un milieu spécifique favorisant la croissance fongique (Bactec® IC/F Mycosis, Becton-Dickinson) avec un système de lecture automatisée fondée sur la mesure du CO<sub>2</sub> produit au cours de la croissance de la levure (automates Bactec®, Becton-Dickson). Le système BacT/ALERT®, bioMérieux), lui aussi automatisé, utilise un même milieu de culture pour la détection des bactéries et des champignons. La détection de la croissance fongique repose sur une méthode colorimétrique (BacT/ALERT®) ou fluorimétrique (Bactec®). Les flacons devront être maintenus dans l'appareil au minimum 2 semaines.

À défaut de méthodes automatisées, les hémocultures pour la bactériologie peuvent être utilisées pour les levures, en particulier les flacons destinés aux bactéries aérobies, car certaines levures comme *C. glabrata* sont incapables de se multiplier en anaérobiose.

L'utilisation du système Isolator® (Lyse-centrifugation), avec la libération des levures intracellulaires par lyse des cellules sanguines, leur concentration par centrifugation, et l'ensemencement

du culot sur des milieux de mycologie, permettrait de raccourcir le délai de culture. Ces milieux pour hémocultures ne permettent pas d'identifier directement les levures. En cas de positivité, il convient de réaliser un repiquage sur un milieu standard ou mieux sur un milieu chromogénique (Bouchara et *al.*, 2010).

#### III.4. Identification des levures au laboratoire

La démarche est résumée dans les Figures 42, et 43. L'identification repose sur la morphologie macroscopique des cultures et l'aspect microscopique (Figures 44 à 46), mais surtout sur des tests physiologiques, immunologiques ou biochimiques (Bouchara et *al.*, 2010).

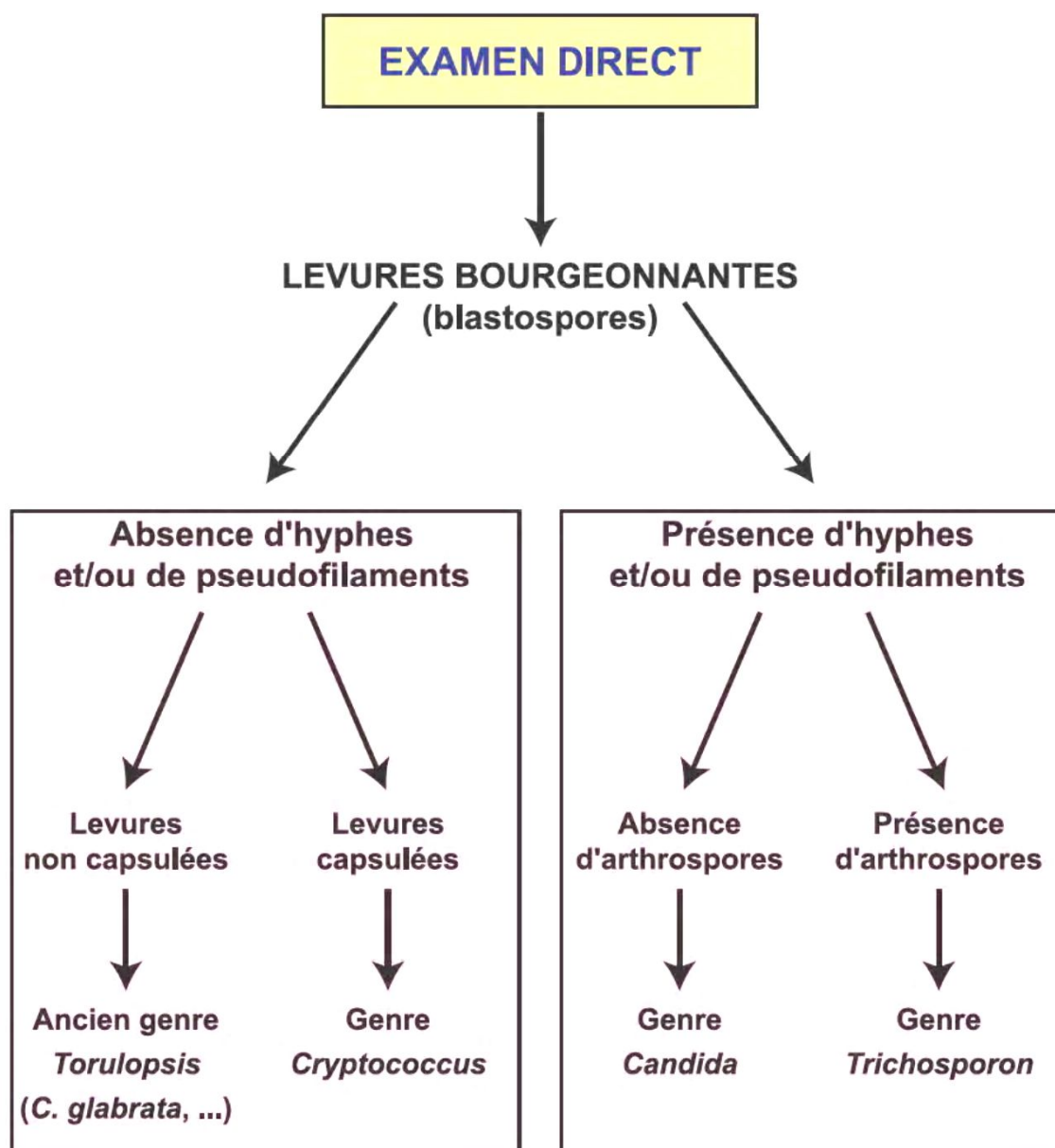
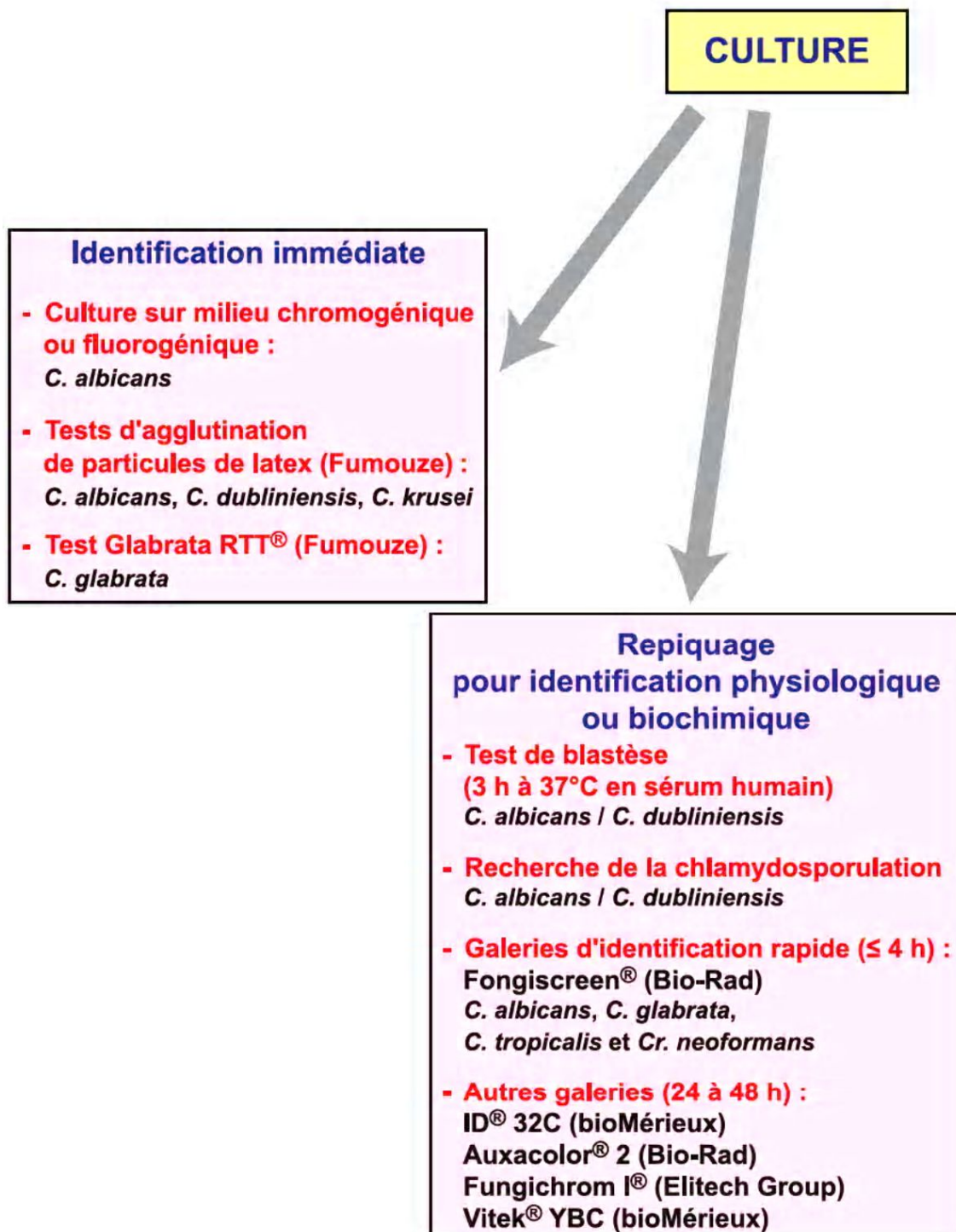


Figure 42 : Démarche diagnostique d'une levure au laboratoire - Examen direct (Bouchara et *al.*, 2010)

Figure 43: Démarche diagnostique d'une levure au laboratoire – Cultures (Bouchara et *al.*, 2010)

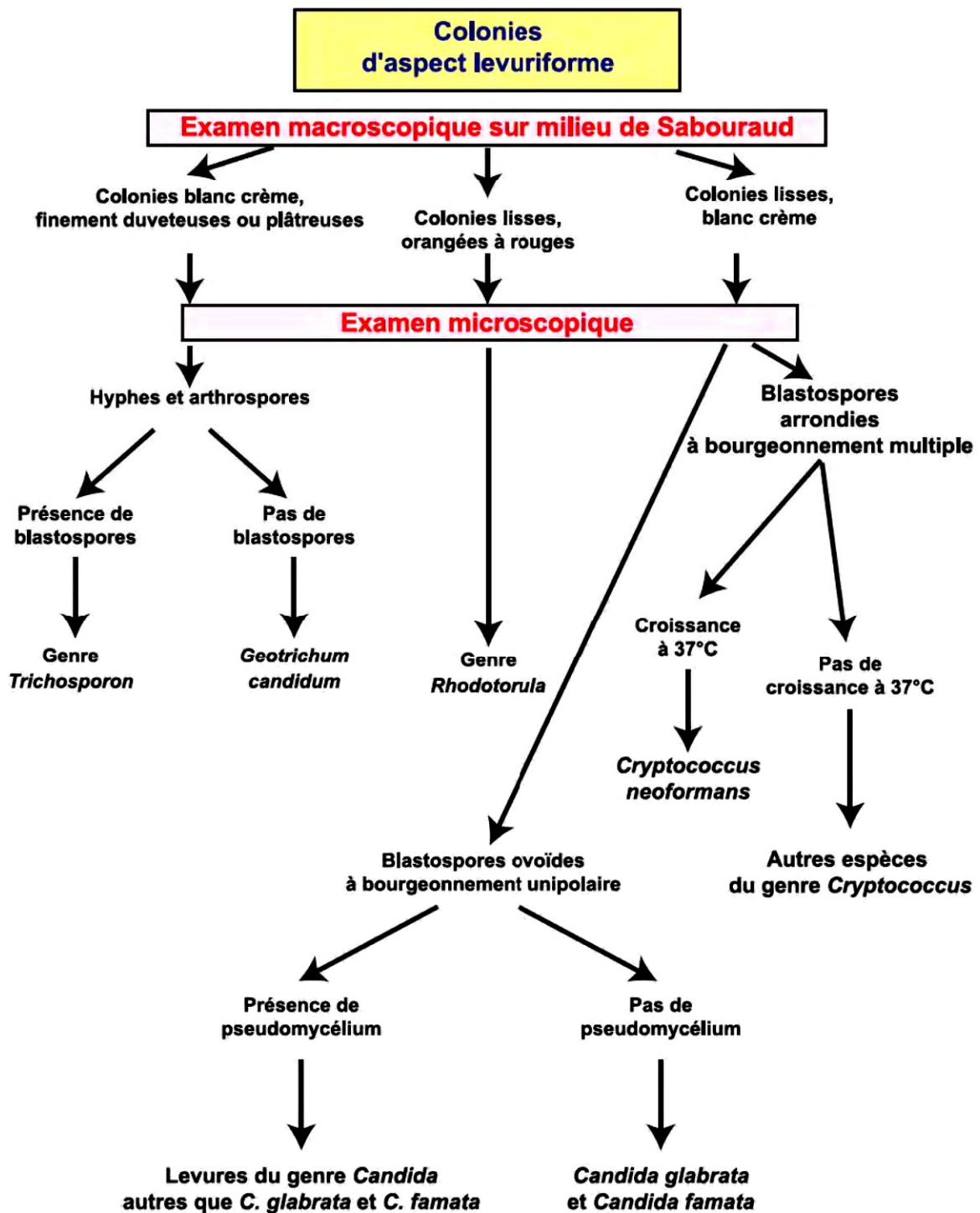


Figure 44 : Arbre d'identification devant une culture d'aspect levuriforme (Bouchara et al., 2010)

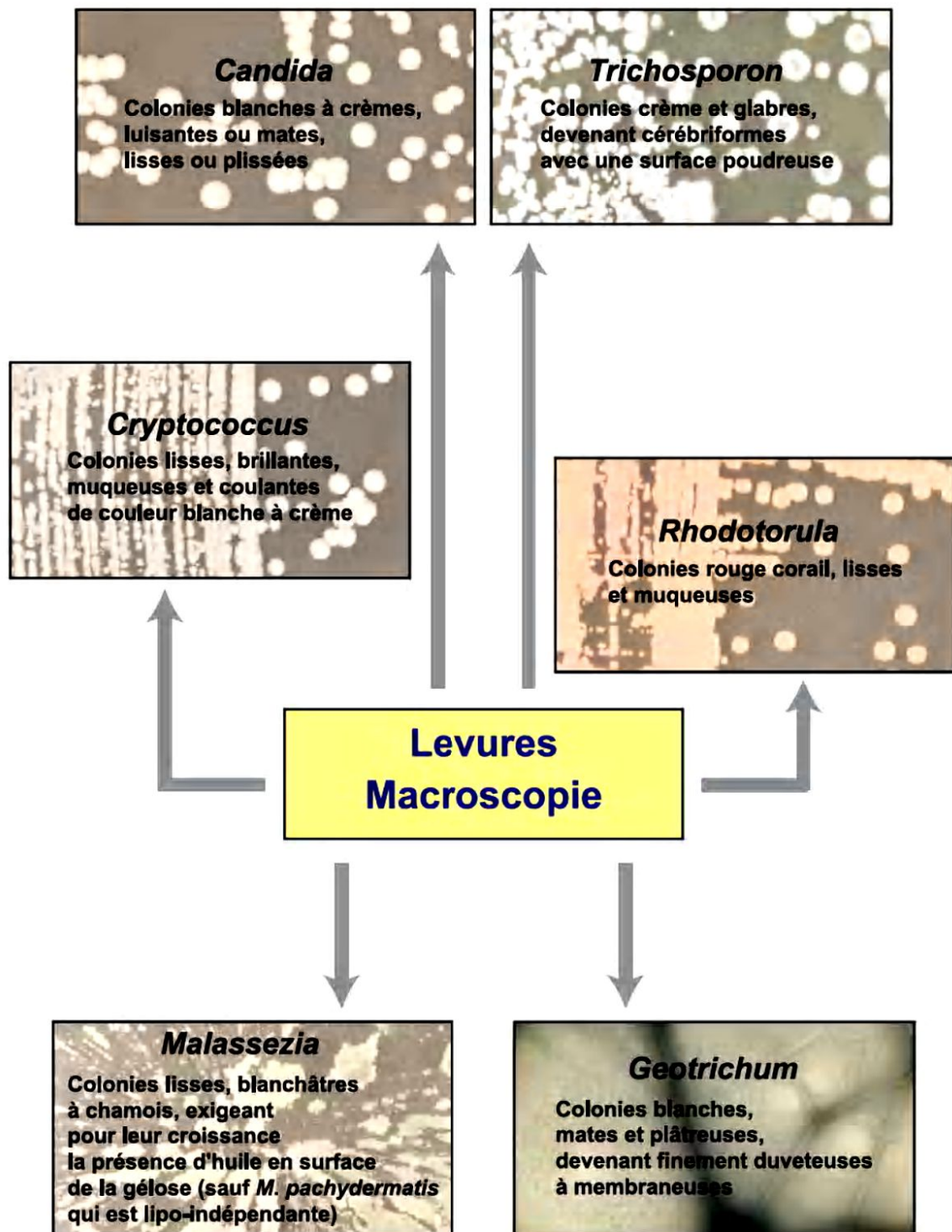


Figure 45 : Aspect macroscopique des principaux genres de levures sur milieu de Sabouraud (Bouchara et al., 2010)



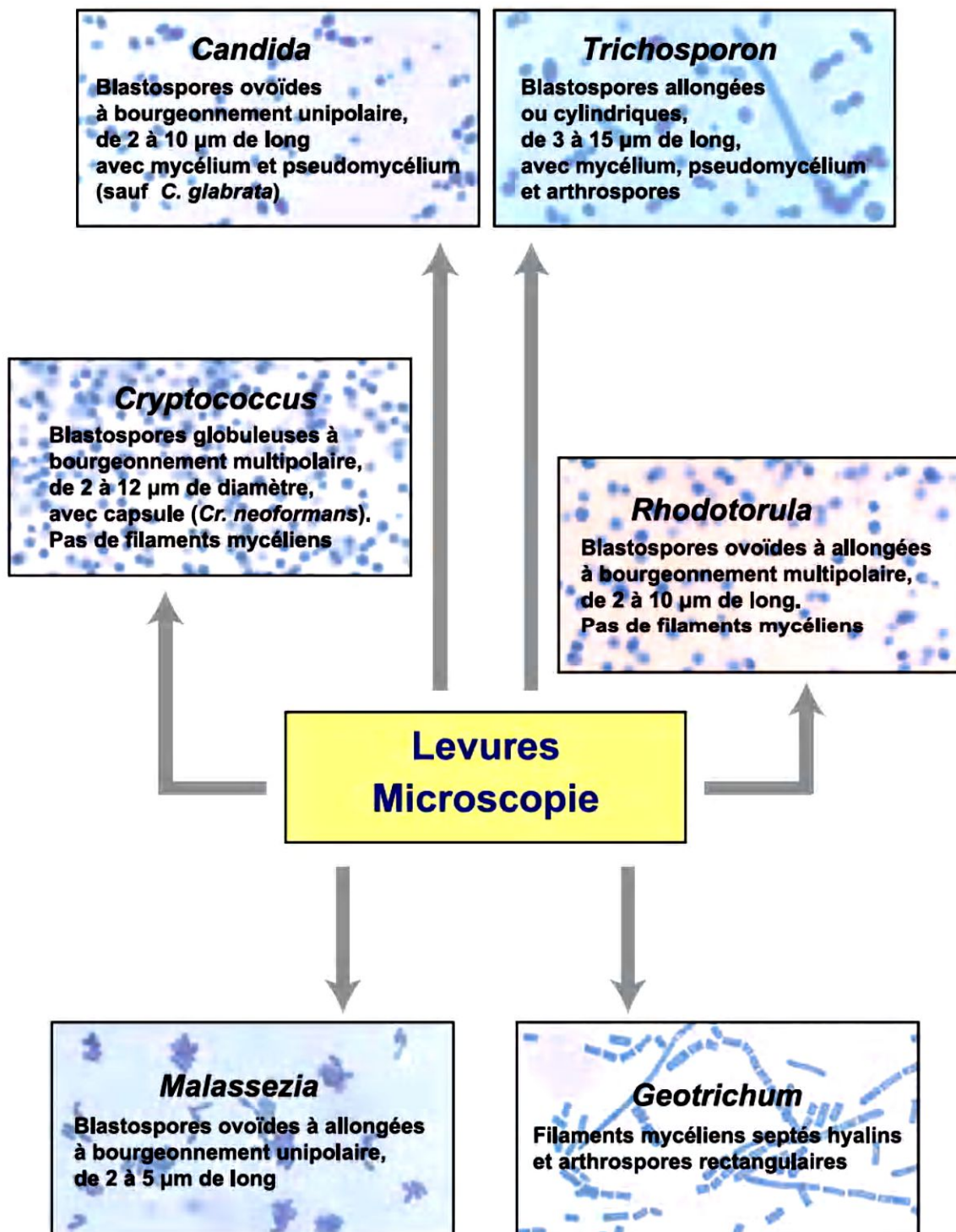


Figure 46 : Aspect microscopique des principaux genres de levures en culture sur milieu de Sabouraud (Bouchara et *al.*, 2010)

L'identification de l'espèce isolée nécessite de disposer de colonies bien individualisées, et un ré-isolement s'avère parfois nécessaire. Par ailleurs, même si un diagnostic de présomption a déjà été posé par isolement sur milieu chromogénique, il est nécessaire de confirmer l'identité de la levure.

En pratique, l'identification fait appel à des caractères morphologiques, mais surtout à des tests physiologiques, biochimiques, ou même immunologiques basés alors sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps monoclonaux. L'identification moléculaire (par analyse protéomique, par PCR multiplex avec des sondes spécifiques d'espèces, ou par hybridation avec des sondes spécifiques d'espèces immobilisées sur des puces à ADN), prometteuse pour l'avenir, n'est pour l'instant réalisée que dans les laboratoires spécialisés (Bouchara et *al.*, 2010).

### III.4.1. Identification de *Candida albicans*

L'identification de la levure isolée comprend dans un premier temps la recherche de l'appartenance à l'espèce *C. albicans*, puisqu'il s'agit de l'espèce la plus fréquemment impliquée dans les levures. Plusieurs techniques peuvent être utilisées, les plus anciennes étant le test de blastèse et la recherche de la chlamydosporulation (Figure 47) (Bouchara et *al.*, 2010).

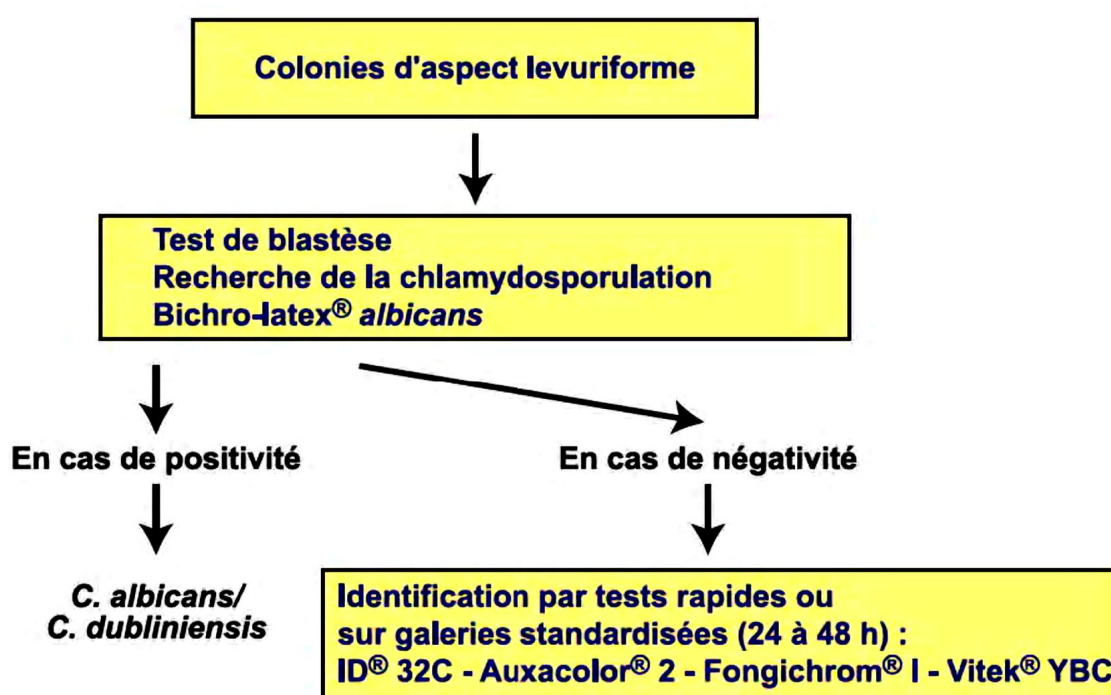


Figure 47: Identification de *Candida albicans* (Bouchara et *al.*, 2010)

#### a. Test de blastèse

Ce test, appelé aussi test de germination, est basé sur le fait que *C. albicans* (mais aussi *C. dubliniensis*) produit en 3 heures à 37°C dans du sérum humain ou animal, un tube germinatif à partir des blastospores (Figure 48).

Ce tube germinatif, fin et flexueux, ne présente pas de constriction à sa base (par différence avec du pseudomycélium de levure qui est formé par bourgeonnement, et présente une cloison à l'émergence de la cellule fille). Il est impératif de ne pas dépasser 3 h car d'autres espèces de levures pourraient alors produire des tubes germinatifs. Ce test peut aussi donner lieu à des faux négatifs et expose, par ailleurs, l'opérateur aux risques liés à l'utilisation de produits sanguins (Bouchara et *al.*, 2010).

#### b. Recherche de la chlamydosporulation

Sur milieu PCB (pomme de terre, carotte, bile) ou RAT (crème de riz, agar, Tween 80), *C. albicans* produit en 24 h à 48 h à 20-25°C des chlamydospores à l'extrémité de pseudofilaments (Figure



49). Il faut cependant noter que *C. dubliniensis* produit lui aussi des chlamydo-spores sur ces milieux. Elles sont plus abondantes et disposées par paires ou par triplets (Bouchara et al., 2010).

En pratique, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri de 55 mm de diamètre. On réalise une suspension d'une colonie de levures dans 1 ml d'eau distillée stérile. Une goutte de cette suspension est déposée au centre de la boîte de Pétri et recouverte d'une lamelle stérile. La boîte est examinée par transparence après 24 à 48 heures d'incubation à 26°C (Bouchet et al., 1989).

✚ Sur milieu de PCB plusieurs techniques possibles:

- ✓ **En tube:** à l'aide d'une spatule, ensemercer à partir du fond du tube, en surface, puis, arrivé au tiers de la pente, couper dans la gélose en faisant une strie jusqu'au haut de la gélose, afin d'ensemencer les levures en profondeur. Après 24 ou 48 heures d'étuve à 27°C, découper à la spatule un petit cube de gélose de part et d'autre de la strie. Déposer sur une lame avec une goutte de bleu lactophénol. Poser une lamelle en écrasant doucement le cube de gélose. Lire au microscope.
- ✓ **En boîte:** couler un tube de PCB en boîte de Petri de 5 cm. Ensemercer à l'aide d'une pipette un peu de levures en surface, puis terminer par 3 stries en profondeur dans la gélose. Recouvrir d'une lamelle. Lire après 24 ou 48 heures d'incubation à 27°C, directement sur la platine du microscope.
- ✓ **En Culture sur lame :** de loin la meilleure technique. Couler sur une lame de microscope, à l'aide d'une pipette, sur une surface de 3 x 2,5 cm, environ 0,8 ml de milieu PCB préalablement fondu au bain-marie. Ensemercer les levures en faisant trois stries dans la gélose. Recouvrir d'une lamelle. Poser la lame dans une boîte fermant hermétiquement afin d'éviter la dessiccation. Mettre à l'étuve à 27 °C. Lire après 24 heures et 48 heures.

Cette manière de procéder donne les meilleurs résultats. La pseudofilamentation est facilement obtenue. La lecture est très rapide. Il est possible d'ensemencer chaque strie avec une autre colonie si l'on pense à une association. De plus, elle est économique, un tube de PCB acheté dans le commerce permettant de préparer environ 8 lames (Koenig, 1995).

### c. Bichro-latex<sup>®</sup> albicans (Fumouze Diagnostics)

Le principe de ce test sur lame repose sur l'agglutination, en présence de blastospores de *C. albicans*, de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique d'un antigène de la paroi de cette levure. Ces particules de latex colorées en rouge sont en suspension dans un contre-colorant vert.

Ainsi, s'il s'agit de *C. albicans*, l'agglutination des particules de latex par les blastospores se traduira par la formation d'agglutinats rouges sur un fond vert (Figure 50). Ce test présente une excellente sensibilité et une grande spécificité, du moins pour le complexe *C. albicans/C. dubliniensis*. En effet, il est également positif pour *C. dubliniensis* et ne permet pas de différencier les deux espèces (Bouchara et al., 2010).

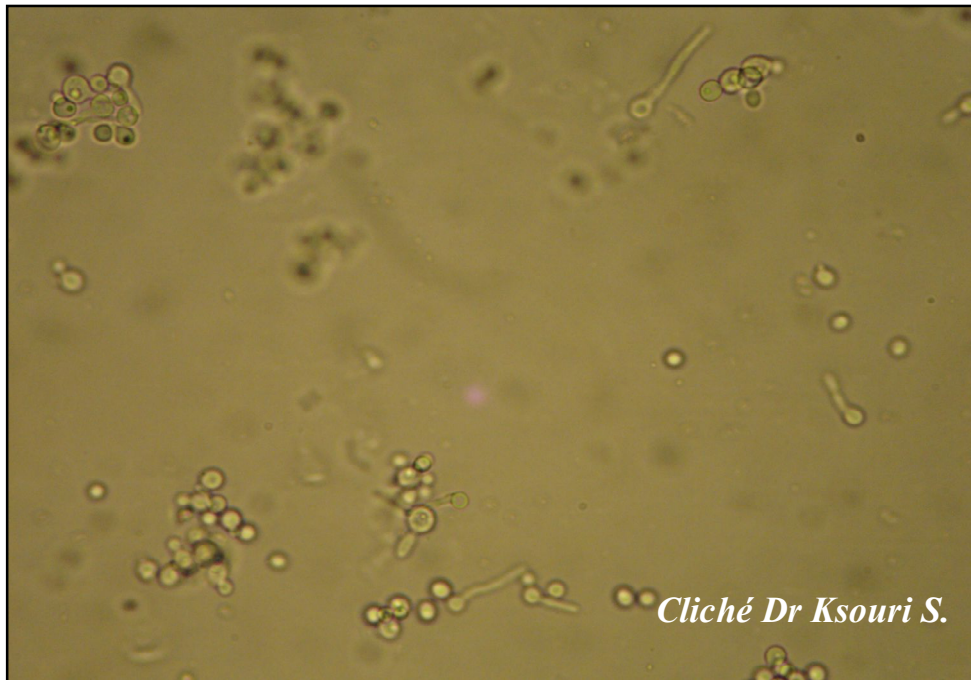
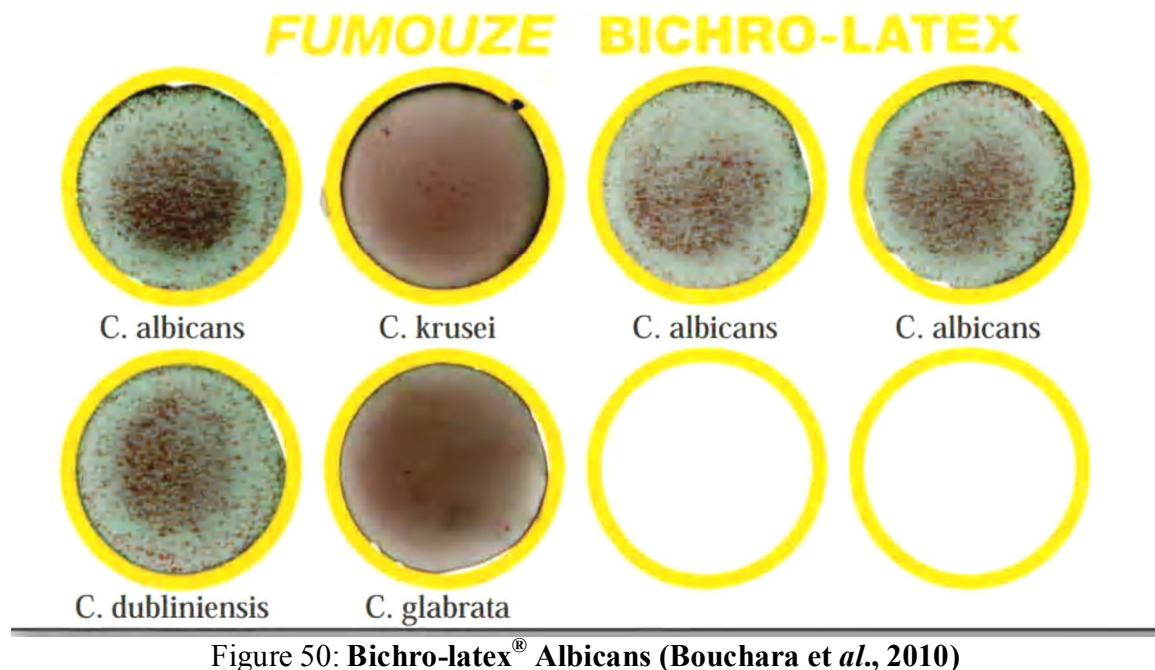


Figure 48 : Test de blastèse



Figure 49: Recherche de la chlamydo sporulation



#### d. Tests rapides d'identification biochimique

Les caractères d'assimilation et de fermentation des sucres par les levures sont régis par les lois de Kluver-Delcker:

- ✚ toutes les levures assimilent le glucose (le glucose sert donc de témoin de l'exécution correcte de l'auxanogramme);
- ✚ toute levure qui fait fermenter un sucre l'assimile nécessairement;
- ✚ toute levure qui ne fait pas fermenter le glucose ne fait fermenter aucun sucre;
- ✚ toute levure qui fait fermenter le glucose fait également fermenter le fructose et le mannose;
- ✚ aucune levure ne fait fermenter en même temps le maltose et le lactose (Bouchet et al., 1989).

Trois dispositifs basés sur des tests biochimiques permettent d'identifier *C. albicans* :

Murex *C. albicans* (Murex Diagnostics), Albicans-Sure® (Clinical Standards Laboratoires) et BactiCard Candida® (Remel CO). Ces tests reposent sur la recherche de deux activités enzymatiques,  $\beta$ -galactosaminidase et L-proline aminopeptidase, la mise en évidence de ces deux activités enzymatiques associées signant le diagnostic de *C. albicans*/*C. dubliniensis* (Bouchara et al., 2010).

#### e. Recherche de la reproduction asexuée

On recherche principalement des saques et des ascospores. En effet, la production de basides ne se fait que dans des conditions de cultures très particulières, réservées à des laboratoires de recherche. Il est possible, dans certains cas de voir directement des asques sur milieu RATou PCB, lorsqu'il s'agit d'une souche homothalique d'une levure ascomycète. La levure sexuée la plus fréquente étant *Saccharomyces cerevisiae*, en repique sur milieu à l'acétate de sodium (MAS), milieu qui favorise la production d'asques. Après 48h d'incubation à 27°C, un simple examen au bleu lactophénol permet de reconnaître facilement des asques contenant de 1 à 4 ascospores, rondes, réfringentes. Il est possible de faire un étalement sur lame et de colorer par la méthode de Wirtz: les ascospores sont colorées en vert, alors que les blastospores sont roses. Si l'on désire rechercher d'autres levures ascosporeées, il faut repiquer sur milieu V8 ou milieu de Gorodkova, en sachant qu'il faut souvent attendre 3 semaines ou plus pour obtenir une reproduction sexuée. Après cette première étape, on peut passer à l'identification de l'espèce. Il faut bien sûr qu'il n'ait pas d'associations de levures, auquel cas, on réisole sur boîte. Il faut également s'assurer de l'absence de

germes qui pourraient fausser le résultat. Si tel est le cas, on ensemence la levure sur milieu de Raulin. Ce milieu, à pH 3.2, supprime les germes tout en conservant les levures. Après 24 heures d'étuve à 27°C, on repique sur milieu de Sabouraud (Koenig, 1995).

### III.4.2. Identification des espèces non albicans

#### a. Réduction des sels de Tétrazolium

Ce test repose sur la réduction du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium incorporé dans le milieu de culture en un produit coloré qui confère aux colonies de levures une coloration allant du rose au rouge selon l'espèce. Il faut cependant signaler que la différenciation reste assez subjective. Ce test qui n'est pas commercialisé en Algérie, présente un intérêt très limité pour l'identification des levures. Son intérêt majeur réside dans la visualisation des associations de levures dans un produit pathologique, mais ici aussi, ce test est supplanté par les milieux chromogéniques décrits plus récemment qui sont beaucoup plus discriminants (Bouchara et *al.*, 2010).

#### b. Tests immunologiques

Les champignons pathogènes sont plus allergisants que les bactéries ils provoquent ainsi une forte hypersensibilité cutanée mais une quantité d'anticorps circulants assez faible, voire nulle (*Cryptococcus*).

Le diagnostic sérologique des mycoses est essentiellement utilisé dans les mycoses profondes. Il se heurte à deux difficultés:

- ❖ la principale est l'obtention d'antigènes standardisés et de qualité. Les champignons pathogènes sont en effet constitués par une mosaïque complexe de fractions antigéniques (par exemple, 71 fractions antigéniques reconnues chez *Candida albicans*). Pratiquement, les fractions utilisées sont soit des antigènes solubles, soit des antigènes figurés. Classiquement, les antigènes solubles proviennent de broyats de cultures assez jeunes (antigènes somatiques) ou de filtrats de cultures âgées de 30 jours (antigènes métaboliques) ; les antigènes figurés sont obtenus soit à partir de suspensions standardisées de levures ou de fragments mycéliens, soit à partir de coupes à congélation d'organes d'animaux infestés expérimentalement.
- ❖ la seconde difficulté réside dans le fait que de tels examens sérologiques ne sont interprétables que chez des sujets immunologiquement compétents qui élaborent normalement des anticorps contre champignons. Or les malades atteints de mycoses profondes et pour qui ces examens sérologiques sont prescrits présentent, pour la plupart, une altération des défenses immunitaires à laquelle peut encore s'ajouter la libération d'endotoxines, qui inhibent davantage encore ces réactions (*C. albicans*).

Il est alors aisé de comprendre qu'un résultat sérologique isolé est d'interprétation délicate. C'est la raison pour laquelle, en pratique, il est recommandé:

- ✓ d'effectuer, comme la loi l'exige, au moins deux techniques complémentaires, dont les résultats devront être concordants;
- ✓ de réaliser ces techniques au moins sur deux prélèvements de sérum effectués à 3 semaines d'intervalle et permettant de mettre en évidence une modification significative du taux des anticorps (Bouchet et *al.*, 1989).

La structure antigénique des levures a été étudiée depuis de nombreuses années. C'est en 1960, que HASENCLEVER (cité par Koenig, 1995), démontre qu'il existe 2 sérotypes pour *C. albicans*: le sérotype A, le plus répandu en Amérique et en Europe, le sérotype B, plus fréquent en Afrique. Des travaux complémentaires ont montré par ailleurs une résistance plus fréquente du sérotype B à la 5 fluorocytosine. En 1970, les travaux de TSUCHIYA et *al.* (cité par Koenig, 1995), basés sur la composition des polysaccharides thermostables de la paroi permettent de séparer les levures en 5 groupes antigéniquement indépendants. Ces travaux ont trouvé une application pratique, puisqu'à partir de sérums monospécifiques



préparés chez le lapin, Il est possible d'identifier, par simple agglutination sur lame, les principales espèces de levures incriminées en pathologie humaine.

D'une façon générale, les tests sérologiques sont basés sur l'agglutination par les blastospores de *C. dubliniensis* (BichroDubli<sup>®</sup>, Fumouze Diagnostics) ou de *C. krusei* (Krusei Color<sup>®</sup>, Fumouze Diagnostics) de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal spécifique de ces espèces.

Le Candida check<sup>®</sup> (Iatron Laboratories) est un kit basé sur des tests d'agglutination sur lame (et l'étude de l'assimilation du saccharose) utilisant un panel d'immunsérums polyclonaux de lapin, qui permet d'identifier les 8 principales espèces du genre *Candida* en fonction du profil d'agglutination. La différenciation entre *C. albicans* et *C. tropicalis* est néanmoins impossible par ces tests d'agglutination, nécessitant le recours à l'étude de l'assimilation du saccharose (Bouchara et al., 2010).

### c. Tests biochimiques

Le test Glabrata RTT<sup>®</sup> (Fumouze Diagnostics), de réalisation simple, permet d'identifier rapidement *C. glabrata* par sa capacité à hydrolyser le tréhalose et l'absence d'hydrolyse du maltose (Figure 51). D'autres espèces peuvent en effet hydrolyser ces deux hydrates de carbone (Bouchara et al., 2010).

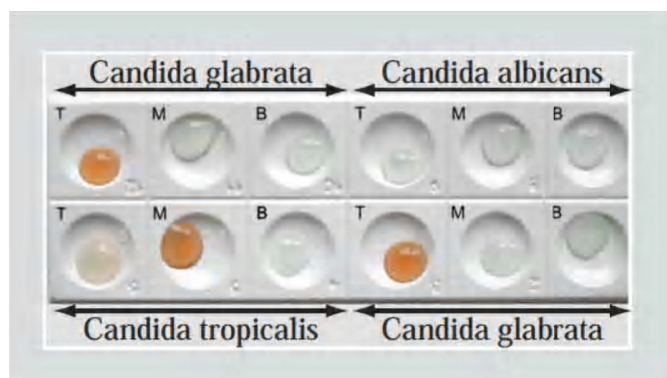


Figure 51: Glabrata RTT<sup>®</sup> (Bouchara et al., 2010)

Mais, la grande majorité de ces tests repose sur l'étude de l'assimilation des hydrates de carbone en aérobiose (auxanogramme du carbone), et pour certains de la fermentation de ces sources de carbone (zymogramme).

De nombreux dispositifs miniaturisés et standardisés sont commercialisés (Tableau 6), tels que les galeries Api<sup>®</sup> 20C Aux ou ID<sup>®</sup> 32C commercialisées par bioMérieux (Bouchara et al., 2010).

Tableau 6 : Caractéristiques des différentes galeries d'identification commercialisées (Bouchara et al., 2010).

Paramètres	API® 20C AUX (bioMérieux)	Auxacolor®2 (Bio-Rad)	Candifast® (ElitechGroup)	Fungichrom® (ElitechGroup)	Fungifast® (ElitechGroup)	ID®32C (bioMérieux)	Vitek®YBC (bioMérieux)
Nombre de taxons	43	33	10	24	10	63	50
Nombre de tests	19	20	9	15	20	31	20
Cycloheximide	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Uréase	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Phénol-oxydase	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Inoculum	2 McF	1,5 McF		2 McF	2 McF	2 McF	1,8 à 2,2 McF
Durée	48 à 72 h	24 à 72 h	24 à 72 h	24 à 48 h	24 à 72 h	48 à 72 h	18 h
Caractères morphologiques	Obligatoires	Obligatoires	Non obligatoires	Non obligatoires	Obligatoires	Non demandés	Obligatoires
Commentaires	Manipulation simple, mais ce test est peu discriminant	Manipulation simple	Manipulation simple, mais ce test est peu discriminant	Manipulation simple, mais ce test est peu discriminant	Manipulation simple. Nombre limité de taxons	Manipulation simple. Test performant	Manipulation simple. Test performant

Dans l'auxanogramme, la levure est placée en aérobiose en présence d'un panel plus ou moins large d'hydrates de carbone (oses simples, polyols, osamines, ...). Les sources de carbone sont déjà distribuées sous forme lyophilisée au fond des cupules de la galerie d'identification. Lorsque la levure assimile le sucre, sa multiplication se traduit par un trouble dans la cupule ou par le virage d'un indicateur de pH.

Dans le zymogramme, l'étude de l'assimilation des hydrates de carbone comme source de carbone et d'énergie est effectuée en anaérobiose (réalisée en recouvrant les cupules d'huile de paraffine) et l'assimilation par la voie fermentative entraîne un virage de l'indicateur de pH en raison de la production de métabolites acides. Après traduction du profil d'assimilation en un code numérique, l'identification de l'espèce est assurée par comparaison à des bases de données. Selon les dispositifs commerciaux, 10 à 63 espèces peuvent être identifiées appartenant principalement au genre *Candida*, mais aussi à d'autres genres comme *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* ou *Saccharomyces*.

- Le système API<sup>®</sup> 20C AUX (bioMérieux) repose sur l'étude de l'assimilation de 19 sources de carbone.
- Le test Auxacolor<sup>®</sup> 2 (Bio-Rad) comprend 15 tests colorimétriques dont 13 reposent sur l'assimilation de carbohydrates, les deux derniers correspondant à la sensibilité au cycloheximide (Actidione<sup>®</sup>) et la recherche de la phénoloxydase.
- Les dispositifs Candifast<sup>®</sup> et Candifast<sup>®</sup> Es Twin (ElitechGroup) qui permettent respectivement l'identification des levures ou l'identification et l'étude simultanée de la sensibilité aux antifongiques, comportent l'étude de la fermentation de 7 sucres, de la sensibilité au cycloheximide et de l'hydrolyse de l'urée.
- Les dispositifs Fungichrom<sup>®</sup> et Fungifast<sup>®</sup> (ElitechGroup) qui permettent respectivement l'identification des levures ou l'identification et l'étude simultanée de la sensibilité aux antifongiques, comprennent l'étude de l'hydrolyse de 2 substrats chromogènes, de l'assimilation de 5 carbohydrates, de l'hydrolyse de l'urée et la recherche de la phénoloxydase.
- La galerie ID<sup>®</sup> 32C (bioMérieux) comprend l'étude de l'assimilation de 29 sources de carbone, l'étude de la sensibilité à l'Actidione<sup>®</sup> et la recherche de l'hydrolyse de l'esculine. Cette galerie d'identification est aujourd'hui la plus performante. Elle peut être automatisée et sert souvent de référence.
- Le dispositif Vitek<sup>®</sup> YBC (bioMérieux) comporte 20 tests, la sensibilité à l'Actidione<sup>®</sup>, l'assimilation du nitrate, l'hydrolyse de l'urée et l'assimilation de 17 sources de carbone. Ce système entièrement automatisé permet l'identification de 50 taxons.

La discrimination entre *C. albicans* et *C. dubliniensis* sur les galeries d'identification n'est pas toujours aisée, de même que des caractères physiologiques peuvent être identiques dans certaines galeries pour 2 espèces voisines. Pour cette raison, il est important de prendre également en compte les caractères macroscopiques et microscopiques pour l'identification des levures (Tableau 7) (Bouchara et al., 2010).



Tableau 7: Caractéristiques morphologiques des principales levures d'intérêt médical et vétérinaire (Bouchara et al., 2010).

Espèce	Morphologie sur milieu de Sabouraud		Morphologie microscopique sur RAT
	Aspect des colonies	Microscopie	
<i>Candida</i> spp.	Colonies blanches à crèmes, luisantes ou mates, lisses ou plissées	Blastospores ± pseudofilaments	Blastospores ± filaments et/ou pseudofilaments ± chlamydo-spores
<i>C. albicans</i>	Blanches, luisantes, lisses à bords nets	Blastospores ovoïdes (3-14 x 3-7 µm)	Blastospores, filaments, pseudofilaments et chlamydo-spores
<i>C. dubliniensis</i>	Crèmes, lisses ou plissées à bords nets	Blastospores ovoïdes (3-14 x 3-7 µm)	Blastospores, filaments, pseudofilaments et nombreuses chlamydo-spores
<i>C. glabrata</i>	Blanches, brillantes, lisses à bords nets	Blastospores rondes à ovoïdes (3-4 x 2-3 µm)	Blastospores rondes à ovoïdes Pas d'eumycélium ni pseudomycélium
<i>C. tropicalis</i>	Blanches à crèmes, lisses à bords nets	Blastospores ovoïdes (6-10 x 4-7 µm)	Blastospores ovoïdes et nombreux pseudofilaments
<i>C. parapsilosis</i>	Crèmes, lisses à bords nets	Blastospores rondes à ovoïdes (5-15 x 5-10 µm)	Blastospores rondes à ovoïdes et pseudofilaments courts
<i>C. krusei</i>	Blanches, mates à bords festonnés odeur d'alcool de fruit	Blastospores ovoïdes à cylindriques (5-12 x 3-6 µm)	Blastospores ovoïdes à cylindriques Pseudofilaments
<i>C. kefyr</i>	Blanches à crèmes, translucides odeur fruitée	Blastospores ovoïdes à allongées (7-10 x 3-5 µm)	Blastospores ovoïdes à allongées Nombreux pseudofilaments
<i>Rhodotorula</i> spp.	Rouges ou orangées	Blastospores globuleuses	Blastospores globuleuses Pas d'eumycélium ni pseudomycélium
<i>Saccharomyces</i> spp.	Blanches à crèmes, lisses à bords nets	Blastospores globuleuses ou allongées (5-15 x 3-10 µm) Asques globuleux (1 à 4 ascospores)	Blastospores globuleuses ou ovoïdes Pas d'eumycélium ni pseudomycélium
<i>Trichosporon</i> spp.	Blanches, sèches, à bords fissurés	Blastospores allongées avec arthrospores	Filaments et pseudofilaments abondants + arthrospores + blastospores
<i>Malassezia</i> lipodépendants	Blanchâtres, puis chamois Lisses	Blastospores ovoïdes, globuleuses ou allongées, avec souvent une large base	Pas de pseudomycélium

### ✚ Interprétation des résultats des cultures

Pour l'interprétation des résultats, il faudra tenir compte du site de prélèvement (superficiel ou profond) et de l'espèce identifiée, mais aussi du terrain (immunodépression sévère ou non). Schématiquement, toute culture positive à partir d'un prélèvement issu d'un site normalement stérile (LCR, liquides de ponction, biopsies tissulaires) témoigne d'une infection à levures. Concernant les urines, la présence de levures doit être interprétée avec prudence, car une souillure issue des voies urinaires basses (urètre) n'est pas rare ; dans ce cas, on s'attachera à dénombrer les colonies. Ainsi une candidurie supérieure à  $10^2$  UFC par ml chez un patient non sondé est en faveur d'une infection urinaire.

Pour les sites cutanés et les sites cavitaires, la présence de levures peut correspondre à un simple portage. L'interprétation nécessitera la confrontation des résultats mycologiques avec les données cliniques. Quand elle est possible (donc principalement pour les prélèvements liquides), la détermination de la charge fongique est souvent contributive au diagnostic. Par exemple, la présence de plus de 10 colonies de levures sur une culture issue d'un prélèvement vaginal, de 5 à 10 colonies par  $\text{cm}^2$  de surface oropharyngée écouvillonnée, de  $10^2$  UFC par ml de solution de rinçage buccal ou de  $10^4$  UFC par gramme de selles, est en faveur du caractère pathogène de la levure isolée.

En l'absence de biopsies issues de tissus ou d'organes profonds, les hémocultures représentent des prélèvements essentiels dans le diagnostic des levuroses systémiques. Leur sensibilité demeure cependant décevante (en général inférieur à 50% selon les différentes études réalisées) malgré l'amélioration des techniques et, notamment, le développement de milieux spécifiques. Par ailleurs, cette sensibilité varie en fonction des espèces : par exemple, *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sont détectés plus précocement que *C. glabrata* ou *C. krusei*. Enfin, elle varie également avec la localisation. Ainsi, en cas de candidose hépato-splénique, seuls 20% des prélèvements sont positifs.

Il est donc important de répéter les prélèvements chez tout patient à risque et de préférence au moment de pics fébriles.

Sans attendre les résultats de l'identification de la levure isolée d'une hémoculture ou d'un prélèvement profond (normalement stérile), il convient d'avertir rapidement le clinicien de la positivité de l'hémoculture, de manière à mettre en oeuvre un traitement antifongique qui pourra être adapté par la suite en fonction de l'espèce identifiée. Il a en effet été clairement montré que tout retard à l'instauration du traitement systémique était préjudiciable en cas de septicémie à levures.

Le caractère pathogène d'une levure doit être discuté dans un contexte clinique et épidémiologique, en particulier lorsqu'elle est isolée de sites superficiels normalement colonisés (peau, bouche, trachée, selles, vagin) ou qu'elle provient de prélèvements pouvant être contaminés (LBA, urines, ...).

L'interprétation doit, en effet, tenir compte de nombreux facteurs: l'espèce isolée, l'intensité de la colonisation (culture pure et/ou abondante), la valeur des indices de Pittet quand ils peuvent être déterminés, l'isolement à plusieurs reprises d'une même levure, ainsi que les données de l'examen direct qui est fortement contributif devant la mise en évidence de filaments mycéliens ou de pseudofilaments. Le terrain (patient immunodéprimé) et la maladie sous-jacente (notamment l'infection par le VIH) sont aussi des informations précieuses à prendre en compte. Pour illustrer ces propos, on peut signaler certains exemples:

- L'isolement de *Candida* dans les selles témoigne le plus souvent d'une simple colonisation. Celle-ci doit cependant être prise en compte dans la surveillance des patients à risque, notamment dans les services de réanimation et d'oncohématologie.

- La présence de *Candida* dans une urine peut être fortuite et la responsabilité de la levure ne sera démontrée que devant une culture pure et abondante et en l'absence de sonde. C'est dans ce contexte que la numération des levures dans les liquides biologiques prend tout son intérêt. La plupart des auteurs s'accordent à évaluer à  $10^4$  UFC/ml le seuil significatif d'une candidurie.
- La présence de levures dans un prélèvement des voies aériennes (expectoration, aspiration bronchique, lavage broncho-alvéolaire) est d'interprétation difficile en raison d'une colonisation fréquente de la sphère oropharyngée. Seule la biopsie (rarement pratiquée) est contributive au diagnostic d'une levurose pulmonaire. En l'absence de biopsies, le caractère habituellement commensal ou non de l'espèce identifiée est important pour l'interprétation.
- Pour les prélèvements profonds (normalement stériles) comme pour les hémocultures, l'isolement de levures, quelle qu'en soit la quantité ou l'espèce, suffit à porter le diagnostic et à instaurer un traitement antifongique qui sera secondairement adapté si besoin en fonction de l'espèce identifiée et des résultats de l'antifongogramme (Bouchara et *al.*, 2010).

### III.5. Techniques innovantes

Ces deux dernières décennies ont connu d'importants progrès technologiques, avec notamment le développement de la biologie moléculaire et l'essor des approches protéomiques. Ces techniques utilisées depuis longtemps dans le cadre des levuroses pour le typage des souches à des fins épidémiologiques, ou dans un but taxinomique pour l'identification de certaines espèces, ont également été envisagées à des fins diagnostiques et des applications sont aujourd'hui disponibles ou pourraient l'être dans un avenir proche (Bouchara et *al.*, 2010).

#### III.5.1. Diagnostic des candidoses profondes

Les applications de la PCR ont suscité de nombreux espoirs. En effet, le statut immunitaire du patient n'entre pas en ligne de compte, contrairement à la recherche d'anticorps spécifiques. De plus, cette technique permet de détecter et d'amplifier des fragments d'ADN fongique provenant de cellules mortes et donc incapables de se développer en culture. Enfin, elle permet théoriquement un diagnostic précoce grâce à une sensibilité et une spécificité élevées. La spécificité dépend de la nature des séquences cibles, alors que la sensibilité analytique repose quant à elle sur la nature de l'échantillon analysé (sérum, sang total ou autre liquide biologique), la méthode d'extraction (manuelle ou automatisée), la nature de la séquence cible (gènes mono- ou multi-copies) et la méthode de détection des amplicons (électrophorèse sur gel d'agarose, hybridation sur membranes, puces à ADN, ...). Les techniques de PCR en temps réel, qui combinent l'automatisation, la rapidité et une évaluation quantitative, ont connu ces dernières années un essor important en microbiologie.

Cependant, en dépit de nombreux travaux, la PCR n'a pas encore permis de remplacer l'hémoculture qui représente le « gold standard » dans le diagnostic des fongémies. L'utilisation de la PCR fongique demeure en effet limitée aux centres hospitalo-universitaires. Sa généralisation est freinée par le manque de standardisation des protocoles techniques (méthodes d'extraction, séquences cibles et techniques de détection de l'ADN amplifié) et le faible nombre de kits commercialisés. La plupart des évaluations ont été réalisées sur un nombre limité de patients, ou sur des échantillons artificiellement contaminés.

La performance de cette approche relève donc du savoir-faire et des protocoles développés par l'équipe en place. Il convient néanmoins de signaler la commercialisation récente de kits permettant le diagnostic des septicémies à levures basés sur l'utilisation du système Lightcycler<sup>®</sup> (Lightcycler SeptiFast

Test, Roche) ou de la technique d'hybridation in situ (PNA FISH, peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridation) (Bouchara et *al.*, 2010).

### III.5.2. Méthodes d'identification

En dépit des nombreuses techniques développées, les applications de la PCR à l'identification des levures à partir d'un produit de culture (flacons d'hémocultures ou cultures sur gélose) restent actuellement limitées, en raison de la performance et de la simplicité d'utilisation des techniques conventionnelles (milieux chromogéniques, tests d'agglutination et galeries d'identification). Cependant, 48 à 96 heures sont souvent nécessaires avant d'aboutir à l'identification de l'espèce, alors que l'approche moléculaire permet de réduire considérablement ce temps d'analyse. Son coût (notamment pour la PCR en temps réel et le séquençage) est cependant très supérieur à celui des techniques mycologiques classiques, et le recours à la biologie moléculaire ne s'envisage généralement que lors des levures profondes. En effet, dans ce contexte, le choix de l'antifongique nécessite l'identification rapide de l'espèce en cause.

Les cibles visées sont généralement des séquences hautement conservées chez les champignons (donc autorisant l'utilisation d'un seul couple d'amorces), entre lesquelles on trouve des régions variables. Les régions ITS1 et ITS2 (Internal Transcribed Spacer ou « espaceurs internes transcrits »), situées sur les gènes codant pour l'ARN ribosomal 5,8S, 18S et 28S, sont les régions variables les plus utilisées. La région ITS2 semble plus particulièrement intéressante, en raison de son haut degré de polymorphisme au sein des espèces du genre *Candida*. Une des approches moléculaires les plus concluantes concerne la différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*, difficilement réalisable avec la plupart des systèmes d'identification phénotypiques classiques. L'amplification par PCR des régions ITS est suivie le plus souvent d'un séquençage, mais il est également possible d'analyser le polymorphisme de longueur des amplicons ou de réaliser une hybridation avec des sondes fluorescentes spécifiques d'espèces, ou encore d'avoir recours à une PCR multiplex ou à des puces à ADN. Cette dernière technique (DNA array), qui consiste à réaliser l'hybridation des produits d'amplification sur des sondes oligonucléotidiques spécifiques d'espèces immobilisées sur lames de verre ou sur membranes, est beaucoup plus rapide et moins coûteuse que le séquençage. Elle s'est révélée capable d'identifier en moins de 24 heures, 77 espèces de levures différentes à partir d'hémocultures positives. La lecture est par ailleurs possible à l'oeil nu (révélation colorimétrique de spots de 400 µm de diamètre). Cette technique, qui permet une identification plus rapide que le système Vitek<sup>®</sup>, est très prometteuse. Elle semble réellement applicable en routine hospitalière, mais pose le problème des espèces rares qui ne seraient pas détectées par les sondes oligonucléotidiques.

Récemment, trois dispositifs d'identification par hybridation in situ (PNA FISH, peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridation) ont été développés par la société AdvanDx (distribués en France par i2a). Ces tests permettent d'identifier à partir des hémocultures positives les principaux agents pathogènes responsables de septicémies (Staphylocoques, Entérocoques et levures). A partir des hémocultures positives, sont réalisés des étalements sur lames qui sont hybridés avec des sondes marquées par différents fluorochromes, et la lecture est effectuée au microscope à fluorescence. Ainsi, le kit Yeast Traffic Light PNA FISH repose sur l'hybridation des levures avec des sondes fluorescentes spécifiques des ARN<sub>r</sub> 26S des principales espèces de levures rencontrées dans les candidémies (Figure 52). Ces tests permettent de s'affranchir de la PCR, tout en assurant une identification d'espèces fiable et rapide (en moins de 3 heures) (Bouchara et *al.*, 2010).

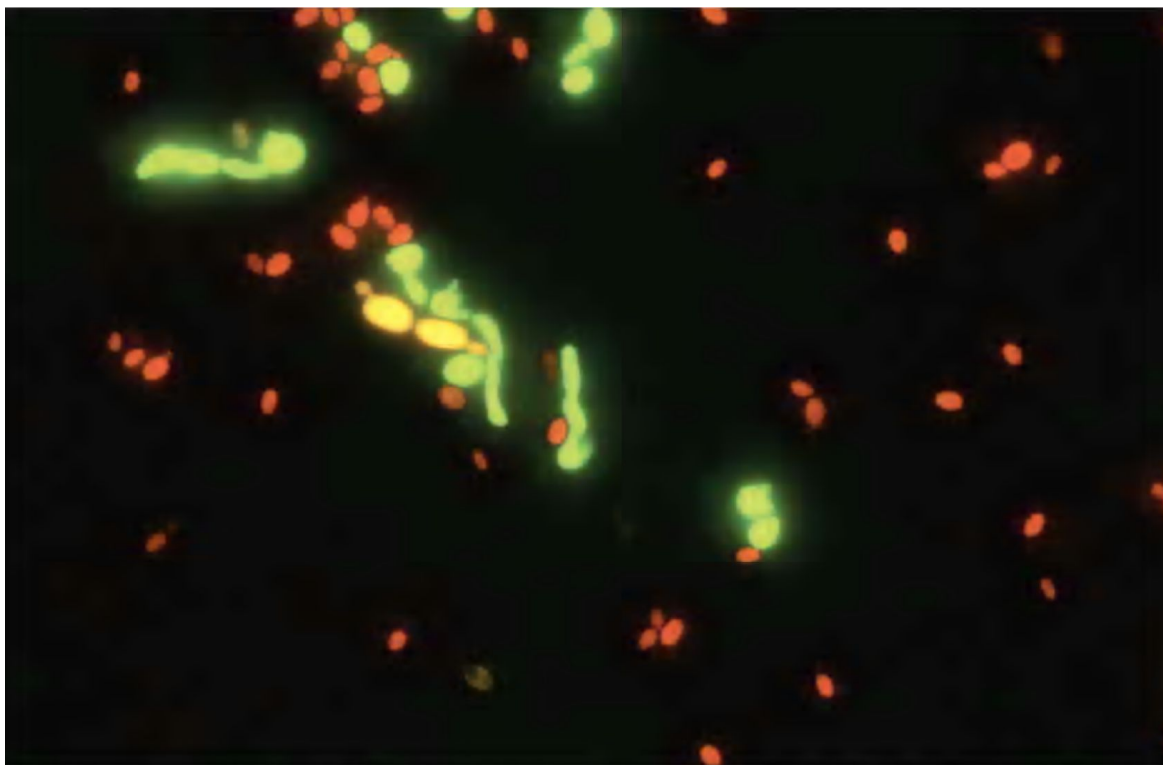


Figure 52: **Détection de levures à partir des hémocultures positives à l'aide du kit Yeast Traffic Light PNA FISHTM (Bouchara et al., 2010)**

A partir de l'hémoculture positive, un frottis est réalisé. Les levures sont hybridées avec des sondes fluorescentes spécifiques d'espèces. Une fluorescence verte est observée pour *C. albicans* et *C. parapsilosis*, alors que *C. glabrata* et *C. krusei* produisent une fluorescence rouge et *C. tropicalis* une fluorescence jaune.

Le kit Lightcycler® SeptiFast kit (Roche) permet quant à lui la détection directe de septicémies à levures par amplification par PCR multiplex des régions ITS des principales bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif et levures, à partir du prélèvement de sang, avec une identification de l'espèce en cause, en moins de 6 heures, par analyse de la température de fusion des produits d'amplification.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionisation-time-of-flight) représente également une alternative intéressante à l'identification moléculaire. Cette approche protéomique permet une identification rapide directement à partir des cultures. Des solutions commerciales sont disponibles (comme le système AXIMA@SARAMIS, de Shimadzu, distribué par i2a ou le système Microflex de Bruker Daltonics) qui permettent d'identifier en quelques minutes seulement les bactéries (Gram positives ou Gram négatives), mais aussi les levures et les champignons sur la base de leurs empreintes MALDI-TOF MS. Les temps de préparation et le coût des consommables sont considérablement réduits par rapport aux techniques moléculaires.

Enfin, d'autres techniques sont également en cours de développement, comme la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, mais elles nécessitent un appareillage encore inhabituel dans un laboratoire de microbiologie (Bouchara et al., 2010).

### III.5.3. Méthodes de typage moléculaire

Les méthodes modernes de typage moléculaire, basées sur l'analyse de la variabilité du génome, représentent de précieux outils d'enquête épidémiologique, notamment en milieu hospitalier. Le réservoir des *Candida* est en effet le plus souvent endogène. Cependant, dans un contexte d'infection nosocomiale, il peut être important de rechercher une origine exogène. Le typage des isolats rencontrés dans un contexte supposé d'épidémie peut ainsi permettre de démontrer la transmission inter-humaine d'une souche (infection résultant par exemple d'une transmission au malade par le personnel soignant). Dans un contexte de candidose chronique ou récidivante, le typage permet également de différencier le portage chronique d'une même souche possédant un profil particulier de virulence ou de résistance aux antifongiques, de réinfections successives par des souches différentes.

Le choix de la méthode va reposer sur son pouvoir discriminant, donc sur sa spécificité plus que sur sa sensibilité. L'étude du polymorphisme de l'ADN permet une caractérisation infra-spécifique des levures étudiées. Deux approches méthodologiques s'opposent, suivant que l'analyse s'appuie sur l'étude du polymorphisme de la taille des chromosomes (électrophorèse en champs pulsé des chromosomes ou Pulsed field Gel Electrophoresis, PFGE) ou de fragments d'ADN (polymorphisme de taille des fragments de restriction enzymatique ou Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP; Empreinte d'ADN ou DNA fingerprinting ; et l'amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphes ou Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) ou sur l'étude du polymorphisme de séquences nucléotidiques identifiées (séquençage multiloci ou Multi Locus Sequence Typing, MLST; analyse de séquences microsatellites). La reproductibilité ou le pouvoir discriminant des différentes méthodes de typage est cependant variable, et elles manquent parfois de standardisation. Pour le typage des souches de *Candida*, la MLST et l'analyse des microsatellites sont les deux méthodes les plus performantes.

La technique MLST (Multilocus Sequence Typing) est basée sur l'analyse du polymorphisme nucléotidique de 6 ou 7 loci indépendants. Les fragments séquencés correspondent à des gènes de « ménage », régions de grande variabilité encadrées par des séquences conservées et qui présentent des variations intra-spécifiques. Cette technique hautement discriminante a par ailleurs l'avantage d'être hautement reproductible, et la standardisation des données obtenues a permis la constitution d'une banque publique permettant de retracer la circulation des souches à l'échelon national et international (<http://www.mlst.net>). Les séquences MLST d'un grand nombre de souches de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* et *C. neoformans* var. *grubii* sont actuellement disponibles dans cette base de données.

D'autres marqueurs présentant des séquences répétées et un certain degré de polymorphisme au sein de familles multigéniques sont utilisés, parmi lesquels il faut citer les régions microsatellites. Il s'agit de répétitions de courts motifs de 1 à 6 paires de bases, extrêmement polymorphes. Le nombre de répétitions à un locus donné est variable. Le séquençage de ces régions est un outil de typage très utile. Comme la MLST, cette technique est standardisable pour chaque espèce de *Candida*. Son pouvoir discriminant augmente également avec le nombre de microsatellites étudiés. Enfin, elle est moins onéreuse et plus rapide que la MLST, mais cette dernière est actuellement plus précise et davantage standardisée.

Outre son application dans l'identification des espèces, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier s'est montrée capable de discriminer les souches de *Candida*, mais les études basées sur cette méthode restent peu nombreuses (Bouchara et al., 2010).



### III.6. Diagnostic indirect

Les difficultés de mise en place de procédures invasives ou l'impossibilité d'avoir recours à de telles procédures pour l'isolement des levures lors d'une suspicion de levurose profonde ou systémique, ont conduit au développement de méthodes immunologiques de mise en évidence d'anticorps sériques ou d'antigènes circulants marqueurs d'une infection fongique invasive. Ces deux types d'approches sont complémentaires (Bouchara et *al.*, 2010).

#### III.6.1. Recherche d'anticorps sériques

En pratique, la recherche d'anticorps sériques est limitée au diagnostic des candidoses profondes ou systémiques.

Plusieurs tests sont aujourd'hui commercialisés:

- L'immunofluorescence indirecte (Figure 53) qui utilise des blastospores de *C. albicans* déposées sur des lames de verre (Candida-Spot IF<sup>®</sup>, bioMérieux)
- L'hémagglutination indirecte qui détecte préférentiellement des anticorps de type IgG ou IgM (Candidose Fumouze<sup>®</sup>, Fumouze).
- L'immunoélectrophorèse ou électrosynérèse (Figure 54) qui détecte des anticorps précipitants (antigènes de *C. albicans* et sérum de contrôle positif anti-*C. albicans*, Bio-Rad).
- et l'ELISA (Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay) qui recherche des anticorps dirigés contre les mannanes de la paroi des levures. Ces techniques sont réalisées en microplaques (Platelia<sup>®</sup> Candida Ab/Ac/Ak, Bio-Rad ; Serion<sup>®</sup> ELISA classic *Candida albicans* IgG / IgM / IgA, Virion/Serion).

Il existe aussi d'autres techniques basées sur le principe du Western-Blot qui mettent en évidence des anticorps spécifiques de la phase mycélienne présente lors d'une candidose invasive: énoïase de 48 kDa, sous-unité de 47 kDa de la Heat Shock-Protein (HSP 90). Ces techniques ne sont pour l'instant pas applicables en routine.

En pratique, il est souhaitable d'associer au moins deux techniques en raison des difficultés d'interprétation liées au caractère commensal de *C. albicans*. Un patient porteur sain de *Candida* peut présenter un taux faible d'anticorps anti-*Candida*, mais des taux élevés d'anticorps, notamment en ELISA, ne sont en pratique pas retrouvés chez des patients simplement colonisés et plaident en faveur du caractère pathogène de la levure. Chez l'immunodéprimé, en raison de la colonisation accrue du tube digestif par suite de l'antibiothérapie et de la faible production d'anticorps, la répétition (deux fois par semaine) des examens sérologiques est nécessaire afin de suivre l'évolution des anticorps. L'ascension du titre en anticorps plaide en faveur d'une infection récente (Bouchara et *al.*, 2010).

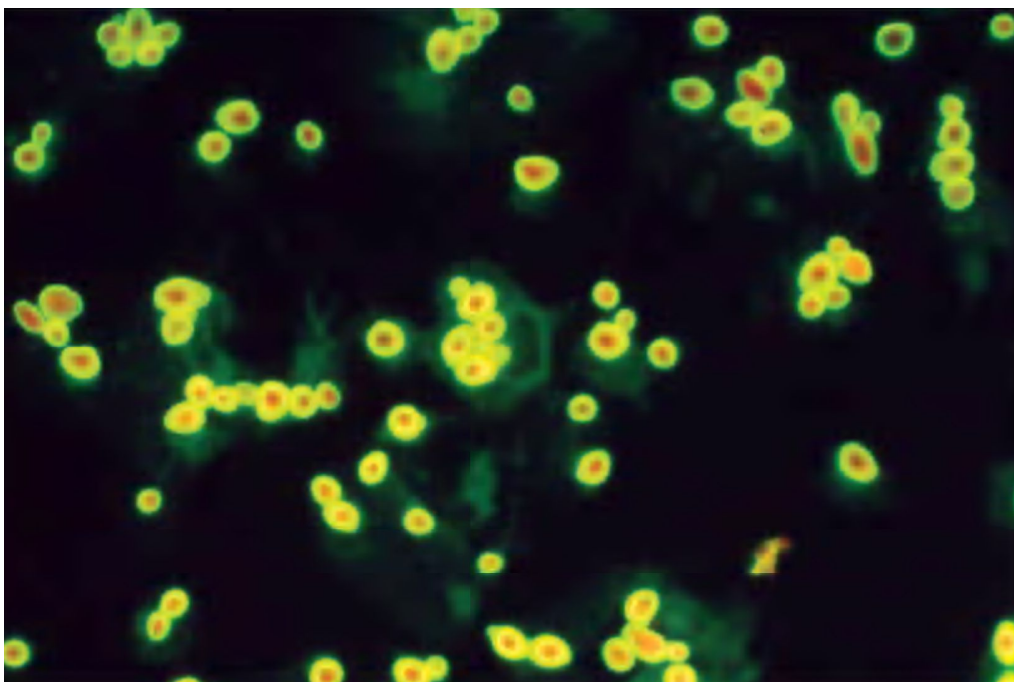


Figure 53 : Détection des anticorps anti-Candida par immunofluorescence indirecte (Bouchara et *al.*, 2010)

Extrait antigénique	Sérum du 08/11/2008
	Sérum témoin
	Sérum du 26/12/2008
Extrait antigénique	Sérum du 31/12/2008
	Sérum témoin
	Sérum du 05/01/2009
Extrait antigénique	Sérum du 05/01/2009
	Sérum témoin
	Sérum du 13/01/2009
<b>Séroconversion candidosique chez un patient atteint de leucémie aigue lymphoblastique ayant développé une candidose disséminée avec uvéite inflammatoire et lésion rétinienne entre le 08/11/2008 et le 26/12/2008.</b>	

Figure 54: Détection des anticorps anti-Candida par électrosynérèse (Bouchara et *al.*, 2010)

### III.6.2. Recherche d'antigènes circulants

Malgré des avancées techniques, la sérologie peut souvent être mise en défaut chez l'immunodéprimé du fait de l'évolution trop rapide de l'infection, du faible taux d'anticorps produits, et de la formation de complexes immuns avec les antigènes fongiques circulants. Dans ces situations, la détection des antigènes circulants ou de métabolites fongiques dans le sang, mais aussi dans les urines, le liquide céphalo-rachidien ou le lavage broncho-alvéolaire, peut pallier ces inconvénients. En pratique,

cette recherche s'applique au diagnostic des candidoses profondes et des cryptococcoses (Bouchara et *al.*, 2010).

### III.6.2.1. Les candidoses

Différents antigènes ou métabolites de la levure peuvent être recherchés dans les liquides biologiques (Bouchara et *al.*, 2010).

#### a. Recherche d'antigènes non définis

Les laboratoires Ramco commercialisent aux Etats-Unis un kit appelé Cand-Tec<sup>®</sup> Candida Detection System, basé sur l'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps polyclonaux dirigés contre un antigène pariétal non défini de *C. albicans* (exoantigène thermolabile). Ce test peu spécifique (Bouchara et *al.*, 2010).

#### b. Recherche de mannanes circulants

Actuellement, trois tests basés sur la détection des antigènes mannanes qui constituent les polysaccharides majeurs de la paroi des levures du genre *Candida*, sont commercialisés pour le diagnostic des candidoses invasives (Bouchara et *al.*, 2010).

- Test Pastorex<sup>®</sup> Candida (Bio-Rad):

Il consiste en l'agglutination de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal anti-mannane. Il présente une excellente spécificité, mais sa sensibilité est mauvaise, ne dépassant pas 30%. De ce fait, il est peu utilisé bien qu'il permette une réponse immédiate.

- Test Platelia Candida Ag<sup>®</sup> (Bio-Rad):

Il détecte les mannanes circulants par une technique ELISA sandwich en microplaques. Sa spécificité est excellente, sa sensibilité n'excède pas 50%. De plus, comme le test Pastorex<sup>®</sup> Candida, il reconnaît de façon inconstante les mannanes de la paroi des blastospores des espèces non albicans (*C. krusei*, *C. kezyr* et *C. parapsilosis*). Il est recommandé d'associer la recherche des anticorps anti-mannanes à la recherche des mannanes circulants. Des études ont montré qu'avec ce double suivi, plus de 80% des épisodes infectieux causés par *C. albicans*, *C. glabrata* ou *C. tropicalis* peuvent être détectés. De même, ces tests Platelia<sup>®</sup> permettraient de réaliser plus précocement le diagnostic de candidose systémique, en moyenne 4 jours avant la positivité des hémocultures.

- Test Serion ELISA antigen Candida<sup>®</sup> (Virion/serion):

Ce test, voisin du précédent, est basé sur la détection des antigènes mannanes par une technique ELISA en microplaques (Bouchara et *al.*, 2010).

#### c. Recherche de -glucanes circulants

D'autres tests ont été développés récemment, basés sur la détection des  $\beta(1,3)$ -D glucanes qui, avec la chitine, sont les polysaccharides de structure majeurs de la paroi fongique. Ces polysaccharides, normalement présents dans le sérum de sujets sains à des valeurs basses, sont libérés dans la circulation en cas d'infections fongiques et des taux élevés de (1,3)-D glucanes peuvent alors être retrouvés. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que le taux de  $\beta(1,3)$ -D glucanes augmente bien avant l'apparition des signes cliniques, ce qui permet d'envisager un diagnostic précoce. De plus, la spécificité de ces tests ne se limite pas au genre *Candida* puisque les 3-glucanes sont produits par pratiquement tous les champignons. Ils sont cependant peu contributifs pour le diagnostic des cryptococcoses et des zygomycoses (faible production de 3-glucanes).

A l'heure actuelle, seul le test Fungitell® (Associates of Cape Cod, Inc.). Le principe de ce test réalisé en microplaques est présenté dans la Figure 55. En présence d'endotoxine, de facteur C et de facteur G, les  $\beta(1,3)$ -D glucanes vont permettre l'hydrolyse d'un substrat peptidique chromogénique avec libération de paranitroaniline (pNA) et l'intensité de la coloration obtenue sera fonction de la concentration en  $\beta(1,3)$ -D glucanes circulants.

Ce test présente une sensibilité comprise entre 70 et 100% selon les études. Chez les patients à risque, des taux sériques d'au moins 80 pg/ml sont hautement corrélés avec des infections fongiques invasives, et inversement des valeurs basses ont une haute valeur prédictive négative (Bouchara et *al.*, 2010).

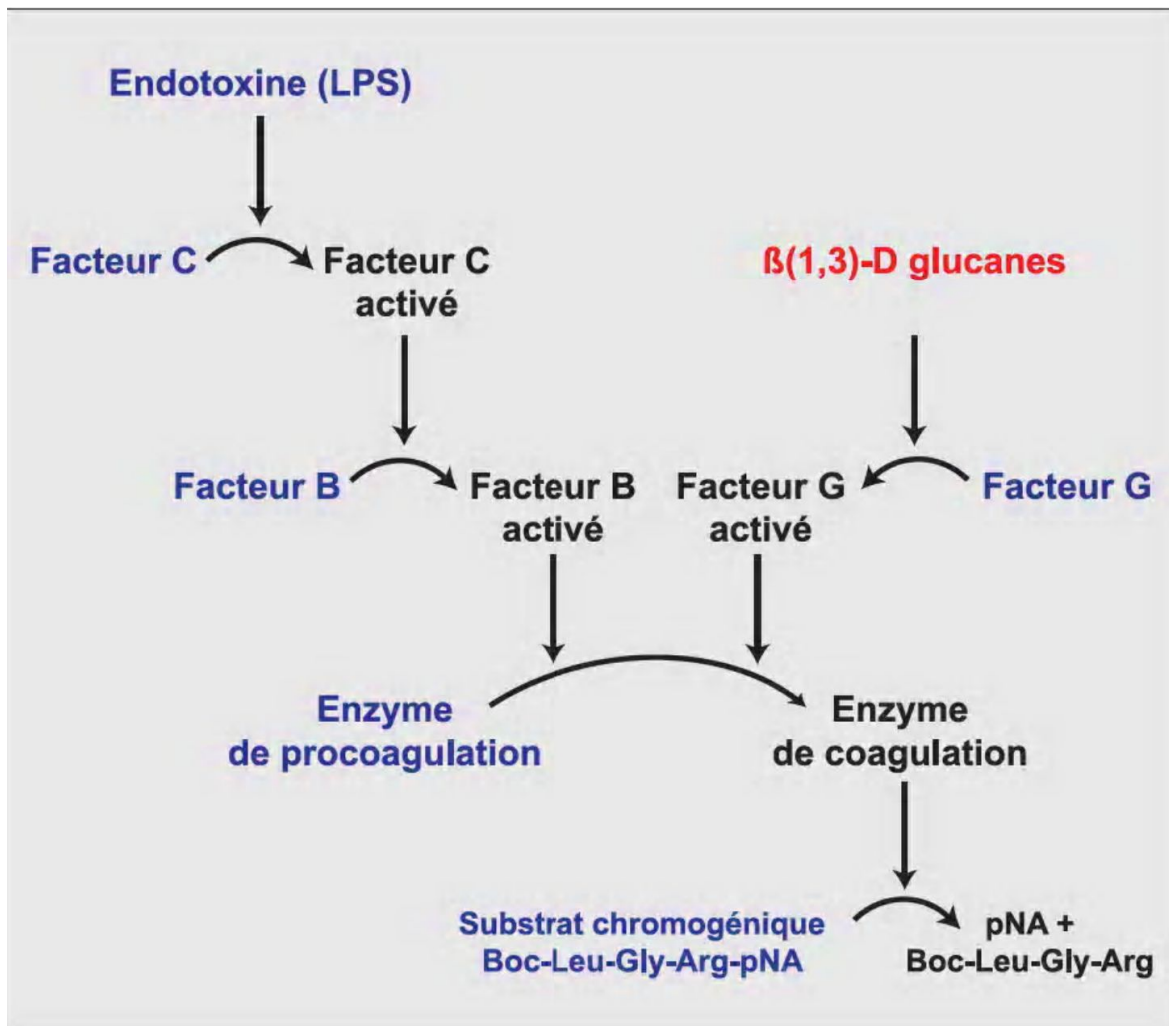


Figure 55 : Détection des  $\beta$ -glucanes circulants (Bouchara et *al.*, 2010)

#### d. Diagnostic des candidoses vaginales

Une technique d'immunochromatographie sur membrane utilisant un anticorps monoclonal reconnaissant des antigènes mannanes a été développée récemment pour le diagnostic des candidoses vaginales et la différenciation entre l'état commensal et l'état pathogène. Ce test rapide et simple à mettre en oeuvre permet la détection dans les sécrétions vaginales des antigènes mannanes qui sont excrétés in vivo et qu'on retrouve en concentration élevée lors d'un état pathogène. Il devrait être prochainement commercialisé sous le nom de CANDI-VAGI (Figure 56) (Bouchara et *al.*, 2010).

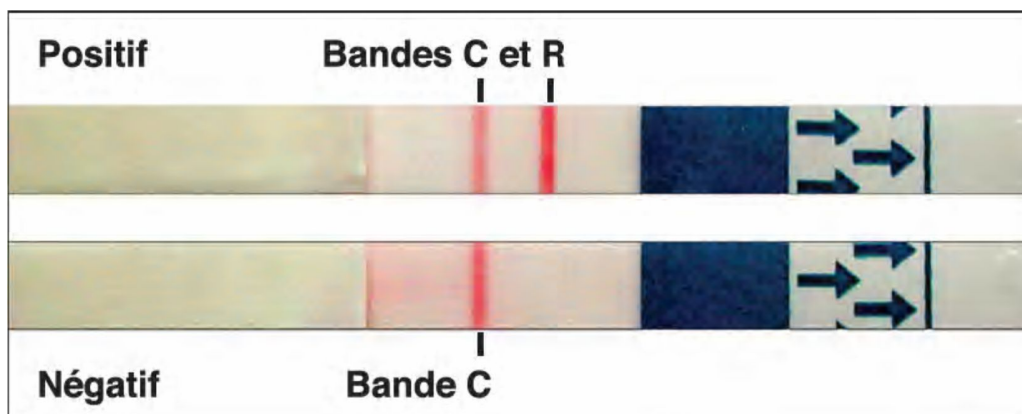


Figure 56: Principe du test CANDI-VAGI pour le diagnostic des candidoses vaginales (Bouchara et *al.*, 2010)

Lorsque le dispositif est introduit dans l'échantillon à tester, obtenu à partir d'un prélèvement vaginal traité avec le milieu d'extraction, les antigènes mannanes de *Candida* éventuellement présents, se fixent sur l'anticorps monoclonal 5B2 (IgM) lié aux particules d'or et forment des complexes antigènes-anticorps-particules d'or. Ces complexes migrent et se fixent, par l'intermédiaire des antigènes, sur l'anticorps 5B2 immobilisé sur la bandelette. Une bande colorée en rose ou rose violacé apparaît (R). L'excès d'anticorps monoclonal lié aux particules d'or se fixe ensuite sur la ligne « Contrôle » (C) où sont immobilisés des anticorps anti-IgM. Il apparaît alors sur cette ligne une coloration rose ou rose violacé, qui témoigne de la bonne migration. L'apparition d'une seule bande (C) indique un résultat négatif, et l'apparition de deux bandes (R et C) un résultat positif (Bouchara et *al.*, 2010).

### III.6.2.2. La cryptococcose

Pour la cryptococcose, 4 tests sont actuellement commercialisés. Ils reposent tous sur une technique d'agglutination de particules de latex sensibilisées par des anticorps polyclonaux (CryptoLa-test<sup>®</sup>, International Biologica Laboratories ; Cryptococcal Antigen Latex Agglutination-System ou CALAS<sup>®</sup>, Meridian Diagnostics ; Latex Cryptococcal Antigen Detection System, IMMY ou Myco-Immun) ou des anticorps monoclonaux (Pastorex crypto plus<sup>®</sup>, Bio-Rad).

Tous ces tests présentent une très bonne sensibilité et une excellente spécificité. Pour le sérum, il est recommandé de chauffer celui-ci au préalable pendant 10 minutes à 100°C pour dissocier d'éventuels complexes immuns et éliminer le facteur rhumatoïde.

Les techniques mycologiques classiques suffisent largement à poser le diagnostic d'une levurose superficielle. Concernant les localisations profondes, les hémocultures peuvent rester négatives en dépit d'une large dissémination de la levure dans l'organisme. Dans ces situations, l'approche sérologique peut aussi être prise en défaut, en raison du statut immunitaire des patients qui sont souvent immunodéprimés. La recherche des antigènes (mannanes,  $\beta$  (1,3)-D glucanes) peut pallier ces difficultés. Cependant, elle n'est utilisable en pratique que pour les candidoses et les cryptococcoses. La biologie moléculaire s'avère être une alternative intéressante, mais pour l'instant aucun dispositif commercial n'est validé et sa performance relève du savoir-faire des équipes qui la pratiquent (Bouchara et *al.*, 2010).

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Botton B, Breton A, Fevre M, Guy PH, Larpent JP, Veau P. Moisissures utiles et nuisibles: importance industrielle. Paris: Masson Centre National des Lettres; 1985.
2. Bouchara JP, Pihet M, de Gentile L, Cimon B, Chabasse D. Les levures et levuroses. Cahier De Formation Biologie Médicale. Bioforma. 2010 ; N° 44, Juin : 1-200.
3. Bouchet PH, Guignard JL, Madulo-Leblond G, Régli P. Mycologie générale et médicale. Paris: Edition Masson, 1989.
3. Case C. L. 2006. Microbiology. Part A. Page Web Ppt. Www.Guamdiver.De/06\_T-1/Term-1-Class/B230/Postings/Tfc\_Ch12\_Lect.Ppt
4. Chabasse D, Guiguen CL, Contet-Audonnet N. Mycologie Médicale. Masson, Paris : 1-78 ; 1999.
5. Chabasse D. Classification des champignons d'intérêt médical. Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS Paris, Maladies infectieuses, 8-088-8-10, 2001 : 15 p.
6. Chabasse D, Bouchara JP, De Gentile L, Brun S, Cimon B, Penn P. Les Moisissures D'intérêt Médical. Cahier De Formation Biologie Médicale. Bioforma. 2002 ; N° 25, Mars : 1-159.
7. Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. Les dermatophytes. Cahier De Formation Biologie Médicale. Bioforma. 2004 ; N° 31, Mars : 1-158.
8. Chabasse D, Miegerville M. Cryptococcose. 2° Cycle Des Etudes Médicales. Enseignement De Parasitologie Et Mycologie. Association Française Des Enseignant De Parasitologie Et Mycologie. Faculté De Médecine De Nantes. 1<sup>ère</sup> Edition Septembre : 151-160 ; 2005.
9. Chermette R, Bussieras J. Parasitologie Vétérinaire, Mycologie. Service De Parasitologie. Ecole Nationale Vétérinaire D'alfort. 11-157 ; 1993.
10. Delorme J. & Robert A. 1997. Mycologie Médical. Montréal. Décarie.
11. Euzeby J. Cours De Mycologie Médicale Comparée, Les Mycoses Des Animaux Et Leurs Relations Avec Les Mycoses De L'homme. Edition Vigot Frères : 42-113 ; 1969.
12. Euzeby J. Mycologie Médicale Comparée, Les Mycoses Des Animaux Et Leurs Relations Avec Les Mycoses De L'homme. Edition Vigot Frères, Tome 1 : 9-262 ; 1992.
13. Euzeby J. Mycologie Médicale Comparée, Les Mycoses Des Animaux Et Leurs Relations Avec Les Mycoses De L'homme. Edition Vigot Frères, Tome 2 : 4-463 ; 1994.
14. Guillot J. Le diagnostic biologique des mycoses animales. Revue française des laboratoires. Février 1998 ; N°310 : 57-64.
15. Hawksworth, Sutton & Ainsworth, 1970. Cité Par Chabasse Et Al, 1999.



16. Hoog, 1995. Cité Par Chabasse Et Al, 1999.
17. Jacquet J, Boutibonnes P. Recherches Sur Les Caractères Des Aspergillus Pathogènes. Les Espèces Majeurs A. Fumigatus, A. Clavatus Et A. Flavus. Bull. Acad. Vét. Edition Vigot Frères. Tome Xxxx, Avril ; 1967.
18. Koenig H. Guide De Mycologie Médicale. Ellipses : 1-96 ; 1995.
19. Kurtzman CP, Fell JW. The Yeasts: A Taxonomic Study. 4th Ed. Amsterdam: Elsevier Science B V; 1998.
20. Kwon Chung & Bennett, 1992. Cité Par Coube J., Avortements Et Mammites Mycosiques Des Bovins : Etude Bibliographique Des Connaissances Actuelles. The. Doc. Vét. Env Nantes., 54 : 20-162; 1997.
21. Lagneau P. E. & Houtain J. Y. 2001. Aspergillose Invasive Chez Des Psittacidés. Ann. Méd. Vét. 145 : 307-310.
22. Moulinier C. Parasitologie et mycologie médicales ; Eléments de morphologie et de biologie. E M INTER – Editions médicales internationales. 685-796. 2003