



**Le complexe Tricophyton mentagrophytes,
caractérisation mycologique et moléculaire d'un nouveau
variant : Trichophyton mentagrophytes var. porcellae**

Anne-Laure Charlent

► **To cite this version:**

Anne-Laure Charlent. Le complexe Tricophyton mentagrophytes, caractérisation mycologique et moléculaire d'un nouveau variant : Trichophyton mentagrophytes var. porcellae. Sciences pharmaceutiques. 2011. hal-01739135

HAL Id: hal-01739135

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739135>

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I

2011

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le Mercredi 19 Octobre 2011

Par Anne-Laure CHARLENT

Née le 18 Février 1982 à Amiens (80)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

**Le complexe *Trichophyton mentagrophytes*,
Caractérisation mycologique et moléculaire d'un nouveau
variant : *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae***

Membres du Jury

Président :	Monsieur le Professeur C. GANTZER
Juges :	Monsieur le Professeur JL. SCHMUTZ
	Madame le Docteur N. CONTET-AUDONNEAU
Directrice :	Madame le Docteur M. MACHOUART

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2011-2012

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier :

Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ *	Thérapie cellulaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Jean-Louis MERLIN *	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	Microbiologie
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	Biochimie
Pierre LEROY	Chimie physique
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie organique
Patrick MENU	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	Microbiologie
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	Chimie Physique
Cédric BOURA	Physiologie
Igor CLAROT	Chimie analytique
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Roudayna DIAB	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	Pharmacologie
Raphaël DUVAL	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	Hématologie

Adil FAIZ	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	Chimie organique
Frédéric JORAND	Santé publique
Olivier JOUBERT	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	Hématologie
Christophe MERLIN	Microbiologie
Blandine MOREAU	Pharmacognosie
Maxime MOURER	Chimie organique
Francine PAULUS	Informatique
Christine PERDICAKIS	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	Pharmacologie
Virginie PICHON	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV *	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT *	Physiologie-Physiopathologie
humaines	
Mohamed ZAIYOU	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	Sémiologie
--------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	Anglais
--------------------------	---------

* en attente de nomination

A notre Président de thèse,

Monsieur le Professeur Christophe GANTZER,

Professeur de Microbiologie,

Faculté de Pharmacie, Nancy

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury,

Veillez trouver ici l'expression de notre reconnaissance et notre profond respect.

A notre Juge,

Monsieur le Professeur Jean-Luc SCHMUTZ,

Professeur de Dermato-Vénéréologie,

Chef de service de Dermatologie (PU-PH),

CHU Brabois - Faculté de Médecine, Nancy

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en participant à ce jury.

Pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail,

Veillez trouver ici, l'expression de notre profond respect et de notre gratitude.

A notre Juge,

Madame le Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU,

Docteur en Mycologie médicale (MCU-PH)

Laboratoire de Mycologie/ service de Dermatologie,

CHU Brabois - Faculté de Médecine, Nancy

Nous vous remercions de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger cette thèse.

Pour votre disponibilité, votre aide, votre accueil chaleureux au sein du laboratoire de Mycologie et le partage de vos connaissances,

Veillez trouver ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

A notre Directrice de thèse,

Madame le Docteur Marie MACHOUART,
(MCU-PH) Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
CHU Brabois - Faculté de Médecine, Nancy

*Pour votre enthousiasme, votre dynamisme,
Pour l'énergie et votre constante disponibilité,
Nous vous remercions pour la bienveillance dont vous avez fait preuve à notre égard,
Veuillez trouver ici l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.*

Au Docteur Cécile Gueidan,

Chercheur au Museum d'histoire naturelle de Londres,

Pour votre aide au niveau de nos analyses phylogénétiques.

A Céline et Christine,

Un grand merci à vous deux pour votre accueil, notre très bonne entente au laboratoire de Mycologie à Fournier et votre collaboration pour ce travail.

A Sandra,

Pour ton aide précieuse dans les manipulations de biologie moléculaire.

A l'ensemble du personnel du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,

Pour votre accueil et votre soutien.

A ma famille et tout particulièrement,

Mes parents,

Pour avoir toujours été là pour moi

Pour votre patience, votre soutien indéfectible et la liberté des choix que vous m'avez accordés,

Ce travail vous est dédié, trouvez ici l'expression de tout mon amour.

Mes sœurs Ludivine et Perrine, *qui comptent beaucoup pour moi*, ainsi que mon beau-frère Guillaume

Ma mamie Eliane,

Trouve ici l'expression de tout mon amour et de toute ma tendresse.

Aux souvenirs affectueux de mon papi Serge (ça y est j'ai terminé mes études !) et de ma mamie Denise.

A mes amis,

Marjorie, Gaëlle, Marie,

Talentueuses pédiatres et anesthésiste en devenir, nos rencontres à l'internat de Thionville et nos vacances passées ensemble resteront gravées à jamais.

Mes co-internes, et tout particulièrement Céline R., Céline A., Leila, Thomas, Guérric, Carole, Isabelle, Stéphanie, Anthony,...

Camille, Maryline, Carole,

Une vraie amitié est née entre nous à Nancy, que de bons moments partagés.

Adeline, Alex, Philippe, Sandrine, Sébastien, Fanny et Guillaume,

A notre amitié sincère depuis les bancs de la faculté.

Mes amis de la danse, Julie, Assane, George, Hugo...

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	17
INTRODUCTION.....	19
I GÉNÉRALITÉS SUR LES DERMATOPHYTES.....	20
I.1 Définition.....	20
I.2 Historique des classifications	21
I.3 Reproduction sexuée des dermatophytes.....	25
I.3.1 Mise en évidence des formes parfaites.....	25
I.3.2 Modalités de la reproduction sexuée.....	25
I.3.3 Taxonomie du complexe <i>Trichophyton mentagrophytes</i> et de ses formes parfaites	26
I.3.3.1 <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	26
I.3.3.2 <i>Arthroderma benhamiae</i>	26
I.4 Epidémiologie.....	28
I.4.1 Origine des dermatophytes.....	28
I.4.2 Adaptation au parasitisme	30
I.4.3 Répartition géographique	31
II ASPECTS CLINIQUES	33
II.1 Modes de contamination.....	33
II.1.1 Contamination d'origine humaine	33
II.1.2 Contamination d'origine animale	34
II.1.3 Contamination d'origine tellurique.....	34
II.2 Facteurs favorisants.....	35
II.3 Pouvoir pathogène	35
II.3.1 Physiopathologie	36
II.3.1.1 Généralités	36
II.3.1.2 Mode de végétation sur la peau.....	37
II.3.1.3 Mode de végétation dans le cheveu ou le poil	37
II.3.1.4 Mode de végétation au niveau de l'ongle	38
II.3.1.5 Réponse de l'hôte.....	39
II.3.1.5.1 Réaction immunitaire non spécifique.....	39
II.3.1.5.2 Réaction immunitaire spécifique.....	39

II.3.2 Manifestations cliniques : particularités du complexe <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	40
II.3.2.1 Pathogénie de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	40
II.3.2.2 Pathogénie de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	44
II.3.2.3 Pathogénie de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	45
III MÉTHODES D'IDENTIFICATION CLASSIQUE DES DERMATOPHYTES	46
III.1 Prélèvement et transport	46
III.1.1 Notions théoriques.....	46
III.1.2 Notions pratiques.....	47
III.1.2.1 Matériel nécessaire au recueil de l'échantillon	47
III.1.2.2 Techniques de prélèvement en fonction des sites touchés	47
III.1.2.2.1 Lésions cutanées	47
III.1.2.2.2 Lésions des régions pileuses	48
III.1.2.2.3 Onyxis.....	48
III.2 Identification morphologique	49
III.2.1 Examen microscopique direct	49
III.2.2 Culture.....	50
III.2.2.1 Isolement des dermatophytes.....	50
III.2.2.2 Identification.....	51
III.2.2.2.1 Examen macroscopique des cultures	51
III.2.2.2.2 Examen microscopique des cultures	51
III.2.2.2.3 Milieux d'identification	54
III.3 Identification morphologique du complexe <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	55
III.3.1 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	55
III.3.1.1 Examen macroscopique des cultures	55
III.3.1.2 Examen microscopique des cultures.....	56
III.3.1.3 Examens complémentaires	57
III.3.2 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	57
III.3.2.1 Examen macroscopique des cultures	57
III.3.2.2 Examen microscopique des cultures.....	58
III.3.2.3 Examens complémentaires	58
III.3.3 <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	59
III.3.3.1 Examen macroscopique des cultures	59
III.3.3.2 Examen microscopique des cultures.....	60
III.3.3.3 Examens complémentaires	60

IV APPLICATION DES OUTILS MOLÉCULAIRES AUX DERMATOPHYTES 61

IV.1 Identification moléculaire des dermatophytes 61

IV.1.1 PCR-RFLP	61
IV.1.2 PCR nichée.....	63
IV.1.3 PCR-ELISA	63
IV.1.4 PCR en temps réel.....	64
IV.1.5 PCR suivie de séquençage	65

IV.2 Epidémiologie moléculaire des dermatophytes 66

IV.2.1 PCR aléatoires.....	66
IV.2.1.1 RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA	67
IV.2.1.2 AP-PCR.....	67
IV.2.1.3 PCR fingerprinting	68
IV.2.2 PCR et séquençage.....	69
IV.2.2.1 Utilisation de marqueurs moléculaires pour la classification phylogénique du complexe <i>T. mentagrophytes</i>	69

V CARACTERISATION D'UN NOUVEAU VARIANT TRANSMIS PAR LE COCHON D'INDE AU SEIN DU COMPLEXE *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* : *T. MENTAGROPHYTES* VAR. *PORCELLAE* 72

V.1 Objectif..... 72

V.2 Matériels et méthodes 72

V.2.1 Sélection des souches	72
V.2.2 Identification morphologique	76
V.2.2.1 Conditions de culture	76
V.2.2.2 Techniques d'identification	76
V.2.2.3 Mise en évidence de la forme parfaite	77
V.2.3 Caractérisation moléculaire	77
V.2.3.1 Extraction de l'ADN.....	78
V.2.3.2 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne.....	79
V.2.3.2.1 Principe	79
V.2.3.2.2 Choix des gènes cibles	82
V.2.3.2.3 Conditions expérimentales.....	83
V.2.3.3 Révélation électrophorétique	84
V.2.3.3.1 Préparation du gel d'agarose.....	84
V.2.3.3.2 Préparation des échantillons et migration	85
V.2.3.3.3 Lecture et interprétation des résultats	85
V.2.3.4 Séquençage	86
V.2.3.5 Analyse phylogénétique.....	87

V.3 Résultats.....	88
V.3.1 Caractéristiques mycologiques des prélèvements et souches étudiées	88
V.3.1.1 Examen direct des prélèvements.....	88
V.3.1.2 Examen macroscopique des cultures	88
V.3.1.3 Examen microscopique des cultures.....	90
V.3.1.4 Mise en évidence de la forme téléomorphe	91
V.3.1.5 Caractéristiques de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>porcellae</i> versus <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	91
V.3.2 Caractéristiques moléculaires	93
V.3.2.1 Amplification des quatre gènes cibles	93
V.3.2.2 Séquençage des produits d'amplification	95
V.3.2.2.1 Analyse des séquences	97
V.3.2.2.2 Analyse des alignements : recherche des polymorphismes.....	97
V.3.2.3 Analyse phylogénétique.....	109
V.4 DISCUSSION	117
CONCLUSION.....	121
BIBLIOGRAPHIE	122
TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	129
➤ LISTE DES FIGURES.....	129
➤ LISTE DES TABLEAUX.....	131
ANNEXES.....	132

LISTE DES ABREVIATIONS

A. : *Arthroderma*

ADN : Acide Désoxyribo-Nucleique

ADNm : Acide Désoxyribo-Nucléique mitochondrial

ADNr : Acide Désoxyribo-Nucléique ribosomique

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomique

ACT: Actine

BCP: Bromocrésol pourpre

BTUB: Beta-tubuline

CBS : Centraal Bureau voor Schimmelcultures

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire

CHS : Chitine synthase

CIPRES : Cyberinfrastructure for Phylogenic Research

DAF : DNA Amplification Fingerprinting (Empreintes génétiques de produits de PCR)

dNTP : désoxyNucléotideTri-Phosphate

dATP : désoxyAdénosineTri-Phosphate

dCTP : désoxyCytidineTri-Phosphate

dGTP : désoxyGuanosineTri-Phosphate

dTTP : désoxyThymidineTri-Phosphate

E. : *Epidermophyton*

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

IGS : Intergenic spacer

IL : Interleukine

ITS : Internal Transcribed Spacer

KOH : Hydroxyde de potassium

M. : *Microsporium*

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MLST : Multilocus Sequence Typing

MnSOD : Superoxyde dismutase du manganèse

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)

AP-PCR : Arbitrarily Primed PCR (PCR avec amorces aléatoires)

PDA : Pomme de terre Dextrose Agar

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA (ADN polymorphe amplifié au hasard)

RAxML: Randomized Axelerated Maximum Likelihood

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

T.: *Trichophyton*

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris- Borate-EDTA

Lymphocytes Th: lymphocytes T helper

Tm: Melting Temperature (Température de Fusion)

INTRODUCTION

En mycologie, l'identification précise de l'agent pathogène responsable et notamment celle des dermatophytes est nécessaire pour des raisons diagnostiques et épidémiologiques.

Les techniques mycologiques classiques d'identification recherchent des caractères phénotypiques variables selon les espèces mais malgré l'utilisation de milieux de culture spéciaux, elles se heurtent parfois à des souches atypiques.

En effet, sur le plan taxonomique, certaines espèces de dermatophytes sont très voisines et ont une dénomination qui n'est pas toujours reconnue de manière universelle, leur différenciation reposant sur des critères morphologiques peu tranchés.

Ainsi, des techniques de biologie moléculaire ont récemment été développées afin de mettre en évidence des profils caractéristiques de chaque genre et espèce de dermatophytes ainsi que de leurs variants.

Trichophyton mentagrophytes est un dermatophyte à large distribution qui suscite l'intérêt de nombreux mycologues depuis plusieurs années, d'une part pour son adaptation au parasitisme et son pouvoir pathogène chez l'homme et l'animal et d'autre part pour sa complexité taxonomique. Aujourd'hui, plusieurs variants de cette espèce sont identifiés et reconnus.

Notre étude suggère l'existence d'un nouveau variant récemment isolé chez des patients présentant des épidermatophyties, proche de l'espèce *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* et qui serait transmis par le cochon d'Inde.

L'objectif est d'identifier cette souche par des caractères phénotypiques, biochimiques et génotypiques et de positionner ce nouveau variant dans un arbre phylogénétique du complexe *Trichophyton mentagrophytes*.

I GÉNÉRALITÉS SUR LES DERMATOPHYTES

I.1 Définition

Les champignons sont des organismes eucaryotes, uni- ou pluricellulaires, dépourvus de chlorophylle. Qualifiés d'hétérotrophes, ils se nourrissent par absorption et nécessitent pour se développer une source de carbone qui provient de matières organiques en décomposition (saprophytes) ou d'être vivants (parasites) [1 ; 2].

La nomenclature des champignons obéit aux mêmes règles et subdivisions que les classifications botaniques. Le règne se répartit en divisions (caractérisées par le suffixe -mycota), séparées en classes (suffixes -mycètes), puis divisées en ordres (suffixe -ales), eux même répartis en familles (suffixe -acées). Une famille est composée de genres qui comprennent des espèces. On distingue donc dans le règne des Fungi, cinq classes (ou phyla) selon leur mode de reproduction :

- les Chytridiomycotina (Chytridiomycètes), non impliqués en pathologie humaine,
- les Zygomycotina (Zygomycètes),
- les Ascomycotina (Ascomycètes),
- les Basidiomycotina (Basidiomycètes),
- les Deuteromycotina (Deutéromycètes), champignons imparfaits.

Les dermatophytes sont des champignons microscopiques appartenant à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des Onygnales, à la famille des Arthrodermataceae et au genre des *Arthroderma* [3 ; 4]. Ce sont des champignons filamenteux à thalle septé se multipliant sur le mode sexué, et produisant des ascospores (spores endogènes produites dans les asques disposées sans ordre précis dans des gymnothèces). La forme sexuée (dite forme parfaite ou téléomorphe) de ces champignons étant difficile à obtenir, la classification repose sur la reproduction asexuée ou conidiogénèse ; ainsi certains dermatophytes dont la forme sexuée reste inconnue appartiennent au phylum des Deutéromycètes [5 ; 6].

Au laboratoire, les biologistes, n'étudient que les formes asexuées (formes dites «imparfaites» ou anamorphes) [1].

Lors de la reproduction asexuée basée sur le mode thallique solitaire, les dermatophytes produisent deux types de spores ou conidies (également appelées, pour les dermatophytes, aleuries) : des spores unicellulaires appelées microconidies ou microaleuries, et des spores pluricellulaires, à base tronquée et cloisonnées transversalement, les macroconidies ou macroaleuries [2 ; 4 ; 5]. Ces deux types de spores, par leur morphologie et leur abondance, permettent la distinction de trois genres :

- Le genre *Microsporum* (Gruby 1843)
- Le genre *Trichophyton* (Mamsten 1845)
- Le genre *Epidermophyton* (Sabouraud 1907)

I.2 Historique des classifications

En 1910, Raymond Sabouraud, médecin dermatologue français établit une classification des dermatophytes en étudiant l'aspect clinique de la lésion et le mode de parasitisme dans le cheveu ou le poil de la barbe. Il utilise également les caractères macroscopiques des cultures surtout et les caractères microscopiques pour identifier de nouvelles espèces. Cette classification reposant sur des critères cliniques reste d'un intérêt primordial pour les praticiens [1].

	Mode de parasitisme
1. genre <i>Microsporum</i>	Microsporique (gaine de petites spores compacte autour du cheveu ou poil)
2. genre <i>Trichophyton</i> :	
- <i>Trichophyton</i> endothrix	Endothrix (multiplication des spores à l'intérieur du cheveu ou poil)
- <i>Trichophyton</i> ectothrix microïdes	Microïde (gaine de petites spores en chaînette à l'extérieur du cheveu ou du poil)
- <i>Trichophyton</i> ectothrix mégaspores	Mégaspore (gaine de spores plus grosses à l'extérieur du cheveu)
3. Les <i>Achorions</i>	Favique (faible multiplication des spores)
4. genre <i>Epidermophyton</i>	Pas d'attaque des poils <i>in vivo</i>

Tableau I : Classification de Sabouraud [1].

En 1930, Langeron, médecin et mycologue français propose avec Milochevitch une classification botanique essentiellement basée sur l'observation microscopique des cultures notamment la présence ou non et l'aspect des macro- et microconidies, et de façon beaucoup plus anecdotique sur le mode de parasitisme. Cette classification, modifiée ultérieurement par Vanbreuseghem, retient six genres : *Epidermophyton*, *Keratinomyces*, *Langeronia*, *Sabouraudites* ou *Microsporum*, *Trichophyton*, et *Ctenomyces* [1].

Genres	Caractéristiques microscopiques des cultures
<i>Epidermophyton</i>	Pas de microconidie Macroconidies : en massues, en bouquets, à parois minces et lisses, pluricellulaires
<i>Keratinomyces</i>	Pas de microconidie Macroconidies : fuselées, pluricellulaires à parois lisses et épaisses
<i>Langeronia</i>	Microconidies : piriformes, rares ou absentes Macroconidies absentes Arthrospores habituellement nombreuses Mycélium buissonneux
<i>Sabouraudites</i> ou <i>Microsporum</i>	Microconidies : piriformes, mesurant de deux à trois microns, disposées selon le type acladium Macroconidies : lisses à membrane double et épaisse, fusiformes, abondantes ou peu nombreuses
<i>Trichophyton</i>	Microconidies : piriformes, mesurant de deux à trois microns, parfois très allongées, disposées selon le type acladium Macroconidies : lisses à membrane mince, fusiformes, généralement rares ou absentes
<i>Ctenomyces</i>	Microconidies : rondes, de deux à trois microns de diamètre, disposées en croix de lorraine ou en grappes très nombreuses Macroconidies : lisses à membrane mince ; contour irrégulier ; généralement rares Spires et organes en bois de cerf : fréquents

Tableau II : Classification de Langeron et Milochevitch [1].

En 1934, Emmons publie la troisième grande classification couramment utilisée dans tout le monde anglo-saxon [1]. Plus simple, elle reconnaît trois genres : *Microsporum*, *Trichophyton*, et *Epidermophyton* [4 ; 5]. Les genres *Ctenomyces* et *Keratinomyces* précédemment cités ont été rattachés au genre *Trichophyton*. Cette classification moderne repose sur les caractères en vie parasitaire, c'est-à-dire le type d'invasion pileaire, et sur les caractères culturels des dermatophytes [6].

Le genre *Microsporum* (Gruby 1843) :

Il regroupe une dizaine d'espèces dont cinq en pratique métropolitaine peuvent être retrouvées chez l'homme (*M. canis*, *M. audouinii* var *langeroni*, *M. persicolor*, *M. praecox*, *M. gypseum*)

Le parasitisme pilaire est de type microsporique. Au niveau microscopique on note la présence de macroconidies fusiformes à paroi verruqueuse ou échinulée, et de microconidies le plus souvent piriformes, mais parfois rondes.

Le genre *Trichophyton* (Malmsten 1845) :

La plupart des dermatophytes (plus d'une vingtaine d'espèces) sont répertoriés dans ce genre. Seules une dizaine d'espèces peuvent parasiter la peau et les phanères de l'homme. Au niveau microscopique on observe la présence de macroconidies à paroi lisse et à cloisons peu nombreuses, les microconidies sont rondes ou piriformes selon les espèces.

On distingue trois séries d'espèces selon le mode de parasitisme pilaire :

Les espèces endothrix (= endothrix de Sabouraud),

Les espèces ectothrix à petites spores (= microïdes de Sabouraud),

Les espèces ectothrix à grosses spores (= mégaspores de Sabouraud).

Trichophyton rubrum et *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* sont des exceptions.

En principe, ils n'attaquent pas les cheveux.

Le genre *Epidermophyton* (Lang 1879, Sabouraud 1907) :

Ce genre ne comprend qu'une seule espèce, *Epidermophyton floccosum*, caractérisée 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 ni les poils et rarement les ongles des orteils [5].

SABOURAUD (Nouvelle pratique dermatologique 1936) Classification selon le type de parasitisme pileaire	LANGERON et MILOCHEVITCH (Annales de parasitologie 1930) Classification botanique	EMMONS (Archives of Dermatology 1934) Classification botanique
Pas de parasitisme pileaire EPIDERMOPHYTON	EPIDERMOPHYTE	EPIDERMOPHYTON
Parasitisme microsporique MICROSPORUM	SABOURAUDITE	MICROSPORUM
Parasitisme favique ACHORION GYPSEUM <i>Bodin</i>		
ACHORION SCHOENLEINII	TRICHOPHYTON	TRICHOPHYTON
Parasitisme endothrix TRICHOPHYTON ENDOTHRIX		
Parasitisme mégaspore TRICHOPHYTON MEGASPORE		
Parasitisme microïde TRICHOPHYTON MICROIDE	CTENOMYCES	

Tableau III : Comparaison des trois grandes classifications des dermatophytes [4].

Les genres *Langeronia* et *Keratinomyces* décrits par Langeron et Vanbreuseghem étant considérés comme non pathogènes pour l'homme, n'ont pas été répertoriés dans le tableau III.

Enfin en 1966, Rivalier complète avec des sous-genres la classification d'Emmons tentant ainsi, de maintenir des espèces décrites par *Sabouraud* comme sous-espèces avec notamment [1] :

Trichophyton mentagrophytes sub sp. *asteroides*

Trichophyton mentagrophytes sub sp. *granulosum*

Trichophyton mentagrophytes sub sp. *lacticolor*

Trichophyton mentagrophytes sub sp. *radians*

Trichophyton mentagrophytes sub sp. *interdigitale*

Toutes ces classifications « historiques » ont été établies à partir des formes asexuées c'est à dire imparfaites ou anamorphes des dermatophytes. Depuis, la découverte de formes parfaites (téleomorphes) de certains dermatophytes suggère l'existence d'autres espèces, étoffant la nomenclature.

I.3 Reproduction sexuée des dermatophytes

I.3.1 Mise en évidence des formes parfaites

C'est en 1899 que la notion de reproduction sexuée chez les dermatophytes est abordée lorsque Matruchot et Dassonville suggèrent qu'un *Ctenomyces* pourrait être la forme sexuée d'un *Trichophyton* [1 ; 7].

Les mycologues qui ne tiennent compte que des formes sexuées (dites « parfaites » ou téléomorphes), après avoir retenu deux genres : *Nannizzia* et *Arthroderma* n'en retiennent plus qu'un seul, le genre *Arthroderma* [1].

I.3.2 Modalités de la reproduction sexuée

Les champignons se développent par un système de filaments ou hyphes plus ou moins développés et ramifiés, appelé le thalle. Chez les dermatophytes, l'apparition de fertilité est due à la confrontation de thalles issus de spores génétiquement différenciées dont les noyaux sont de type « mâle » (+) ou « femelle » (-) : c'est pourquoi ils sont qualifiés d'espèces hétérothalliques [2 ; 5].

Lorsque deux thalles se rencontrent, on assiste à la formation des gamétocystes mâles (anthéridies) ou femelles (ascogones) sur les filaments mycéliens. Les ascogones s'enroulent autour des anthéridies puis, les noyaux de l'anthéridie passent dans l'ascogone. Les noyaux + et - s'apparient et donnent un filament dicaryotique.

Ensuite, les noyaux fusionnent, c'est l'étape de la caryogamie. Enfin, après réduction chromatique, des asques octosporés apparaissent. Parallèlement à la conjugaison des anthéridies et des ascogones, des filaments se forment et s'enchevêtrent à partir du pied de l'anthéridie pour donner la paroi de l'ascocarpe (organe protecteur des asques). Chez les dermatophytes, ces ascocarpes sont appelés gymnothèces ou cléistothèces : ascocarpes globuleux, complètement clos, à contours mal délimités. La probabilité d'isoler d'un produit pathologique deux souches de polarité différente est si rare qu'il est en pratique impossible de retrouver les formes parfaites des dermatophytes dans les primocultures au laboratoire [2 ; 5].

1.3.3 Taxonomie du complexe *Trichophyton mentagrophytes* et de ses formes parfaites

En 1973, Mitsuo Takashio, mycologue d'origine japonaise, a montré que, contrairement à ce que soutient Ajello en 1968, *Arthroderma benhamiae* n'est pas l'unique état sexué (forme parfaite) de *Trichophyton mentagrophytes*. Il met en évidence une autre forme téléomorphe de ce dernier : *Arthroderma vanbreuseghemii* [7 ; 8 ; 9 ; 10].

1.3.3.1 Arthroderma vanbreuseghemii

Cette espèce importante en pathologie humaine a été séparée des autres formes parfaites par des techniques de confrontation que lui a appliquées Takashio [7].

Les cléistothèces ont les caractères généraux du genre *Arthroderma*. Les cellules des hyphes péridiales (constituant la paroi des cléistothèces) présentent une constriction et portent comme appendice des vrilles à spirales lâches ou serrées. Les asques et les ascospores ne présentent aucune particularité.

Les formes anamorphes ou conidiennes dites « imparfaites » correspondant à cette forme téléomorphe sont *Tricophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et var. *interdigitale*.

1.3.3.2 Arthroderma benhamiae

Takashio a montré que l'on peut séparer les souches d'*Arthroderma benhamiae* en deux races : une race américano-européenne et une race africaine. Les confrontations entre souches de même race sont très fertiles alors que celles entre souches de races différentes le sont peu. De plus, la race africaine comprend une variété « *erinacei* » dont la forme anamorphe correspondante serait *Tricophyton mentagrophytes* var. *erinacei*.

Les souches de la variété *erinacei*, isolées du hérisson européen *Erinaceus europaeus* sont de signe +. Celles isolées du hérisson africain *Erinaceus albiventris*, sont de signe -. Néanmoins ces souches ne se fertilisent pas mutuellement et seules les confrontations avec les souches de signe opposé et de la même race sont fertiles [7 ; 8].

	Forme imparfaite (anamorphe)	Forme parfaite (téléomorphe)
	Genre <i>Epidermophyton</i>	pas de genre
Anthropophile	<i>E. floccosum</i>	inconnue
	Genre <i>Microsporum</i>	Genre <i>Arthroderma</i> (ex <i>Nannizzia</i>)
Anthropophiles	<i>M. audouinii</i> <i>M. audouinii</i> var. <i>langeronii</i> <i>M. rivalieri</i> <i>M. ferrugineum</i>	formes parfaites inconnues
Zoophiles	<i>M. canis</i> <i>M. canis</i> var. <i>distortum</i> <i>M. equinum</i> <i>M. persicolor</i> <i>M. praecox</i> <i>M. nanum</i>	<i>Arthroderma otae</i> <i>A. otae</i> <i>A. de signe (-)</i> <i>A. persicolor</i> inconnue <i>A. obtusa</i>
Telluriques pathogènes	<i>M. gypseum</i> <i>M. gypseum</i> <i>M. fulvum</i>	<i>A. gypseum</i> <i>A. incurvatum</i> <i>A. fulvum</i>
Telluriques Saprophytes	<i>M. amazonicum</i> <i>M. boullardii</i> <i>M. cookei</i> <i>M. racemosum</i> <i>M. vanbreuseghemii</i>	<i>A. borellii</i> <i>A. corniculatum</i> <i>A. cajetani</i> <i>A. racemosum</i> <i>A. grubyi</i>
	Genre <i>Trichophyton</i>	Genre <i>Arthroderma</i>
Anthropophiles	<i>T. menta.</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. schoenleinii</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. concentricum</i> <i>T. gourvilii</i> <i>T. megninii</i> (<i>T. rosaceum</i>)	signe + ou <i>A. vanbreuseghemii</i> + signe (-) inconnue inconnue signe (-) inconnue inconnue inconnue inconnue
Zoophiles	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> <i>T. equinum</i> <i>T. verrucosum</i> <i>T. simii</i> <i>T. quinckeanum</i> <i>T. gallinae</i>	<i>A. vanbreuseghemii</i> <i>A. benhamiae</i> (race africaine) <i>A. benhamiae</i> (race américano-européenne) <i>A. benhamiae</i> (race africaine) inconnue inconnue <i>A. simii</i> inconnue inconnue
Telluriques pathogènes	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>A. vanbreuseghemii</i>
Telluriques saprophytes	<i>T. terrestre</i> <i>T. terrestre</i> <i>T. terrestre</i> <i>T. ajelloi</i> (<i>Keratinomyces ajelloi</i>) <i>T. flavescens</i> <i>T. (Chrysosporium) georgiae</i> <i>T. gloriae</i> <i>T. vanbreuseghemii</i>	<i>A. quadrifidum</i> <i>A. insingulare</i> <i>A. lenticularum</i> <i>A. uncinatum</i> <i>A. flavescens</i> <i>A. ciferrii</i> <i>A. gloriae</i> <i>A. gertleri</i>

Tableau IV : Correspondance des formes anamorphes et téléomorphes des dermatophytes (classification actuelle).

Si certains dermatophytes restent saprophytes du sol, beaucoup ont évolué vers le parasitisme, d'abord chez l'animal, puis chez l'homme ; ayant des conséquences sur le plan biologique avec la disparition progressive de l'aptitude à la reproduction sexuée. Mais cette adaptation au parasitisme a également des répercussions sur le plan épidémiologique.

I.4 Epidémiologie

I.4.1 Origine des dermatophytes

Il est admis traditionnellement de présenter l'épidémiologie des dermatophytes en fonction de leur mode de vie [5 ; 6] :

- les dermatophytes zoophiles, parasites obligatoires des animaux : ce sont pour la plupart les agents de zoonoses (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *Microsporum persicolor*, *Trichophyton gallinae*).
- les dermatophytes anthropophiles, parasites obligatoires de l'homme : ils sont difficilement transmissibles aux animaux (zoonoses inversées rares) (*Microsporum audouinii*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*).
- les dermatophytes géophiles, qui ont une vie saprobiotique dans le sol et peuvent parfois contaminer l'homme ou les animaux (*Microsporum gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*).

T. mentagrophytes est le dermatophyte qui a le plus large habitat. Il est à la fois zoophile, anthropophile mais il peut également avoir une vie saprobiotique dans le sol [2 ; 5 ; 6].

Espèces anthropophiles	
- genre <i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>
- genre <i>Microsporum</i>	<i>M. audouinii</i> var. <i>langeronii</i> <i>M. ferrugineum</i>
- genre <i>Trichophyton</i>	<i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. schoenleinii</i>
Espèces zoophiles	
- genre <i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i> (chat- chien) <i>M. persicolor</i> (souris) <i>M. praecox</i> (cheval) <i>M. equinum</i> (cheval) <i>M. nanum</i> (porc)
- genre <i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (chat, lapin, cheval) <i>T. erinacei</i> (hérisson) <i>T. verrucosum</i> (bovin) <i>T. equinum</i> (cheval) <i>T. gallinae</i> (volaille)
Espèces telluriques	
- genre <i>Microsporum</i>	<i>M. gypseum</i> <i>M. fulvum</i>
- genre <i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> <i>T. ajelloi</i> <i>T. terrestre</i>

Tableau V : Classification des dermatophytes selon leur habitat [6].

1.4.2 Adaptation au parasitisme

L'évolution classique des dermatophytes vers le parasitisme a lieu suivant un schéma de transmission du sol à l'animal puis de l'animal vers l'homme.

D'abord saprophytes du sol, les dermatophytes se développent aux dépens de la kératine présente dans ce milieu (fragments de poils de peau, de cornes, de sabots, de carapaces d'insectes...) puis familiarisés à ce substrat, ils parasitent le poil de l'animal (kératine vivante) ou directement l'homme [3].

Récemment, une nouvelle approche épidémiologique concernant l'adaptation au parasitisme plus évolutive a été proposée décrivant deux principales catégories de dermatophytes [3] :

- Les dermatophytes géophiles et zoophiles, encore liés au sol ou proches de celui-ci.
- Les dermatophytes zoophiles et anthropophiles, associés au parasitisme strict, n'étant plus associés au sol.

L'engagement parasitaire des dermatophytes a des conséquences sur le plan épidémiologique, clinique et biologique : en effet plus une espèce est adaptée à son hôte, plus elle diffuse aisément au sein de la population concernée et meilleure est la tolérance clinique. Au niveau biologique, on constate une perte de la reproduction sexuée chez les espèces éloignées du sol et bien adaptées au parasitisme [3].

Dermatophytes associés au sol	Dermatophytes associés au parasitisme strict
Reproduction sexuée (souches + et -)	Absence de stade sexué
Reproduction asexuée active	Conidiogenèse pauvre
Présence d'organes perforateurs	Absence d'organes perforateurs
Indépendance vitaminique	Vitaminodépendance
Activité uréasique positive	Test à l'uréase négatif
Résistance aux conditions extérieures (osmophilie)	

Tableau VI : Caractéristiques des deux nouvelles catégories évolutives des dermatophytes.

Toutefois, il existe une catégorie intermédiaire regroupant des dermatophytes ayant des caractères « parasites » et « saprophytes ». C'est le cas de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, espèce anthropophile stricte uniquement rencontrée à l'état parasitaire mais qui présente encore des caractères telluriques tels que la présence d'organes perforateurs et un test à l'uréase positif [3]

Cette nouvelle approche est à nuancer puisque *Microsporum gypseum*, espèce tellurique ne présente pas d'activité uréasique.

I.4.3 Répartition géographique

La plupart des dermatophytes ont une distribution cosmopolite (*E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum*, ...), d'autres espèces restent localisées à certaines régions du globe comme *M. ferrugineum* (Asie, Afrique), *T. concentricum* (Asie, Indonésie).

La diminution de fréquence d'isolement de certaines espèces comme *M. ferrugineum*, *T. schoenleinii* s'explique par leur limitation à des zones géographiques étroites. D'autres espèces, à l'inverse, en s'adaptant à la population autochtone sont en augmentation (*M. audouinii* var. *langeronii*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*) et donnent des épidémies, par exemple, en milieu scolaire dans les grandes villes cosmopolites [5].

De surcroît, les courants migratoires de populations engendrent la réapparition de certaines espèces comme *T. tonsurans*. Agent de teigne et habituellement isolé chez des patients provenant du continent américain ou des Caraïbes (notamment Haïti), ce champignon a été à l'origine de petites épidémies de lésions cutanées et du cuir chevelu chez des jeunes judokas depuis le début des années 2000 en France. Le même phénomène a été décrit au Japon entre 2001 et 2003, chez des judokas ainsi que chez d'autres pratiquants de sport de combat ayant participé à des tournois internationaux [11].

Espèces	Agents	Provenance géographique
anthropophile	<i>E. floccosum</i> <i>M. audouinii</i> <i>M. audouinii</i> var. <i>langeroni</i> <i>M. audouinii</i> var. <i>rivalieri</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. concentricum</i> <i>T. yaoundei</i> <i>T. schoenleinii</i>	Cosmopolite Cosmopolite Afrique noire Afrique noire Afrique noire continent américain, Caraïbes, cosmopolite Asie, Moyen-Orient, Bassin méditerranéen cosmopolite cosmopolite Pacifique, Sud-Est asiatique, Amérique latine Afrique centrale Afrique du Nord
zoophile	<i>M. canis</i> <i>M. gallinae</i> <i>M. equinum</i> <i>M. persicolor</i> <i>M. nanum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i> <i>T. verrucosum</i> <i>T. simii</i>	Cosmopolite Cosmopolite Cosmopolite Amérique, Europe Cosmopolite Cosmopolite Europe, Nouvelle-Zélande Cosmopolite Cosmopolite Inde
géophile	<i>M. gypseum</i> <i>M. praecox</i>	Cosmopolite États-Unis, Europe de l'Ouest

Tableau VII : Répartition des principaux dermatophytes selon l'origine géographique.

II ASPECTS CLINIQUES

II.1 Modes de contamination

L'aptitude au parasitisme des dermatophytes leur confère une contagiosité manifeste. La contamination peut être d'origine humaine (dermatophytes anthropophiles), animale (zoophiles), tellurique (géophiles) [2 ; 6].

Les espèces anthropophiles diffusent bien dans la population humaine, tandis que les zoophiles souvent adaptées à une ou plusieurs espèces animales passent rarement chez l'homme et de façon accidentelle. Enfin, les telluriques (ou géophiles) sont transmis à l'homme ou l'animal par le biais le plus souvent d'un traumatisme ou d'une souillure tellurique [4 ; 5 ; 6].

II.1.1 Contamination d'origine humaine

En France métropolitaine, c'est le cas le plus fréquent. La transmission peut être directe, d'individu à individu mais elle se fait le plus souvent par l'intermédiaire de sols (salles de bains, salles de sport, piscines...), souillés par des squames parasitées d'origine humaine. Des objets tels que les peignes, les brosses, les foulards, les vêtements ou les chaussures contenant des arthrospores potentiellement infectantes peuvent également être sources de contamination. *T. rubrum*, suivi de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, représentent les deux espèces isolées le plus fréquemment au laboratoire, à partir de lésions cutanées ou d'onyxis. *E. floccosum*, est de moins en moins isolé depuis une dizaine d'années. Plus rarement, la contamination a lieu à partir d'enfants originaires de régions défavorisées du globe (pays du sud essentiellement) ou ayant séjourné là-bas et présentant des teignes contagieuses. Les espèces les plus souvent isolées sont, dans ce cas, *M. audouinii* var. *langeronii*, *T. violaceum*, *T. soudanense* et *T. tonsurans* et plus rarement *T. schoenleinii* [2 ; 5 ; 6].

II.1.2 Contamination d'origine animale

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

La contamination de l'homme par l'animal est cependant rare, elle s'effectue à partir d'animaux d'élevage, de rente (*Trichophyton verrucosum* au contact des bovins), ou de compagnie (*Microsporum canis* au contact des chats et des chiens). Ces animaux peuvent être porteurs de lésions apparentes (« dartres des bovidés »), ou s'avérer être des porteurs sains, comme c'est souvent le cas chez le chat avec *Microsporum canis*. De petits mammifères sauvages (mulot, campagnol...) peuvent être porteurs de *Microsporum persicolor* ou de *Trichophyton mentagrophytes* et déposer des spores contaminantes à proximité des habitations humaines. Les autres espèces zoophiles comme *Microsporum praecox*, *Trichophyton erinacei* ou *Trichophyton equinum* sont plus rarement impliquées en pathologie humaine [2 ; 4 ; 6].

II.1.3 Contamination d'origine tellurique

Certains dermatophytes se multiplient dans le sol, notamment dans les sols enrichis en kératine animale (poils, fragments de corne, de sabots, plumes,...). La contamination de l'homme se produit à partir d'un contact avec de la terre ou du sable, le plus souvent suite à un traumatisme avec effraction cutanée (griffures ou coupures à l'occasion de travaux de jardinage). Les dermatophytes géophiles (*Microsporum gypseum*, *Microsporum fulvum* et *Trichophyton mentagrophytes*) ne sont cependant que rarement isolés de lésions humaines. D'autres dermatophytes telluriques considérés comme non pathogènes, tels que *Trichophyton terrestre* ou *Trichophyton ajelloi*, peuvent également être isolés. Ces espèces sont capables de coloniser le revêtement cutané, mais sans entraîner de lésions [5 ; 6]

II.2 Facteurs favorisants

L'apparition de dermatophytoses, mycoses superficielles provoquées par les dermatophytes (parfois appelées dermatophyties ou *Tinea* chez les anglo-saxons) peut être favorisée par divers facteurs d'ordre physiologique ou pathologique, ou encore liés au mode de vie [5]. Citons:

- Les facteurs hormonaux : ce sont les enfants les plus touchés par les teignes, ils guérissent spontanément à la puberté pour la plupart;
- Les facteurs immunologiques comme l'immunosuppression liée au SIDA, une corticothérapie, un traitement immunosuppresseur, ou une chimiothérapie, un diabète
- La profession : agriculteurs, éleveurs de bovins et vétérinaires sont particulièrement exposés à une contamination par une espèce zoophile.
- La macération (chaleur et humidité) 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, ...);
- La pratique des sports équestres, de la natation, des sports en salle (arts martiaux, gymnastique, ...) favorisent également le développement et la dissémination des dermatophytes
- Les microtraumatismes peuvent être sources d'onyxis des pieds chez les sportifs [4 ; 5].

II.3 Pouvoir pathogène

Les dermatophytes ont une prédilection pour la kératine de la couche cornée de la peau, des poils, des cheveux et des ongles chez l'être humain, de la peau, des poils et des griffes chez l'animal. Ils sont responsables d'infections cutanées superficielles de la peau et des phanères mais respectent toujours les muqueuses [2 ; 5 ; 6 ; 12].

II.3.1 Physiopathologie

II.3.1.1 Généralités

Les dermatophytes sont rarement saprophytes (certaines espèces telluriques) et le plus souvent pathogènes chez l'homme [13 ; 14]. La première étape dans l'établissement d'une dermatophytose implique l'adhérence d'une arthrospore (spore provenant de la fragmentation d'un filament mycélien et constituant l'élément infectant) au cornéocyte (couche kératinisée de l'épithélium malpighien pluristratifié). Le principal mécanisme d'adhérence des champignons repose sur la reconnaissance spécifique entre des adhésines fongiques et des récepteurs de l'hôte. Les adhésines identifiées chez les champignons pathogènes, notamment les dermatophytes, sont principalement des protéines et des mannoprotéines, classées en fonction des ligands auxquels elles se lient [14].

- Les adhésines de type lectine présentes à la surface des microconidies de *T. mentagrophytes* se lient aux résidus mannose et galactose des cellules épithéliales.
- Les adhésines fibrillaires présentes à la surface des microconidies et des arthrospores de *T. mentagrophytes* permettent la connexion avec les kératinocytes.

Pendant l'étape d'adhérence, les éléments fongiques doivent résister à différents facteurs tels que les ultraviolets, les variations de températures et d'humidité, la compétition avec la flore résidente et les propriétés locales physico-chimiques de l'épiderme. Les acides gras insaturés à longues chaînes, en particulier les chaînes 7, 9, 11 et 13 produits par les glandes sébacées sont fongostatiques.

Ensuite, les spores doivent germer et pénétrer le *stratum corneum* plus rapidement que la desquamation. Ceci est possible grâce à la sécrétion de protéases, de lipases et d'enzymes mucolytiques qui apportent également des nutriments utiles aux champignons.

Les protéases jouent un rôle dans les premiers stades de l'invasion du stratum corneum, en modifiant la surface des kératinocytes ou la paroi fongique. Ces enzymes sont également impliquées dans l'adhérence du champignon aux kératinocytes [13 ; 14 ; 15].

La cinétique d'adhérence de *T. mentagrophytes* a été étudiée grâce à l'utilisation d'un modèle *ex vivo* d'explants cutanés humains constitués de toutes les couches de l'épiderme. Lors de cette étude, l'adhérence n'est survenue qu'après 12 heures, la germination a débuté après 24 heures et l'invasion du *stratum corneum* par les hyphes a eu lieu après 3 jours [15].

II.3.1.2 Mode de végétation sur la peau

Favorisée par une lésion cutanée préexistante, le champignon pénètre la couche cornée de l'épiderme puis la croissance se fait de façon circulaire et centrifuge. Les lésions seront donc arrondies, le champignon étant actif sur le pourtour externe (couronnes de vésicules ou de squames) et ayant tendance à disparaître dans le centre [2 ; 5 ; 6 ; 12].

II.3.1.3 Mode de végétation dans le cheveu ou le poil

Secondairement à l'atteinte cutanée, le champignon se développe à partir de l'ostium folliculaire pour atteindre le bulbe pileux (plus de kératine à ce niveau). L'évolution du champignon dans le cheveu dépend de l'espèce responsable [2 ; 12 ; 16] :

- teigne favique : faible multiplication, le cheveu reste long.
- teigne endothrix : multiplication importante à l'intérieur du cheveu : les arthroconidies restent dans la gaine pileaire, remplaçant la kératine pileaire et laissant le cortex intact.
- teigne ecto endothrix : multiplication à l'intérieur et à l'extérieur du cheveu : les arthroconidies pénètrent dans le follicule pileux puis dans le cortex du cheveu.

- Gaine de petites spores compactes, non dissociables par la potasse : teigne microsporique
- Gaine de petites spores en chaînettes, dissociable par la potasse : teigne microïde
- Gaine de spores plus grosses : teigne mégaspore

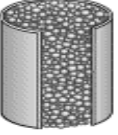
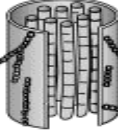
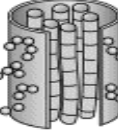
Aspect clinique des lésions	1,2,3 plaques alopéciques de quelques mm de diamètre	Très nombreuses plaques alopéciques de quelques mm de diamètre	Teigne inflammatoire (kérion aigu)	Teigne inflammatoire (kérion subaigu)	Teigne favique
Examen clinique des cheveux	Cheveux cassés à quelques mm de l'émergence	Cheveux cassés très courts englués dans les squames ou aspect de comédon	Cheveux expulsés rapidement	Cheveux cassés court avant d'être expulsés	Cheveux non cassés
Aspect en Wood	Wood +	Wood -	Wood -	Wood -	Wood +
Aspect du parasitisme pileaire à l'examen direct	Microsporique 	Endothrix 	Microïde 	Mégaspore 	Favique 
Étiologies	Dermatophytes anthropophiles <i>M. audouinii</i> <i>M. langeroni</i> (Afrique noire) <i>M. ferrugineum</i> (Extrême-Orient) Dermatophytes zoophiles <i>M. canis</i>	Dermatophytes anthropophiles <i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> (Méditerranée) <i>T. soudanense</i> (Afrique noire) <i>T. megninii</i> (Portugal)	Dermatophytes zoophiles <i>T. mentagrophytes</i> <i>T. erinacei</i>	Dermatophytes zoophiles <i>T. ochraceum</i>	Dermatophytes anthropophiles <i>T. schoenleinii</i>

Figure 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des teignes [12].

II.3.1.4 Mode de végétation au niveau de l'ongle

Le champignon pénètre l'ongle qui a eu un traumatisme ou suite à une lésion dermatophytique cutanée, et l'envahit du bord libre vers la matrice proximale selon quatre voies principales [2 ; 12 ; 17 ; 18 ; 19] :

➤ Pénétration par l'intermédiaire de la région sous-unguéale distale ou latéro-distal :

Le champignon prolifère dans le lit de l'ongle à partir du bord latéro-distal en direction de la matrice. La couche cornée hyperkératosique soulève le bord libre qui se sépare progressivement des tissus sous-unguéaux. L'ongle devient friable, puis il est détruit. (Onychomycodystrophie totale)

➤ Pénétration par la face dorsale de la tablette : leuconychies

L'ongle est envahi profondément ou plus superficiellement. Il s'agit d'onychomycose superficielle blanche dont *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* est responsable dans 90% des cas.

➤ Pénétration dans la région sous-unguéale proximale :

L'atteinte initiale se fait sous le repli sous-unguéal et progresse vers la région distale sous la tablette. Cet aspect rare est observé plus volontiers chez les patients immunodéprimés, *T. rubrum* est en général responsable.

➤ Pénétration de la tablette sans atteinte du lit unguéal :

Il s'agit d'onychomycose endonyx, toute la tablette unguéale est atteinte sans hyperkératose sous unguéale. *T. soudanense* et *T. violaceum* en sont les principaux responsables.

II.3.1.5 Réponse de l'hôte

II.3.1.5.1 Réaction immunitaire non spécifique

La réaction immunitaire débute lorsque le dermatophyte pénètre la couche cornée, il interagit alors avec les kératinocytes. Ces derniers sécrètent des cytokines telles que l'IL-8 en présence des antigènes du dermatophyte notamment la trichophytine. Ainsi, les kératinocytes en plus de leur rôle mécanique de barrière jouent un rôle dans l'initiation précoce de la réaction inflammatoire.

Ces cytokines entraînent l'arrivée de polynucléaires neutrophiles dont le rôle est de phagocyter les éléments fongiques et d'inhiber la croissance fongique, et des macrophages qui vont présenter les antigènes fongiques aux lymphocytes lors de la réponse immunitaire spécifique [20].

II.3.1.5.2 Réaction immunitaire spécifique

Immunité humorale

Lors de la réaction immunitaire, certains champignons produisent des facteurs chimiotactiques de bas poids moléculaire (identiques aux bactéries) alors que d'autres activent la voie alterne du complément. Une activation prédominante des lymphocytes T de type 2 (Th2) entraîne une réaction immunitaire tournée vers la production d'anticorps et une installation chronique de la maladie. Plusieurs études ont montré que l'immunité humorale n'induisait pas de protection efficace contre les dermatophytes [20 ; 21].

Immunité cellulaire

C'est la seule immunité efficace dans l'élimination des dermatophytes. Le mécanisme passe par une hypersensibilité retardée (type IV). Une activation prédominante des lymphocytes Th1 stimule la réponse immunitaire à médiation cellulaire, caractérisée par la production d'IFN- γ , IL-12 et IL-2, puis la guérison.

Lors du premier contact avec le champignon, la réaction inflammatoire est minime et le test à la trichophytine (préparation obtenue à partir de cultures de dermatophytes contenant des antigènes de groupe et d'espèce) négatif. Les antigènes des dermatophytes sont pris en charge par les cellules de Langerhans et présentés aux lymphocytes T dans les ganglions.

Ensuite, il y a prolifération lymphocytaire clonale, avec inflammation puis destruction des champignons. Le test à la trichophytine devient alors positif.

Les dermatophytides surviennent chez 4 à 5% des patients : il s'agit de réactions inflammatoires survenant à distance du foyer infectieux telles que des lésions eczématiformes de localisation variée ou des dyshidroses des mains ou des pieds. Ces réactions sont associées à un test à la trichophytine positif [2 ; 12 ; 20 ; 21].

II.3.2 Manifestations cliniques : particularités du complexe *Trichophyton mentagrophytes*

Trichophyton mentagrophytes est le dermatophyte présentant le plus large habitat. Il est à la fois tellurique, zoophile et anthropophile par sa variété *interdigitale*. Cette variété est souvent isolée au laboratoire, elle représente 15 à 20 % des isolats de dermatophytes [6].

II.3.2.1 Pathogénie de *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*

De contagion strictement interhumaine, par l'intermédiaire des sols de piscines, de salles de bains, ce champignon est totalement incapable d'attaquer le poil, c'est un épidermophyte et un agent d'onychomycose ; il provoque essentiellement des lésions du pied dont les signes fonctionnels sont représentés par un prurit souvent intense, exacerbé par l'eau et la chaleur. Des sensations de brûlures peuvent aussi se rencontrer [2 ; 5 ; 6 ; 19].

❖ Intertrigos interdigito-plantaires

Ils débutent habituellement dans le dernier espace inter-orteils. Initialement réduites à une simple fissure desquamante plus ou moins prurigineuse, les lésions débordent ensuite largement les bords latéraux des 4^{ème} et 5^{ème} orteils et se généralisent aux autres espaces inter-orteils réalisant le « pied d'athlète », à la plante du pied et aux ongles.

Plus tardivement, la peau au fond des plis s'épaissit et devient blanc nacré. Des vésicules peuvent se voir à la périphérie des lésions. *T. mentagrophytes* var *interdigitale* est incriminé dans ce type de lésions dans 30 % des cas, derrière *T. rubrum* impliqué dans 65 % des cas [2 ; 4 ; 5 ; 6].



Figure 2 : Intertrigo interdigito-plantaire à dermatophyte
(<http://www.drvarlet.fr/mycoses-orteils-ad.html>)

❖ Lésions plantaires

Les lésions sont asymétriques, érythémato-squameuses et prurigineuses ; la peau en regard des lésions est souvent épaissie et fissurée. Elles peuvent prendre un aspect vésiculo-bulleux. Parfois, les lésions se présentent comme une pachydermie plantaire, affectant les deux pieds et s'arrêtant brusquement au niveau des bords (« aspect en mocassin »).

Une co-infection à *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et à bactéries gram négatif est responsable d'éruption bulleuse, pustuleuse, purulente et ulcérée de la plante. Lymphangite, érysipèle peuvent compliquer le tableau [2; 4; 5].



Figure 3 : Lésion plantaire à dermatophyte.

❖ Onyxis

Quatre aspects cliniques sont décrits en fonction du mode de pénétration du champignon dans l'ongle.

L'aspect le plus fréquemment rencontré est l'onychomycose distale avec atteinte du bord libre de l'ongle sous forme d'une tache blanche ou jaune qui s'étend progressivement vers la matrice. L'ongle devient épais, friable et perd sa transparence [18].



Figure 4 : Onychomycose disto-latérale

Les leuconychies superficielles ou profondes, tout d'abord décrites chez le patient sidéen, également constatées en l'absence d'immunodépression ; se manifestent par des petits îlots blancs, opaques, à limites nettes, qui par coalescence vont atteindre progressivement toute la surface de l'ongle. Celui-ci s'effrite alors par simple grattage à la curette [2 ; 4 ; 5 ; 6 ; 17].



Figure 5 : Leuconychie superficielle

L'onychomycose proximale se traduit par une atteinte de l'ongle au niveau de la matrice, des taches blanches émergent dans la région lunulaire puis s'étendent peu à peu. Elle atteint le plus souvent l'immunodéprimé [17].



Figure 6 : Onychomycose proximale (<http://www.ourhealthnetwork.com>)

L'onychomycodystrophie peut être totale par aggravation progressive des variétés précédentes, surtout disto-latérales. Toute la lame devient friable, en « bois pourri » et s'effrite peu à peu complètement.



Figure 7: Onychomycodystrophie totale

❖ Intertrigos des grands plis

T. mentagrophytes var. *interdigitale* peut être exceptionnellement retrouvé à l'aîne ou dans le pli interfessier. Il s'agit d'une lésion symétrique de part et d'autre du pli, à bords réguliers, bien délimitée et érythémateuse [6 ; 22].



Figure 8 : Intertrigo des grands plis (<http://www.drvarlet.fr>)

II.3.2.2 Pathogénie de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*

Les souches zoophiles (présentent dans le pelage des animaux) ou telluriques de *Trichophyton mentagrophytes* donnent des lésions inflammatoires des parties découvertes du corps (peau, cuir chevelu, barbe).

❖ Dermatophyties de la peau glabre

Elles correspondent à l'ancienne dénomination d'herpès circiné.

Trichophyton mentagrophytes var. *mentagrophytes* réalise de larges plaques cutanées, souvent pustuleuses, très inflammatoires, d'extension centrifuge mais sans guérison centrale. Les lésions prurigineuses siègent au visage, tronc et membres [2; 5; 6].



Figure 9 : Epidermophytie circinée

❖ Teignes inflammatoires ou suppurées (kérion de Celse, sycosis)

L'affection commence par un ou plusieurs placards érythémateux, arrondis et prurigineux au niveau du cuir chevelu ou de la barbe (sycosis). Ensuite, les placards se tuméfient et se couvrent de pustules folliculaires laissant couler un pus jaunâtre lorsqu'elles se rompent. Cheveux et poils s'éliminent alors spontanément. Ces teignes sont parfois associées à des signes généraux modérés (fièvre, céphalées, arthralgies) et à des adénopathies satellites sensibles [6 ; 22].



Figure 10: Sycosis de la moustache

II.3.2.3 Pathogénie de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*

T. mentagrophytes var. *erinacei* est très proche de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. Le hérisson constitue le réservoir animal de ce dermatophyte. L'homme se contamine au contact d'un hérisson ou indirectement à partir d'herbe souillée par les spores de *T. erinacei*. Ce champignon est isolé surtout en Europe et en Nouvelle-Zélande. Il est rarement impliqué en pathologie humaine en France, il provoque des épidermophyties circinées ou des kériens des parties découvertes du corps, visage, mains, cuir chevelu [6].

III MÉTHODES D'IDENTIFICATION CLASSIQUE DES DERMATOPHYTES

III.1 Prélèvement et transport

Le prélèvement constitue une étape décisive dans l'établissement du diagnostic mycologique, en effet sa qualité est essentielle et conditionne l'isolement de l'agent pathogène.

Le prélèvement doit permettre de recueillir un matériel suffisamment abondant, pour la réalisation d'un examen direct et la mise en culture [6 ; 23].

III.1.1 *Notions théoriques*

Afin d'obtenir un prélèvement de qualité, certaines règles sont à respecter :

Le prélèvement doit être réalisé à distance de tout traitement antifongique local ou systémique. Une fenêtre thérapeutique de 15 jours est indiquée lors d'utilisation de topique classique, 3 mois en cas d'antifongique filmogène et de 1 à 3 mois en cas d'antifongique systémique (30 jours : griséofulvine et kétoconazole ; 3 mois : terbinafine), une toilette locale préalable à l'aide d'un savon neutre permet d'éliminer les moisissures de l'environnement pouvant contaminer les cultures mais qui n'est pas toujours réalisée en pratique [12 ; 23]. Les lésions multiples doivent être prélevées et identifiées séparément (lésions siégeant dans un site anatomique différent et lésions d'aspect clinique distinct).

Par ailleurs il faut prélever du matériel vivant, le champignon ayant une croissance centrifuge, les mycéliums vivants sont donc situés à la périphérie des lésions cutanées ou à la jonction ongle sain / ongle mort [2 ; 6 ; 23].

Un certain nombre de renseignements pourront être collectés par le préleveur, comme la notion de voyage récent, d'un contact avec des animaux ou d'une pratique de sports particuliers, profession, date (ou estimation) du début des lésions, prurit, antécédent de mycose et traitement antérieur (*Annexe 1 : Fiche de renseignements cliniques patients*).

La réalisation du prélèvement doit être confiée à un personnel expérimenté, ayant une bonne connaissance sémiologique des dermatophytoses.

III.1.2 Notions pratiques

III.1.2.1 Matériel nécessaire au recueil de l'échantillon

- lampe de Wood : permet d'apprécier l'étendue des lésions, parfois sous-évaluée à l'oeil nu et de visualiser la fluorescence des teignes microsporiques et faviques
- pinces à épiler ou à ongles, de différentes tailles
- vaccinostyle
- ciseaux droits fins ou courbés, à bouts pointus
- paire de très forts ciseaux courbes
- écouvillon stérile à usage unique
- boîtes de Pétri en plastique ou mieux, en verre
- compresses stériles

III.1.2.2 Techniques de prélèvement en fonction des sites touchés

III.1.2.2.1 Lésions cutanées

Les lésions cutanées sont grattées à leur périphérie à l'aide d'un vaccinostyle ; les squames sont recueillies dans un récipient stérile. Les lésions suintantes doivent être prélevées avec deux écouvillons stériles (examen direct, culture).

Dans les intertrigos inter-digito-plantaires, souvent colonisés par des bactéries et des moisissures, il est conseillé d'essuyer au préalable la zone à prélever, à l'aide d'une compresse stérile.

Cette précaution évitera d'accrocher d'éventuelles moisissures saprophytes, qui pourraient freiner la croissance des dermatophytes. Pour l'examen direct, les squames sont récupérées à l'aide d'un vaccinostyle et le cas échéant avec du papier adhésif [6 ; 12 ; 23].

III.1.2.2.2 Lésions des régions pileuses

L'examen du cuir chevelu à la lampe de Wood permet de visualiser des cheveux fluorescents en cas de teigne microsporique (fluorescence vert clair) ou favique (fluorescence vert foncé). Les teignes à petites plaques (trichophytiques) et les lésions suppurées (kérions) n'entraînent pas de fluorescence [23]. Cet examen nécessite une pièce assurant une obscurité totale. Un minimum d'une dizaine de cheveux ou poils suspects sera prélevé à l'aide d'une pince à épiler et la zone suspecte du cuir chevelu sera grattée avec une curette ou un vaccinostyle et recueillis dans un récipient stérile. En cas de lésions suintantes ou suppurées, l'écouvillonnage sera privilégié [6; 23].

Devant une folliculite, les poils seront prélevés au sein de la réaction inflammatoire, les pustules seront ouvertes avec un vaccinostyle et écouvillonnées.

III.1.2.2.3 Onyxis

La partie distale et malade de l'ongle atteint doit être coupée avec une forte pince à ongles puis grattée et éliminée jusqu'à la limite de la partie saine. Onensemencera seulement les morceaux d'ongles obtenus à la jonction des tissus sains là où le dermatophyte est le plus actif. S'il s'agit d'un onyxis avec périonyxis, le pus sera prélevé à l'écouvillon en appuyant sur le bourrelet périphérique. En cas de leuconychies, il est nécessaire de gratter l'ongle à sa surface. Enfin, dans les onychodystrophies, avec destruction quasi totale de l'ongle, les fragments superficiels potentiellement souillés par des moisissures seront éliminés avant de prélever les quelques fragments d'ongles [2 ; 6 ; 12].

En ce qui concerne le transport, les squames, cheveux et ongles peuvent être conservés plusieurs semaines avant l'examen mycologique (les spores de dermatophytes survivent facilement) à condition d'être maintenus à température ambiante et au sec.

Une identification claire et précise du patient ainsi que de la nature, du siège et de la date du prélèvement est nécessaire [12 ; 23].

III.2 Identification morphologique

III.2.1 *Examen microscopique direct*

Il est indispensable pour orienter le diagnostic d'une dermatophytose et permet d'apporter une réponse rapide au clinicien en affirmant la présence du champignon à l'état parasitaire au sein de la lésion, justifiant ainsi la mise en route d'un traitement spécifique dans l'attente des résultats de la culture. L'examen direct est particulièrement important pour le diagnostic des onyxis dermatophytiques car la culture peut rester négative dans 15 à 20 % des prélèvements [2]. Sur le prélèvement recueilli et déposé sur une lame de verre, on applique un produit éclaircissant contenant habituellement de la potasse (KOH à 10% pour les squames ou à 30% pour les ongles, avec un léger chauffage au bec Bunsen de la préparation) associée ou non à un colorant (noir chlorazole) ou à un fluorochrome, permettant de ramollir la kératine (*Annexe2 : Eclaircissants pour examen direct*). L'emploi de bleu coton, de lactophénol ou de chloral lactophénol d'Amman permet d'éclaircir et de conserver indéfiniment les préparations [2 ; 5 ; 24]. L'examen direct permet de mettre en évidence, au sein de squames ou de fragments d'ongles, des filaments plus ou moins réguliers et arthrospores.

- La visualisation des éléments fongiques est parfois difficile notamment pour les prélèvements d'ongles, un examen direct négatif n'exclut donc pas le diagnostic de dermatophytie et la mise en culture du prélèvement est primordiale.
- Au niveau des lésions cutanées, l'aspect des éléments observés est identique quelles que soient la lésion ou l'espèce fongique responsable secondairement isolée en culture.
- Au niveau des cheveux, l'examen direct s'avère en revanche très contributif au diagnostic de teigne avec cinq types de parasitisme pileaire (figure 1) correspondant chacun à des espèces particulières. Les deux types les plus fréquemment observés correspondent aux teignes microsporiques et trichophytiques. La difficulté est plus grande pour les teignes inflammatoires (kérions, sycosis) et les folliculites. Le parasitisme des cheveux ou des poils est en effet peu abondant et nécessite souvent l'examen de plusieurs cheveux ou poils pour en trouver un seul parasite [2 ; 23 ; 24]. De plus, il n'est pas toujours évident de différencier les filaments mycéliens de dermatophytes des pseudofilaments mycéliens de levure, d'où le recours aux méthodes culturales.

III.2.2 Culture

La culture est un complément indispensable de l'examen direct. En effet, l'isolement en culture du dermatophyte et son identification sont importants, puisque la prophylaxie et le traitement peuvent être différents en fonction de l'espèce isolée [12 ; 23].

III.2.2.1 Isolement des dermatophytes

On utilise des milieux de cultures permettant l'isolement des dermatophytes et d'autres milieux permettant leur identification.

L'isolement des dermatophytes se fait sur des milieux simples contenant un sucre, source de carbone et une peptone, source d'azote.

Le milieu de référence est le milieu de Sabouraud, additionné d'antibiotiques (chloramphénicol et/ou gentamicine) limitant la pousse des bactéries saprophytes de la peau. Ce milieu peut être rendu sélectif des dermatophytes par l'ajout de cycloheximide 0,4% (actidione®) qui inhibe la croissance des moisissures contaminantes sauf *Scopulariopsis brevicaulis* [6 ; 12].

Le milieu de Taplin (ou DTM, Dermatophyte Test Medium) peut être utilisé pour l'isolement et l'identification présomptive des dermatophytes. La présence de dermatophytes est suspectée devant l'alcalinisation de ce milieu contenant un indicateur coloré (rouge de phénol). Cependant, un certain nombre de faux-positifs et de faux-négatifs ont été rapportés, et malgré les améliorations apportées à cette gélose commercialisée, son intérêt ne semble pas faire l'unanimité [23 ; 25] (*Annexe 3 : Milieux d'isolement*).

Le produit pathologique est déposé en appuyant légèrement, en plusieurs endroits séparés à la surface de la gélose. Si l'ensemencement est réalisé en tubes, les dermatophytes étant aérobies, il est indispensable de ne pas visser complètement les bouchons, et si la culture est réalisée en boîte de Pétri, il convient d'humidifier l'étuve pour éviter le dessèchement des géloses [12]. L'utilisation des tubes est privilégiée pour le transport et la conservation de souches, ou en cas d'incubation prolongée. Les cultures sont incubées à 25-30°C (températures plus élevées 30-32°C choisies devant des lésions évoquant *T. verrucosum*).

Une durée d'incubation de 4 semaines minimum doit être respectée avant de rendre des résultats négatifs [2 ; 6 ; 12 ; 23 ; 26]. Les dermatophytes poussent plus ou moins rapidement selon les espèces et les colonies seront caractéristiques après un délai variable : 8 jours pour *E. floccosum* jusqu'à 3 à 4 semaines pour certaines espèces à croissance lente comme *T. verrucosum* ou le pseudodermatophyte *Onychocola canadensis* [2 ; 12].

III.2.2.2 Identification

Les cultures seront examinées une à deux fois par semaine, certains aspects caractéristiques n'apparaissant que de façon transitoire, comme les corémies chez *T. rubrum*. Chaque espèce de dermatophyte présente par ailleurs un délai de pousse optimal où l'aspect morphologique est le plus caractéristique. Le milieu d'isolement de Sabouraud permet dans la plupart des cas l'identification des dermatophytes reposant sur un certain nombre de paramètres : vitesse de croissance, aspects macroscopiques et microscopiques [2 ; 12].

III.2.2.2.1 Examen macroscopique des cultures

Au cours de l'examen macroscopique, il faudra noter l'aspect général des colonies (rondes, étoilées,...), leur couleur au recto et au verso, leur relief (plat, plissé, bombé ou cérébriforme), les caractéristiques de la surface (duveteuse, poudreuse, granuleuse ou glabre), mais aussi la consistance (molle, élastique, cartonnée,...) et la taille (réduite, ou à l'inverse extensive) des colonies. On recherchera également la présence d'un pigment diffusant dans la gélose [23].

III.2.2.2.2 Examen microscopique des cultures

Il se fait à partir d'un fragment de culture dissocié au bleu lactique ou lactophénol et examiné entre lame et lamelle. On peut aussi s'aider d'un morceau de ruban adhésif appliqué à la surface de la colonie (drapeau de Roth), puis déposé entre lame et lamelle, dans le bleu lactique ou lactophénol [12] (*Annexe 4 : Colorants pour examen microscopique des cultures*).

On étudiera:

- L'aspect des filaments mycéliens, cloisonnés, de diamètre régulier, ou à l'inverse présentant des dilatations (mycélium en raquette)
- La présence de chlamydospores parfois disposées en chaînettes (filaments toruloïdes de *T. verrucosum*, *T. violaceum*, *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 (*Trichophyton* et *Epidermophyton*) ou rugueuse, échinulée (*Microsporum*) [6 ; 11]
- La présence d'ornementations (*figure 11*) telles que :
 - excroissances triangulaires caractéristiques de *T. rubrum* (ébauches de macroconidies naissant latéralement sur les filaments et de forme triangulaire)
 - organes pectinés (en forme de peigne) pour *M. audouinii* var. *langeronii* et *T. schoenleinii*
 - vrilles chez *M. persicolor* et *T. mentagrophytes*
 - « clous et chandeliers » ou aspect « en bois de cerf » chez *T. schoenleinii*
 - structures proliférante de *T. erinacei* (observées surtout dans la profondeur de la gélose)
 - organes nodulaires des souches dites « nodulare » de *T. mentagrophytes* [12].

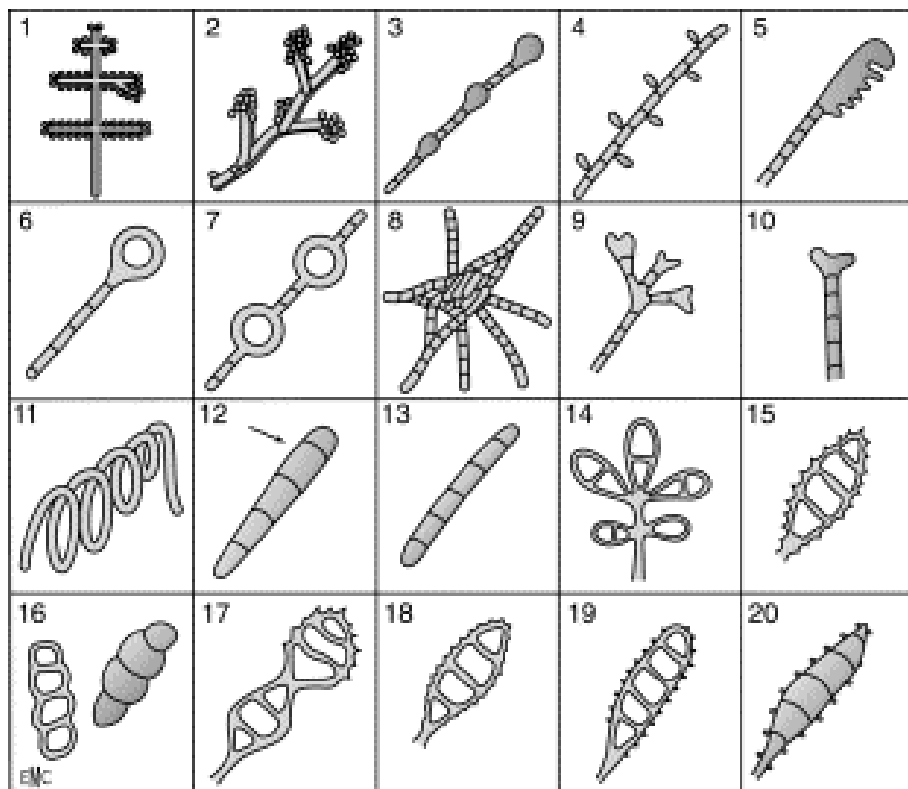


Figure 11 : Aspects microscopiques des cultures : fructifications et formations annexes [12].

1. Aspect du mycélium (hyphe) en « croix de Lorraine » (avec microconidies rondes, *Trichophyton mentagrophytes*) ; 2. Microconidies sphériques en « amas » ; 3. Mycélium en « raquette » ; 4. Microconidies allongées disposées selon le type *Acladium* ; 5. Mycélium pectiné ; 6. Chlamydospore terminale, à l'extrémité d'un filament mycélien ; 7. Chlamydospore intercalaire sur le trajet d'un filament mycélien ; 8. Organe nodulaire (*Trichophyton mentagrophytes*) ; 9. Chandelier favique (*Trichophyton schoenleinii*) ; 10. Clou favique ; 11. Vrille (*Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum persicolor*) ; 12. Macroconidie en « quenouille » de *Trichophyton mentagrophytes* ; 13. Macroconidie de *Trichophyton rubrum* ; 14. Macroconidie en « bouquet » d'*Epidermophyton* ; 15. Macroconidie de *Microsporum canis* ; 16. Macroconidie de *Trichophyton tonsurans* ; 17. Macroconidie de *Trichophyton audouinii* ; 18. Macroconidie de *Microsporum gypseum* ; 19. Macroconidie de *Microsporum fulvum* ; 20. Macroconidie de *Microsporum persicolor*.

III.2.2.2.3 Milieux d'identification

Dans certains cas, le dermatophyte peut rester non identifiable, soit parce que la souche reste stérile (dite « pléomorphisée »), soit parce qu'elle présente des critères culturels macroscopiques ou microscopiques atypiques [1 ; 2 ; 6 ; 23]. Des techniques complémentaires telles que des repiquages sur des milieux spécifiques, dits « d'identification » sont nécessaires pour favoriser la fructification et/ou la production d'un pigment caractéristique [6 ; 12] (*Annexe 5 : Milieux d'identification*).

Les milieux favorisant la conidiogenèse :

Le milieu de Borelli (milieu au lactrimel) stimule la fructification de la majorité des dermatophytes, notamment celle des *Microsporum* (*M. canis*, *M. langeronii*) et renforce la production de pigments (rouge vineux pour *T. rubrum* et jaune pour *M. canis*). D'autres milieux favorisent également la fructification des dermatophytes : milieu de Malt et eau gélosée, la gélose PDA (Potato-Dextrose-Agar), milieu de Baxter.

Le milieu peptoné à 3 % (sabouraud conservation) :

Il permet de différencier les colonies de *M. persicolor* qui deviennent roses en 8 jours de celles de *T. mentagrophytes* qui restent blanches.

Le milieu à l'urée (urée-indole ou Christensen) :

Il permet de différencier *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *T. rubrum*. La variété autochtone, duveteuse, de *T. rubrum* est uréase négative, alors que le milieu vire au rose fuchsia en 2 jours (milieu liquide urée-indole) ou en 7 jours (milieu gélosé de Christensen) pour *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

Le milieu au Bromocrésol pourpre (BCP caséine) :

Ce milieu, gris au départ, contient du bromocrésol pourpre et vire au bleu-violacé avec *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Il n'y a pas de changement de couleur pour *T. rubrum* et *M. persicolor*. Ce milieu contient également de la caséine que *T. verrucosum* hydrolyse en quelques jours, de même que *T. violaceum* var. *glabrum*.

Le milieu BHI (Brain-Heart Infusion) gélosé :

Il peut être utilisé pour mettre en évidence *T. verrucosum*. Ce milieu riche, comme les géloses au sang, favorise la croissance de cette espèce zoophile.

Certains dermatophytes exigent pour leur croissance, certaines vitamines ou certains acides aminés. *T. verrucosum* et *T. concentricum* ont besoin de thiamine et d'inositol [12].

III.3 Identification morphologique du complexe *Trichophyton mentagrophytes*

III.3.1 *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*

Le diagnostic morphologique de cette espèce repose sur l'examen direct qui montre des filaments dans les squames et un parasitisme de type ecto ou endothrix microïde dans les poils et les cheveux, et sur les caractères cultureux.

III.3.1.1 Examen macroscopique des cultures

La croissance des colonies sur milieu de Sabouraud avec ou sans Actidione® est rapide, les colonies apparaissent en quatre à cinq jours et sont caractéristiques en 10 jours [6].

A l'examen macroscopique des cultures, plusieurs aspects peuvent être rencontrés :

- variété *asteroïdes* : colonies blanches, poudreuses, à pourtour étoilé. Il existe fréquemment un pigment de couleur rouge cerise au verso, de forme étoilée.
- variété *granulosum* : disque poudreux formé de gros grains blanc-crème, pigment jaune vif au verso.
- variété *radians* : colonies finement duveteuses, très blanches présentant des franges étoilées en périphérie. Pas de pigment au verso.
- variété *lacticolor* : colonies plates à pourtours arrondis de couleur blanc-crème, poudreuses ou finement duveteuses. Au verso, présence d'un pigment variable jaune à rouge. (ressemble à *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* mais pousse plus rapidement)
- variété *nodulare* : colonies glabres, brunes à rouilles, stériles en primoculture montrant des filaments épais.

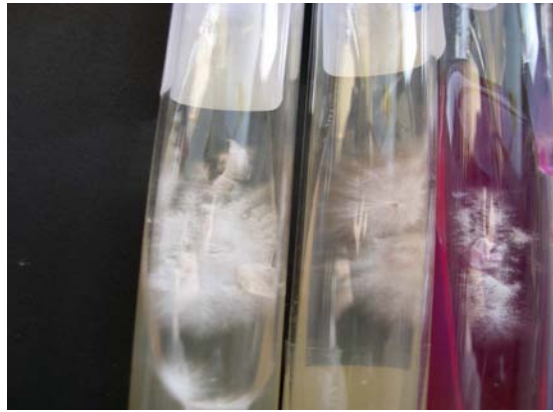


Figure 12 : Aspects macroscopiques des colonies de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* sur milieux de Sabouraud (avec et sans Actidione®) et milieu DTM (à droite).

III.3.1.2 Examen microscopique des cultures

L'examen microscopique des cultures sur milieu de Sabouraud est souvent riche :

Les microconidies rondes sont nombreuses et disposées en grappes sur des filaments articulés à angles droits (croix de Lorraine). Des macroconidies à paroi lisse et mince, en forme de massue sont souvent présentes ; elles contiennent trois à six logettes et mesurent 20-50 μm x 10-12 μm . Des vrilles sont souvent présentes et parfois associés à des organes pectinés et à des filaments en bois de cerf.

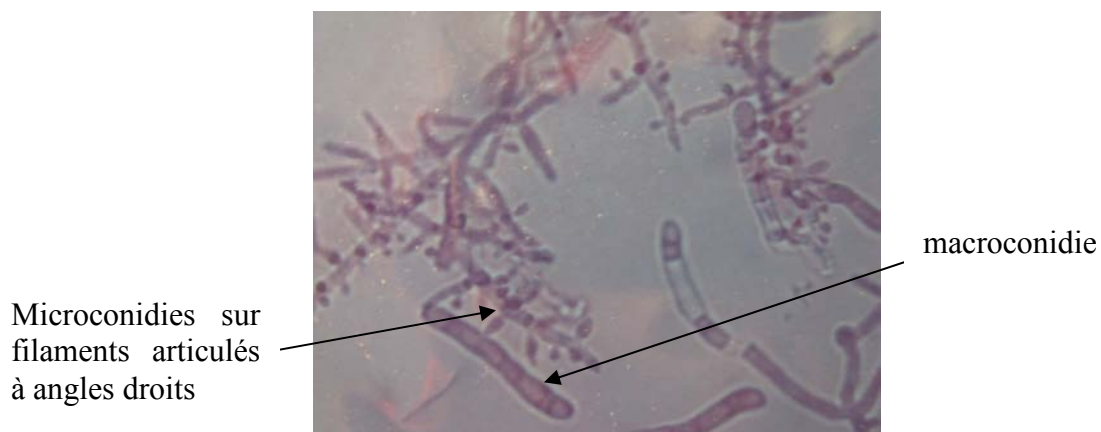


Figure 13 : Aspect microscopique d'une culture de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

III.3.1.3 Examens complémentaires

Lorsque les souches sont stériles, le repiquage sur un milieu pauvre favorise la sporulation.

Trichophyton mentagrophytes var. *mentagrophytes* n'a pas d'exigence vitaminique mais présente une activité uréasique [4 ; 5 ; 6].

III.3.2 *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*

Pour cette variété anthropophile qui n'attaque jamais les cheveux et les poils, l'examen direct des squames montre de filaments et des arthrospores [5 ; 6].

III.3.2.1 Examen macroscopique des cultures

La croissance des colonies sur milieu de Sabouraud avec ou sans actidione® est plus lente que la variété zoophile, les colonies de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* sur milieu de Sabouraud (avec ou sans Actidione®) poussent en moyenne en 8 jours.

Les colonies sont plates à contours arrondis ou finement frangés, poudreuses à grains blanc-crème, et parfois quelques plis radiés apparaissent en vieillissant.

L'envers est incolore ou pigmenté de façon très variable brun, jaune, rouge plus ou moins vif. Certaines souches pléomorphisent d'emblée et sont duveteuses et d'un blanc pur. D'autres sont poudreuses, couleur de pêche, riches en microconidies [5 ; 6].



Figure 14 : Aspect macroscopique de colonies de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* sur milieu de Sabouraud.

III.3.2.2 Examen microscopique des cultures

Il peut être identique à *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. Chez les souches duveteuses, les fructifications sont pauvres : les microconidies sont piriformes et disposées en acladium.



Figure 15 : Aspect microscopique de cultures de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

III.3.2.3 Examens complémentaires

Parfois les souches sont atypiques sur les plans macroscopique et microscopique, de forme étoilée, de couleur brun à rouille, et d'aspect glabre et stérile (présence de quelques filaments prenant un aspect en « bambou »), c'est la variété *nodulare*. Après repiquages successifs l'aspect caractéristique est observé.

Les souches pléomorphisées posent un problème de diagnostic différentiel avec *Trichophyton rubrum*, ce qui impose des études complémentaires tels que des repiquages.

Divers milieux peuvent alors être utilisés : le milieu de Takashio, le milieu de Baxter, le milieu PDA, le milieu de malt, le milieu de Borelli.

Comme la variété zoophile, la variété anthropophile n'a pas d'exigence vitaminique et présente une activité uréasique.

III.3.3 *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*

Trichophyton mentagrophytes var. *erinacei* est très proche de *T. mentagrophytes* zoophile. L'examen direct des squames retrouve des filaments cloisonnés et un parasitisme microïde des poils et des cheveux.

III.3.3.1 Examen macroscopique des cultures

La culture sur milieu de Sabouraud avec et sans Actidione® pousse rapidement en 6 à 8 jours. Les colonies sont finement poudreuses et étoilées, de couleur très blanche. Un pigment jaune orangé est présent au verso des colonies. Ces colonies pléomorphisent rapidement, elles deviennent duveteuses, blanches et le pigment jaune orangé disparaît.



Figure 16 : Aspect macroscopique des colonies de *T. mentagrophytes* var. *erinacei* sur milieu de Sabouraud.

III.3.3.2 Examen microscopique des cultures

De nombreuses microconidies piriformes sont présentes sur des filaments articulés à angles droits. Des macroconidies en massue peuvent se voir, mais on n'observe pas de vrilles.

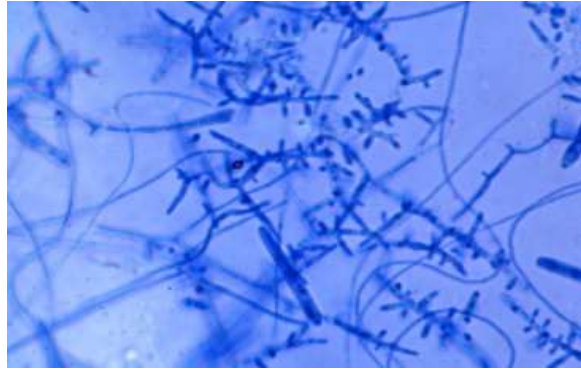


Figure 17 : Aspect microscopique d'une culture de *T. mentagrophytes* var. *erinacei*.
(Objectif x100)

III.3.3.3 Examens complémentaires

Des éléments irréguliers de grande taille, les propagules, peuvent être observées en profondeur de gélose sur milieu de malt.

Les souches françaises présentent une activité uréasique alors que les souches anglaises et néo-zélandaises sont uréases négatives.

Le temps de croissance, parfois long, des dermatophytes et la nécessité d'une identification précise des genres et espèces ont rapidement conduit à évaluer les techniques de biologie moléculaire dans le cadre du diagnostic et de la taxonomie.

IV APPLICATION DES OUTILS MOLÉCULAIRES AUX DERMATOPHYTES

Plusieurs méthodes moléculaires ont été développées pour pallier au manque de sensibilité et de spécificité des techniques d'identification classiques des dermatophytes basées sur les critères phénotypiques.

IV.1 Identification moléculaire des dermatophytes

Mise au point en 1985 par Kary Müllis, la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique d'amplification des acides nucléiques qui a révolutionné la biologie moléculaire. Elle est basée sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN matrice, permettant d'amplifier rapidement une quantité importante d'ADN à l'origine peu abondante. C'est un processus de répétition initié par l'hybridation à la séquence cible d'un oligonucléotide synthétique de 15 à 30 bases nommé « amorce ». L'enzyme ajoute successivement les nucléotides complémentaires de la séquence à amplifier et un ADN double brin est ainsi synthétisé.

Cette avancée technologique s'est imposée dans les laboratoires et a permis l'essor de nouvelles méthodes ayant un large champ d'applications scientifiques notamment en microbiologie.

IV.1.1 *PCR-RFLP*

Cette technique associe l'amplification génomique d'un gène cible par PCR à une digestion enzymatique aboutissant à un profil de fragments d'acides nucléiques qui, après migration électrophorétique en gel d'agarose ou de polyacrylamide peuvent être analysés directement ou hybridés avec des sondes spécifiques, permettant un diagnostic de genres et/ou d'espèces.

Dans les années 1990 plusieurs équipes ont tenté d'identifier des genres et espèces de dermatophytes par l'analyse du polymorphisme de longueur de fragments de restriction enzymatique en ciblant l'ADN mitochondrial [27 ; 28 ; 29 ; 30].

De Bièvre et al, en étudiant *T. rubrum*, en 1987, ont montré que cette espèce pouvait être classée en deux groupes distincts [27]. Cinq ans plus tard, l'équipe de Nishio parviendra aux mêmes conclusions [28].

Bien qu'à cette époque, Mochizuki et Kawasaki considèrent cette méthode déterminante pour l'identification des espèces, celle-ci se révélera être un outil d'identification peu discriminant [29 ; 30]. En effet, cette technique appliquée à *T. mentagrophytes* n'a pas permis de le distinguer moléculairement de *T. tonsurans* alors que ces deux espèces sont facilement différenciables sur leurs critères morphologiques [30].

L'utilisation de la cible mitochondriale ne se révélant pas si sensible qu'initialement espéré, des équipes se sont orientées vers l'analyse de l'ADN ribosomique, en étudiant les différentes régions de son unité de transcription, pour de la même façon réaliser des techniques de PCR-RFLP dans le but de détecter les dermatophytes et de les identifier, parfois même au sein des prélèvements mycologiques directement [31 ; 32 ; 33 ; 34 ; 35 ; 36]. Cette cible a montré une meilleure sensibilité que l'ADN mitochondrial ou que les méthodes conventionnelles telles que la culture, pour la détection et l'identification des dermatophytes.

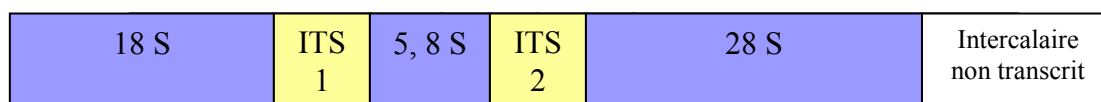


Figure 18 : Schéma de l'unité transcriptionnelle de l'ADN ribosomique des champignons.

A partir de cette cible ribosomique, d'autres techniques toujours basées sur la PCR ont été développées en quête d'une meilleure spécificité et sensibilité pour l'identification des dermatophytes.

IV.1.2 PCR nichée

Les techniques de PCR nichée utilisant deux couples d'amorces lors de deux étapes d'amplifications successives ont également été employées comme outils à visée diagnostique des dermatophytes.

L'équipe de Garg publie en 2007, une étude montrant une bonne sensibilité d'une technique de PCR nichée pan-dermatophytes ciblant les trois genres communs : *Trichophyton*, *Epidermophyton* et *Microsporum* et utilisant deux couples d'amorces ciblant la chitine synthase, chez des patients cliniquement suspects d'onychomycose [37].

En 2009, d'autres études plus fines utilisant le principe de PCR nichée et menées par des équipes japonaises ont été publiées. Ebihara et al. ont ciblé la séquence du gène de la sous-unité ribosomique 28S de l'ARN pour détecter la présence de dermatophytes ou d'autres moisissures impliquées dans les onychomycoses [38].

Uchida et al. ont réalisé dans un premier temps une PCR utilisant des amorces universelles spécifiques des dermatophytes, puis une PCR nichée utilisant deux couples d'amorces spécifiques de *T. mentagrophytes* et *T. rubrum* [39]. Ces techniques d'identification utilisées directement à partir de prélèvements se sont révélées être plus sensibles que la culture.

Cependant, ces techniques de PCR nichée occasionnent des contaminations importantes, elles sont donc très critiquables en diagnostic et ont été peu à peu abandonnées au profit de techniques plus modernes comme la PCR-ELISA mais surtout la PCR en temps réel.

IV.1.3 PCR-ELISA

Récemment, des techniques de PCR couplées aux méthodes immunoenzymatiques telles que l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) ont été développées pour permettre le diagnostic d'infections à dermatophytes.

Le kit Onychodiag® commercialisé par la société BioAdvance a fait l'objet d'une évaluation multicentrique montrant la performance de ce test pour le diagnostic des onychomycoses à dermatophytes. Cependant, s'il permet de détecter la présence de dermatophyte au sein même du prélèvement, ce kit a ses limites puisqu'il n'est pas capable de déterminer le genre ou l'espèce en cause [40 ; 41].

L'équipe allemande de Beifuss a également mis au point une technique PCR-ELISA permettant l'identification de cinq espèces de dermatophytes à partir de prélèvements cutanés et unguéaux : *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* [42]. Même si ce test offre une bonne sensibilité et spécificité vis-à-vis de ces espèces, il ne permet cependant pas d'identifier d'autres espèces de dermatophytes ou moisissures impliquées dans les épidermophyties ou onychomycoses. La PCR-ELISA reste une méthode technologiquement très lourde à mettre en place pour le diagnostic des dermatophytoses, et les kits proposés sur le marché ont un intérêt économique limité dans ce type de pathologie par rapport aux techniques d'identification classique telles que la culture.

IV.1.4 PCR en temps réel

En raison de sa rapidité, de son excellente précision et de sa capacité d'analyse à grande échelle, la PCR en temps réel est utilisée dans des domaines variés.

Aussi, plusieurs équipes ont mis en application cette technique pour la détection et l'identification de dermatophytes au sein de prélèvements [43 ; 44 ; 45 ; 46]. En 2007, Arabatzis et de Hoog ont développé une PCR temps réel multiplex recherchant les espèces du complexe *T. mentagrophytes* et *T. rubrum* ainsi que *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *M. canis* et *M. audouinii* [43]. Cette méthode d'identification sensible et spécifique permet un diagnostic des dermatophytoses en moins de 24 heures optimisant ainsi la prise en charge thérapeutique des patients. Dans une étude publiée en 2010, Bergmans et al. mettent également au point une technique de PCR en temps réel pour la détection et l'identification de 11 espèces de dermatophytes [44 ; 45].

Même si ces méthodes permettent une meilleure détection et identification des dermatophytes au sein des prélèvements par rapport à la culture et dans des délais très courts, elles restent malgré tout coûteuses à mettre en place en laboratoire par rapport aux méthodes classiques.

Récemment la société Bio-evolution (anciennement Bioadvance) a commercialisé un kit de PCR en temps réel pour la détection des dermatophytes sans toutefois proposer l'identification des champignons au niveau de l'espèce.

IV.1.5 PCR suivie de séquençage

Le séquençage d'ADN cible consiste à mettre à jour le code génétique d'un gène ou d'une portion de gène ou même d'un génome entier en déterminant l'enchaînement de nucléotides de cet ADN, après amplification d'un fragment d'ADN défini par PCR. Cette technique utilise les connaissances acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

De part sa précision, le séquençage est un excellent outil tant pour le diagnostic que pour des études épidémiologiques et phylogénétiques. Les inconvénients majeurs sont le coût élevé et le problème du choix percutant des gènes à séquencer en fonction du pouvoir discriminant désiré.

Différents gènes cibles ont été séquencés, notamment le gène codant pour la chitine syntase par l'équipe de Kano en 2000 [47] ; le séquençage de ce gène a permis en outre à l'équipe tunisienne de Neji d'identifier leur première souche de *Microsporum ferrugineum*, en 2010 [48].

En 2002, Ninet et al. ont utilisé un kit commercial permettant le séquençage d'une portion du gène codant la sous-unité 28S de l'ARNr pour l'identification rapide de certaines espèces de dermatophytes notamment *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* [49].

En parallèle, plusieurs équipes se sont intéressées au séquençage des gènes codant les régions ITS de l'ARN ribosomique pour l'identification des dermatophytes. En 2008 les équipes japonaise de Li et française de Bouchara sont parvenues à identifier 17 espèces de dermatophytes en utilisant cette technique [50].

La difficulté des méthodes d'identification par séquençage réside dans le fait d'avoir une base de données suffisamment importante pour pouvoir comparer les séquences et permettre une identification précise. Aujourd'hui le « gold standard » pour l'identification d'une souche atypique de dermatophyte en biologie moléculaire est le séquençage de la région ITS [41 ; 51 ; 52 ; 53 ; 54 ; 55]. C'est le seul marqueur pour lequel il existe une base de données assez conséquente pour l'identification des dermatophytes.

Là encore d'un point de vue économique ces techniques nécessitent des moyens financiers importants et ne présentent qu'un intérêt limité pour les laboratoires ayant une bonne expérience dans les méthodes conventionnelles d'identification en mycologie médicale.

IV.2 Epidémiologie moléculaire des dermatophytes

L'épidémiologie moléculaire appliquée aux dermatophytes consiste à utiliser les différentes techniques basées sur la variabilité de l'ADN pour le typage des souches. Le but étant de différencier des isolats provenant d'origines distinctes ou d'établir un lien de parenté entre des souches.

Différentes méthodes moléculaires à visée épidémiologique et phylogénétique ont été exploitées telles que les techniques de PCR aléatoires et le séquençage.

IV.2.1 PCR aléatoires

L'AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR, PCR avec amorces aléatoires), la PCR fingerprinting (ou DAF : DNA Amplification Fingerprinting, empreintes génétiques de produits de PCR), et la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, ADN polymorphe amplifié au hasard) sont des techniques voisines fondées sur l'amplification aléatoire de séquences d'ADN.

La technique RAPD basée sur le principe de la PCR utilise une amorce courte (généralement 10 bases) pour amplifier des fragments d'ADN. N'ayant pas d'ADN cible spécifique, chaque amorce s'hybride alors à l'ADN matrice au hasard. De ce fait, on ne connaît pas la nature des produits obtenus qui varient en longueur et en séquence.

Le DAF et l'AP-PCR sont des technologies alternatives des RAPD, plus complexes qui utilisent des concentrations plus élevées en amorces. Lors du développement de ces méthodes, aucune règle n'est établie pour le choix des amorces et de nombreux essais sont nécessaires pour obtenir des résultats reproductibles et fiables.

Plusieurs équipes ont proposé et testé différentes amorces aléatoires pour l'identification et le typage des dermatophytes.

IV.2.1.1 RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

Parmi les différentes méthodes de RAPD évaluées pour l'identification et l'épidémiologie des dermatophytes, citons les travaux de deux équipes françaises :

En 1998, Kac et ses collaborateurs ont sélectionné deux amorces A04 (5'-AATCGGGCTG-3') et A06 (5'-GGTCCCTGAC-3') permettant de générer des profils spécifiques de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et ainsi de confirmer l'identification morphologique établie pour 23 espèces et d'identifier cinq isolats atypiques ou pléomorphisés [56 ; 57].

En 1999, l'équipe de Dunand, a étudié 55 souches appartenant aux espèces *Microsporum* et au genre *Arthroderma* par la technique RAPD et a testé neuf amorces : F27, OPAA11, TR1, M13, OPD18, A4, A7, A3, A8. Seules certaines amorces (OPD18) ont permis de mettre en évidence un profil type pour chaque espèce de *Microsporum*, permettant leur identification [58]. Cependant, les profils de *M. audouinii* et de *M. langeronii* ont montré des similitudes quelle que soit l'amorce utilisée ce qui a permis de révéler l'existence d'un seul variant phénotypique : *Microsporum audouinii* var. *langeroni* [58].

IV.2.1.2 AP-PCR

En 1997, en utilisant deux amorces (OPAA11) et (OPD18) appliquée à l'AP-PCR, l'équipe australienne menée par Liu, a obtenu des profils d'amplification spécifiques de 20 espèces de dermatophytes mais les variétés anthropophiles et zoophiles de *T. mentagrophytes* (*T. m.* var. *interdigitale* et *T. m.* var. *mentagrophytes*) n'ont pas pu être différenciées [59]. Deux nouvelles amorces (OPAA17) et (OPU15), combinées aux deux précédentes, ont permis d'identifier 23 espèces de dermatophytes et de distinguer *T. m.* var. *interdigitale* de *T. m.* var. *mentagrophytes* [60 ; 61].

En Ecosse, Howell qui s'est également intéressé à l'identification moléculaire des dermatophytes par RAPD est parvenu aux mêmes résultats que Liu, distinguant *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* avec deux des 26 amorces testées : (OPA13) et (HLWL85). Cependant leurs profils d'amplification sont très proches et ne diffèrent que par une seule bande [62].

IV.2.1.3 PCR fingerprinting

En ce qui concerne les techniques de PCR fingerprinting, l'équipe de Gräser, en utilisant des amorces non spécifiques telles que (AC)10, AP3, (GTC)5, a mis en évidence des profils d'amplification uniques et caractéristiques pour 17 espèces de dermatophytes [63]. Ils suggèrent que cette combinaison d'amorces pourrait être utilisée pour l'identification d'isolats cliniques même s'ils n'ont pas de caractéristiques phénotypiques classiques. De plus, parmi 6 variants de *T. mentagrophytes* (*T. m. var. mentagrophytes*, *T. m. var. erinacei*, *T.m. var. granulosum*, *T. m. var. nodulare*, *T. m. var. quinckeanum*, *T. m. var. interdigitale*) quatre profils d'amplification ont pu être clairement distingués. Ainsi, des signatures typiques ont été observées pour *T. mentagrophytes var. granulosum* et *T. mentagrophytes var. erinacei*. Cependant, aucune des amorces utilisées ne différencie *T. mentagrophytes var. quinckeanum* de *T. mentagrophytes var. mentagrophytes* et *T.mentagrophytes var. interdigitale* de *T. mentagrophytes var. nodulare*. Ces variétés ayant des caractéristiques morphologiques assez proches il est parfois également difficile de les distinguer d'un point de vue cultural [63].

Ces chercheurs ont également remarqué des similitudes entre les profils d'amplification de certaines espèces, notamment pour *T. verrucosum* et *T. mentagrophytes var. erinacei* qui sont toutes deux des espèces zoophiles et uréase positive, alors que le réservoir et les caractéristiques phénotypiques de ces deux espèces sont très différents.

L'équipe italienne de Faggi a également décrit une technique de PCR fingerprinting utilisant une seule amorce de séquence répétée : (GACA) 4 aboutissant à des profils caractéristiques pour *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton ajelloi* et *Epidermophyton floccosum* et détectant 3 profils distincts selon les variétés *granulosum*, *laticolor* et *radians* au sein de l'espèce *T. mentagrophytes* [64 ; 65].

Toutes ces études moléculaires basées sur l'amplification aléatoire ont permis de constater que lorsque deux espèces sont proches sur le plan éco-épidémiologique et *a fortiori* génétique, peu d'amorces sont capables de les distinguer, une sélection doit donc se faire parmi un nombre important d'amorces pour n'en retenir que quelques unes permettant la distinction très fine de profils. En effet, quelle que soit l'amorce utilisée, les profils divergent d'autant plus que les espèces sont éloignées comme c'est le cas pour *M. persicolor* et *M. langeronii* [56 ; 64 ; 66].

Malgré la rapidité et la flexibilité de ces PCR aléatoires, la mise au point de ces techniques est souvent délicate et fastidieuse par manque de standardisation et elles sont donc peu reproductibles et de nombreuses amorces doivent être testées avant d'obtenir des profils informatifs.

IV.2.2 PCR et séquençage

Le complexe *Trichophyton mentagrophytes* a été largement étudié ces dernières années à l'aide du séquençage de différents gènes cibles dans une optique de différenciation des variants étroitement liés d'un point de vue taxonomique.

IV.2.2.1 Utilisation de marqueurs moléculaires pour la classification phylogénique du complexe *T. mentagrophytes*

Les espèces inscrites dans le complexe anthrozoophile *T. mentagrophytes* ont d'abord été définies sur la base des caractéristiques morphologiques ainsi que grâce aux tests d'accouplement [67]. Plus récemment, elles ont été étudiées en utilisant des méthodes moléculaires, notamment le séquençage de gènes cibles, révélant une organisation plus complexe que prévue avec la mise en lumière des relations phylogéniques entre les espèces et l'identification de nouvelles espèces.

La force ou la robustesse d'un arbre phylogénique permettant la distinction d'espèces voisines dépend surtout de la qualité informative des données, c'est à dire des séquences comparées de marqueurs choisis à bon escient et il est nécessaire de comparer plusieurs généalogies de gènes si l'on veut aboutir à des résultats concluants.

Pour ces études de phylogénie moléculaire, les gènes utilisés pour sont le plus souvent les nucléotides des régions ITS1 et 2 de l'ADN ribosomique, mais d'autres gènes codant des protéines telles que la chitine synthase, la calmoduline, l'actine, la bêta-tubuline ont aussi été utilisés [68 ; 69 ; 70 ; 71].

Makimura et al. ont été les premiers à étudier les séquences de la région ITS1 (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomique des dermatophytes, notamment des espèces et variants du complexe *T. mentagrophytes*, en 1998 [69 ; 72].

A l'aide du couple d'amorces 18SF1 (5'-AGGTTTCCGTAGGTGAACCT-3') et 58SR1 (5'-TTCGCTGCGTTCTTCATCGA-3'), 13 souches standards référencées ont été utilisées dans cette étude dont deux souches d'*Arthroderma vanbreuseghemii*, cinq d'*Arthroderma simii*, deux d'*Arthroderma benhamiae* de race americano-européenne, deux d'*Arthroderma benhamiae* de race africaine, deux de *T. mentagrophytes* var *erinacei*.

Des souches de *T. mentagrophytes* et *T. rubrum* provenant de prélèvements effectués chez l'homme et l'animal ont également été analysées. Trois groupes distincts ont ainsi pu être individualisés : un premier groupe incluant les souches d'*Arthroderma vanbreuseghemii* et celles de *T. mentagrophytes* d'origine animale ou humaine ; un deuxième groupe regroupant *Arthroderma benhamiae* et *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*, enfin un troisième groupe comportant les séquences des souches d'*Arthroderma simii*. Les variétés zoophiles et anthropophiles de *Trichophyton mentagrophytes* et *Arthroderma vanbreuseghemii* semblent partager une origine génétique commune, de même que *Arthroderma benhamiae* et *T. mentagrophytes* var. *erinacei*.

Ainsi, ces chercheurs ont montré que l'information d'une séquence de petite taille (100 à 400pb) mais suffisamment polymorphe, permet d'apporter des éléments informatifs intéressants concernant la phylogénie du complexe *T. mentagrophytes* et l'identification des espèces qui le composent.

Plus récemment, Heidemann et al. ont complété cette étude en précisant le lien entre la forme anamorphe de *T. mentagrophytes* var. *erinacei* et les formes parfaites africaines de *Arthroderma benhamiae* en se basant également sur le séquençage de la région ITS de l'ADNr du complexe *T. mentagrophytes* [73].

Parmi les études utilisant le séquençage de gènes codant des protéines, Kano et al, en 1998, ciblent la chitine synthase 1(CHS1) pour analyser les relations phylogénétiques du complexe *T. mentagrophytes* [47]. Des amorces spécifiques du gène de la CHS1 ont alors été dessinées pour chaque forme téléomorphe de référence : les amorces AB1 (5'-CTA TGC ACA ATG AGG ACG AG-3') et AB2 (5'-GTT AAA CAG TTT CTT GCC ATG-3') pour *Arthroderma benhamiae* ; les amorces AS1 (5'-CAA TGT ATA ACG AAG ATG AG-3' et AS2 (5'-CTG CGT CGA GGA GAA CAC AA-3') pour *A. simii* et les amorces AV1 (5'-CGA TGT ATA ATG AGG ACG AG-3') et AV2 (5'-CTC TTT AAG ACA GAA GAG GAG-3') pour *A. vanbreuseghemii*.

Des profils distincts ont ainsi été mis en évidence pour ces trois espèces, permettant d'établir un lien entre les formes asexuées des variétés zoophiles et anthropophiles de *Trichophyton mentagrophytes* et la forme sexuée *Arthroderma vanbreuseghemii*, comme l'avait déjà montré Makimura avec le séquençage de la région ITS.

En 2007, l'équipe française de Fréalle, a évalué l'apport du gène de la superoxyde dismutase du manganèse : MnSOD pour la phylogénie du complexe *T. mentagrophytes* [74]. Conformément aux résultats des études précédentes, Fréalle et al. soulignent la relation étroite entre *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *Arthroderma vanbreuseghemii* et celle liant *T. mentagrophytes* var. *erinacei* et *Arthroderma benhamiae*. De plus cette équipe montre que ce gène n'est pas une cible plus discriminante que le gène codant pour les régions ITS.

V CARACTERISATION D'UN NOUVEAU VARIANT TRANSMIS PAR LE COCHON D'INDE AU SEIN DU COMPLEXE *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES* : *T. MENTAGROPHYTES* VAR. *PORCELLAE*

V.1 Objectif

Parmi les dermatophytes zoophiles appartenant au complexe *T. mentagrophytes*, certains sont responsables d'épidermophyties de la peau glabre chez l'homme, notamment *T. mentagrophytes* var. *erinacei*. Ce dernier habituellement retrouvé de façon naturelle chez le hérisson et rarement isolé au laboratoire, a été identifié pour la première fois en Nouvelle Zélande en 1963. Depuis 2008, plusieurs patients ont présenté des lésions attribuées à un dermatophyte proche de cette espèce dans la région de Nancy et qui serait transmis par le cochon d'Inde. Cette étude a pour but de caractériser ce nouveau variant d'un point de vue phénotypique et génotypique. Lors d'une précédente étude publiée en juillet 2010, le docteur N. Contet-Audonneau, MCU-PH au laboratoire de mycologie du CHU de Nancy a suggéré de nommer ce nouveau variant *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae* [75].

V.2 Matériels et méthodes

V.2.1 Sélection des souches

Pour cette étude 27 souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* ont été isolées entre avril 2009 et août 2010, dont 9 provenant de prélèvements réalisés sur des cochons d'Inde, une à partir de la cage d'un cochon d'Inde, et 17 issues d'épidermophyties humaines. Parmi les 17 patients atteints, 12 d'entre eux sont originaires de Lorraine. Huit patients lorrains sont venus au laboratoire de mycologie du CHU de Nancy afin d'effectuer un prélèvement mycologique ; les autres prélèvements ont été réalisés par des dermatologues et envoyés à Nancy pour en réaliser le diagnostic. Cinq patients ont été prélevés dans d'autres régions : les patients GIG et MAZ à l'hôpital Saint Louis à Paris mais tous deux originaires de l'Yonne, les patientes CUT, GAU et DUF ont été prélevées dans des laboratoires privés respectivement situés en Marne, Haute-Marne et Pas de Calais. Le sexe ratio (M/F) est de 0, 3.

identification	Sexe	Date de naissance	Date du prélèvement	Localisation des lésions	Département d'origine
SCH	F	19/01/1997	28/04/2010	Corps et visage	54
BRU	M	20/05/1983	02/02/2010	Avant-bras droit	54
CHE	F	29/09/1999	26/04/2010	Cuisse droite	54
LA	F	15/06/2002	06/04/2009	Poignet droit	54
JAC	F	08/02/2007	09/04/2009	Menton	54
PER	F	06/05/1997	02/09/2009	Joue droite	54
MAN	M	23/08/1977	08/06/2009	Kérion de la moustache	54
SET	M	28/04/2001	09/03/2010	Dos	57
ATH	F	17/07/2005	04/05/2010	joues	54
ATO	NC*	NC	NC	NC	54
CUT	F	22/07/1986	31/05/2010	Paume main gauche	51
HAV	F	09/09/1970	27/05/2010	Abdomen et pubis	54
GAU	F	02/04/1980	27/07/2010	Visage	52
DUF	F	21/09/2000	27/07/2010	Dos	62
URI	F	04/09/1985	16/07/2010	Nuque, dos	54
GIG	F	30/12/2000	18/08/2010	Corps	89
MAZ	M	05/03 /1997	18/08/2010	Cou	89

Tableau VIII : Caractéristiques épidémiologiques des patients inclus dans l'étude.

(* NC : non communiqué)

Lorsque les prélèvements des patients ont été réalisés au laboratoire, un recueil de données sous forme de questionnaire a été réalisé auprès de chacun d'entre eux qui ont tous mentionné un contact avec un cochon d'Inde. (*Annexe 1 : Fiche renseignements cliniques patients*)

Ces patients présentent des lésions touchant les parties découvertes du corps. Il s'agit majoritairement d'atteintes de la peau glabre, un cas de kérion au niveau de la moustache a été recensé. Pour les patients ayant consulté au laboratoire, nous avons observé de grandes plaques érythémato-squameuses extensives, délimitées de manière irrégulière par un bourrelet inflammatoire.



Figure 19 : Epidermophytie du menton chez la patiente SCH.



Figure 20 : Epidermophytie de l'abdomen chez la patiente HAV.



Figure 21 : Epidermophytie de la nuque et du dos chez la patiente URI.

En ce qui concerne les cochons d'Inde, 8 souches proviennent d'échantillons recueillis dans des animaleries de la région, un prélèvement a été réalisé sur le cochon d'Inde appartenant à une patiente de l'étude (URI), et un autre à partir de la cage de l'animal. Les 9 cochons d'Inde prélevés étaient cliniquement sains.



Figure 22 : Prélèvement d'un cochon d'Inde.

Les squames ont été raclées à l'aide d'un vaccinostyle en périphérie des lésions et mises dans une boîte de Pétri stérile pour réaliser l'examen direct après éclaircissement au noir chlorazole et la mise en culture. Les prélèvements des cochons d'Inde ont été réalisés à l'aide de compresses stériles par frottage vif du pelage, plus particulièrement au niveau du museau et directementensemencés pour la culture mycologique.

Pour l'étude moléculaire de ce nouveau variant du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, nous avons également utilisé trois souches de *T. mentagrophytes* zoophiles (variété *mentagrophytes*) et quatre souches de *T. mentagrophytes* anthropophiles (variété *interdigitale*) isolées à partir de prélèvements effectués chez des patients et identifiées grâce aux critères morphologiques.

Parmi l'ensemble de ces souches, 8 ont été envoyées au Centre de référence hollandais CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures) pour être référencées et conservées.

V.2.2 Identification morphologique

V.2.2.1 Conditions de culture

Chaque prélèvement issu de l'homme a été mis en culture sur des milieux dits d'isolement classique : Sabouraud-Dextrose-Agar et Sabouraud-Cycloheximide (0.4%) -Dextrose-Agar.

Les squames ont été déposées en deux à trois points sur la pente de la gélose en tube.

Pour les prélèvements recueillis à partir des animaux, la technique de mise en culture consiste à appuyer fortement la compresse sur milieu de Sabouraud-Cycloheximide (1%)-Dextrose-Agar coulé cette fois en boîte. (*Annexe 2 : Composition des milieux d'isolement*)

Les cultures ont été incubées à 27°C dans des étuves durant 8 à 30 jours de façon à permettre une croissance suffisante pour l'identification morphologique des champignons.

V.2.2.2 Techniques d'identification

Les cultures ont été examinées attentivement chaque semaine et en cas de pousse, les colonies ont été analysées macroscopiquement et microscopiquement.

Afin de favoriser la fructification des souches, indispensable à l'identification précise des genres et espèces de dermatophytes, d'autres milieux de culture ont été nécessaires tels que le milieu PDA (Pomme de terre – Dextrose – Agar). Les colonies ont alors été repiquées et incubées à 27°C sur ce dernier milieu.

L'identification morphologique macroscopique des cultures a porté sur l'aspect, la couleur, la consistance des colonies. L'examen microscopique des cultures a été fait à partir d'un morceau de ruban adhésif appliqué à la surface de la colonie (drapeau de Roth), puis déposé entre lame et lamelle, dans le lactophénol. L'aspect des filaments mycéliens a alors été étudié ainsi que l'abondance et la morphologie des microconidies, la présence et la morphologie des macroconidies.

L'activité uréasique a également été testée sur milieu à l'urée Christensen et l'hydrolyse de la caséine a été observée sur milieu de Bromocrésol pourpre caséine (BCP), tous deux incubés à 27°C. Ces deux milieux permettent un diagnostic différentiel avec les autres dermatophytes notamment *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, ce dernier pouvant présenter ou non une activité uréasique selon son origine.

V.2.2.3 Mise en évidence de la forme parfaite

La forme parfaite de certaines souches a été mise en évidence selon la méthode de Takashio. Nous avons confronté quatre souches : LA, JAC, MAN et PER avec des souches de référence d'*Arthroderma benhamiae* africaines de polarité positive et négative (RV30 000+ et RV30 000-) provenant de l'institut de médecine tropicale d'Anvers et conservées à l'Institut Scientifique de Santé Publique à Bruxelles en Belgique.

Les souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* ont alors été ensemencées avec des souches de référence d'*Arthroderma benhamiae* africaines de polarité positive et négative afin d'observer au point de jonction des deux mycéliums l'apparition d'une double rangée de cléistothèces témoins du succès de la fécondation réciproque.

V.2.3 **Caractérisation moléculaire**

L'analyse moléculaire des dermatophytes a nécessité l'amplification de 4 gènes (actine, bêta tubuline, chitine synthase et ITS) par une technique de PCR classique, réalisée à la faculté de Médecine de Nancy, suivie d'un séquençage effectué par la société Genoscreen (Lille). Préalablement à ces étapes, les ADN ont été extraits manuellement.

V.2.3.1 Extraction de l'ADN

Les ADN génomiques fongiques ont été extraits à partir de cultures de champignons réalisées sur milieux de Sabouraud sans antibiotique à l'aide du kit commercial « High Pure PCR Template Preparation » (Roche Diagnostics, France) (*Annexe 6 : Schéma du protocole d'extraction des dermatophytes*).

- Un aliquot de culture est prélevé et incubé dans 200 µl de tampon de lyse cellulaire à 37°C pendant 30 minutes
- 40 µl de protéinase K sont ajoutés ce qui permet la lyse des parois fongiques et la digestion des protéines libérant ainsi l'ADN.
- Ce mélange est incubé 10 minutes dans un thermobloc à 72°C
- Ensuite 100 µl d'isopropanol sont ajoutés avant une brève étape de centrifugation.
- La totalité du mélange est transféré sur une colonne et centrifugé une minute à 10000 rotations par minute (rpm). Les acides nucléiques sont ainsi retenus par les fibres du filtre ultra pur de la colonne.
- Les acides nucléiques retenus sont lavés avec un tampon (500 µl) permettant l'élimination des contaminants inhibiteurs de PCR et le mélange est centrifugé 1 min à 10 000 rpm.
- L'étape de lavage est répétée afin d'enlever toutes les impuretés
- Enfin, l'ADN est élué grâce au tampon d'élution (100 µl) préalablement préchauffé à 72°C.

Les ADN extraits ont été utilisés immédiatement ou conservés à -20°C pour une utilisation ultérieure.

V.2.3.2 Amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne

V.2.3.2.1 Principe

Les ADN extraits ont été ensuite amplifiés par PCR classique en vue d'une analyse ultérieure de l'information génétique par séquençage.

Les acteurs de la PCR :

- L'ADN matrice, contenant le fragment cible à amplifier
- Les amorces : sens et anti-sens. Elles délimitent la séquence à amplifier en s'hybridant spécifiquement à la cible ; l'une sur un premier brin, l'autre sur le brin complémentaire. Elles ne doivent pas s'apparier entre elles ; la distance qui les éloigne détermine la taille de l'amplicon.
- L'enzyme : la Taq polymérase, thermorésistante et extraite de la bactérie *Thermus aquaticus* ; elle n'est pas dégradée suite à des passages successifs à 95°C
- Le magnésium (Mg^{2+}) : apporté sous forme de $MgCl_2$, est un cation indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et à l'incorporation des nucléotides.
- Les nucléotides dNTP (désoxyNucléotides-Tri-Phosphate) : dATP, dCTP, dGTP et dTTP. Ils constituent les outils de travail de la polymérase.

La réaction d'amplification :

L'amplification par PCR nécessite des cycles de variation rapide de températures qui ont lieu dans un appareil programmable nommé thermocycleur. Nous avons utilisé le MyIQ2 commercialisé par la société Bio-Rad (Marne la Coquette, France).

La répétition de ces cycles d'amplification comprend 3 étapes :

1^{ère} étape : La dénaturation thermique ($\approx 94^{\circ}\text{C}$)

Les liaisons hydrogènes qui assurent la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues par la chaleur. L'ADN passe alors sous forme de simples brins qui serviront de matrice au cours des cycles d'amplification.

2^e étape : L'hybridation des amorces

La température doit être abaissée à une valeur légèrement inférieure au T_m des amorces pour qu'elles se lient à leur séquence nucléique complémentaire et déterminent ainsi la taille du fragment à amplifier.

3^e étape : L'extension des amorces

La Taq polymérase allonge les amorces hybridées à l'ADN en y incorporant les dNTPs complémentaires de la séquence de la matrice simple brin. La synthèse s'effectue dans le sens $5' \rightarrow 3'$ à 72°C (température optimale). Le cycle terminé, on obtient 2 copies de la séquence d'ADN d'intérêt.

Un nouveau cycle de réplication débute ensuite. Le nombre de copies de la séquence choisie est théoriquement doublé à chaque réplication, suivant une augmentation exponentielle. Ainsi, le nombre de copies au bout de n cycles devrait être 2^n . En pratique, ce chiffre n'est pas atteint car le rendement à chaque cycle n'est pas de 100%.

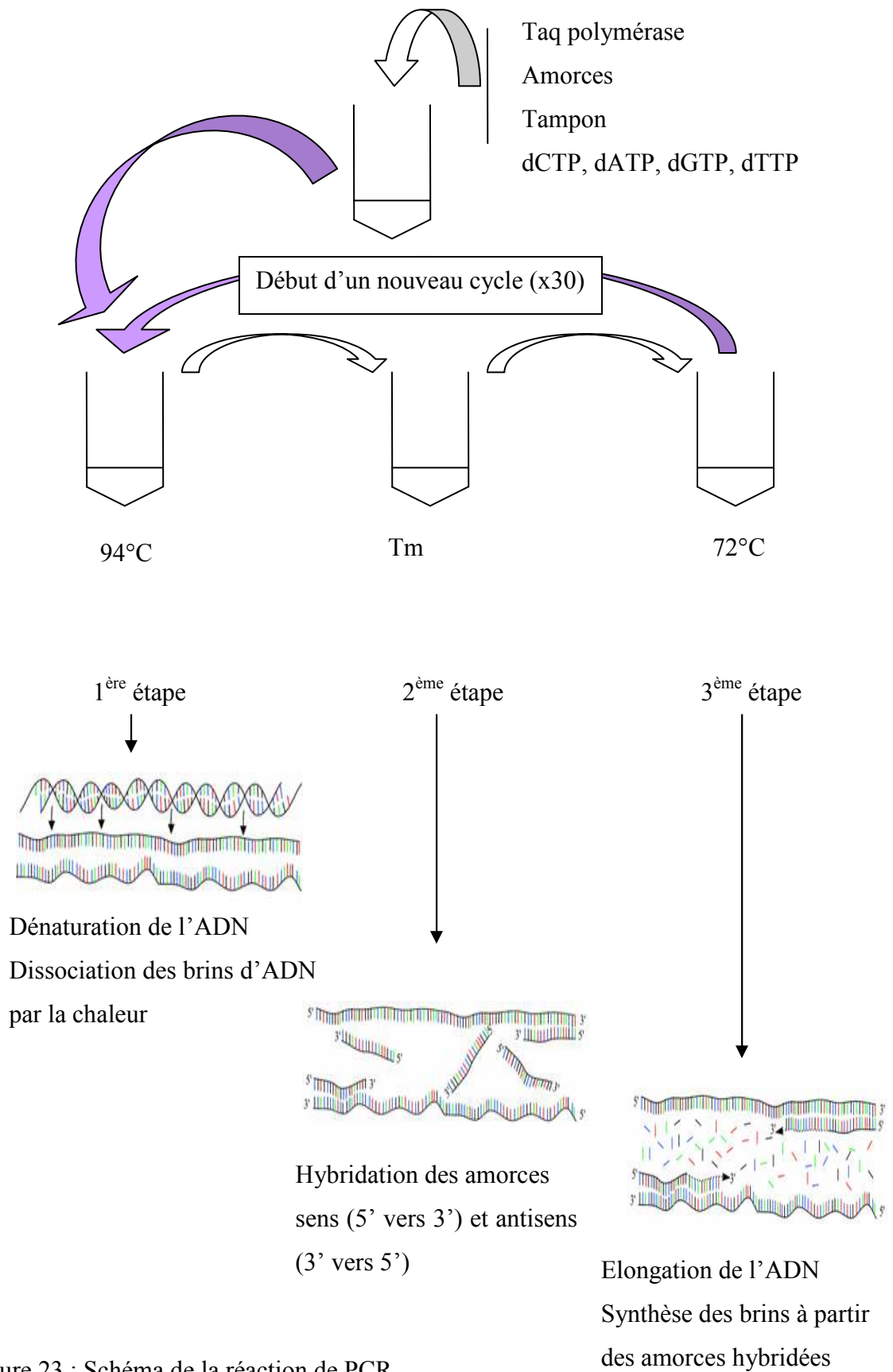


Figure 23 : Schéma de la réaction de PCR.

V.2.3.2.2 Choix des gènes cibles

D'après la revue de la littérature, quatre gènes cibles ont été sélectionnés comme étant les plus informatifs pour mener une étude phylogénétique du complexe *Trichophyton mentagrophytes*. Le tableau ci-dessous précise les caractéristiques des amorces utilisées.

Gene cible	amorce	Température d'hybridation	Séquences 5'-3'	Taille du fragment amplifié (pb)	références
ITS	ITS1 ITS4	51°C	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCCTCCGCTTATTGATATGC	600	White et al 1990 [76] Fréalte et al 2007 [75]
Actine	512F 783R	55°C	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	260	Carbone et Kohn, Mycologia 91(3):553-556, 1999 [77]
Chitine Synthase	Chs679F Chs354R	55°C	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	300	Kano R. et al. Curr. Microbiol. 37 (4), 236-239 (1998) [78]
béta tubuline	Bt2a Bt2b	58°C	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	500	Glass N.L., Donaldson G.C. 1995. Microbiol., 61, p.1323-1330. [79]

Tableau IX : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes cibles.

V.2.3.2.3 Conditions expérimentales

La préparation du mélange réactionnel ou « mix » contenant tous les éléments nécessaires à la réaction de polymérisation en chaîne est réalisée suivant le protocole suivant :

	Volume en μl (pour 1 échantillon)
Eau	29.1
MgCl ₂ (25mM)	1.5
Tampon (10x)	5
dNTP (2mM)	5
amorce Sens (10 pm/ μl)	2
amorce Antisens (10 pm/ μl)	2
Taq (5U/ μl) (Eurogentec)	0.4 (2U/50 μl)
Volume total	45

Tableau X : Réalisation du mélange réactionnel pour PCR

Ainsi, 45 μl du mix ont été répartis dans des microtubes de 0,2 ml, auxquels ont été ajoutés 5 μl d'ADN extraits. Lors de chaque réaction, un témoin négatif sans ADN mais avec de l'eau est ajouté ainsi qu'un témoin positif pour lequel on utilise un ADN déjà validé dans une précédente amplification. Le témoin négatif a pour but de contrôler l'absence de contamination lors de la réaction d'amplification. Le témoin positif sert à vérifier la bonne réalisation de la réaction.

La réaction d'amplification a ensuite lieu dans un thermocycleur MyIQ2 (Biorad, Marne La Coquette, France) d'après le programme suivant comprenant une phase initiale de dénaturation de 94°C durant deux minutes, suivie de 35 cycles de trois étapes : une dénaturation de 45 secondes à 94°C puis l'hybridation durant 30 secondes à une température définie selon le couple d'amorces utilisé (tableau IX), puis une phase d'élongation de 2 minutes à 72°C. Enfin une étape d'élongation terminale de 7 minutes à 72°C est réalisée et les produits d'amplification sont ensuite maintenus à température ambiante dans l'appareil avant révélation.

Une fois la PCR terminée, l'électrophorèse sur gel d'agarose permet de vérifier que les échantillons d'ADN ont bien été amplifiés, qu'il n'y a pas de contamination et que les produits sont de taille attendue.

V.2.3.3 Révélation électrophorétique

L'électrophorèse permet la séparation d'un mélange de molécules chargées électriquement en fonction de leurs tailles et de leurs charges. La migration se fait sous l'influence d'un courant électrique. L'ADN est chargé négativement de part ses groupements phosphates, et va donc migrer vers l'anode (pôle positif). La vitesse de migration de l'ADN n'est fonction que de la taille du fragment pour l'ADN linéaire.

Le gel d'agarose est constitué de petites mailles (réticulées) ce qui entraîne un phénomène de tamisage : les petites molécules migreront plus rapidement et plus facilement que les grosses molécules qui seront ralenties. Plus le gel d'agarose est concentré plus la vitesse de migration des fragments volumineux est réduite.

V.2.3.3.1 Préparation du gel d'agarose

L'agarose (extrait de l'agar), se présente sous forme d'une poudre blanche qui se dissocie dans un tampon porté à ébullition.

Pour cette étude la concentration en agarose utilisée est de 1,5 % soit 1.5 g d'agarose mélangé avec 100 mL de tampon TBE 1X. Après dissolution de l'agarose dans le tampon, et refroidissement du mélange, 10 µl d'un produit intercalant sont ajoutés au mélange : le GelRedtm Nucleic Acid Gel Stain 10000X (Interchim, Montluçon, France). Ce réactif s'intercale entre les brins d'ADN double brin et permet de détecter les produits issus de l'amplification lors de la lecture du gel en provoquant une émission de fluorescence sous la lampe UV. Le gel est coulé sur un support à plat.

Avant solidification, les peignes sont ajoutés pour former les puits dans lesquels seront déposés les produits à migrer.

Après solidification du gel, les peignes sont retirés et le gel est placé dans une cuve remplie de TBE 1X et couplée à un générateur.

V.2.3.3.2 Préparation des échantillons et migration

Cinq microlitres des produits de PCR amplifiés sont mélangés avec 2 μL d'un tampon de charge, le Gel Loading Buffer® (Invitrogen, France). Le sucrose contenu dans ce réactif va alourdir le produit PCR amplifié qui descendra au fond des puits. Le bleu de bromophénol présent dans le colorant va permettre de suivre l'évolution de la migration (front de migration).

Afin de pouvoir connaître la taille en paires de bases (pb) des échantillons migrés, 5 μL d'un marqueur de taille sont déposés dans un puits. Ce produit est un mélange de fragments d'ADN de tailles connues. Ici il s'agit du SmartLadder® (Eurogentec, Angers, France) étalonné de 100 à 1000 pb.

Une fois les échantillons déposés dans les puits, la migration est programmée à 120 V et dure environ 40 minutes.

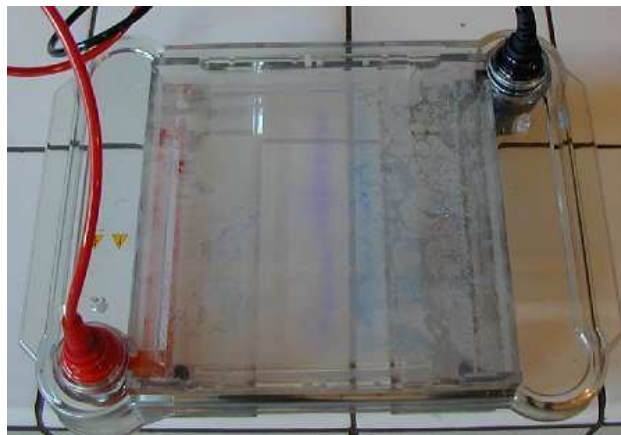


Figure 24 : Migration électrophorétique (<http://www.snv.jussieu.fr>)

V.2.3.3.3 Lecture et interprétation des résultats

La détection des bandes invisibles à l'œil nu et le traitement des images se fait grâce à un analyseur à ultraviolets, le GelDoc™ XR (Biorad, Marne La Coquette, France) regroupant une lampe UV couplée avec un objectif, le dispositif étant relié à un ordinateur. La présence ou l'absence de bandes attesteront de la réussite ou non de la PCR.

Les tailles des bandes obtenues pour les échantillons sont comparées avec le marqueur de taille.

V.2.3.4 Séquençage

Rappelons que le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné.

Pour cette étape, les produits de PCR ont été directement envoyés à la société de biotechnologies GENOSCREEN (Lille), de façon à effectuer le séquençage en double sens avec les deux amorces préalablement utilisées dans chaque réaction d'amplification.

Les séquences sont ensuite retournées par mail dans un délai de 48h sous forme de deux fichiers informatiques : le premier est un chromatogramme. Chaque pic correspond à la lecture d'un nucléotide et la couleur du pic nous indique quel nucléotide se trouve à cette position (bleu : C, noir : G, rouge : A, Vert : T). Le second correspond à un fichier texte.

L'analyse de ces séquences ainsi que les alignements ont été réalisés par la suite grâce au logiciel BioEdit version 7.0.9.

Principe de l'analyse des séquences :

Une première correction des chromatogrammes a été effectuée par la société qui a réalisé le séquençage. Cette correction permet de vérifier qu'au moment de la lecture par le logiciel d'analyse, aucun pic n'a été oublié ou alors qu'il n'y a pas eu superposition de plusieurs pics. Une seconde correction est nécessaire afin de s'assurer de la bonne concordance des résultats. Ces séquences sont ouvertes, lues et corrigées avec le logiciel BioEdit.

Une fois les éventuelles erreurs corrigées, les séquences sens et antisens sont alignées pour générer une séquence consensus pour chaque produit séquencé. Ensuite, les séquences consensus sont comparées entre elles par alignement sur le logiciel Bioedit, pour vérifier la présence ou non de polymorphismes entre elles.

V.2.3.5 Analyse phylogénétique

Les alignements précédemment réalisés ont été utilisés pour la construction d'arbres phylogénétiques. Ceux-ci permettent d'observer le regroupement des souches entre elles suivant les polymorphismes nucléotidiques. L'analyse de ces arbres permet de situer un groupe d'espèces fongiques par rapport à un autre. Dans notre cas, l'objectif est de positionner les souches issues des cochons d'Inde au sein du complexe *T. mentagrophytes* c'est à dire de les situer par rapport à *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *T. mentagrophytes* var. *erinacei*. Ces analyses sous-traitées au Muséum d'Histoires Naturelles de Londres (Dr. C. Gueidan) ont été réalisées à l'aide du programme RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood, Stamatakis 2005, 2008) et du site internet CIPRES (Cyberinfrastructure for Phylogenic Research, <http://www.phylo.org>).

V.3 Résultats

V.3.1 *Caractéristiques mycologiques des prélèvements et souches étudiées*

V.3.1.1 Examen direct des prélèvements :

A l'examen direct des squames prélevés et éclaircis au noir chlorazol, des filaments mycéliens sont observés au microscope (objectif x50) attestant de l'origine mycologique des lésions cutanées pour chacun des patients.

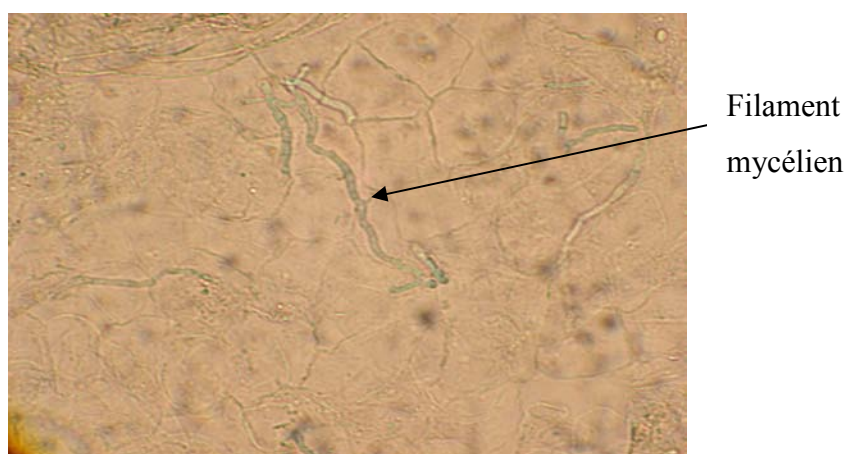


Figure 25 : Examen direct de squames. (Objectif X100)

V.3.1.2 Examen macroscopique des cultures:

Après 8 jours de culture, les premières colonies fongiques ont été observées sur milieu de Sabouraud (avec et sans Actidione®). Elles présentent des caractéristiques atypiques par rapport aux autres dermatophytes connus : elles sont initialement jaunes, glabres puis veloutées au bout de deux semaines, plissées de façon radiaire, étoilées en périphérie, avec une élévation centrale. Elles présentent une coloration jaune-orangée intense au recto comme au verso et un pléomorphisme peut apparaître en subculture. Lors de l'étude, sept souches issues de patients et une issue des cochons d'Inde étaient ainsi pléomorphisées.

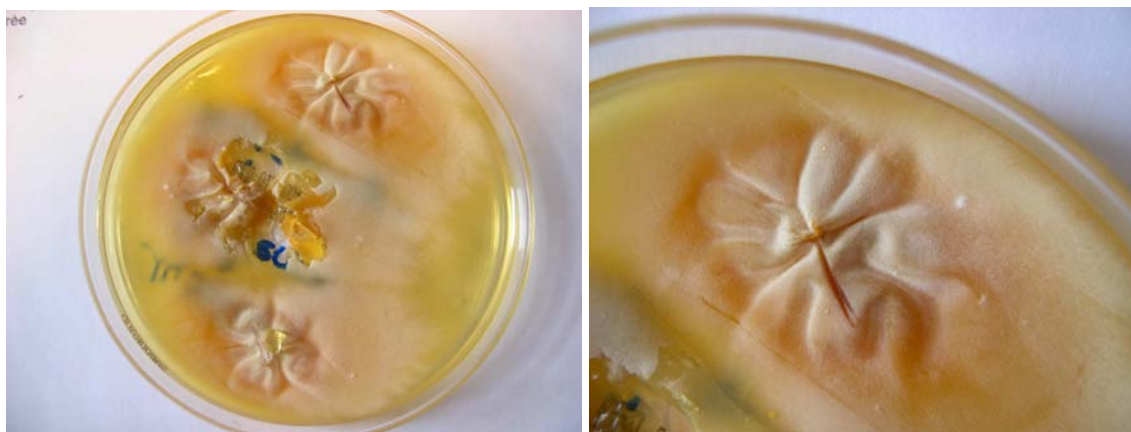


Figure 26 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu de Sabouraud en boîte.



Figure 27 : Aspect macroscopique des colonies sur milieu de Sabouraud en tube.

Le milieu à l'urée et le milieu BCP caséine ont été observés dans un délai de 7 jours. Aucune des souches n'a présenté d'activité uréasique, le milieu à l'urée n'ayant pas viré de couleur. Au contraire, chacune des souches a provoqué l'hydrolyse de la caséine sur milieu BCP. Ces caractéristiques permettent d'apporter un critère de distinction par rapport à *T. mentagrophytes* var. *erinacei* qui présente ou non selon l'origine, une activité uréasique et n'entraîne pas l'hydrolyse de la caséine.



Figure 28



Figure 29

Figure 28 : Activité uréasique négative sur le milieu de Christensen à l'urée

(En cas de positivité la couleur du milieu vire au fuchsia)

Figure 29 : Hydrolyse de la caséine sur milieu BCP (présence d'un halo autour des colonies)

V.3.1.3 Examen microscopique des cultures :

Sur milieu de Sabouraud et après 8 jours de culture, l'aspect microscopique des colonies n'a montré aucune fructification (filaments dits « stériles »). Au delà de ce délai, les souches ne fructifient pas et certaines pléomorphisent.

Des subcultures sur milieux pauvres (le milieu PDA étant le plus efficace) ont donc été nécessaires pour voir apparaître après trois semaines des microconidies piriformes s'insérant sur les filaments articulés à angles droits. Ni macroconidie, ni vrille n'ont été observées.

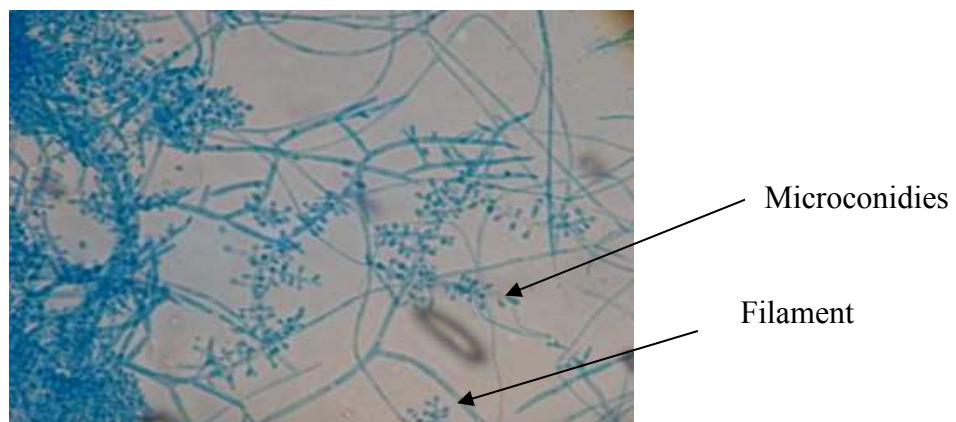


Figure 30 : Aspect microscopique d'une souche de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* sur milieu PDA après trois semaines de pousse (objectif X50).

V.3.1.4 Mise en évidence de la forme téléomorphe :

Afin de mettre en évidence la forme sexuée de ce variant, les tests d'accouplements ont été réalisés sur quatre souches : LA, JAC, MAN et PER avec des souches de référence d'*Arthroderma benhamiae* africaines (RV30 000+ et RV30 000-). Des cléistothèces contenant des asques et ascospores se sont formés au contact des souches africaines d'*Arthroderma benhamiae* + (RV30 000+), démontrant ainsi l'appartenance de ces souches au complexe et l'existence pour ce variant *porcellae* d'une forme téléomorphe de polarité négative. Ici, une seule rangée de cléistothèces a été obtenue, témoignant comme chez *T. mentagrophytes* var. *erinacei* d'une dégénérescence sexuelle de ces souches.

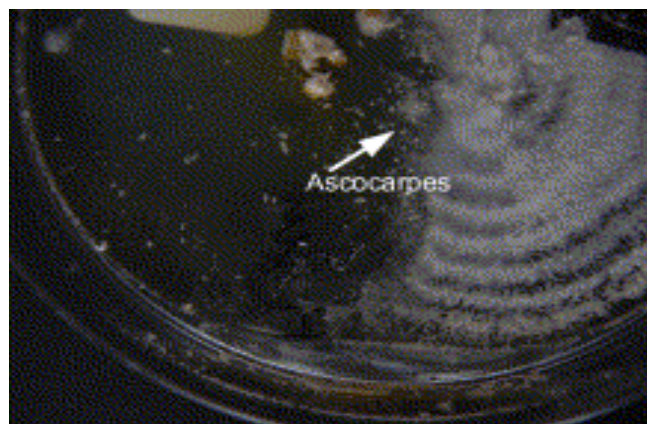


Figure 31 : Epreuve de confrontation entre une souche de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et la souche de référence *Arthroderma benhamiae* race africaine (RV30 000+) [75].

V.3.1.5 Caractéristiques de *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae* versus *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* :

Au final, ce nouveau variant présente des caractéristiques morphologiques et culturelles proches de celles de *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, ainsi que d'autres bien distinctes et répertoriées dans le tableau XI.

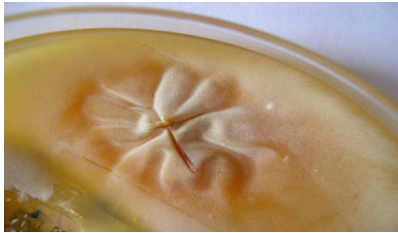
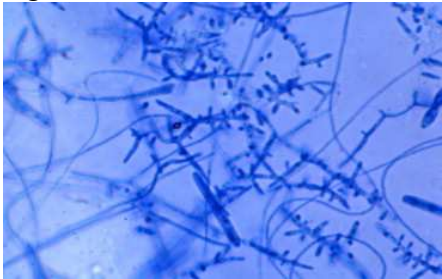
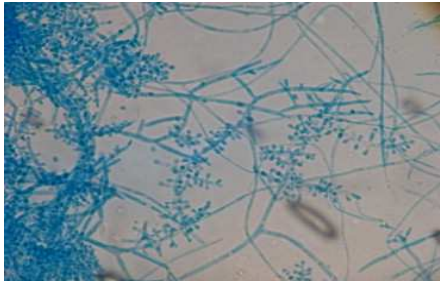
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>porcellae</i>
Forme parfaite	<i>Arthroderma benhamiae</i> polarité +	<i>Arthroderma benhamiae</i> polarité -
Réservoir animal	Hérisson (<i>Erinaceus europaeus</i>)	Cochon d'Inde (<i>Caviae porcellus</i>)
délai de pousse des cultures	8 jours	8 jours
Aspect macroscopiques des cultures sur milieu de Sabouraud	<u>Recto</u> : colonies blanches, étoilées, plates, finement poudreuses  <u>Verso</u> : pigment jaune vif en primoculture	<u>Recto</u> : colonies jaunes orangées, frangées en périphérie, glabres, plissées de façon radiaire, élevure au centre  <u>Verso</u> : pigment jaune-orangé
Aspect microscopiques des cultures sur milieu de Sabouraud à J8	Nombreuses microconidies piriformes et macroconidies à paroi mince et lisse en forme de cigare. Absence de vrille 	Mycélium stérile
Aspect microscopiques des cultures sur milieu PDA à J21	Nombreuses microconidies piriformes et rares macroconidies Absence de vrille	Nombreuses microconidies piriformes Absence de macroconidie et de vrille 
uréase	Uréase +/-	Uréase -
Milieu BCP	N'hydrolyse pas la caséine	Hydrolyse de la caséine

Tableau XI : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des *T. mentagrophytes* variétés *porcellae* et *erinacei*.

V.3.2 Caractéristiques moléculaires

V.3.2.1 Amplification des quatre gènes cibles

L'analyse moléculaire du nouveau variant a tout d'abord comporté une étape d'amplification de quatre gènes : ITS, bêta-tubuline, actine, chitine synthase.

Chaque couple d'amorces ciblant ces gènes a été initialement validé sur quelques ADN extraits de souches de façon à s'assurer des conditions expérimentales de l'extraction d'ADN et de l'amplification.

La spécificité des amorces, l'obtention d'amplicons de taille attendue et l'absence de contamination lors de la PCR ont été contrôlées lors de l'étape d'électrophorèse.

Ainsi, l'absence de bande visible lors de la révélation du gel d'électrophorèse peut indiquer un dysfonctionnement de la réaction d'amplification dans le thermocycleur (programme inadapté par exemple) mais aussi une mauvaise spécificité des amorces ou des conditions d'amplification non optimales (composition du mix par exemple). Une mauvaise extraction de l'ADN peut aussi être à l'origine du problème : soit la quantité d'ADN extrait est insuffisante soit l'ADN extrait est trop concentré inhibant la réaction d'amplification. Au contraire, l'obtention de bandes de taille attendue permet de valider les protocoles. L'absence de contamination doit également être validée par un témoin négatif qui ne doit révéler aucune bande.

Dans cette étude, les quatre cibles présentaient une taille distincte : 600 paires de bases (pb) pour l'ITS, 500 pb pour la bêta-tubuline, 300 pb pour la chitine synthase, 260 pb pour l'actine.

Les figures ci-dessous présentent des exemples de migrations électrophorétiques obtenues pour chaque couple d'amorces sur quelques échantillons.

Dans certains cas (figure 33, bande 4), les bandes obtenues étaient inexistantes ou très faibles, ne permettant pas de réaliser le séquençage des amplicons par la suite. La dilution au 1/10 ou au 1/100 des échantillons d'ADN correspondant a permis l'obtention de bandes d'intensité satisfaisante. Les ADN étaient trop concentrés initialement, ce qui a inhibé la réaction d'amplification.

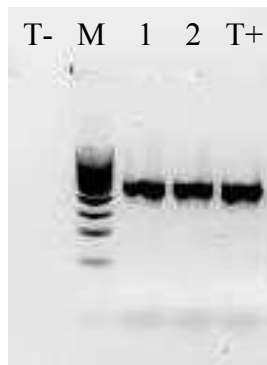


Figure 32 : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène de la bêta-tubuline.

Les produits ont une taille attendue d'environ 500 pb

*T- : témoin négatif; T+: témoin positif; M: marqueur de taille (100pb); 1 et 2: échantillons d'ADN amplifiés de *T. porcellae*.*



Figure 33 : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène ITS.

Les produits ont une taille attendue d'environ 600 pb

*T- : témoin négatif; T+: témoin positif; M : marqueur de taille (100pb) ; 1 à 4 : échantillons d'ADN amplifiés de *T. porcellae*.*

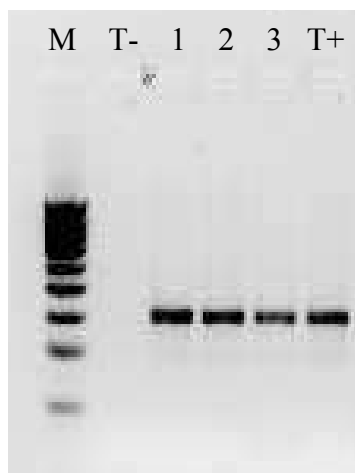


Figure 34 : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène de la chitine synthase.

Les produits ont une taille attendue d'environ 260 pb

*T- : témoin négatif; T+: témoin positif; M: marqueur de taille (100pb); 1à 3 : échantillon d'ADN amplifié de *T. porcellae**



Figure 35 : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène de l'actine.

Les produits ont une taille attendue d'environ 260 pb

*T- : témoin négatif; T+: témoin positif; M: marqueur de taille (100pb); 1: échantillon d'ADN amplifié de *T. porcellae**

V.3.2.2 Séquençage des produits d'amplification

Les souches correspondant aux espèces étudiées et pour lesquelles le séquençage des quatre gènes cibles a été effectué, sont répertoriées dans le tableau XIII.

Identification		Espèces de dermatophyte	Gènes étudiés				Numéro CBS
Code patient ou animal	Ref. labo		ITS	ACT	CHS	BTUB	
Cochon d'Inde 1	1	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 2	2	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 3	3	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 4	4	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 5	5	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 6	6	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 7	7	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 8	8	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cochon d'Inde 9	9	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
Cage (9)	30	<i>T.porcellae</i>	-	+	-	-	
SCHO	10	<i>T.porcellae</i>	-	-	-	-	
BRU	11	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
CHE	12	<i>T.porcellae</i>	-	-	-	-	
LA	13	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
JAC	14	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	CBS 128730
PER	15	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
MAN	16	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
SET	17	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
ATH	18	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
ATO	19	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
CUT	20	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	CBS 128731
HAV	21	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	CBS 128732
GAU	25	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	
DUF	26	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	CBS 128735
URI	27	<i>T.porcellae</i>	+	+	+	+	CBS 128736
GIG	35	<i>T.porcellae</i>	-	+	-	+	
MAZ	36	<i>T.porcellae</i>	-	+	+	+	
COUR	31	<i>T. interdigitale</i>	-	+	-	+	
JAQ	32	<i>T. interdigitale</i>	-	-	-	+	
GUE	38	<i>T. interdigitale</i>	+	-	-	+	CBS 128737
PAT	22	<i>T.interdigitale</i>	+	+	+	+	CBS 128733
SCH	23	<i>T. mentagrophytes</i>	-	+	-	+	CBS 128734
STA	29	<i>T. mentagrophytes</i>	+	+	+	+	
FRA	33	<i>T. mentagrophytes</i>	+	+	+	+	

Tableau XII : Souches utilisées pour l'étude moléculaire.

(+ : souches amplifiées et séquencées, - : souches non amplifiées et non séquencées,

ACT : actine, CHS : chitine synthase, BTUB : bêta-tubuline)

Parmi les souches identifiées morphologiquement comme étant *T. mentagrophytes* var. *porcellae*, toutes celles issues de cochons d'Inde ont été séquencées pour les quatre gènes. Concernant les 17 souches issues de patients, des profils complets ont été obtenus pour 13 d'entre elles. Les réactions d'amplification des deux souches SCHO et CHE n'ont pas abouti même après plusieurs essais : ces souches n'ont donc au final pas été incluses dans l'étude moléculaire.

Pour le patient MAZ, la région ITS n'a pas été amplifiée. De la même façon, les gènes cibles ITS et chitine synthase n'ont pas pu être séquencés pour la souche issue du patient GIG. Dans ces différentes situations aucune explication n'a été validée, bien que la dégradation des ADN ait été fortement suspectée. Les subcultures des souches correspondantes n'ayant pas poussé, de nouvelles extractions n'ont pu être réalisées.

Pour trois des souches de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* sélectionnées, les profils de séquençage des gènes cibles sont également incomplets : seul le gène codant pour la bêta-tubuline a été amplifié et séquencé pour les quatre souches : la souche 22 (CBS138733) a pu être séquencée pour les quatre gènes cibles.

Enfin, parmi les trois souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, deux ont pu être amplifiées et séquencées pour les quatre gènes cibles.

En considérant ces profils de séquençage incomplets et de façon à augmenter la pertinence de l'étude, nous avons utilisé des séquences issues de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) pour compléter nos alignements.

	ITS	Actine	Chitine synthase
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	- EF568104		
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	- EU 181446 - AF168124 - FM986778 - FM986773		- AB005794
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	- FJ428243 - Z97997 - Z97996		
<i>Arthroderma benhamiae</i>		- AB194256 - AB194250 - AB194254	- AB044155 - AB050933

Tableau XIII : Séquences issues de la base de données GenBank.

V.3.2.2.1 Analyse des séquences

Les résultats du séquençage réalisé par la société de biotechnologies GENOSCREEN (Lille) ont été envoyés sous forme de chromatogrammes où chaque pic de couleur correspond à un nucléotide précis (bleu : C, noir : G, rouge : A, Vert : T). A chaque chromatogramme est associé un fichier texte correspondant à l'information nucléotidique brute.

Les séquences ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel BioEdit.

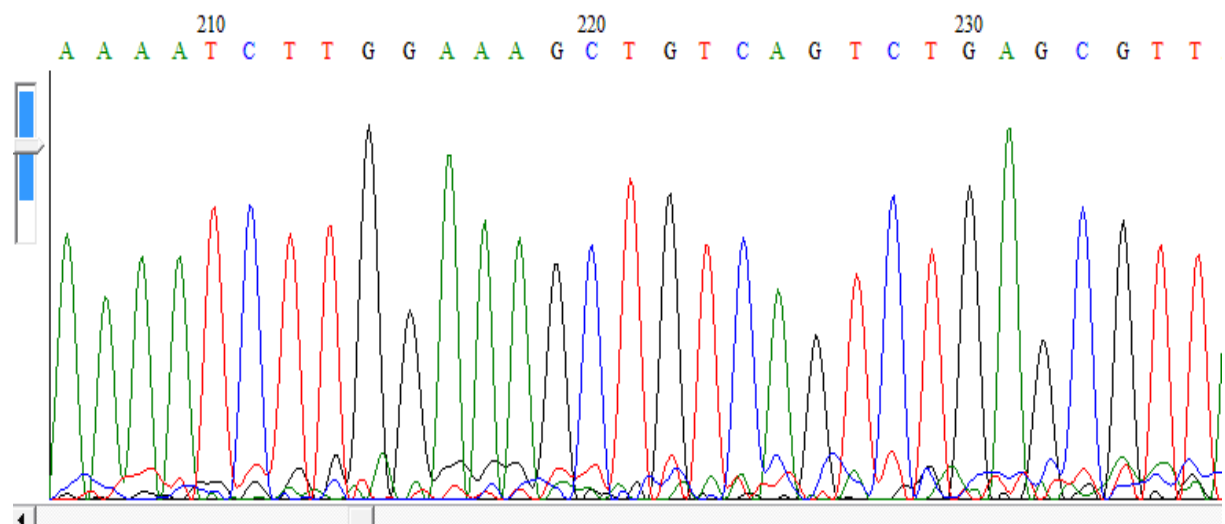


Figure 36 : Exemple d'un chromatogramme pour une des séquences obtenues.

(Visualisé avec le logiciel Bio Edit version 7.0.9)

V.3.2.2.2 Analyse des alignements : recherche des polymorphismes

La majorité des séquences obtenues étant de bonne qualité, elles ont donc été exploitées pour l'analyse moléculaire. Pour chaque souche une séquence consensus de chaque gène a été conçue. L'ensemble des séquences consensus a ensuite été aligné pour rechercher les polymorphismes présents entre les souches, gène par gène. Pour chaque alignement des quatre gènes, la souche JAC a servi de référence car d'une part c'est une souche déposée à la collection du CBS sous le numéro d'accèsion CBS128730 et d'autre part, les quatre gènes ont été séquencés avec succès.

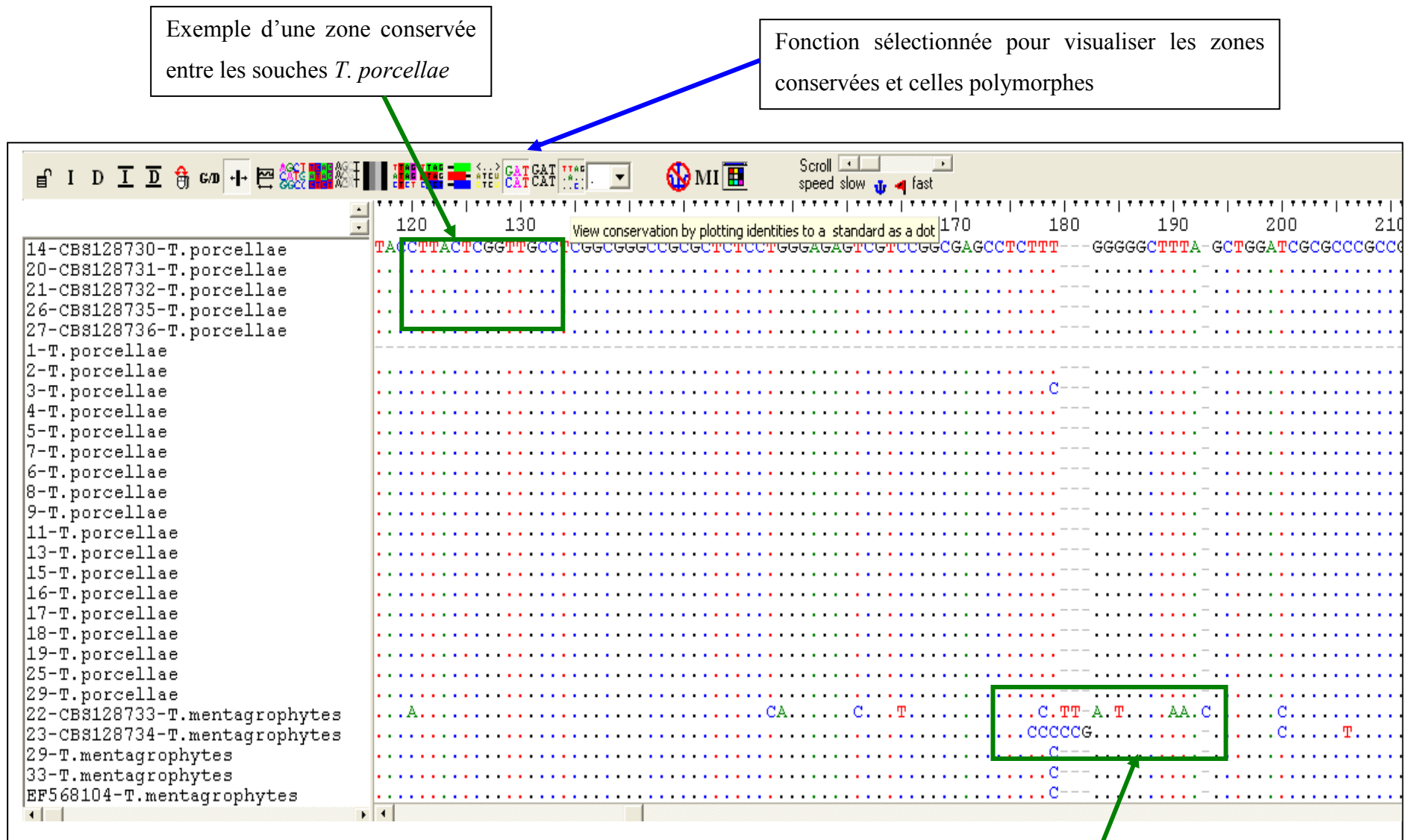


Figure 37 : Alignements des séquences et mise en évidence des polymorphismes.

Le logiciel BioEdit permet de visualiser les positions nucléotidiques variables entre les séquences: les points correspondent aux nucléotides identiques par rapport à la séquence de référence. En cas de polymorphisme le nucléotide variable est indiqué par la lettre correspondante.

Exemple d'une zone polymorphe entre les souches *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*

Les tableaux XIV, XV, XVI, et XVII répertorient les polymorphismes nucléotidiques observés pour chaque souche en fonction du gène séquencé. Pour chaque souche et selon le gène étudié, des profils types ont donc été définis. Le bilan global de ces profils génomiques est résumé dans le tableau XVIII.

Lors de cette analyse, lorsque les souches d'une même espèce ou sous-espèce présentent le même profil, une seule d'entre elles a été répertoriée. Par exemple, les profils de l'espèce *T. mentagrophytes* var. *porcellae* sont représentés par la souche JAC (référence laboratoire n°14, référence CBS 128730) pour chacune des quatre analyses étant donné les similitudes de séquences entre les souches gène par gène.

Si plusieurs souches de la même espèce ou sous espèce ont des profils distincts, chacun de ceux-ci sont répertoriés, c'est le cas notamment pour l'espèce *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

Le plus grand nombre de polymorphismes nucléotidiques a été observé sur l'analyse des séquences des gènes codant pour la région ITS de l'ADN des espèces de dermatophytes.

❖ Analyses des polymorphismes des séquences des gènes codant pour la région ITS : (tableau XIV)

Toutes les souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* sauf une qu'elles soient isolées à partir du cochon d'Inde ou de l'homme présentent des séquences identiques pour le gène codant la région ITS ; les profils identiques de séquençage de ces souches ont été associés au profil 1. La souche isolée du cochon d'Inde 3 (référence laboratoire 3) diffère de ce premier profil en 8 positions nucléotidiques, définissant ainsi un autre profil de séquençage : le profil 2

En ce qui concerne *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, les séquences du gène codant la région ITS ont été analysées pour deux souches référencées au CBS : PAT (référence laboratoire : 22, référence CBS 128733) et GUE (référence laboratoire : 38, référence CBS 128737). Ces souches ont montré des profils similaires entre elles pour la région ITS mais différents de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* (profil 1 et 2). En effet 59 polymorphismes nucléotidiques ont été répertoriés par rapport au profil 1, définissant un profil spécifique (profil 3) pour les séquences du gène codant l'ITS chez ces deux isolats.

Les séquences ITS de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* issues de la base de données GenBank ont toutes présentées des profils identiques au profil 3 défini pour la souche PAT.

Toutes les souches *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* présentent des séquences ITS différentes entre elles. Pour chacune d'elles, des profils de séquençage distincts ont donc été définis : le profil 4 pour la souche SCH (référence laboratoire 23, référence CBS 128734), le profil 5 pour la souche STA (référence laboratoire 29) et le profil 6 pour la souche FRA (référence laboratoire 33). Les polymorphismes différenciant ces souches du profil 1 (*T. mentagrophytes* var. *porcellae*) se situent en quatre positions nucléotiques pour le profil 4, six positions pour le profil 5 et 7 pour le profil 6.

De même, la séquence de la souche *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* issue de GenBank (EF 568104) présente un autre profil (profil 7) se distinguant du profil 1 par 8 nucléotides.

Les séquences ITS de l'espèce *T. mentagrophytes* var. *erinacei* issues de GenBank présentent des polymorphismes touchant 8 nucléotides par rapport aux séquences du profil 1, définissant ainsi un nouveau profil de séquençage : le profil 8. Ce dernier profil est très proche du profil 7 correspondant au séquençage de la souche *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* de GenBank, en effet seuls deux nucléotides permettent de distinguer leurs séquences.

*L'analyse des polymorphismes des séquences ITS a permis de mettre en évidence 8 profils distincts dont trois spécifiques des espèces *T. mentagrophytes* var. *porcellae*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *T. erinacei* et quatre correspondant à des souches *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* présentant chacune un profil particulier.*

identification	souche	<u>Positions nucléotidiques variables</u>																																		
		22	57	59	63	64	70	80	98	102	120	152	153	154	161	165	178	179	180	181	183	185	190	191	193	200	222	223	224	232	237	238	239	241		
CBS 128730 (JAC=14)	<i>T.m. var. porcellae</i>	A	A	T	-	C	A	T	T	-	C	C	T	G	T	C	T	T	-	-	G	G	T	T	-	T	A	T	C	-	-	-	-	G		
Cochon d'inde 3 (3)	<i>T.m. var. porcellae</i>	G	C				G										C																			
CBS 128733 (PAT=22)	<i>T.m. var. interdigitale</i>	G	C	A			G	A	G	C	A			C	A	C	T	C			T	T	A	T	A	A	C	C	G	C	A	T	T	C	A	A
CBS 128734 (SCH=23)	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	G		A	T				G																											
STA = 29	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	G															C																	A		
FRA =33	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	G	C				G																												A	
EF568104 (genbank)	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	G																																	A	
FJ428243	<i>T.m. var. erinacei</i>	G																																	A	

identification	243	269	270	276	401	406	443	481	483	484	487	488	489	495	496	500	503	539	549	562	576	577	591	604	611	613	620	622	623	626	627	PROFIL
CBS 128730 (JAC=14)	A	T	-	T	T	T	A	A	C	T	-	-	-	-	C	G	G	C	G	G	C	T	T	C	C	C	A	T	T	T	-	1
Cochon d'Inde 3 (3)				C				G		C																					T	2
CBS 128733 (PAT=22)	G	C	A	C	C	C	G	G	G	C	C	C	G	G	G	T	T	T	A	A	T	C	C	A	G	T		A	C	A	T	3
CBS 128734 (SCH=23)																																4
STA = 29							G		C										A													5
FRA =33		C					G		C																							6
EF568104							G		C							T	T		A							T						7
FJ428243		C					G		C							T	T									T						8

Tableau XIV : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant la région ITS.

❖ Analyses des polymorphismes des séquences des gènes codant pour la chitine synthase (tableau XV) :

Toutes les séquences du gène codant la chitine synthase des souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* provenant du cochon d'Inde ou de l'homme sont identiques entre elles, ce qui permet de définir un premier profil de séquençage (profil 1) ; à l'exception d'une souche isolée du cochon d'Inde (référence laboratoire 3).

Seule la souche PAT (référence laboratoire 22, référence CBS 128733) pour l'ensemble des *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* a pu être séquencée pour le gène de la chitine synthase et montre un profil distinct du profil 1 en 11 positions nucléotidiques : c'est le profil 2.

La séquence (AB 005794) issue de GenBank pour le gène de la chitine synthase pour *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* correspond également au profil 2.

Les trois souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* donnent des profils de séquençage distincts du profil 1.

La souche SCH (référence laboratoire 23, référence CBS 128734) présente le profil 3 et diffère du profil 1 par 7 polymorphismes nucléotidiques.

Les souches STA (référence laboratoire 29) et FRA (référence laboratoire 33) ont des profils de séquençage identiques mais se distinguent du profil 1 en trois positions nucléotidiques : c'est le profil 4. La souche de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* isolée chez le cochon d'Inde 3 présente le même profil de séquençage que ces dernières.

Par ailleurs, deux séquences du gène codant pour la chitine synthase du téléomorphe *Arthroderma benhamiae* issues de GenBank ont été analysées, dont une (AB 050933) montrant un profil identique au profil 1 ; l'autre (AB 044155) définissant le profil 5, distinct du profil 1 par 10 polymorphismes nucléotidiques.

*L'analyse des polymorphismes des séquences du gène codant la chitine synthase a permis de mettre en évidence cinq profils distincts dont deux spécifiques des espèces *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, deux correspondant à des souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et un autre associé à une souche d'*Arthroderma benhamiae*.*

identification	souche	<u>Positions nucléotidiques variables</u>																			PROFIL
		10	16	37	40	49	52	64	73	79	94	130	148	151	163	166	169	193	196	230	
CBS 128730 (JAC=14)	<i>T. m. var. porcellae</i>	A	G	T	T	G	C	A	T	C	T	G	C	C	G	G	A	T	C	A	1
Cochon d'inde 3 (3)	<i>T. m. var. porcellae</i>		T	A								A									4
CBS128733 (PAT=22)	<i>T.m. var. interdigitale</i>	G		A	C	A	T		C	T	G		T	T					T		2
CBS128734 (SCH=23)	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>			A		A				T			T			A		C	G		3
STA = 29	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>		T	A								A									4
AB044155 (genbank)	<i>Arthroderma benhamiae</i>			A		A		G		T			T		A	A	G		G	C	5

Tableau XV : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant pour la chitine synthase.

❖ Analyses des polymorphismes des séquences des gènes codant pour la bêta-tubuline (tableau XVI) :

Toutes les séquences du gène codant la bêta-tubuline des souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* provenant du cochon d'Inde ou de l'homme sont identiques entre elles et définissent un premier profil de séquençage : le profil 1.

Pour *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, quatre souches ont été séquencées pour le gène de la bêta-tubuline. Trois d'entre elles ont montré des profils identiques définissant le profil 2 et se distinguant du premier profil au niveau de 26 nucléotides.

La séquence du gène de la bêta-tubuline de la souche COU (référence laboratoire 31) n'a révélé aucun polymorphisme par rapport à celles correspondant au profil 1 et relative à *T. mentagrophytes* var. *porcellae*.

Concernant les souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, trois ont été séquencées pour le gène de la bêta-tubuline, celles-ci ont toutes montré des profils distincts. La souche SCH (référence laboratoire 23, référence CBS 128734) s'est distinguée du profil 1 par 7 polymorphismes nucléotidiques lui conférant ainsi le profil 3. La souche STA (référence laboratoire 29) est associée au profil 4 puisqu'elle a montré 2 polymorphismes au niveau de la séquence de la bêta-tubuline la différenciant ainsi du premier profil.

Enfin, aucun polymorphisme n'a été noté entre la séquence de la bêta-tubuline de la souche FRA (référence laboratoire 33) et celle des souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* correspondant au profil 1.

*L'analyse des polymorphismes des séquences du gène codant la bêta-tubuline a permis de mettre en évidence quatre profils distincts dont deux spécifiques des espèces *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, et deux autres correspondant à des souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.*

identification	souche	<u>Positions nucléotidiques variables</u>																															PROFIL
		38 40 52 62 78 83 99 144 146 147 149 151 152 153 154 155 156 157 158 160 161 180 187 200 275 374 386 398 404 407 440																															
CBS128730 (JAC=14)	<i>T.m.var. porcellae</i>	T G C A A A C G G G C A A A G T C C C G T G T C C T C G T T	1																														
CBS128733 (PAT=22)	<i>T.m. var. interdigitale</i>	G A T G G T A A A A G T T C C G G T T T C A A C T C	2																														
CBS128734 (SCH=23)	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	G A G C A C C	3																														
STA = 29	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	T T	4																														

Tableau XVI : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant pour la bêta tubuline.

❖ Analyses des polymorphismes des séquences des gènes codant pour l'actine (tableau XVII) :

Toutes les séquences du gène codant l'actine des souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* provenant du cochon d'Inde ou de l'homme sont identiques entre elles, et définissent un premier profil de séquençage : le profil 1 ; à l'exception de deux souches : GIG (référence laboratoire 35) et MAZ (référence laboratoire 36) qui présentent des profils similaires entre elles mais distincts du profil 1 (profil 2).

Deux souches de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (PAT, référence laboratoire 22, référence CBS 128733 et COU, référence laboratoire 31) ont été séquencées pour le gène de l'actine et ont montré des profils identiques au profil 2. Ce profil 2 diffère du profil 1 par 20 nucléotides. Ainsi les deux souches GIG et MAZ de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* ont le même profil que certaines souches de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* pour le gène de l'actine.

Comme pour le gène de la bêta-tubuline, parmi les souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, trois ont été séquencées pour le gène de l'actine, et ont montré des profils distincts. La souche SCH (référence laboratoire 23, référence CBS 128734) s'est distinguée du profil 1 par 13 polymorphismes nucléotidiques lui conférant ainsi le profil 3. La souche STA (référence laboratoire 29) est associée au profil 4 : elle a montré 4 polymorphismes dans la séquence de l'actine la différenciant ainsi du premier profil. Enfin, aucun polymorphisme n'est noté entre la séquence de l'actine de la souche FRA (référence laboratoire 33) et celle des souches *T. mentagrophytes* var. *porcellae* correspondant au profil 1.

A noter : trois séquences du gène de l'actine issues de GenBank et correspondant à trois souches d'*Arthroderma benhamiae* ont été analysées. Deux d'entre elles ont montré des profils identiques au profil 1 relative à *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et une autre, un profil similaire au profil 3 correspondant à *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

*L'analyse des polymorphismes des séquences du gène codant l'actine a permis de mettre en évidence quatre profils distincts dont un spécifique de l'espèce *T. mentagrophytes* var. *porcellae*, un autre commun aux espèces *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et *T. mentagrophytes* var. *porcellae*, et deux autres correspondant à des souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.*

identification	souche	<u>Positions nucléotidiques variables</u>																										PROFIL			
		55	61	62	63	64	66	70	71	72	73	74	86	107	108	111	112	113	114	117	123	124	177	183	184	185	186		188	208	222
CBS128730 (JAC=14)	<i>T.m.</i> var. <i>porcellae</i>	A	C	C	A	T	C	T	T	C	T	C	G	A	G	A	C	C	C	A	C	T	-	C	T	A	G	-	T	T	1
CBS128733 (PAT=22)	<i>T.m.</i> var. <i>interdigitale</i>	T							C	C	T	C	A	T		A		G	T		G	T	G	A	A	C	C	A	T	A	2
CBS128734 (SCH=23)	<i>T.m.</i> var. <i>mentagrophytes</i>	G	T	T	C	C		C	C	T				C		G											T	C	C		3
STA = 29	<i>T.m.</i> var. <i>mentagrophytes</i>	C																		T	G					T					4

Tableau XVII: Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant pour l'actine.

<u>Identification des souches</u>				Profil de séquençage			
				ITS	actine	Béta-tubuline	Chitine synthase
CBS 128730 JAC	14	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde1	1	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde2	2	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde3	3	<i>T. m. var. porcellae</i>	2	1	1	1	4
Cochon d'inde4	4	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde5	5	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde6	6	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde7	7	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde8	8	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cochon d'inde9	9	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
Cage cochon d'inde 9	30	<i>T. m. var. porcellae</i>	—	1	—	—	1
BRU	11	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
LA	13	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
PER	15	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
MAN	16	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
SET	17	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
ATH	18	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
ATO	19	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
CBS 128731 CUT	20	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
CBS 128732 HAV	21	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
GAU	25	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
CBS 128735 DUF	26	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
CBS 128736 URI	27	<i>T. m. var. porcellae</i>	1	1	1	1	1
GIG	35	<i>T. m. var. porcellae</i>	—	2	1	—	—
MAZ	36	<i>T. m. var. porcellae</i>	—	2	1	—	1
CBS 128733 PAT	22	<i>T.m. var. interdigitale</i>	3	2	2	2	2
CBS 128737 GUE	38	<i>T.m. var. interdigitale</i>	3	—	2	—	—
COU	31	<i>T.m. var. interdigitale</i>	—	2	1	—	—
JAQ	32	<i>T.m. var. interdigitale</i>	—	—	2	—	—
EU181446 (GenBank)		<i>T.m. var. interdigitale</i>	3	—	—	—	—
AF168124 (GenBank)		<i>T.m. var. interdigitale</i>	3	—	—	—	—
FM986778 (GenBank)		<i>T.m. var. interdigitale</i>	3	—	—	—	—
FM 986773 (GenBank)		<i>T.m. var. interdigitale</i>	3	—	—	—	—
AB005794 (GenBank)		<i>T.m. var. interdigitale</i>	—	—	—	—	2
CBS 128734 SCH	23	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	4	3	3	3	3
STA	29	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	5	4	4	4	4
FRA	33	<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	6	1	1	1	4
EF568104 (GenBank)		<i>T.m. var. mentagrophytes</i>	7	—	—	—	—
FJ 428243 (GenBank)		<i>T.m. var. erinacei</i>	8	—	—	—	—
Z97997 (GenBank)		<i>T.m. var. erinacei</i>	8	—	—	—	—
Z97996 (GenBank)		<i>T.m. var. erinacei</i>	8	—	—	—	—
AB 194256 (GenBank)		<i>Arthroderma benhamiae</i>	—	1	—	—	—
AB 194250 (GenBank)		<i>Arthroderma benhamiae</i>	—	3	—	—	—
AB 194254 (GenBank)		<i>Arthroderma benhamiae</i>	—	1	—	—	—
AB 044155 (GenBank)		<i>Arthroderma benhamiae</i>	—	—	—	—	5
AB 050933 (GenBank)		<i>Arthroderma benhamiae</i>	—	—	—	—	1

Tableau XVIII : Profils de séquençage en fonction du gène et de la souche étudiée.

V.3.2.3 Analyse phylogénétique

Les alignements des sequences constituent des matrices de positions nucléotidiques qui sont ensuite analysées grâce à un programme de reconstruction phylogénétique utilisant une méthode statistique d'estimation du maximum de vraisemblance (programme RAxML). Ainsi, pour chaque gène étudié (ITS, actine, chitine synthase et bêta-tubuline), un arbre phylogénétique a été réalisé à partir des données de séquençage. Un arbre combinant l'analyse des quatre gènes a également été construit (*figure 42*).

Afin d'interpréter et estimer la robustesse des arbres phylogénétiques, la technique du bootstrap est employée pour une évaluation statistique. Plus la valeur de bootstrap (située au niveau des branches de l'arbre phylogénétique) est élevée, plus la fiabilité de la branche est importante.

L'utilisation d'un outgroup (groupe externe) est utilisée en phylogénie pour déterminer une racine commune entre les branches d'un arbre phylogénétique.

Les quatre premiers arbres (ITS, actine, chitine synthase et bêta-tubuline) ont été réalisés sans outgroup.

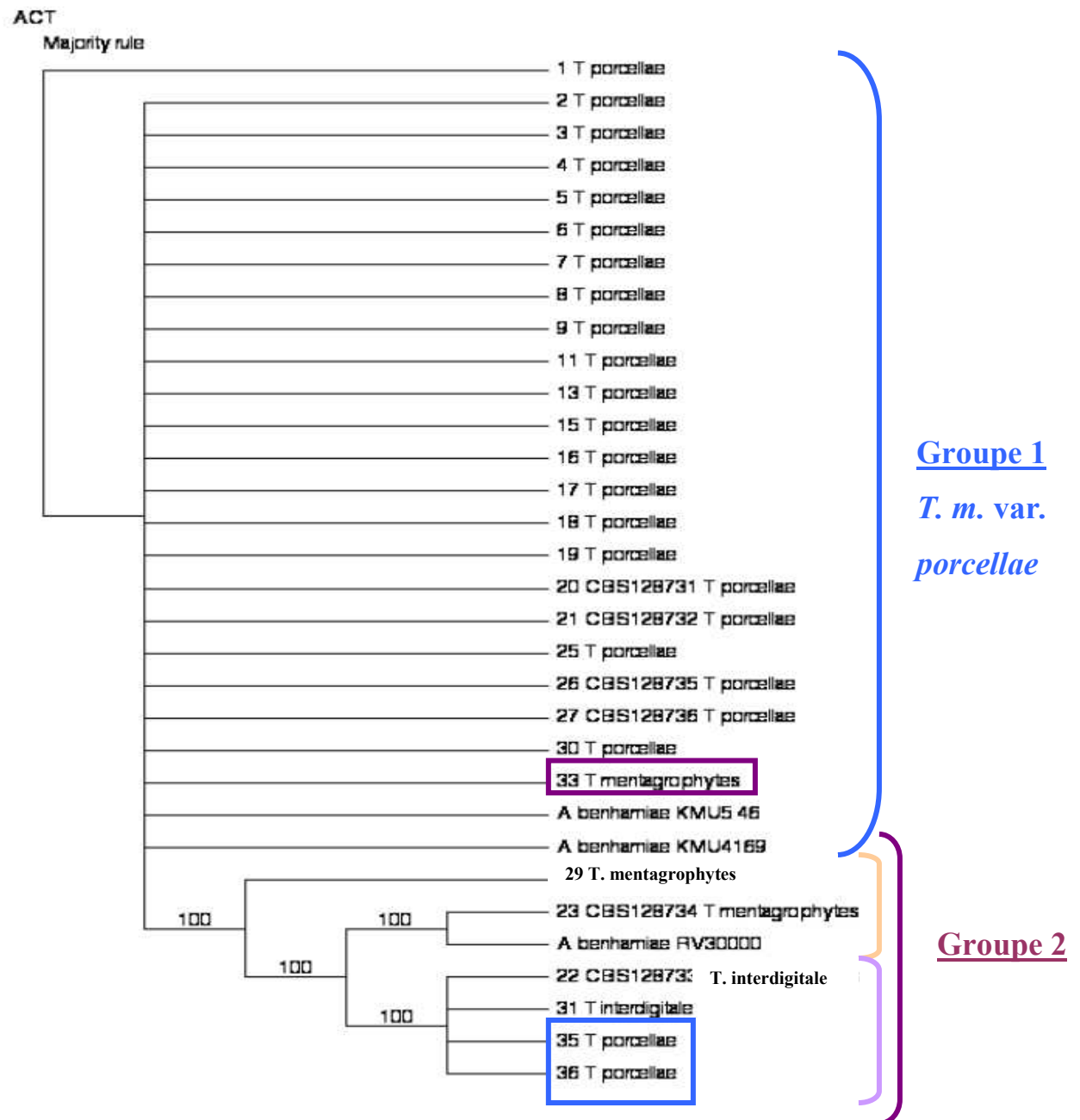


Figure 38 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences de l'actine.

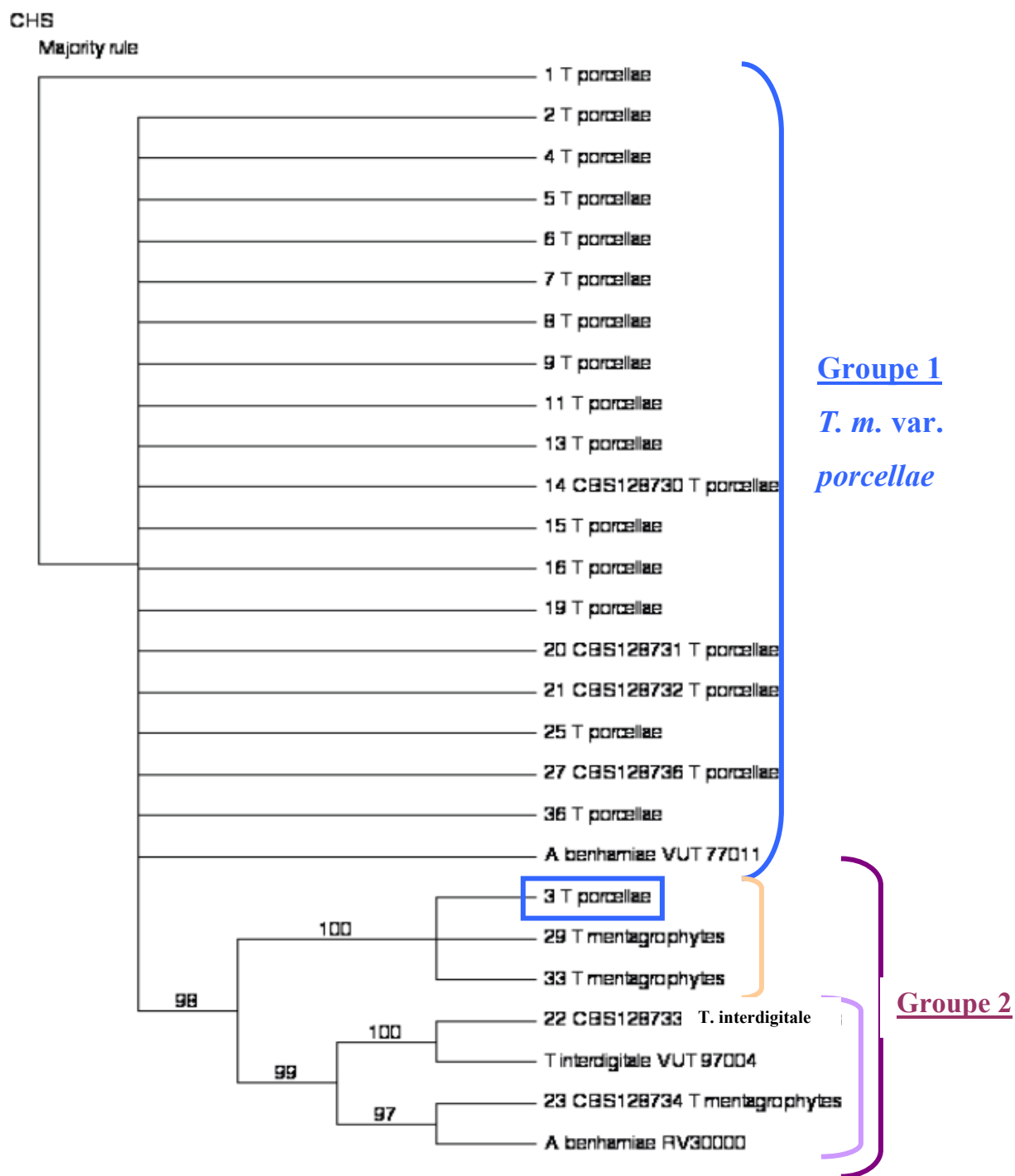


Figure 39 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences de chitine synthase.

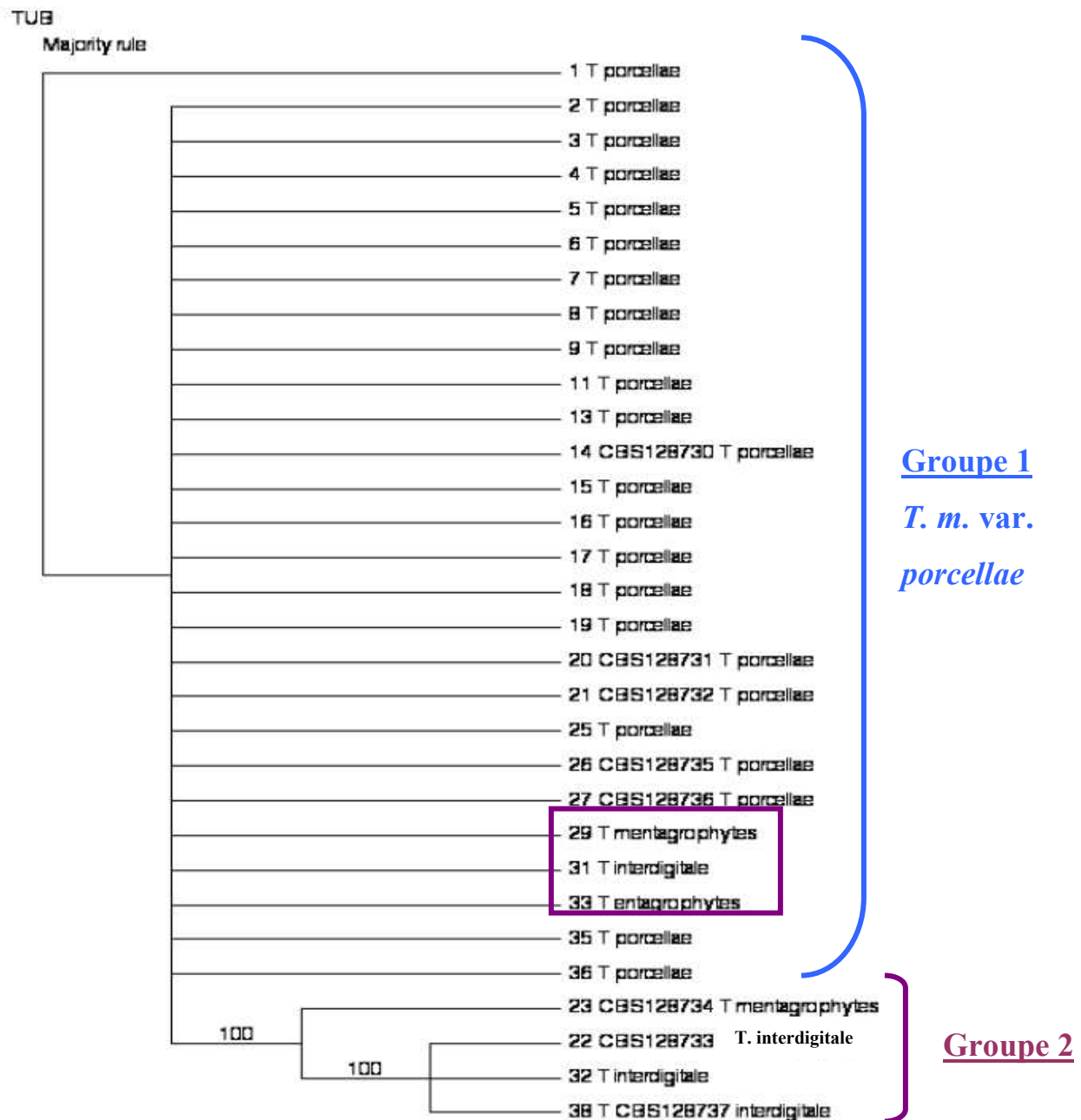


Figure 40 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences de bêta-tubuline.



Figure 41 : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des sequences ITS.
(TM : *Trichophyton mentagrophytes*, TI : *Trichophyton interdigitale*, TE : *Trichophyton erinacei*)

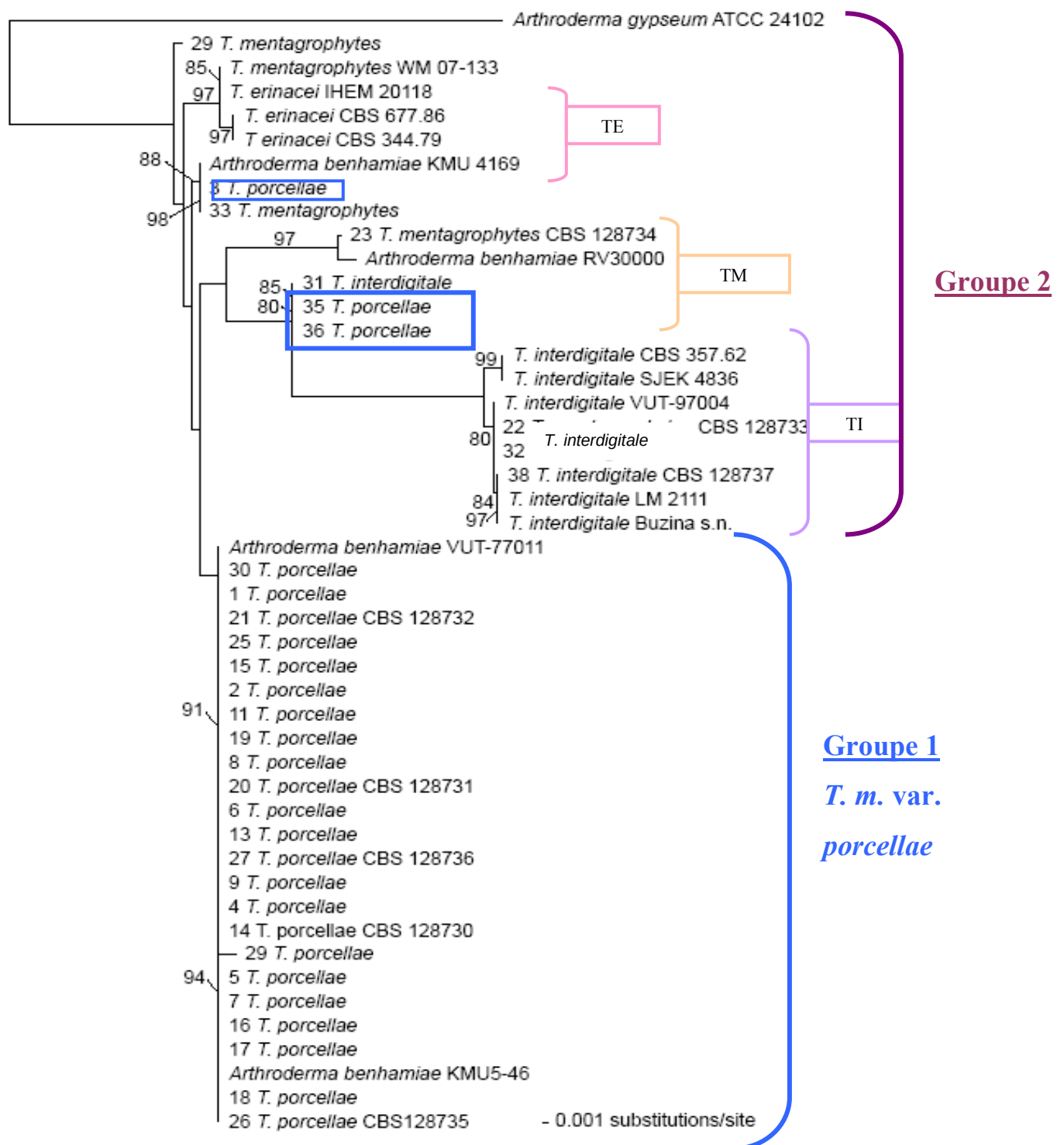


Figure 42 : arbre phylogénétique combiné construit à partir des alignements des gènes de l'actine, chitine synthase, bêta-tubuline et ITS.

(TM : *Trichophyton mentagrophytes*, TI : *Trichophyton interdigitale*, TE : *Trichophyton erinacei*)

Pour chaque arbre phylogénétique réalisé avec chacun des gènes étudiés ainsi qu'avec l'arbre combiné, deux groupes d'espèces se distinguent.

Le groupe 1 rassemble l'essentiel des *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et le groupe 2, les autres espèces du complexe *T. mentagrophytes* incluant les variants *mentagrophytes*, *interdigitale* et *erinacei*.

Cependant, dans ces arbres, certaines souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* n'apparaissent pas dans le groupe 1, de même certaines souches des autres variants ne figurent pas dans le groupe 2.

Ainsi pour l'arbre issu des séquences de l'actine, la souche 33 (FRA) correspondant morphologiquement à *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* mais présentant un profil de séquençage identique à *T. mentagrophytes* var. *porcellae* est incluse dans le groupe 1. De même les souches 35 (GIG) et 36 (MAZ) identifiées morphologiquement comme *T. mentagrophytes* var. *porcellae* mais présentant le même profil de séquençage que *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, appartiennent au groupe 2.

Pour l'arbre construit à partir des séquences de la bêta-tubuline, la souche 31 (COU) correspondant à *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* et les souches 29 (STA) et 33 (FRA) identifiées *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* sont incluses dans le groupe 1 des *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et présentent d'ailleurs des profils de séquençage proches de ces espèces.

La souche 3 (issue du cochon d'Inde 3) qui présente plusieurs zones polymorphes dans les régions ITS et chitine synthase par rapport aux souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* ne se situe pas dans le groupe 1 mais dans le groupe 2. De même la souche 1 correspondant à *T. mentagrophytes* var. *porcellae* issue du cochon d'Inde 1 n'appartient pas au groupe 1 dans l'arbre ITS. La séquence ITS de cette souche 1 est incomplète ce qui peut expliquer la difficulté de lui attribuer un groupe au sein de l'arbre phylogénétique.

Pour l'arbre construit à partir des séquences ITS, la répartition des souches non *porcellae* est plus nette que pour les autres gènes, en effet au sein du groupe 2 apparaissent des sous-groupes individualisant les variants *mentagrophytes*, *interdigitale* et *erinacei*. Ceci indique que l'ITS est un gène plus discriminant pour séparer les espèces que les gènes codant pour l'actine, la bêta-tubuline et la chitine synthase. Cependant, les valeurs de bootstrap ne sont pas toutes élevées ce qui signifie que les branches associées à ces valeurs ne sont pas fortement « supportées ».

Pour l'arbre combiné, un nombre plus important de séquences GenBank ont été ajoutées ainsi qu'un groupe externe, de façon à augmenter la robustesse de l'arbre phylogénétique. Malgré cela, la discrimination des espèces n'apparaît pas supérieure à l'analyse faite avec les séquences ITS seules.

Les souches 3, 35 et 36 sont retrouvées dans le groupe 2 ; la souche 3 se rapprochant phylogénétiquement de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et les souches 35 et 36 de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*.

V.4 DISCUSSION

Récemment, dermatologues et biologistes ont constaté l'émergence d'une nouvelle espèce de dermatophyte pathogène pour l'homme et transmise par le cochon d'Inde.

En effet, au laboratoire de mycologie du CHU de Nancy, chez certains patients, des manifestations cliniques bruyantes ont été observées à type d'épidermophyties très inflammatoires des zones découvertes du corps.

Lors de ces observations cliniques, l'interrogatoire de ces patients a mis en évidence à chaque fois un contact direct avec un cochon d'Inde, faisant suspecter un dermatophyte zoophile.

L'hypothèse d'une infection à dermatophytes a alors été confortée lors des examens directs et des cultures mycologiques. Cependant, les cultures correspondantes ont présenté des aspects macroscopiques et microscopiques inhabituels, ne permettant pas d'établir un diagnostic d'espèce. Nous avons néanmoins constaté certains points communs entre ces souches atypiques et l'espèce *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*.

Lors d'une étude précédente, se basant principalement sur des critères d'identification morphologiques, le docteur Contet-Audonneau avait alors suggéré de nommer cette espèce *T. mentagrophytes* var. *porcellae* [75].

Dans l'étude présentée ici, l'identification de ce nouveau variant a été élargi en se basant sur des caractères génotypiques avec pour but de positionner cette espèce dans la taxonomie des dermatophytes et plus précisément au sein du complexe *Trichophyton mentagrophytes*.

Cette analyse encore inédite pour ce variant s'est inspirée des diverses études menées dans le domaine de l'identification et de la taxonomie fongique, notamment pour le choix des gènes cibles. L'étude moléculaire a ainsi porté sur l'analyse de quatre gènes codant la région ITS de l'ADN ribosomique et de protéines fonctionnelles : l'actine, la bêta-tubuline et la chitine synthase.

Lors de l'analyse des séquences obtenues, une homogénéité a été notée pour la plupart des séquences étiquetées *T. mentagrophytes* var. *porcellae* pour chaque gène. Néanmoins, la souche 3 issue du cochon d'Inde a présenté des polymorphismes la rapprochant davantage de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* pour les séquences ITS et chitine synthase. Il faut noter que cette souche était pléomorphisée lors des analyses moléculaires ce qui peut expliquer les difficultés de lui attribuer un profil type correspondant aux autres souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae*.

Des polymorphismes avec les autres souches de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et *T. mentagrophytes* var. *erinacei* ont néanmoins été mis en évidence soulignant la distinction avec ces espèces.

Les souches de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* présentent également des profils de séquençage relativement homogènes pour les quatre gènes étudiés mis à part une souche pour le gène codant la bêta-tubuline présentant un profil identique à celui des souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* (souche 31, COU).

Au contraire, les souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* donnent des profils de séquençage très variés en fonction des souches et des gènes étudiés. L'une d'entre elles présente des profils de séquençage identiques pour les gènes codant pour l'actine et la bêta-tubuline identiques à ceux des *T. mentagrophytes* var. *porcellae* (souche 33, FRA).

Ces données suggèrent d'une part un plus faible pouvoir discriminant des gènes de l'actine et la bêta tubuline et d'autre part une diversité moléculaire des souches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* correspondant probablement aux différentes variétés observées morphologiquement.

Dans l'analyse des alignements de séquences, un nombre plus important de polymorphismes apparaît entre les souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et les souches de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* par rapport aux autres espèces zoophiles.

Les souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* semblent génétiquement plus proches de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* et var. *erinacei*, parallèlement les polymorphismes observés sont peu nombreux entre ces souches pour les quatre gènes étudiés.

Cette distance génétique pourrait être expliquée par le fait que *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* est un dermatophyte anthropophile strict. Et le rapprochement génétique avec les souches *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* est conforté par le fait que *T. mentagrophytes* var. *porcellae* est un variant zoophile.

Certaines souches d'*Arthroderma benhamiae*, séquencées pour les gènes de l'actine et de la chitine synthase, ont montré des profils identiques à ceux de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* ; d'autres ont montré des profils identiques à *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

Ceci peut suggérer que *T. mentagrophytes* var. *porcellae* et *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* partageraient la même forme sexuée d'*Arthroderma benhamiae*. Cette donnée étant un argument supplémentaire pour inclure *T. mentagrophytes* var. *porcellae* au sein du complexe *T. mentagrophytes*.

En résumé, l'analyse des résultats de séquençage a distingué les souches de *T. mentagrophytes* var. *porcellae* des autres espèces du complexe *T. mentagrophytes* tout en les rapprochant des variants zoophiles *mentagrophytes* et *erinacei*.

L'analyse phylogénétique a confirmé ces résultats en illustrant par les arbres phylogénétiques les liens entre les espèces du complexe *T. mentagrophytes*.

En outre, ceci a permis de constater que le gène ITS est le plus contributif pour l'étude taxonomique du complexe *T. mentagrophytes* avec une meilleure séparation des variants *mentagrophytes*, *interdigitale* et *erinacei*.

L'association combinée des quatre gènes : ITS, actine, chitine synthase et bêta-tubuline n'a pas augmenté le pouvoir discriminant par rapport à l'utilisation isolée de l'ITS. Ces résultats sont conformes à ceux de l'équipe de Fréalle qui lors de son étude en 2007, n'a pas montré la supériorité du gène MnSOD par rapport au gène ITS pour distinguer les espèces du complexe *T. mentagrophytes* [74].

Par ailleurs, le choix des gènes utilisés pour la phylogénie apparaît primordial pour la réalisation d'arbres fiables, en effet des souches bien identifiées en morphologie peuvent être associées à des groupes auxquels elles n'appartiennent pas. Dans notre étude, sous réserve d'une bonne identification morphologique, nous remarquons que certaines souches sont en effet placées dans le «mauvais groupe ». L'utilisation d'autres gènes est donc à envisager comme ceux utilisés dans les études MLST (Multilocus Sequence Typing) développées dans le domaine mycologique [41].

Afin d'améliorer la robustesse des arbres phylogénétiques, différents autres axes pourraient être exploités tels que l'utilisation d'un nombre plus important de séquences, la définition d'un outgroup fiable pour lequel les séquences de chaque marqueur étudié serait disponible et le recours à plusieurs méthodes de construction d'arbre phylogénétique en parallèle.

En conclusion de cette étude, même si l'utilisation de quatre gènes ne semble pas apporter de bénéfice d'un point de vue taxonomique par rapport à l'étude du seul gène ITS, il apparaît clairement que quelque soit le gène choisi, *T. mentagrophytes* var. *porcellae* constitue un groupe à part au sein du complexe *T. mentagrophytes*, confirmant les observations morphologiques.

CONCLUSION

Notre étude a permis de caractériser un nouveau variant au sein du complexe *T. mentagrophytes* d'après des critères d'identification morphologiques et moléculaires et qui serait transmis à l'humain *via* un contact avec le cochon d'Inde. Ce nouveau variant présente des caractéristiques morphologiques proches mais bien distinctes de certaines espèces du complexe *T. mentagrophytes*, en l'occurrence les variétés zoophiles et plus particulièrement *T. mentagrophytes* var. *erinacei*.

Les résultats concernant l'étude moléculaire sont une première approche de phylogénie à approfondir mais nous arrivons à la conclusion que ce variant, tout en ayant un lien de parenté avec le téléomorphe *Arthroderma benhamiae*, se distingue des autres espèces du complexe *mentagrophytes* et constitue un groupe à part dans la taxonomie de ce complexe.

Ce nouveau variant *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae* est à suspecter devant toute épidermophytie de la peau glabre d'un patient en relation avec les cochons d'Inde.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. Badillet
Dermatophyties et Dermatophytes.
Atlas Clinique et biologique (3e ed). Paris: Editions Varia, 1991
- [2] D. Chabasse, Cl Guiguen, N. Contet-Audonneau
Mycologie médicale.
Editions Masson, collections Abrégés, 1999
- [3] D. Chabasse
Les dermatophytes : d'où viennent-ils ? Comment sont-ils devenus des parasites ?
Journal de Mycologie Médicale (2008); 18 : 27-35
- [4] N. Contet-Audonneau
Dermatophyties
Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Biologie clinique
- [5] Bioforma
Les dermatophytes.
Cahier de formation Biologie Médicale n°31, 2004
- [6] D. Chabasse, N. Contet-Audonneau, JP. Bouchara, AM. Basile
Moisissures-Dermatophytes-Levures/ Du prélèvement au diagnostic.
Editions Biomérieux
- [7] R. Vanbreuseghem, Ch. De Vroey, M. Takashio
Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire.
Editions Masson, 1978
- [8] KJ. Kwon-Chung, Ph. D., John E, Bennett, M.D
Medical Mycology.
Lea and Febiger, 1992
- [9] RC. Summerbell
Form and function in the evolution of dermatophytes.
Revista Iberoamericana de Micologia, 2000
- [10] F. Symoens, O. Jousson, C. Planard, M. Fratti, P. Staib, Mignon B., M. Monod
Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex.
International Journal of Medical Microbiology (2010)
- [11] D. Chabasse, M. Pihet, JP. Bouchara
Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine: revue générale.
Revue francophone des laboratoires, novembre 2009- n°416
- [12] A. Zagnoli, B. Chevalier, B. Sassolas
Dermatophyties et dermatophytes.
Encycl. Méd. Chir. (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier), Maladies infectieuses, 8-614-A-10, (2003), 14p

- [13] A. Baldo, A. Mathy, S. Vermout, J. Tabart, B. Losson, B. Mignon
Les mécanismes d'adhérence des champignons responsables de mycoses superficielles.
Ann. Méd. Vét., (2007) ,151 :192-199
- [14] A. Baldo, M. Monod, A. Mathy, L. Cambier, E.T. Bagut, F. Defaweux, F. Symoens, N. Antoine, B. Mignon
Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes.
Mycoses DOI:10.1111/j-1439-0507.2011.02081.x, 11 Aug (2011)
- [15] L. duek, G. Kaufman, Y. Ulman, I. Berdicevsky
The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections.
J. Infect. (2004); Feb, 48(2):175-80
- [16] N. Contet-Audonneau
Teignes du cuir chevelu.
Encycl. Méd. Chir (éditions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), AKPS Encyclopédie Pratique de Médecine, 8-0926, 2003,5p.
- [17] R. Baran, D. Chabasse, M. Feuilhade de Chauvin
Les onychomycoses.
J. Mycol. Med. (2001); 11: 5-13
- [18] Groupe de travail de la Société Française de Dermatologie
Onychomycoses : modalités de diagnostic et prise en charge.
Ann. Dermatol. Venereol. (2007); 134: 5 Supplément 7-16
- [19] I. Weitzman, RC. Summerbell
The dermatophytes.
Clinical Microbiology Reviews, (1995); Apr, p.240-259
- [20] SR. Almeida
Immunology of dermatophytosis.
Mycopathologia (2008) nov-dec; 166 (5-6) 277-83
- [21] JA. Woodfolk
Allergy and dermatophyte.
Clin. Microbiol. Rev. (2005) January; 18(1):30-43
- [22] P. Hochedez P., A. Datry, E. Caumes
Mycoses superficielles.
EMC, Traité de Médecine Akos (2007); 4-1380
- [23] D. Chabasse, M. Pihet
Les dermatophytes : les difficultés du diagnostic mycologique.
Revue Francophone des Laboratoires, (2008) novembre - n°406
- [24] N. Contet-Audonneau
Le prélèvement mycologique en dermatologie.
Nouv. Dermatol. 2006 ; 25 : Suppl.5 : 1-28
- [25] S.Gromadzki, R. Ramani, V. Chaturvedi
Evaluation of new medium for identification of dermatophytes and primary dimorphic pathogens.
Journal of Clinical Microbiology, January (2003), p. 467-468, Vol. 41, No. 1

- [26] K. Gupta Aditya, Q. Tu Linh
Dermatophytes : diagnosis and treatment.
J. Am. Acad. Dermatol., (2006) June, volume 54, number 6
- [27] C. De Bièvre, C. Dauguet, V.H. Nguyen, O. Ibrahim-Granet
Polymorphism in mitochondrial DNA of several *Trichophyton rubrum* isolates from clinical specimens.
Ann. Inst. Pasteur Microbiol. (1987); 138: 719-27
- [28] K. Nishio, M. Kawasaki, H. Ishizaki
Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis.
Mycopathologia (1992); 117: 127-32
- [29] T. Mochizuki, K. Takada, S. Watanabe, M. Kawasaki, H. Ishizaki
Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA.
J. Med Vet. Mycol. (1990); 28:191-6
- [30] M. Kawasaki, H. Ishizaki, M. Aoki, S. Watanabe
Phylogeny of *Nannizzia incurvata*, *N. gypsea*, *N. fulva* and *N. otae* by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA.
Mycopathologia (1990); 112: 173-7
- [31] A. Kamiya, A. Kikuchi, Y. Tomita, T. Kanbe
PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis.
Journal of Dermatological Science (2004); 34: 35-48
- [32] J. Ding, J. Li, Z. Liu, Z. Tan
Clinical identification of common species of dermatophytes by PCR and PCR-RFLP.
J. Huazhong. Univ Sci Technolog. Med Sci. 2004. 24(6):642-644
- [33] G. He, J. Li, J. Ding, Z. Tan
Identification of common species of dermatophytes by PCR-RFLP
J Huazhong. Univ Sci Technolog. Med Sci. 2005. 25(4): 458-460
- [34] A. Dobrowolska, P. Staczek, A. Kaszuba, M. Kozłowska
PCR-RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in central Poland.
Letter to the editor, Journal of Dermatological Science (2006) 42, 71-74
- [35] R. Bagyalakshmi, B. Senthilvelan, K.L. Therese, S. Murugusundram, H.N. Madhavan
Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens.
Indian J Dermatol. (2008)53(1):15-20
- [36] O. Bontems, P.M. Hauser and M. Monod
Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis.
British Journal of Dermatology (2009); 161, pp791-796
- [37] J. Garg, R. Tilak, S. Singh, A.K. Gulati, A. garg, P. Prakash, G. Nath
Evaluation of Pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis.
Journal of Clinical Microbiology, Oct.2007, p. 3443-3445

- [38] M. Ebihara, K. Makimura, K. Sato, S. Abe, R. Tsuboi R
Molecular detection of dermatophytes and non dermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences.
British Journal of Dermatology (2009), 161, pp1038-1044
- [39] T. Uchida, O. Makimura, K. Ishihara, H. Goto, Y. Tajiri, M. Okuma, R. Fujisaki, K. Uchida, S. Abe, M. Iijima
Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples.
Journal of Dermatology (2009); 36: 202-208
- [40] C. Savin, S. Huck, C. Rolland, M. Benderdouche, O. Faure, G. Noacco, J. Menotti, E. Candolfi, H. Pelloux, R. Grillot R, S. Coupe, F. Derouin
Multicenter evaluation of a commercial PCR-enzyme-linked immunosorbent assay diagnostic kit (onychodiag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis.
Journal of Clinical Microbiology, Apr. 2007 p. 1205-1210
- [41] Y. Gräser Y, J. Scott, R. Summerbell
The new species concept in dermatophytes - a polyphasic approach.
Mycopathologia (2008) Nov-Dec; 166(5-6):239-56.
- [42] B. Beifuss, G. Bezold, P. Gottlober, C. Borelli, J. Wagener, M. Schaller, HC. Korting
Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24h PCR-ELISA technique open to protocol transfer.
Mycoses (2011) March; volume 54, issue2, p 137-145
- [43] M. Arabatzis, LES. Bruijnesteijn van Coppenraet, EJ. Kuijper, GS. De Hoog, APM. Lavrijsen, K. Templeton
Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme.
British Journal of Dermatology (2007) 157, pp681-689
- [44] AM. Bergsmans, LM. Scouls, M. Van der Ent, A. Klaassen, N. Böhm, RGF. Winternans
Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples.
Clinical Microbiology and Infection; Volume 14 number 8, August 2008: 778-788
- [45] AM. Bergmans, M. Van der Ent, A. Klaassen, N. Böhm, G.I. Andriessse, R.G.F. Winternans
Evaluation of a single tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material.
Clin Microbiol Infect. Volume 16, Issue 6, June 2010: p704-710
- [46] R. Gutzmer, S. Mommert, U. Küttler, T. Werfel, A. Kapp
Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR.
Journal of Medical Microbiology (2004), 53, 1207-1214
- [47] R. Kano, Y. Nakamura, T. Watari, S. Watanabe, H. Takahashi, H. Tsujimoto, A. Hasegawa
Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*.
Current Microbiology vol.37 (1998), pp.236-239
- [48] S. Neji, F. Makni, H. Sellami, F. Cheikhrouhou, A. Sellami, A. Ayadi
Molecular identification of dermatophytes isolated in Sfax-Tunisia.
Journal de mycology Médicale (2010); 20: 85-90

- [49] B. Ninet, I. Jan, O. Bontems, B. L  chenne, O. Jousson, R. Panizzon, D. Lew, M. Monod
Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit.
Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2003, p. 826-830
- [50] H.C. Li, J.P. Bouchara, M.M.L. Hsu, R. Barton, S. Su, T.C. Chang
Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions.
J Med Microbiol 57 (2008), 592-600
- [51] T. Kanbe
Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis.
Mycopathologia (2008), 166:307-317
- [52] C.J. Jackson
Molecular identification and strain typing of dermatophyte fungi.
Nippon Ishinkin. Gakkai Asshi (2001); 42(1):7-10
- [53] C.J. Jackson, R.C. Barton, E.G.V. Evans
Species identification and strain differentiation of dermatophytes fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions.
Journal of Clinical Microbiology (1999) Apr.: p.931-936
- [54] F. Kong, Z. Tong, X. Chen, T. Sorrell, B. Wang, Q. Wu, D. Ellis, S. Chen
Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification.
J Clin Microbiol (2008) Apr. (46)4 : 1192-9
- [55] K. Makimura
Species identification system for dermatophytes based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1.
Nippon Ishinkin. Gakkai Zasshi (2001); 42(2): 61-67
- [56] G. Kac, M.E. Bougnoux, M. Feuilhade, S. Sen  , F. Derouin
Differentiation d'isolats de *Trichophyton rubrum* et de *Trichophyton interdigitale* par la technique de random amplification of polymorphic DNA (RAPD).
Journal de Mycologie Médicale (1999); 9 : 39-41
- [57] G. Kac
Molecular approaches to the study of dermatophytes.
Med Mycol. (2000) Oct; 38(5):329-36
- [58] J. Dunand, C. De Bièvre, M.A. Rouffaud
Intérêt de la rapid-pcr dans l'identification des dermatophytes du genre *Microsporum*.
Journal de Mycologie Médicale (1999), 9 : 191-196
- [59] D. Liu, S. Coloe, J. Pedersen, R. Baird
Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton* dermatophytes.
FEMS Microbiol Lett. (1996); 136(2): 147-150
- [60] D. Liu, S. Coloe, R. Baird, J. Pedersen
Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction.
British Journal of Dermatology (1997);137(3): 351-355

- [61] D. Liu, S. Coloe, R. Baird, J. Pedersen
Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi.
J Med Microbiol. (2000); 49(6):493-497
- [62] S.A. Howell, R.J. Barnard, F. Humphreys
Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections.
J Med Microbiol. (1999), 48(1): 33-40
- [63] Y. Gräser, M. El Fari, W. Presber, W. Sterry, H.J. Tietz
Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions.
British Journal of Dermatology (1998); 138: 576-582
- [64] E. Faggi, G. Pini, E. Campisi, C. Bertellini, E. Difonzo, F. Mancianti
Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes.
Journal of Clinical Microbiology, (2001) Sept.; p.3382-3385
- [65] E. Faggi, G. Pini, E. Campisi
PCR fingerprinting for identification of common species of dermatophytes.
J Clin Microbiol. (2002), 40(12):4804-4805
- [66] C.J. Jackson, T. Mochizuki, R.D. Barton
PCR fingerprinting of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* using polymorphic subrepeat loci in the rDNA nontranscribed spacer.
Journal of Medical Microbiology (2006), 55, 1349-1355
- [67] M. Kawasaki, K. Anzawa, A. Wakasa, K. Takeda, T. Mochizuki, H. Ishizaki, B. Hemashettar
Matings among three teleomorphs of *Trichophyton mentagrophytes*.
Jpn. J.Med.Mycol. (2010) vol.51, p. 143-152
- [68] O. Jousson, B. Léchenne, O. Bontems, S. Capoccia, B. Mignon, J. Barblan, M. Quadroni, M. Monod
Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalsin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*.
Microbiology (2004) Feb. ; 150: 301-10
- [69] K. Makimura, T. Mochizuki, A. Hasegawa, Uchida K., H. Saito, H. Yamaguchi
Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions.
Journal of Clinical Microbiology (1998) Sept.; p.2629-2693
- [70] Y. Gräser, M. El Fari, R. Vilgalys, AF. Kuijpers, GS. De Hoog, W. Presber, H. Tietz
Phylogeny and taxonomy of the family Arthrodermataceae (dermatophytes) using sequence analysis of the ITS region.
Med Mycol (1999) Apr.; 37(2):105-14
- [71] A. Hirai, R. Kano, Y. Nakamura, S. Watanabe, A. Hasegawa
Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences.
Antonie von Leeuwenhoek (2003) 83: 11-20
- [72] K. Makimura, Y. Tamura, T. Mochizuki, A. Hasegawa, Y. Tajiri, R. Hanazawa, K. Uchida, H. Saito, H. Yamaguchi
Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 region.
Journal of Clinical Microbiology (1999) Apr.; p.920-924

- [73] S. Heidemann, M. Monod, Y. Gräser
Signature polymorphism in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *Trichophyton mentagrophytes* sensu lato.
British Journal of Dermatology (2010); 162: pp 282-295
- [74] E. Fréalle, M. Rodrigue, N. Gantois, C.M. Aliouat, E. Delaporte, D. Camus, E. Dei-Cas, C. Kauffmann-Lacroix, J. Guillot, L. Delhaes
Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison.
Microbiology (2007); 153: 3466-3477
- [75] N. Contet-Audonneau, C. Leyer
Emergence d'un dermatophyte transmis par le cochon d'Inde et proche de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* : *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae*.
Journal De Mycologie Médicale (2010) Dec. ; p. 321-325
- [76] TC. White, BJ. Oliver, Y. Gräser, MR. Henn
Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes,
Eukaryotic Cell, Aug. 2008, p. 1238-1245, vol 7, N°8
- [77] I. Carbone, LM. Kohn
A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes.
Mycologia, 91(3), (1999), pp553-556
- [78] GC. Donaldson
Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes.
Appl. Environ. Microbiol, (1995) 61, p.1323-1330.
- [79] R. Kano, Y. Nakamura, T. Watari, S. Watanabe, H. Takahashi, H. Tsujimoto, A. Hasegawa
Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*.
Curr. Microbiol. 37 (4), 236-239 (1998)

TABLE DES ILLUSTRATIONS

➤ Liste des figures

<u>Figure 1</u> : Caractéristiques cliniques et biologiques des teignes.....	37
<u>Figure 2</u> : Intertrigo interdigito-plantaire à dermatophyte	41
<u>Figure 3</u> : Lésion plantaire à dermatophyte.....	41
<u>Figure 4</u> : Onychomycose disto-latérale.....	42
<u>Figure 5</u> : Leuconychie superficielle.....	42
<u>Figure 6</u> : Onychomycose proximale	43
<u>Figure 7</u> : Onychodystrophie totale.....	43
<u>Figure 8</u> : Intertrigo des grands plis	44
<u>Figure 9</u> : Epidermophytie circinée.....	44
<u>Figure 10</u> : Sycosis de la moustache	45
<u>Figure 11</u> : Aspect microscopique des cultures : fructifications et formations annexes.....	53
<u>Figure 12</u> : Aspects macroscopiques des cultures de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> sur milieux de Sabouraud (avec et sans actidione) et milieu DTM (à droite).....	56
<u>Figure 13</u> : Aspect microscopique d'une culture de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	56
<u>Figure 14</u> : Aspect macroscopique de colonies de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> sur milieu de Sabouraud.....	57
<u>Figure 15</u> : Aspects microscopiques d'une culture de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	58
<u>Figure 16</u> : Aspect macroscopique des colonies de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i> sur milieu de Sabouraud	59
<u>Figure 17</u> : Aspect microscopique d'une culture de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	60
<u>Figure 18</u> : Schéma de l'unité transcriptionnelle de l'ADN ribosomique des champignons... ..	62
<u>Figure 19</u> : Epidermophytie du menton chez la patiente SCH.....	74
<u>Figure 20</u> : Epidermophytie de l'abdomen chez la patiente HAV	74
<u>Figure 21</u> : Epidermophytie de la nuque et du dos chez la patiente URI.....	75
<u>Figure 22</u> : Prélèvement d'un cochon d'Inde	75
<u>Figure 23</u> : Schéma de la réaction de PCR.....	81
<u>Figure 24</u> : Migration électrophorétique	85
<u>Figure 25</u> : Examen direct de squames.....	88

<u>Figure 26</u> : Aspect macroscopique des colonies sur milieu de Sabouraud en boîte.....	89
<u>Figure 27</u> : Aspect macroscopique des colonies sur milieu de Sabouraud en tube.....	89
<u>Figure 28</u> : Activité uréasique négative sur milieu de Christensen à l'urée.....	90
<u>Figure 29</u> : Hydrolyse de la caséine sur milieu BCP.....	90
<u>Figure 30</u> : Aspect microscopique d'une souche de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>porcellae</i> sur milieu PDA après trois semaines de pousse.....	90
<u>Figure 31</u> : Epreuve de confrontation entre une souche de <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>porcellae</i> et la souche de référence <i>Arthroderma benhamiae</i> race africaine	91
<u>Figure 32</u> : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène de la bêta-tubuline.....	94
<u>Figure 33</u> : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène ITS	94
<u>Figure 34</u> : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène de la chitine synthase	94
<u>Figure 35</u> : Migration électrophorétique de produits d'amplification du gène de l'actine.....	94
<u>Figure 36</u> : Exemple d'un chromatogramme pour une des séquences obtenues.....	97
<u>Figure 37</u> : Alignements des séquences et mise en évidence des polymorphismes	98
<u>Figure 38</u> : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences de l'actine	110
<u>Figure 39</u> : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences de chitine synthase	111
<u>Figure 40</u> : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences de bêta-tubuline.....	112
<u>Figure 41</u> : Arbre phylogénétique construit à partir de l'alignement des séquences ITS	113
<u>Figure 42</u> : Arbre phylogénétique combiné construit à partir des alignements des gènes de l'actine, chitine synthase, bêta-tubuline et ITS	114

➤ Liste des tableaux

<u>Tableau I</u> : Classification de Sabouraud.....	21
<u>Tableau II</u> : Classification de Langeron et Milochevitch	22
<u>Tableau III</u> : Comparaison des trois grandes classifications des dermatophytes	24
<u>Tableau IV</u> : Correspondance des formes anamorphes et téléomorphes des dermatophytes (classification actuelle).....	27
<u>Tableau V</u> : Classification des dermatophytes selon leur habitat.....	29
<u>Tableau VI</u> : Caractéristiques des deux nouvelles catégories évolutives des dermatophytes	30
<u>Tableau VII</u> : Répartition des principaux dermatophytes selon l'origine géographique	32
<u>Tableau VIII</u> : Caractéristiques épidémiologiques des patients inclus dans l'étude	73
<u>Tableau IX</u> : Caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes cibles	82
<u>Tableau X</u> : Réalisation du mélange réactionnel pour PCR.....	83
<u>Tableau XI</u> : Caractéristiques morphologiques et biochimiques des <i>T. mentagrophytes</i> variétés <i>porcellae</i> et <i>erinacei</i>	92
<u>Tableau XII</u> : Souches utilisées pour l'étude moléculaire.....	95
<u>Tableau XIII</u> : Séquences issues de la base de données GenBank	96
<u>Tableau XIV</u> : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant la région ITS	101
<u>Tableau XV</u> : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant pour la chitine synthase	103
<u>Tableau XVI</u> : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant pour la bêta tubuline.....	105
<u>Tableau XVII</u> : Polymorphismes nucléotidiques des séquences du gène codant pour l'actine	107
<u>Tableau XVIII</u> : Profils de séquençage en fonction du gène et de la souche étudiée	108

ANNEXES

Annexe 1 : Fiche de renseignements cliniques patients.

ETIQUETTE DU PATIENT

patient adressé par le Dr

N°DOSSIER :

DATE DE PRELEVEMENT :

1° prélèvement : Oui ☐ Non ☐

2° prélèvement : Oui ☐ Non ☐

Origine géographique:

Voyages : Oui ☐ Non ☐

Animaux : Oui ☐ Non ☐

Profession :

Régions :

Lesquels :

LOCALISTION

CORPS (thorax-dos-épaule-abdomen-fesse-anal-pubis)

VISAGE (front-œil-nez-oreille-joue-menton-nuque-cou-tempe-sourcils)

BOUCHE (lèvres-palais-langue-appareil dentaire-perlèche)

ONGLES

CUIR CHEVELU

MAIN(poignet-doigt-interdigital-pulpe-périonyxis-paume-dos)

PIED (cheville-talon-interorteils-plante-dessus-dos-avant-)

PLI (inguinal-interfessier-axillaire-sous mammaire)

GENITAL



LESION

-anomalie de coloration de l'ongle	Oui ☐	Non ☐
-hyperkératose	Oui ☐	Non ☐
-onycholyse	Oui ☐	Non ☐
-atteinte matricielle	Oui ☐	Non ☐
-onychopathie	Oui ☐	Non ☐
-périonyxis	Oui ☐	Non ☐
-intertrigo	Oui ☐	Non ☐
-autres	Oui ☐	Non ☐

INFLAMMATION

Pityriasis versicolor Oui ☐ Non ☐

Dermite séborrhéique Oui ☐ Non ☐

Folliculite Oui ☐ Non ☐

TRAITEMENT

En cours par

-antifongiques : Oui ☐ Non ☐

-corticoïdes : Oui ☐ Non ☐

-immunosuppresseurs : Oui ☐ Non ☐

-autre Oui ☐ Non ☐

Lequel :

Arrêt du traitement depuis le

Annexe 2 : Eclaircissants pour examen direct.

➤ Lactophénol d'Amman :

Phénol (acide phénique)	10 g
Acide lactique	10 g
Glycérine	20 g
Eau distillée	10 mL

➤ Chloral-lactophénol :

Hydrate de chloral	20 g
Phénol	10 g
Acide lactique	10 mL

➤ Solution de noir chlorazole

Dissoudre 5 g d'hydroxyde de potassium dans 90 mL d'eau distillée.

Parallèlement, dissoudre 100 mg de noir chlorazole E (Sigma) dans 10 mL de diméthylsulfoxyde. Verser la solution de noir chlorazole dans la solution d'hydroxyde de potassium.

Annexe 3 : Milieux d'isolement.

➤ Milieu de Sabouraud simple :

Néopeptone	10 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
pH : 5 - 5,6	

Autoclaver pendant 15 minutes à 115°C.

Conservation pendant un à deux mois à 4°C

➤ Milieux de Sabouraud additionnés d'antibiotiques :

Chloramphénicol 0,5 g/L

Gentamicine 0,01 à 0,1 g/L

➤ Milieux de Sabouraud-Actidione :

Cycloheximide 0,5 g/L

(Le cycloheximide doit être solubilisé au préalable dans 2 mL d'acétone.

➤ Milieu DTM (dermatophyte Test Medium) de Taplin :

Phytone	10 g
Glucose	20 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

Porter à ébullition et ajouter 40 mL de solution de rouge de phénol (0,5 g de rouge de phénol – 15 mL NaOH 0,1N – eau distillée 85 mL)

HCl 0,8N	6 mL
Cycloheximide	0,5 g
Chloramphénicol	0,5 g
pH : 5,5	

Autoclaver 15 minutes à 120°C. Ce milieu de culture, commercialisé par la société bioMérieux, vire au rouge avec tous les dermatophytes (mais également certaines moisissures.

Annexe 4 : Colorants pour examen microscopique des cultures.

➤ Solution de Bleu de toluidine

Bleu de toluidine	300 mg
Eau distillée	60 mL
Acide sulfurique concentré	2 mL
Ethanol	140 mL

➤ Bleu coton au lactophénol :

Phénol	20 mL
Acide lactique	20 mL
Glycérine	40 g
Bleu coton (bleu de Poirier)	0,5 g
Eau distillée	20 mL

Annexe 5 : Milieux d'identification.

Seuls les milieux de de Borelli et PDA sont commercialisés.

➤ Milieu lactrimel de Borelli

Farine de blé	14 g
Lait écrémé en poudre	14 g
Miel pur	7 g
Agar	20 g
Chloramphénicol	0,5 g
Cycloheximide	0,5 g
Eau distillée	1000 mL

➤ Milieu PDA (potato – dextrose – agar)

Difco™ Potato – dextrose – agar	39 g
Eau distillée	1000 mL
pH : 5,6	

➤ Milieu de Baxter (Milieu de Lab-Lemco)

Lab-Lemco (Oxoid)	2,5 g
Glucose	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

➤ Milieu à l'urée de Christensen

SOLUTION A	
Peptone tryptique	1 g
Glucose	1 g
Dihydrogénophosphate de potassium	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Rouge de phénol	0,12 g
Urée	20 g
Eau distillée	1000 mL

MILIEU DE BASE	
Agar	15 g
Eau distillée	900 mL

Préparer la solution A et la stériliser par filtration.

Préparer le milieu de base en solubilisant l'agar par chauffage à ébullition.

Ajuster le pH à 6,8 – 7. Répartir en tubes à vis à raison de 9 mL par tube, et autoclaver pendant 15 minutes à 121°C. Au moment de l'emploi, incorporer 1 mL de la solution A dans le milieu de base maintenu en surfusion. Homogénéiser et incliner les tubes.

➤ Milieu au Bromocrésol pourpre (BCP)

SOLUTION A	
Lait écrémé en poudre	80 g
Solution alcoolique de BCP 1,6%	2 mL
Eau distillée	1000 mL

SOLUTION B	
Glucose	40 g
Agar	30 g
Eau distillée	1000 mL

Autoclaver les deux préparations séparément (à 115°C pendant 8 minutes pour la solution A, à 120°C pendant 15 minutes pour la solution B). Refroidir à 45 °C avant de mélanger les deux préparations. Homogénéiser, puis répartir en tubes stériles. Le pH final est d'environ 6,6.

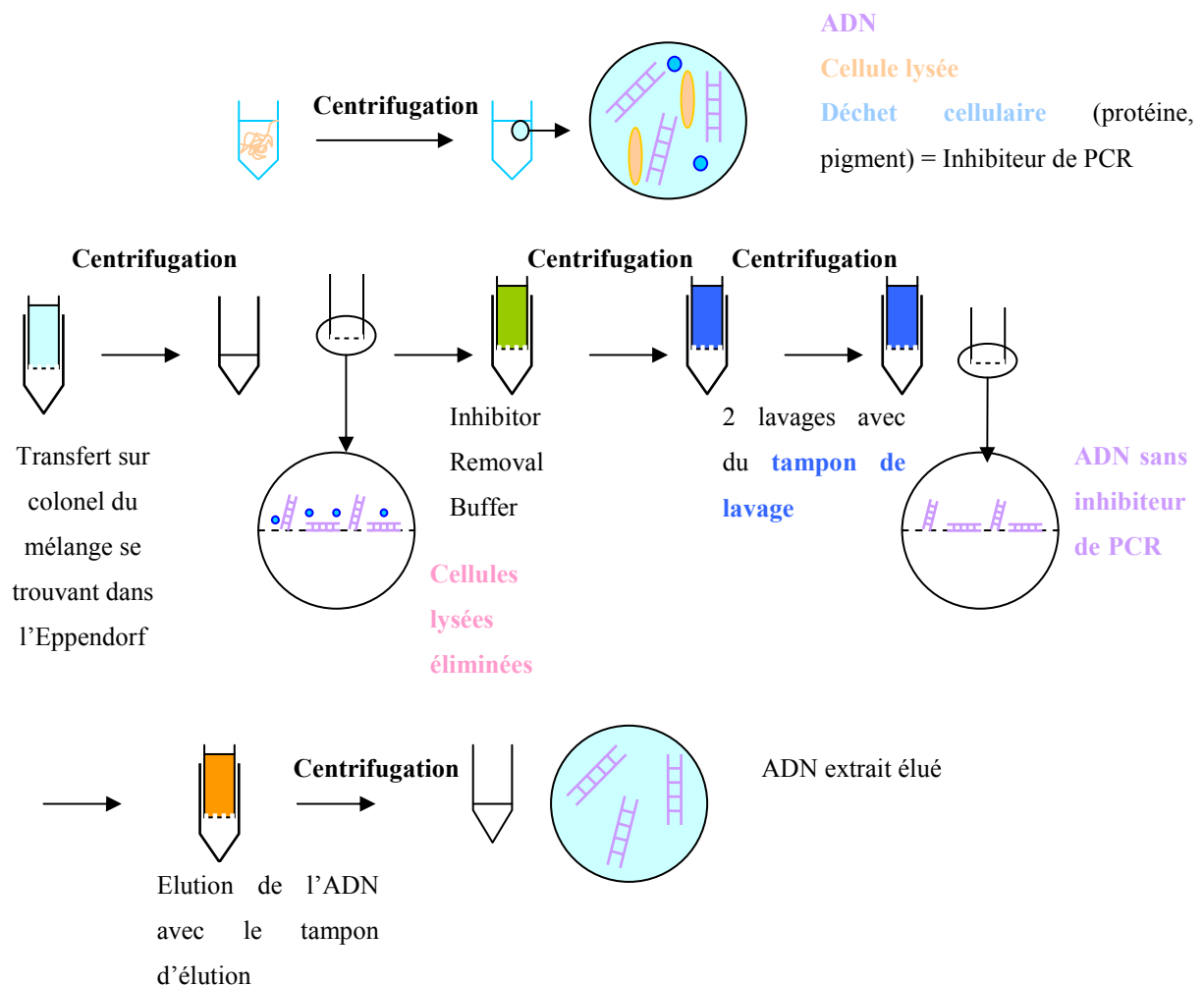
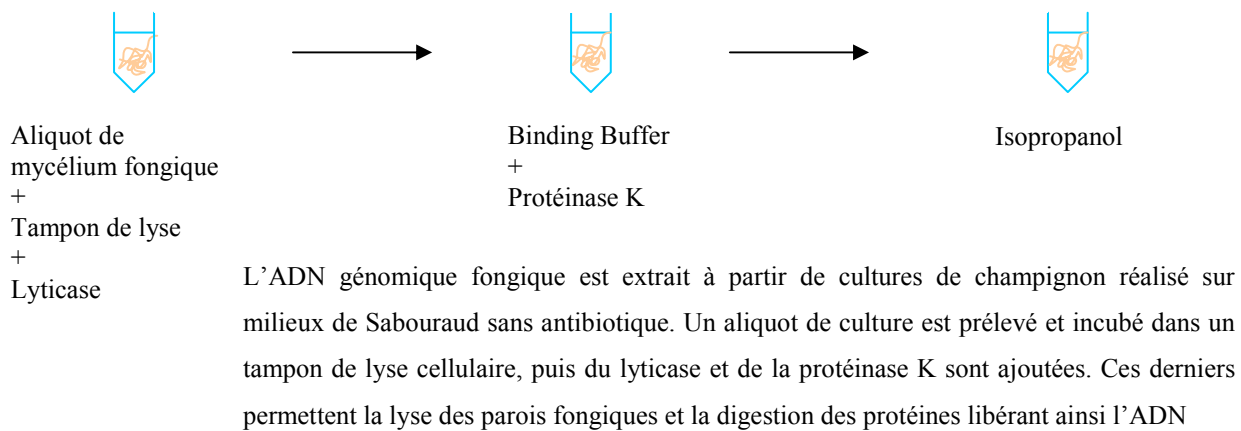
➤ Milieu de Takashio (Sabouraud dilué)

Glucose	2 g
Néopeptone	1 g
MgSO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL
pH : 6,2	

Annexe 6 : Schéma du protocole d'extraction des dermatophytes.

Extraction d'ADN fongique : Kit High pure PCR template

Préparation, Roche



DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Mercredi 19 Octobre 2011, 17h

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Anne-Laure CHARLENT

Sujet :

**Le complexe *Trichophyton mentagrophytes*,
Caractérisation mycologique et moléculaire d'un
nouveau variant : *Trichophyton mentagrophytes*
var. *porcellae***

Jury :

Président : Monsieur le Professeur C. GANTZER
Directeur : Madame le Docteur M. MACHOUART

Juges : Monsieur le Professeur JL. SCHMUTZ
Madame le Docteur N. CONTET-AUDONNEAU

Vu,

Nancy, le 20.09.2011

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. le Pr C. GANTZER

Mme le Dr M. MACHOUART



Vu et approuvé,

Nancy, le 20.09.2011

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,



Francine PAULUS



Vu,

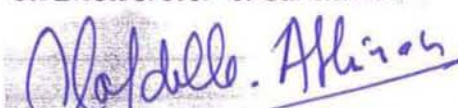
Nancy, le 20.9.2011

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président

et par Délégation.

La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,



C. CAPDEVILLE-ATKINSON
Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement : 3768

N° d'identification :

TITRE

**Le complexe *Trichophyton mentagrophytes*,
Caractérisation mycologique et moléculaire d'un nouveau variant :
Trichophyton mentagrophytes var. *porcellae***

Thèse soutenue le Mercredi 19 Octobre 2011, 17h

Par Anne-Laure CHARLENT

RESUME :

Depuis 2008, dermatologues et biologistes ont constaté l'émergence d'une nouvelle espèce de dermatophyte pathogène pour l'homme et transmise par le cochon d'Inde.

Notre étude a permis de caractériser ce nouveau dermatophyte selon des critères d'identification morphologiques et moléculaires, et de le positionner dans un arbre phylogénétique du complexe *Trichophyton mentagrophytes*.

Ce nouveau variant *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae* est à suspecter devant toute épidermophytie de la peau glabre d'un patient en relation avec les cochons d'Inde.

MOTS CLES : Dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae*, identification, biologie moléculaire, PCR, taxonomie, cochon d'Inde

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature	
<u>Madame le Docteur Marie MACHOUART</u>	<u>Laboratoire de Mycologie/parasitologie</u>	Expérimentale	+
		Bibliographique	□
		Thème	5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle

