

Mémoire de Maîtrise en médecine

Identification des dermatophytes en culture sur la base de leurs critères
macroscopiques et microscopiques.

Etudiante

Laurève Mélisande Chollet, MMed

Tuteur

Prof. Michel Monod
Service de Dermatologie, CHUV

Expert

Dr. Philippe Hauser, MER
IMUL, CHUV

Lausanne, le 1^{er} octobre 2014

Résumé

Contexte : Les dermatophytes sont des champignons filamenteux parasites spécialisés qui dégradent les tissus kératinisés. Ils sont responsables de la plupart des mycoses de la peau, du cuir chevelu et des cheveux, et des ongles. Le choix du traitement des dermatophytoses dépend des symptômes et du dermatophyte incriminé parmi une quinzaine d'espèces possibles.

L'identification des dermatophytes se fait en général sur la base des caractères macroscopiques et microscopiques des cultures. L'identification est parfois difficile ou reste incertaine car il peut y avoir des variations d'un isolat à l'autre au sein d'une même espèce. Cependant, les espèces sont facilement identifiées sur la base de séquences d'ADN. En pratique, des séquences d'ADN ribosomique suffisamment polymorphes sont le plus souvent utilisées pour discriminer les espèces de dermatophytes.

Des méthodes spécialisées et sophistiquées telles que les séquences d'ADN et la spectrométrie de masse sont de plus en plus proposées dans la littérature pour identifier les dermatophytes. Toutefois, ces méthodes ne peuvent pas être utilisées directement par un médecin dans un cabinet médical. C'est pourquoi des méthodes plus simples basées sur l'observation de caractères phénotypiques des champignons en culture ne devraient pas être abandonnées.

Objectif : Etablir une clé d'identification dichotomique se basant sur des caractères macroscopiques et microscopiques permettant une identification fiable du dermatophyte par la culture. Des clés d'identification des espèces seront élaborées et testées pour leur validation en parallèle avec leur identification par des méthodes de Biologie Moléculaire. Créer un outil simple qui pourra être utilisé au laboratoire par des médecins ou des biologistes non spécialisés en mycologie pour identifier les dermatophytes sans avoir recours à une technologie sophistiquée.

Méthodes :

Inventaire des espèces isolées de 2001 à 2012 au laboratoire de dermatologie du CHUV.

Inventaire des caractères phénotypiques permettant de caractériser chaque espèce.

Création d'un système dichotomique sur la base des caractères phénotypiques pour séparer et identifier les espèces (clé d'identification des espèces).

Résultats attendus : Les résultats attendus sont définis au niveau des objectifs. L'outil doit être accessible pour des personnes inexpérimentées qui pourront alors identifier les dermatophytes.

Plus-value : Les dermatophytoses sont fréquemment diagnostiquées. Cet outil est destiné à tous les dermatologues installés et au personnel de laboratoire qui ne sont pas nécessairement spécialisés en la matière.

Mots-clés : Dermatophyte. Macroscopie. Microscopie. Identification. Clé.

Table of Contents

1	Introduction générale.....	4
1.1	Caractères généraux et classification des champignons.....	4
1.2	Les mycoses cutanées	5
1.2.1	Tinea corporis.....	6
1.2.2	Tinea cruris.....	6
1.2.3	Tinea pedis	7
1.2.4	Tinea manuum.....	7
1.2.5	Tinea faciei et Tinea barbae.....	7
1.2.6	Tinea capitis.....	7
1.2.7	Tinea unguium (dermatophytoses unguéales).....	8
1.3	Le traitement des dermatophytoses chez l'homme.....	9
1.3.1	Médicaments et cibles.....	9
1.3.2	Traitement.....	10
1.4	Techniques usuelles de laboratoire en mycologie dermatologique	11
1.4.1	L'examen microscopique direct des prélèvements dermatologiques.....	11
1.4.2	La culture des prélèvements dermatologiques.....	11
1.4.3	L'apport de la biologie moléculaire dans l'identification des dermatophytes.....	12
2	Objectif du travail de master	13
3	Matériel et méthodes.....	14
3.1	Cultures des prélèvements dermatologiques.....	14
3.2	Elaboration de la clé dichotomique.....	14
4	Résultats et Discussion	18
4.1	Espèces identifiées et discordances.....	18
4.2	Clé dichotomique finale.....	20
5	CONCLUSION.....	25
6	Annexes et notes concernant la clé dichotomique finale	26
6.1	Ancienne clé dichotomique.....	26
6.2	Notes concernant la clé dichotomique finale	30
7	Bibliographie.....	30

1 Introduction générale

1.1 Caractères généraux et classification des champignons

Les champignons représentent un groupe très hétérogène d'organismes tels que les dermatophytes, les levures, les *Penicillium*, les morilles et les champignons à lamelles. Ils comprennent plus de 100'000 espèces. Les principaux caractères des champignons sont les suivants :

1. Les champignons sont des eucaryotes, contrairement aux bactéries qui sont des procaryotes. Les procaryotes sont des organismes ne possédant pas de noyau bien défini, ni d'organites intracellulaires entourés d'une membrane. La cellule fongique, quant à elle, comprend un noyau, divers organites tels qu'un reticulum endoplasmique, un appareil de Golgi, des mitochondries, des vacuoles ainsi qu'une enveloppe extérieure appelée la membrane plasmique.

2. En plus de la membrane plasmique, les champignons sont dotés d'une paroi. La paroi cellulaire des champignons n'a pas la même structure que la paroi cellulaire des organismes végétaux. Celle des champignons est constituée de chitine, et de β 1-3 et β 1-6 glucane. Celle des végétaux consiste en des fibres de cellulose qui sont incorporées dans une matrice faite de divers polysaccharides et de diverses protéines.

3. N'ayant pas de chlorophylle, les champignons sont hétérotrophes : ne pouvant eux-même pas effectuer la synthèse de tous leurs constituants, ils utilisent une source de carbone organique exogène afin d'obtenir les éléments pour pallier à cette synthèse.

4. Les champignons peuvent vivre sous 2 formes : sous la forme de colonies de cellules isolées, appelées les levures, ou sous la forme de mycélium. Un mycélium est un réseau de filaments ramifiés (ou hyphes) cloisonnés transversalement. Chaque segment d'hyphe ou cellule fongique comprend un à plusieurs noyaux haploïdes ou diploïdes.

5. La reproduction s'accomplit en libérant des spores, produites soit par méiose, c'est-à-dire de manière sexuée, ou alors par mitose, de manière asexuée. De manière générale, les spores sont unicellulaires, mais il existe aussi des spores pluricellulaires. Les spores sexuées sont souvent générées dans des unités spécialisées des hyphes, les sporanges microscopiques ou macroscopiques qui montrent une différenciation limitée de tissus.

Les champignons peuvent affecter un grand nombre de tissus chez l'être humain : les tissus apparents comme la peau, le cuir chevelu ou les ongles, certaines structures telles que la cornée, les sinus ou encore les oreilles, etc. Les champignons peuvent aussi affecter les organes internes. Basés sur des caractères microscopiques, macroscopiques, physiologiques, et à des fins de bon choix de traitements, les champignons sont classés en trois grands groupes en microbiologie médicale :

1. *Les Dermatophytes* : ils forment un groupe de champignons filamenteux parasites qui ont la capacité de coloniser la peau et ses appendices (cheveux, poils et ongles) qui sont des tissus kératinisés. Lorsque l'on prélève du matériel mycologique à partir d'une lésion dermatologique et qu'on lui fournit un milieu de culture pour s'y développer, le champignon se reproduit uniquement par mitose. Les spores alors produites de manière asexuée nous permettent de reconnaître le dermatophyte incriminé et d'élaborer une classification de ce dernier en trois genres distincts : *Microsporum*, *Epidermophyton* et *Trichophyton* (Mignon et al., 2011). Les diverses espèces de champignons se révèlent être soit anthropophiles, zoophiles ou géophiles. Les espèces zoophiles se retrouvent uniquement dans les genres *Microsporum* et *Trichophyton*.

Cependant, si on fournit des conditions bien particulières de culture aux dermatophytes, ils se montrent capables de se reproduire de manière sexuée. La reproduction sexuée requiert la rencontre de souches de sexe opposé (brins + et -) pour produire des fructifications : les cléistothèces. Les cléistothèces sont de petites boules contenant des asques sphériques, cellules spécialisées contenant chacune des spores générées par la rencontre d'un brin + et -, et d'une méiose. On donne le nom de genre *Arthroderma* aux espèces de dermatophytes dont on est parvenu à obtenir la reproduction sexuée sur le milieu de culture au laboratoire. (Hay et al., 1984)

2. *Les levures (et les champignons dimorphes)* : parmi les levures les plus importantes en pathologie humaine, on citera *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Histoplasma capsulatum*. Une levure vit sous la forme de colonies de cellules isolées. Celles-ci sont produites par bourgeonnement ou par division cellulaire. Les levures se retrouvent surtout chez les ascomycètes, mais aussi chez les basidiomycètes et les zygomycètes. Elles ne forment alors pas un groupe taxonomique unique.

Les levures se distinguent des champignons filamenteux par leur capacité à former des colonies de cellules isolées. Cependant, il existe des champignons dimorphes : en fonction de diverses conditions de croissance, il est possible qu'une espèce se trouve soit sous la forme de champignon filamenteux, soit sous la forme d'une levure. Parmi les champignons dimorphes, on peut citer *Candida albicans* ou encore *Histoplasma capsulatum*. Ainsi, une forme levurique n'exclut pas une forme filamenteuse.

3. *Les moisissures ou champignons filamenteux non dermatophytes*: ils forment un groupe hétérogène dans lequel on retrouve les *Aspergillus*, les *Fusarium* ainsi que les *Mucor*. Ils peuvent être saprophytes, contaminants ou parasites.

1.2 Les mycoses cutanées

Les champignons responsables des infections de la peau et de ses annexes sont le plus souvent des dermatophytes. Cependant les levures et les moisissures peuvent aussi causer ces infections. Bien que les dermatophytes soient classifiés selon le genre, on les classe encore en fonction de leur environnement écologique. Il existe alors trois groupes écologiques de dermatophytes: les espèces anthropophiles qui infectent l'homme (inflammation moyenne chronique), les espèces

zoophiles qui infectent les animaux (inflammation intense) et les espèces géophiles dont l'habitat naturel est le sol. D'une manière générale, les espèces zoophiles et géophiles sont associées à des infections inflammatoires aiguës, et les espèces anthropophiles à des infections chroniques et peu ou pas inflammatoires.

Une teigne ou *tinea* est une mycose de la peau, des cheveux ou des ongles. Dans la littérature, ce terme est souvent synonyme de dermatophytose. Cependant, l'affection *tinea nigra* n'est pas causée par un champignon dermatophyte, mais par une levure appelée *Hortaea werneckii*. Le terme *tinea* est attribué à la caractéristique clinique d'une lésion dermatophytique : éclaircissement central de la lésion, l'infection fongique se produisant de manière centrifuge.

Dans les mycoses superficielles, l'invasion fongique est limitée à la peau, les cheveux et les ongles. Ainsi, seul le stratum corneum est envahi. La réponse inflammatoire de l'hôte peut, quant à elle, toucher l'épiderme et le derme. Le pourtour de la lésion est marginé, surélevé, érythémateux, parfois avec des pustules. L'infection se manifeste parfois sous la forme d'une seule lésion annulaire, mais les lésions peuvent être multiples. Le diagnostic différentiel comprend : psoriasis, érythème annulaire, eczéma annulaire ou discoïde (nummulaire), pityriasis rosea (Hay *et al.*, 1984).

1.2.1 Tinea corporis

On désigne par le terme *tinea corporis* les dermatophytoses de la peau glabre. Elles peuvent être provoquées par tous les dermatophytes mais les agents les plus souvent incriminés sont, pour les espèces zoophiles *Arthroderma vanbreuseghemii* et *Arthroderma benhamiae* (deux espèces appelées avant *Trichophyton mentagrophytes*), ainsi que *Microsporum canis*, et pour les espèces anthropophiles *Trichophyton rubrum* (Monod *et al.*, 1992). Elles ont le plus souvent pour origine une infection à dermatophyte chez un animal domestique parasité. Cliniquement, la lésion d'une *tinea corporis* présente un rash érythémateux pruritique, un pourtour en écailles qui délimite le centre de la lésion pouvant contenir des pustules ou des vésicules (Hay R. *et al.*, 2012). On peut trouver une dermatophytose dans n'importe quelle zone non pileuse du tronc, du visage (à l'exception des zones de la barbe, *tinea barbae*), des membres, des pieds, des mains et de l'aîne. L'infection peut se développer à partir d'une *tinea pedis* ou *cruris*, ou bien peut être primaire (Hay *et al.*, 1984).

1.2.2 Tinea cruris

Elle désigne une dermatophytose de l'aîne. Transmise par contact d'humain à humain, les agents infectieux causant la *tinea cruris* peuvent être également transmis par le linge. Si le patient est touché par une dermatophytose des pieds, on doit penser à une auto-inoculation. La présentation clinique de cette affection ainsi que les agents infectieux qui en sont responsables sont semblables à la *tinea corporis*. Alors que cette dernière apparaît le plus souvent chez les enfants et les jeunes adultes, la *tinea cruris* est plus fréquente chez l'homme adulte (Hay R. *et al.*, 2012).

1.2.3 Tinea pedis

Il s'agit d'une dermatophytose des pieds (mycose de la plante ou intertiglio). Les principales espèces responsables sont *T. rubrum*, *T. interdigitale* (80% et 20% des cas respectivement) (Monod *et al.*, 1992), ou encore *E. floccosum*. *Tinea pedis* est une infection très fréquente qui se répand d'être humain à être humain. Les hommes sont plus affectés que les femmes en raison du port fréquent de chaussures de sport fermées. Si cette affection n'est pas traitée, elle évolue chroniquement. L'image clinique montre une desquamation sèche ou macérée des espaces interdigitaux latéraux qui s'étend médialement. Une hyperkératose de la plante et du côté latéral du pied montre l'aspect typique de « pied de moccassin ». Les ongles peuvent être atteints (Hay *R. et al.*, 2012).

1.2.4 Tinea manuum

La teigne de la paume des mains est souvent provoquée par une autoinfection à partir d'une teigne des pieds. La prédominance masculine de cette teigne est expliquée par la prédominance masculine de la teigne des pieds. Les espèces responsables sont *T. rubrum*, occasionnellement d'autres espèces causant *tinea pedis*, ou alors des espèces zoophiles (*T. erinacei*) ou géophiles (Hay *et al.*, 1984).

1.2.5 Tinea faciei et Tinea barbae

Tinea faciei se réfère à une dermatophytose infectant toute partie du visage. *Tinea barbae* est une dermatophytose confinée à la zone de la barbe.

Les teignes du visage sont des infections causées par les espèces zoophiles *T. mentagrophytes* et *M. canis*, et par les espèces anthropophiles (ex *T. rubrum*) provenant d'autres sites comme par exemple les infections du scalp. L'image clinique révèle un érythème, des écailles et de petites pustules. Les démangeaisons peuvent être fréquentes et on compte qu'environ la moitié des patients atteints de *tinea faciei* se plaignent de photosensibilité (Hay *et al.*, 1984).

Les teignes de la barbe infectent les adultes et sont provoquées par *Trichophyton verrucosum* dont le réservoir est le bétail (Mignon *et al.*, 2011). L'espèce *Trichophyton mentagrophytes* et occasionnellement des espèces anthropophiles peuvent être citées. Les lésions sont très inflammatoires, avec érythème, œdème, pustules et perte de poils. Il peut aussi y avoir formation de kérion et de lymphadénopathie. (Hay *et al.*, 1984).

1.2.6 Tinea capitis

Ce sont les dermatophytoses du cuir chevelu. La présentation clinique de ces infections diffère d'un individu à l'autre en fonction de l'agent pathogène incriminé et des capacités immunitaires de l'individu infecté. Cette teigne affecte principalement les enfants avant la puberté (Hay *et al.*, 1984).

Les espèces responsables d'une teigne du cuir chevelu sont variables : on peut citer des espèces zoophiles telles que *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, des espèces anthropophiles telles que *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense* ainsi que des espèces géophiles comme par exemple *M. gypseum* (Hay *et al.*, 1984). Les espèces zoophiles créent des inflammations plus intenses que les autres espèces anthropophiles et géophiles. La lumière de Wood utilise un rayonnement UV d'une longueur d'onde de 365 nm émettant une

fluorescence verte permettant d'identifier les teignes à *Microsporum canis* (Mignon et al., 2001). Quatre principaux types de dermatophytoses du cuir chevelu sont reconnus : infections ectothrix (se développant sur la gaine des poils) à petites spores, infections ectothrix à spores de diamètre moyen, infections ectothrix à grandes spores, et les infections endothrix (se développant sous la gaine à l'intérieur du poils) (Hay et al., 1984).

Parmi les atteintes du cuir chevelu, on distingue encore le favus dont l'espèce responsable, *Trichophyton schoenleinii*, émet lui aussi une fluorescence verte (Hay et al., 1984).

1.2.7 Tinea unguium (dermatophytoses unguéales)

On définit les onychomycoses comme des infections chroniques de l'ongle causées par un champignon. Les agents infectieux incriminés se révèlent être des dermatophytes dans 60-80 % des cas (Kanazawa et al., 2013).

Les onychomycoses représentent jusqu'à 30% des mycoses superficielles et 50% des maladies de l'ongle. On estime la prévalence des onychomycoses à plus de 10% dans la population générale et à 40% dans la population vieillissante (Baudraz-Rosselet et al., 2010).

Concernant *tinea unguium*, il s'agit des dermatophytoses unguéales qui sont des infections très fréquentes. Les orteils sont le plus souvent affectés, et leur infection succède généralement à une mycose plantaire ou interdigitale (Hay et al., 1984). Quant à une infection des ongles des mains, elle fait généralement suite à une atteinte de la paume de la main, cette dernière étant le plus souvent unilatérale (Hay et al., 1984). Les espèces les plus fréquemment responsables des *tinea unguium* sont les espèces anthropophiles *Trichophyton rubrum* (80% des cas), *Trichophyton interdigitale* (20% des cas) et *Epidermophyton floccosum* (<1%) (Bontems et al., 2009). Un ou plusieurs doigts ou orteils peuvent être atteints. Parfois l'infection est strictement unilatérale, tout particulièrement si elle touche une main. Dans la présentation clinique des *tinea unguium*, on note une onycholyse atteignant le bord libre et le bord latéral de l'ongle ainsi qu'une discoloration de l'ongle. Une hyperkératose peut être présente. L'ongle s'épaissit et s'effrite. On ne relève habituellement pas d'inflammation paronychiale (Hay et al., 1984).

1.3 Le traitement des dermatophytoses chez l'homme

Les mycoses superficielles causées par les dermatophytes sont en augmentation et leur prise en charge constitue une part importante du travail des médecins dermatologues ou médecins non spécialisés en dermatologie.

Le choix du traitement d'une dermatophytose repose sur le type de lésion clinique ainsi que sur la capacité de réponse au traitement. En effet, reconnaître les facteurs prédisposants aux infections fongiques est primordial, car bien souvent, malgré un traitement adapté, l'infection peut persister grâce à des facteurs de susceptibilité. Si l'on s'attache particulièrement au type de lésion clinique et que l'on prend pour exemple une onychomycose, un échec de traitement sera généralement attribué à une hyperkératose épaisse, une onycholyse, un dermatophytome, l'atteinte des plis latéraux de l'ongle, la présence de conidies quiescentes ou de mycélium séquestré, ou encore des espèces résistantes à ces traitements (Mycoses non dermatophytiques).

D'une manière générale, les lésions focales de la peau glabre sont traitées de manière topique, alors que les traitements systémiques sont recommandés pour les infections chroniques ou étendues, ou encore dans des cas de *tinea capitis* et *tinea unguium*. Bien que certaines infections requièrent un traitement systémique, on renforce ce traitement en le complétant par un médicament topique, comme par exemple lors d'une *tinea capitis*. En effet, le traitement topique permet de réduire la dissémination de particules infectieuses dans l'environnement. Pour pallier à cette dissémination, il est aussi possible de procéder à la coupe des cheveux se situant au pourtour de la lésion dermatophytique. Une surinfection bactérienne pouvant faire suite à l'infection fongique, une thérapie antifongique spécifique doit être associée à un traitement antibiotique.

Lors du calcul des doses à administrer, il est important de savoir que le CMI (concentration minimale inhibitrice) in vitro n'est pas corrélée à l'efficacité en clinique. Des facteurs tels la composition de l'agar, la concentration de l'inoculum, le pH et la durée de l'incubation influencent les résultats in vitro (Mock *et al.*, 1998).

1.3.1 Médicaments et cibles

La griséofulvine, dérivant du *Penicillium griseofulvum*, a été le premier agent antifongique systémique créé. Bien que son mécanisme d'action ne soit que partiellement compris, l'efficacité de la griséofulvine réside en ses propriétés fongistatiques : par son interaction avec les microtubules de la cellule fongique, la griséofulvine inhibe sa mitose en provoquant la disruption du fuseau mitotique (Gull et Trinci, 1973). Les réponses à court terme à la griséofulvine sont généralement bonnes, mais un arrêt trop précoce de traitement peut mener à une récurrence de l'infection (Legendre et Steltz 1980 ; Hay 1990).

Les azoles sont définis comme des agents fongistatiques interférant avec les enzymes de la famille du cytochrome P450. Cette interaction est responsable de l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, constituant majeur de la paroi fongique, d'un arrêt de la prolifération cellulaire et affecte la perméabilité membranaire. Le kétoconazole a été la première alternative médicamenteuse systémique à la griséofulvine. Bien que démontrant une efficacité tout autant élevée voir supérieure à la griséofulvine, le kétoconazole est responsable d'une hépatotoxicité et

de troubles endocriniens (dus notamment à l'interférence avec le cytochrome P450 des cellules mammifères) qui limitent alors son utilisation. Les nouveaux triazoles, et ce tout particulièrement l'itraconazole, démontrent une haute spécificité pour le cytochrome P450 fongique et de ce fait, limitent les effets secondaires émanant d'une interaction d'avec le cytochrome P450 de l'hôte. Ces médicaments sont plus sûrs, mieux tolérés et sont préservés des effets indésirables endocriniens du kétoconazole.

Les allylamines, tout comme les azoles, interfèrent avec la sythèse de l'ergostérol. Les allylamines agissent en bloquant l'époxydation des squalènes. En ce qui concerne la terbinafine, il existe une très faible différence de concentration du médicament le définissant en termes d'agent fongistatique ou d'agent fongicide. En pratique clinique, on désigne communément la terbinafine comme agent fongicide.

La terbinafine et les triazoles sont habituellement utilisés pour le traitement des dermatophytoses cutanées, quelle que soit l'espèce impliquée. Cependant, dans certaines présentations cliniques telles que la tinea capitis, la réponse thérapeutique peut dépendre de l'espèce dermatophytique incriminée et nécessite donc son identification préalable. Le taux de guérison est excellent pour les cas d'infections provoquées par les espèces anthropophiles *T. violaceum* et *T. soudanense*. La griséofulvine se définit comme le traitement de choix de la tinea capitis causée par des espèces zoophiles telles que *Microsporum canis*, *Arthroderma benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* ainsi que pour l'espèce anthropophile *M. langeronii* démontrant une résistance à la terbinafine (Mock *et al.*, 1998). Le fluconazole semble utile aux patients intolérants à la terbinafine ou pour lesquels un traitement de hautes doses de terbinafine est contrindiqué (Foster *et al.*, 2005).

1.3.2 Traitement

Habituellement, on considère la terbinafine et les triazoles comme le traitement de choix d'une tinea corporis, et ce, quelle que soit l'espèce dermatophytique infectante. Pour les infections disséminées et impliquant les annexes cutanées telles que les poils et les ongles, la guérison peut être obtenue grâce à un traitement systémique.

Cependant, si l'on s'intéresse aux tinea capitis, on note que le traitement antifongique doit démontrer une efficacité spécifiquement pour l'espèce de dermatophyte incriminée. La terbinafine systémique per os est hautement plébiscitée dans les tinea impliquant les espèces anthropophiles telles que *T. violaceum* et *T. soudanense*. Mais pour les autres teignes, notamment causées par l'espèce anthropophile *M. audouini* et par les espèces zoophiles *M. canis*, *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*, la griséofulvine semble être le traitement de premier recours. En effet, ces diverses teignes se révèlent insensibles à une cure de terbinafine (Verrier *et al.*, 2013).

La griséofulvine est un médicament actuellement non disponible en Suisse mais il est possible d'en produire en formulation ad hoc par prescription magistrale. A la vue de sa lipophilie, on préconise l'administration de griséofulvine accompagnée d'un aliment gras.

En conclusion, l'identification du dermatophyte incriminé dans la mycose est importante afin d'établir un traitement approprié spécifique à l'espèce de dermatophyte et efficace. En outre, l'identification d'un dermatophyte permet de mettre en œuvre des mesures préventives afin de pallier à une éventuelle récurrence de l'infection ou encore de restreindre la contagion aux proches de la personne primairement infectée (Baudraz-Rosselet *et al.*, 1996)

1.4 Techniques usuelles de laboratoire en mycologie dermatologique

1.4.1 L'examen microscopique direct des prélèvements dermatologiques

Le gold standard de l'identification d'une mycose consiste en la mise en évidence de matériel fongique dans la lésion par la microscopie directe et en la culture des échantillons prélevés auprès du patient. En dermatologie, l'examen direct est essentiel et prime sur le résultat de la culture.

L'examen microscopique direct permet de détecter si oui ou non un champignon est présent dans l'échantillon prélevé auprès du patient.

Au laboratoire de mycologie du CHUV, on a réalisé les examens microscopiques directs à l'aide du réactif au sulfure de sodium (ou KOH 10%) contenant un fluorochrome. On a ajouté au sulfure de sodium (ou au KOH 10%) une solution contenant du fluorochrome pour contraster la vision des éléments fongiques dans le réactif (Monod et al., 1989). Les fluorochromes (utilisés au CHUV : encre Parker et chlorazol black E) (autres laboratoires : Blankophor, Calcofluor ou acridinium orange) se lient à la chitine et de ce fait, marquent les hyphes et les arthrospores qui paraissent fluorescents (Tchernev et al., 2013). La fluorescence vue au microscope à fluorescence permet donc une meilleure observation de la morphologie des champignons (Baudraz-Rosselet et al., 2005).

On a préparé le réactif de sulfure de sodium par la dissolution de 1g de Na_2S dans 7.5 ml d'eau distillée, en y joignant 2.5 ml d'éthanol à 95% ; puis on a complété la solution en y adjoignant 10 μl de Tinopal UNPA-GX (fluorescent brightener 28 ; Sigma USA). Il est possible de conserver cette solution pendant trois mois si on la préserve de la lumière. Une fois la solution réalisée, on a pu y incuber, à l'aide d'une goutte de réactif, les divers prélèvements dermatologiques (squames, poils, cheveux) déposés au préalable sur une lame porte-objet. Avant examen au microscope, les squames doivent avoir été en contact de la solution pendant 1 minute, et les ongles pendant au moins 5 minutes. Cette incubation terminée, on a recouvert le prélèvement d'une lamelle et on a réalisé l'examen microscopique direct à l'aide d'un microscope à fluorescence doté d'un filtre bleu (400-440nm).

L'examen microscopique direct ne permet pas par contre d'identifier l'espèce de champignon et est donc non spécifique. Il faut pour ceci recourir à la culture du matériel contenu dans l'échantillon dermatologique. Quand l'examen direct est positif, il se peut que la culture soit positive ou négative (le champignon pousse ou non sur le milieu de culture). Quand l'examen direct est négatif, il est rare que la culture soit positive. La microscopie fluorescente est hautement sensible dans l'examen direct car les hyphes et les arthrospores produisent de la fluorescence même si on a peu de matériel fongique. De ce fait, la microscopie fluorescente est hautement efficace pour mener un examen microscopique direct.

1.4.2 La culture des prélèvements dermatologiques

Les prélèvements dermatologiques, squames, poils et cheveux, ont été déposés sur un milieu nutritif gélosé. Le milieu de référence pour les champignons est le milieu de Sabouraud. Pour obtenir une croissance satisfaisante du dermatophyte permettant son analyse après culture, il a été nécessaire de sélectionner le dermatophyte des autres germes pouvant eux-aussi pousser

sur le milieu nutritif. Le prélèvement dermatologique a donc été scindé en deux tubes afin d'obtenir deux cultures en parallèle : l'un contenant du chloramphénicol (50 µg/ml) pour inhiber la croissance des bactéries, l'autre contenant également du chloramphénicol, mais en plus du cycloheximide (Actidione, 400 µg/ml). L'actidione inhibe la croissance de la plupart des champignons filamenteux, non celle des dermatophytes résistants à cette substance. Les cultures ont été incubées à 30°C. D'une manière générale, les levures se développent en 24-48 heures, les champignons filamenteux et les saprophytes contaminants en 2-4 jours. Les dermatophytes ont une croissance plus lente et ont donc été identifiés après 7-15 jours de culture (Verrier *et al.*, 2013).

L'identification des espèces de dermatophytes est habituellement réalisée à l'aide de caractéristiques macroscopiques et microscopiques appartenant au dermatophyte par l'observation des macroconidies et des microconidies formées lorsqu'on place le dermatophyte dans un milieu de culture pour qu'il s'y développe.

Les dermatophytes sont classés en trois genres : *Trichophyton*, *Microsporum*, et *Epidermophyton*. En culture, les différentes espèces appartenant au genre *Microsporum* forment des macroconidies en fuseau à paroi épaisse et grossière. Ces macroconidies possèdent des septations transversales. Dans les espèces appartenant au genre *Trichophyton*, les macroconidies ne sont pas systématiquement formées. Si elles sont présentes, on peut remarquer que ces dernières ont une paroi lisse et que leur bordure se termine de manière émoussée. Les espèces des genres *Microsporum* et *Trichophyton* forment également des microconidies qui se répartissent le long des hyphes. Les microconidies varient en nombre de quelques-unes à aucune pour l'espèce *Trichophyton rubrum* à de nombreuses microconidies pour les espèces du complexe *Trichophyton mentagrophytes*. Le genre *Epidermophyton* ne connaît que deux espèces : *E. floccosum* et *E. stockdaleae*. Elles forment des macroconidies piriformes mais ne produisent pas de microconidies (Kwon-Chung and Bennett; 1992; Gräser *et al.*, 1999a). *E. floccosum* est un pathogène anthropophile se rapprochant d'autres espèces anthropophiles, appartenant au genre *Trichophyton* (Gräser *et al.*, 1999a), alors que *E. stockdaleae* se révèle un organisme non pathogène isolé à partir du sol et se rapprochant des espèces géophiles de dermatophytes (Prochacki and Engelhardt-Zasada, 1974).

Le gold standard de l'identification du dermatophyte consiste en la culture des échantillons auprès du patient. Mais, bien souvent, en plus de sa croissance lente, le dermatophyte ne poussera pas fréquemment en culture, spécialement dans les cas d'une précédente thérapie fongique. Pour remarque, concernant les onychomycoses, le dermatophyte responsable ne pousse pas dans 50% des cas (Czaika *et al.*, 2012). De plus, l'identification d'une espèce dermatophytique par la culture s'avère bien souvent difficile, en raison non seulement des caractéristiques communes à plusieurs espèces, mais aussi en raison des variations phénotypiques d'une même espèce d'une culture à une autre. (Verrier *et al.*, 2013).

1.4.3 L'apport de la biologie moléculaire dans l'identification des dermatophytes

Ces dernières années, plusieurs méthodes d'analyses par PCR (polymerase chain reaction) ont été développées pour identifier les espèces de champignons isolées en cultures et cela directement à partir des prélèvements dermatologiques (tissus kératinisés). Des paires d'oligonucléotides basés sur des parties d'ADN ribosomique conservées chez tous les champignons permettent d'amplifier des fragments d'ADN dont la séquence est spécifique de l'espèce. Ainsi, chaque dermatophyte obtenu en culture peut être identifié par PCR sur la base de séquences d'ADN ribosomiques polymorphes lorsque son identification est douteuse sur la base

de ses caractères phénotypiques, macroscopiques et microscopiques. On a aussi montré récemment que les dermatophytes pouvaient être identifiés en utilisant la technique de MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of-Flight Mass Spectrometry) (Nenoff et al., 2013; de Respinis et al., 2013).

2 Objectif du travail de master

Si les techniques de PCR et de MALDI-TOF sont précieuses pour identifier précisément les espèces de dermatophytes, ces techniques demeurent sophistiquées et utilisent des appareils onéreux. Elles ne peuvent pas être utilisées au cabinet du médecin exerçant hors de l'hôpital. En conséquence, l'identification des dermatophytes sur la base des caractères phénotypiques est toujours d'actualité. Les espèces de dermatophytes se différencient d'après la vitesse de croissance du mycélium en culture, de la production de spores, de la morphologie des spores, et de la pigmentation des cultures.

L'objectif de ce travail de master est d'établir une clé d'identification dichotomique, se basant sur des caractères macroscopiques et microscopiques, permettant une identification fiable du dermatophyte en culture. Cette clé est adressée non seulement au médecin spécialisé en dermatologie mais aussi au médecin non dermatologue. Les dermatophytoses étant fréquemment diagnostiquées, ce moyen d'identification représentera un outil précieux à l'élaboration d'un diagnostic étiologique. L'ensemble des espèces comprises dans la clé regroupe les dermatophytes isolés en culture au laboratoire du CHUV aux cours des années 2001 à 2012.

3 Matériel et méthodes

3.1 Cultures des prélèvements dermatologiques

Les isollements des champignons ont été effectués après avoir déposé des squames, des poils ou des cheveux sur du milieu de Sabouraud gélosé. Deux cultures ont été faites en parallèle, l'une sur du milieu de Sabouraud contenant du chloramphenicol (50 µg/ml), l'autre sur le même milieu auquel est ajouté du cycloheximide (Actidione, 400 µg/ml). Le cycloheximide inhibe la croissance de la plupart des champignons filamenteux, mais pas celle des dermatophytes résistants à cette substance. Les dermatophytes qui poussent relativement lentement en comparaison à d'autres espèces de champignons ont été identifiés en culture après 10-15 jours d'incubation.

3.2 Elaboration de la clé dichotomique

La clé dichotomique des espèces a été élaborée pour les espèces dermatophytiques rencontrées au laboratoire de dermatologie du CHUV pendant les années 2001 à 2012 (table 1 : inventaire).

Dans une première étape, nous avons utilisé une première clé dichotomique utilisée en routine au laboratoire de Mycologie du Service de dermatologie pour identifier 50 dermatophytes isolés dans ce laboratoire. Cette clé (cf. Annexes) avait été établie dans les années 90. Après avoir obtenu un diagnostic étiologique de présomption, le résultat étiologique de dermatophyte a été comparé au résultat étiologique obtenu par des personnes expérimentées qui sont le professeur de mycologie ainsi que les laborants en mycologie. Ce processus de validation a permis de parfaire cette clé dichotomique en y introduisant quelques corrections (voir paragraphe 4. Résultats et Discussion) permettant de pallier aux discrepancies observées entre la personne inexpérimentée et les personnes expérimentées lors de l'identification des cultures. Ainsi, une nouvelle clé a été formulée.

Dans une seconde étape, la nouvelle clé a été testée en continuant l'examen des cultures de dermatophytes. Quelques corrections de détail dans la formulation des choix, ont été effectuées pour donner la clé présentée, ici, dans ce travail (Résultats).

Espèce	Diamètre du mycélium après 15 jours de croissance	Aspect du mycélium (couleur)
<i>T. rubrum</i>	>2 cm	dur, difficile à prélever avec une anse, cotonneux couleur variable (blanc, jaune ou rouge) ; envers de la colonie noir, rouge ou jaune
<i>T. interdigitale</i>	>2 cm	non dur, facile à prélever avec une anse, granuleux, poudreux (blanc)
<i>A. vanbreuseghemii</i>	>2 cm	non dur, facile à prélever avec une anse, poudreux (blanc, beige)
<i>A. benhamiae</i> (Phénotype blanc)	>2 cm	non dur, facile à prélever avec une anse (blanc)
<i>A. benhamiae</i> (phénotype jaune)		dur, difficile à prélever avec une anse (jaune ou orangé, plis dans l'agar)
<i>T. erinacei</i>	>2 cm	non dur, facile à prélever avec une anse, poudreux (blanc)
<i>T. soudanense</i>	>2 cm	non dur, non épais, scléreux, colonies étoilées (jaune)
<i>T. verrucosum</i>	<1 cm	Scléreux (blanc)
<i>T. violaceum</i>	<1 cm	Scléreux (le plus souvent violet, quelquefois blanc)
<i>T. tonsurans</i>	>2 cm	Poudreux (blanc sur fond brun)
<i>M. canis</i>	>2 cm	non dur, non épais étoilé ou cotonneux (colonie blanche, jaune, jaune-orange)
<i>M. audouinii</i>	>2 cm	soyeux, colonies plates
<i>M. gypseum</i>	>2 cm	Poudreux (beige)
<i>E. floccosum</i>	>2 cm	Soyeux avec des ilots aériens cotonneux

Espèce	Sporulation		
	Macrospores	Microspores	Autre forme de sporulation
T. rubrum	Généralement absentes Quelques isolements avec des macrospores en forme de massues	Généralement absentes Quelques isolements avec des microspores allongées	∅
T. interdigitale	∅	subsphériques	∅
A. vanbreuseghemii	∅	très nombreuses, subsphériques	∅
A. benhamiae(Phénotype blanc)	∅	rares ou nombreuses	∅
A. benhamiae(phénotype jaune)	∅	∅	∅
T. erinacei	∅	Nombreuses, subsphériques	∅
T. soudanense	∅	∅	∅
T. verrucosum	∅	∅	arthrospores en collier de perles
T. violaceum	∅	∅	∅
T. tonsurans	∅	rares ou nombreuses, plus larges que la largeur des hyphes	Quelquefois des chlamydo-spores
M. canis	en fuseaux, ou absentes	∅	∅
M. audouinii	dans de rares isolements	∅	chlamydo-spores
M. gypseum	Très nombreuses en fuseaux	∅	∅
E. floccosum	En fuseaux groupés, se fragmentant	∅	∅

Espèce	Caractère Inflammatoire	Caractère Ecologique	Distribution géographique
T. rubrum	Peu ou pas inflammatoire	anthropophile	Mondiale
T. interdigitale	non inflammatoire	anthropophile	Mondiale
A. vanbreuseghemii	très inflammatoire	Zoophile (chien, chat, rongeurs)	Mondiale
A. benhamiae (Phénotype blanc)	très inflammatoire	Zoophile (cochon d'Inde)	Mondiale
A. benhamiae (phénotype jaune)		Zoophile (cochon d'Inde)	Mondiale
T. erinacei	très inflammatoire	Zoophile (hérisson)	Mondiale
T. soudanense	peu ou pas inflammatoire	anthropophile	Afrique
T. verrucosum	très inflammatoire	Zoophile (bétail)	Mondiale
T. violaceum	non inflammatoire	Anthropophile	Afrique / Méditerranée
T. tonsurans	peu ou pas inflammatoire	anthropophile	Amérique / Antilles
M. canis	modérément inflammatoire	Zoophile (Chien, chat)	Mondiale
M. audouinii	pas inflammatoire	anthropophile	Afrique
M. gypseum	Très inflammatoire	géophile	Mondiale
E. floccosum	Non inflammatoire	anthropophile	Mondiale

Tables 1 : Inventaire des espèces identifiées au laboratoire de mycologie du CHUV des années 2001 à 2012

4 Résultats et Discussion

4.1 Espèces identifiées et discordances

Lors de l'identification des cultures par la personne inexpérimentée, les résultats suivants ont été obtenus sur la base des informations fournies par la première clé dichotomique qui était utilisée en routine au laboratoire de Mycologie en Dermatologie au CHUV (Table 2).

Espèces	ID L.C	ID Labo + M.M	Discordances
Trichophyton rubrum	87	93	5
T.mentragrophytes (interdigitale)	50	50	0
T.mentragrophytes (zoophiles)	5	7	2
T.mentragrophytes (vanbreuseghemii)	1	1	0
Arthoderma benhamiae	9	9	0
T.soudanense	6	6	0
T.verrucosum	4	5	1
T.violaceum	14	14	0
T.violaceum blanc	1	2	1
T.tonsurans	2	2	0
Microsporum canis	14	16	2
Microsporum audouinii	3	3	0
Microsporum gypseum	3	3	0
Epidermophyton floccosum	2	2	0

Tableau 2 : Tableau de résultats d'identification avec la première clé

ID L.C : identification par l'étudiante L.C.

ID Labo + M.M : identification par les laborants du laboratoire de mycologie et le professeur de mycologie M.M.

Plusieurs discordances ont été observées pour 5 cultures de *Trichophyton rubrum*, 1 culture de *Trichophyton violaceum blanc*, 1 culture de *Trichophyton verrucosum*, et 2 cultures de *Microsporum canis*.

Une identification erronée de l'espèce *Trichophyton rubrum* s'explique par le fait que cette espèce peut présenter une morphologie variable. En effet, parfois, elle ne forme pas de conidies. Dès ce moment-là, sa reconnaissance repose grandement sur les caractères macroscopiques que sont un mycélium cotonneux, blanc, très dur. L'envers de la colonie peut être rose, noir, rouge ou jaune. Ainsi, dans la clé, on a ajouté un alinéa à l'espèce *Trichophyton rubrum* n'ayant pas formé de conidies.

Quant aux espèces *T. violaceum* et *T. verrucosum*, elles peuvent être confondues microscopiquement par le fait qu'elles ne forment toutes les deux que de rares microconidies et macroconidies. Leur différenciation repose alors principalement sur des caractères macroscopiques, telle que la diffusion des pigments dans l'agar ainsi que sur des informations cliniques, tels que l'origine de la teigne ainsi que le caractère inflammatoire ou non de la lésion clinique. Cependant, lorsqu'on se retrouve devant *Trichophyton violaceum blanc*, cette espèce ne possédant pas la pigmentation violette du *Trichophyton violaceum*, elle peut alors facilement être confondue avec *Trichophyton verrucosum* ne possédant, elle non plus, pas de pigmentation particulière de l'agar. Pour éviter une mauvaise distinction de ces espèces, on utilise des critères discriminatoires tels que l'origine de la teigne (zoophile pour *Trichophyton verrucosum*, anthropophile pour *Trichophyton violaceum blanc*) et le caractère inflammatoire ou non de la lésion clinique (très inflammatoire pour *T. verrucosum*, peu inflammatoire pour *T. violaceum*). On a précisé ces différentes caractéristiques dans la nouvelle clé.

Pour l'espèce *Microsporum canis*, une erreur d'identification peut résider dans la non-formation de macrospores en forme de fuseaux. En effet, les macroconidies fusiformes formées par les espèces du genre *Microsporum* sont spécifiques pour ces espèces et leur absence peut mener, pour la personne non avertie, à une exclusion du diagnostic étiologique d'espèces, appartenant au genre *Microsporum*. Dans la nouvelle clé, l'espèce *Microsporum canis* se retrouve alors également dans l'alinéa des espèces ne formant pas de spores, afin de prévenir cette erreur.

4.2 Clé dichotomique finale

Les discrédances ont permis l'élaboration de clé dichotomique finale. La référence se situe en annexe. La vitesse de croissance du mycélium en culture, la production de spores, la morphologie des spores, la pigmentation des cultures (diffusion des pigments dans l'agar) ont été caractérisées pour chaque espèce (table 1 : inventaire). Ces caractères phénotypiques ont été utilisés, en premier, dans l'élaboration de la clé dichotomique. Les discrédances ont permis l'élaboration de clé dichotomique finale. Des caractères particuliers spécifiques à l'une ou l'autre espèce dermatophytique se sont révélés également très utiles pour identifier une espèce. Toutefois, l'identification des dermatophytes demeure souvent difficile si on utilise uniquement leurs caractères morphologiques car les isolats peuvent varier considérablement d'une espèce à l'autre.

L'aspect inflammatoire ou non inflammatoire des lésions cliniques avec respectivement les espèces zoophiles et anthropophiles, ainsi lorsqu'on le sait, l'origine de l'espèce (Afrique, Asie, Amérique, etc.), sont des caractères précieux spécifiques des espèces de dermatophytes. C'est pourquoi ces caractères ont été utilisés dans la clé pour finaliser l'identification d'une espèce avec certitude. Par exemple, ces informations ont permis, lors des identifications de cultures ultérieures, de distinguer un *Trichophyton interdigitale* zoophile d'un *Trichophyton interdigitale* anthropophile.

IDENTIFICATION DES DERMATOPHYTES AU LABORATOIRE DE MYCOLOGIE DU CHUV.

1a. Colonies < 1 cm de diamètre après 15 j. de croissance :

1a Pas de pigment, arthrospores en chaîne dans les cultures âgées (en collier de perles).

Espèce faisant des réactions très inflammatoires. Espèce zoophile (Bétail).

T. verrucosum

1b Pigmentation violette. Occasionnellement colonies blanches, non pigmentées.

Espèce anthropophile (Afrique, Méditerranée).

T. violaceum

1b. Colonies > 2 cm de diamètre après 15 j. de croissance :

2a Présence de spores (macrospores, microspores ou chlamydospores):

3a Présence de macrospores en forme de fuseau, cloisonnées transversalement cinq à douze fois.

-4a Mycélium d'aspect étoilé, envers de la colonie jaune orangé (sans fuseau aussi possible).

M. canis

-4b Colonie d'aspect poudreux de couleur beige ou cannelle, envers de la colonie non coloré.

Macrospores en forme de fuseaux très abondants.

M. gypseum

3b Pas de macrospores en forme de fuseau, mais présence de microspores ; macrospores en massue.

si présence de macrospores!

-5a **Couleur de la colonie (surface) brune ou orangée**

->6a Microspores rares ou nombreuses, plus grosses que le diamètre des hyphes.

Espèce anthropophile, peu ou pas inflammatoire (Amérique, Antilles).

T. tonsurans

->6b Microspores rares ou nombreuses, pas plus grosses que le diamètre des hyphes.

Espèce zoophile, très inflammatoire, souvent sur cuir chevelu. Infections par des cochons d'Inde.

A. benhamiae

-5b **Couleur de la colonie (surface) blanche.**

->7a Mycélium cotonneux, très dur, difficile à prélever avec une anse, blanc. Envers de la colonie rose, noir, rouge ou jaune.

Espèce anthropophile.

T. rubrum

->7b Mycélium non dur, facile à prélever avec une anse : Espèce du complexe *T. mentagrophytes*.

[Ces espèces sont difficiles à identifier sur la base de caractères phénotypiques. Cependant, il est possible de s'orienter pour leur identification, sur la base du caractère inflammatoire ou non inflammatoire de la teigne ainsi que sur la source possible de l'infection (animal) dans le cas d'une teigne inflammatoire.]

- 8a Espèce anthropophile, généralement de **tinea pedis** ou **ongles des pieds**.

T. interdigitale

- 8b Espèces zoophiles très inflammatoires d'autres tinea (**tinea corporis, faciae, capitis**),
pas de **tinea pedis** ou **ongles des pieds**.

9a Espèce transmise généralement par un chien ou du chat, occasionnellement par de petits rongeurs (souris, chinchilla) .

Mycélium poudreux, blanc ou crème. Très nombreuses microspores.

A. vanbreuseghemii

9b Espèce transmise par un hérisson

T. erinacei

9c Espèce transmise par des cochons d'Inde

Microspores rares ou nombreuses.

A. benhamiae

~~3c Pas de macrospores en fuseau, ni microspores, mais présence de spores en chaînes ou de chlamydospores, espèces anthropophiles peu inflammatoires~~

10a Chlamydospores isolées intercalaires ou terminales

11a. Couleur de la colonie (surface) blanche

***M. audouinii* (anciennement *M. langeroni*)**

11b. Couleur de la colonie (surface) brune

T. tonsurans

10b Lorsque la culture est jeune, présence d'hyphes en fuseaux groupés, se fragmentant en articles et en générant des spores en chaînes, +/- sphériques dans les vieilles cultures.

Pléomorphisme rapide, avec des touffes de mycélium blanc, aérien, cotonneux.

E. floccosum

2b Absence de spores

12a Couleur de la colonie (surface) jaune, mycélium formant des plis dans l'agar. Infection transmise par des cochons d'Inde, très inflammatoire

A. benhamiae

12b Pas de plis dans l'agar

13a. Mycélium cotonneux, très dur, difficile à prélever avec une anse, blanc. Envers de la colonie rose, noir, rouge ou jaune.

Espèce anthropophile.

T. rubrum

13b. Mycélium non épais et pas de consistance dure. Colonies d'aspect étoilé :

->14a. Pigmentation jaune ou jaune orangé ou absence de pigmentation ; espèce zoophile transmise le plus souvent par un chien ou un chat, (modérément) inflammatoire. Fuseaux possibles dans les vieilles cultures.

M. canis

->14b. Mycélium à pigmentation jaune, anthropophile, souvent de Tinea capitis peu ou pas inflammatoire (Afrique)

T. soudanense

5 CONCLUSION

Pour 213 espèces analysées, la première clé a démontré des failles dans l'identification de 11 cultures, soit 5 espèces différentes. Une fois ces erreurs identifiées, une nouvelle clé a été rédigée pour identifier les dermatophytes isolés à l'hôpital avec un minimum d'erreurs. Dans les cas où les critères morphologiques ne suffisaient pas à identifier l'espèce, le caractère inflammatoire ou non inflammatoire des lésions cliniques, l'origine de l'espèce (réservoir animal pour les espèces zoophiles, origine géographique i.e. Afrique, Asie, Amérique, pour les espèces anthropophiles), ont été utilisés pour finaliser l'identification d'une espèce. La nouvelle clé a été affinée pour le groupe des espèces appelées *Trichophyton mentagrophytes*, en incluant le caractère inflammatoire ou non inflammatoire des lésions cliniques, et réservoir animal. Mais dans nombre de laboratoires, le terme « *Trichophyton mentagrophytes* » sert encore trop souvent à désigner les espèces *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii*, ou encore d'autres dermatophytes zoophiles. Parmi ceux-ci, on peut citer un dermatophyte plus rare qu'est le *Trichophyton erinacei* ayant pour réservoir le hérisson.

En conclusion, pour orienter le diagnostic de laboratoire, il est important de pouvoir disposer d'une anamnèse complète du praticien qui mentionne les espèces animales en contact avec le patient et qui sont potentiellement à l'origine de l'infection. Cependant il arrive souvent que ces renseignements (données) ne soient pas disponibles. Dans ces cas-là, l'apport de la biologie moléculaire par PCR est une aide précieuse pour l'identification des espèces en dernier recours.

6 Annexes et notes concernant la clé dichotomique finale

6.1 Ancienne clé dichotomique

IDENTIFICATION DES DERMATOPHYTES AU LABORATOIRE DE MYCOLOGIE DU CHUV.

1a. **croissance lente** en bouton. Colonies < 1 cm de diamètre après 15 j. de croissance :

1a Pigmentation violette (Afrique, Méditerranée)

T.violaceum

1b Pas de pigments, spores en chaînes dans les cultures âgées (en collier de perles)
Espèce faisant des réactions très inflammatoires (Bétail).

T. verrucosum

1b. **croissance rapide** colonies > 2 cm de diamètre après 15 j. de croissance :

2a Présence de spores (macrospores, microspores (aleuries) ou chlamydospores):

3a Présence de fuseaux en navettes (macrospores du genre Microsporum) :

4a Mycélium d'aspect étoilé, souvent pigmentation jaune orangé de l'agar.

M. canis

4b Mycélium poudreux à l'aspect du gypse, de couleur beige, pas de pigmentation de l'agar.

Fuseaux très abondants.

M. gypseum

3b Pas de fuseaux en navettes, mais présence de microspores (aleuries): fuseaux en massue, si présence de fuseaux!

5a Mycélium dur, très dense, blanc. Souvent pigmentation rouge ou jaune de l'agar.

T. rubrum

5b Mycélium non dur, facile à prélever avec une anse :

6a Mycélium poudreux ou cotonneux, blanc, aérien, Microspores rares ou très nombreuses.

Généralement de **tinea pedis** ou **ongles des pieds**.

T. mentagrophytes var interdigitale

6b Mycélium poudreux, blanc ou crème. Très nombreuses microspores, généralement d'autres tinea

(tinea corporis, faciae, capitis).

T. mentagrophytes var mentagrophytes

6c Mycélium ras (agar en transparence) ou cotonneux, microspores rares ou nombreuses.

(tinea corporis, faciae, capitis). Infections par des petits rongeurs.

A. benhamiae

6d Mycélium ras (agar en transparence), brun. Microspores rares ou nombreuses

plus grosses que le diamètre des hyphes. (Amérique, Antilles)

T. tonsurans

3c Ni fuseaux en navettes, ni microspores, mais présence de spores en chaînes ou de chlamydo-spores :

7a Lorsque la culture est jeune, présence d'hyphes en fuseaux groupés, se fragmentant en articles et générant des spores en chaînes, +/- sphériques dans les vieilles cultures.

Pléomorphisme rapide, avec des touffes de mycélium blanc, aérien, cotonneux.

E.floccosum

7b Chlamydo-spores isolées intercalaires ou terminales.

M. audouinii
(anciennement *M.langeroni*)

2b Absence de spores

8a Forte pigmentation rouge ou rouge brun de l'agar, en anneau. Dans quelques cas, pigmentation jaune ou absente. Mycélium abondant, épais, aérien, blanc, de consistance très dure.

T.rubrum

8b Mycélium non épais et pas de consistance dure. Colonies d'aspect étoilé :

9a Pigmentation jaune ou jaune orangé ou absence de pigmentation ;

Fuseaux possibles dans les vieilles cultures.

M.canis

9b Mycélium à pigmentation jaune

T.soudanense

3c Pas de macrospores en fuseau, ni microspores, mais présence de spores en chaînes ou de chlamydo-spores, espèces anthropophiles peu inflammatoires

10a Chlamydo-spores isolées intercalaires ou terminales

11a. Couleur de la colonie (surface) blanche

M audouinii (anciennement M. langeroni)

11b. Couleur de la colonie (surface) brune

T. tonsurans

10b Lorsque la culture est jeune, présence d'hyphes en fuseaux groupés, se fragmentant en articles et en générant des spores en chaînes, +/- sphériques dans les vieilles cultures. Pléomorphisme rapide, avec des touffes de mycélium blanc, aérien, cotonneux.

E.floccosum

6.2 Notes concernant la clé dichotomique finale

a. La dénomination « *Trichophyton mentagrophytes* » s'adressait autrefois à de multiples dermatophytes zoophiles et anthropophiles caractérisés par une croissance rapide et une production d'abondantes microspores. Cependant, sur la base de séquences d'ADN et de résultats de confrontations de souches pour tester leur inter-fertilité, il été démontré que ce que l'on nommait *T. mentagrophytes* var *mentagrophytes* correspondait, en fait, à plusieurs espèces dont *Arthroderma benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* qui sont zoophiles et *T. interdigitale* qui est anthropophile. Les caractères macroscopiques et microscopiques de ces espèces se ressemblent beaucoup et la différenciation des espèces est difficile. [C'est pourquoi, le caractère inflammatoire ou non inflammatoire des lésions cliniques, l'origine possible champignon (animal), sont très utiles pour identifier ces espèces]

b. *Arthroderma benhamiae* est une espèce dermatophytique dont le réservoir naturel est le cochon d'Inde ainsi que d'autres rongeurs. Sur le milieu de croissance de Sabouraud, on distingue deux phénotypes pour cette espèce. Le premier de ces phénotypes se caractérise par des colonies blanches possédant un mycélium que l'on peut définir comme duveteux ou poudreux. Les microspores sont en plus ou moins grande quantité. Le deuxième phénotype se distingue du premier par des colonies jaunes possédant un mycélium que l'on définit comme ras. Celui-ci montre des plissements irréguliers dans l'agar et ne possède généralement pas de microspores.

c. *Arthroderma vanbreuseghemii* est une espèce dermatophytique que l'on prélève fréquemment sur des chats chasseurs (généralement des chats européens) et sur des chiens. Le réservoir de cette espèce seraient le sol ou les petits rongeurs. Cependant, lorsqu' *Arthroderma vanbreuseghemii* crée une infection chez l'homme, celle-ci est habituellement liée à un contact avec des chiens ou chats d'extérieur, s'avérant être eux-mêmes infectés par cette espèce dermatophytique. En culture, *Arthroderma vanbreuseghemii* présente un mycélium d'apparence poudreuse blanc à beige. On explique celle-ci par la production de microspores en grand nombre. Par ailleurs, on a isolé des souches possédant un mycélium d'aspect poudreux blanc et possédant un génotype différent à partir de chinchillas et de souris.

d. *Trichophyton interdigitale* (anciennement *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* ou *Microides interdigitalis*) est un dermatophyte que l'on isole presque toujours à partir des pieds (*tinea pedis*) ou des ongles (*tinea unguium*). *Trichophyton interdigitale* est une espèce anthropophile. Il cause des mycoses non inflammatoires et est incapable de se reproduire de manière sexuée avec des souches de « *Trichophyton* » zoophiles (Symoens et al, 2010).

7 Bibliographie

Voir dossier annexe