

## Listes des Figures

---

<b>Figure 1</b> : Macrocinidies du genre <i>Epidermophyton</i> .....	4
<b>Figure 2</b> : Macroconidies et microconidies du genre <i>Microsporum</i> .....	5
<b>Figure 3</b> : Macroconidies et microconidies du genre <i>Trichophyton</i> .....	5
<b>Figure 4</b> : Répartition géographique des espèces microsporiques (A) et aire de répartition des espèces trichophytique (B).....	6
<b>Figure 5</b> : Aspect clinique des différentes types teignes du cuir cheveu, teigne tondante microsporique (A), teigne tondante trichophytique (B), teigne inflamatoire ou kérion (C) et teigne favique (D).....	9
<b>Figure 6</b> : Epidermophyties confluentes de deux avant bras .....	10
<b>Figure 7</b> : Onychomycodystrophie totale des ongles de la main épargnant le pouce .	11
<b>Figure 8</b> : Materiel nécessaire pour le prélèvement des dermatophytoses .....	13
<b>Figure 9</b> : Examens direct des squames montrant des filaments dermatophytiques arthrosporés (x40) .....	14
<b>Figure 10</b> : Parasitismes pilaires ecto-endothrix (A) et endothrix (B).....	15
<b>Figure 11</b> : Examen macroscopique de quelque dermatophytes.....	17
<b>Figure 12</b> : Les ornementations chez les dermatophytes .....	18
<b>Figure 13</b> : Réprésentation schématique des espaces internes transcrits .....	22
<b>Figure 14</b> : Automate d'extraction EZ1 Advanced XL, Qiagen® .....	30
<b>Figure 15</b> : Procédure de l'EZ1 DNA investigator.....	31
<b>Figure 16</b> : Egel® Imager .....	33
<b>Figure 17</b> : Séquenceur 3500 XL Genetic Analyser® .....	35
<b>Figure 18</b> : Répartition de la population selon la classe d'âge .....	37

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau I</b> : Amorces universelles ITS et régions amplifiées .....	32
<b>Tableau II</b> : Distribution des souches de dermatophytes selon le site d'isolement ....	38
<b>Tableau III</b> : Les différentes espèces identifiées par la méthode phénotypique (n = 32) .....	39
<b>Tableau IV</b> : Les différentes espèces identifiées par séquençage de la région ITS (n = 32) .....	39
<b>Tableau V</b> : Les discordances d'identification entre les méthodes phénotypique et moléculaire (n = 5) .....	40

## **Liste des Abréviations**

---

<b>ACEGID</b>	: <i>Africain Center of Excellence in genomic Infectious Diseases</i>
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>BCP</b>	: Bromocrésol pourpre
<b>BHI</b>	: <i>Brain Heart Infusion</i>
<b>BLAST</b>	: <i>Basic Local Alignement Search Tool</i>
<b>CHU</b>	: Centre Hospitalier Universitaire
<b>EPD</b>	: Epidermophytie
<b>ET</b>	: Efficacité Thérapeutique
<b>HALD</b>	: Hôpital Aristide Le Dantec
<b>HTS</b>	: <i>High Throughput Screening</i>
<b>IGS</b>	: <i>Intergenic Spacer</i>
<b>IHU</b>	: Institut Hospitalo-Universitaire
<b>IIO</b>	: Intertrigo Inter-orteils
<b>ITS</b>	: <i>Internal Trancribed Spacer</i>
<b>KOH</b>	: Hydroxyde de potassium
<b>LPM</b>	: Laboratoire Parasitologie-Mycologie
<b>MALDI-TOF</b>	: <i>Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation, Time Of Flight</i>
<b>MS</b>	: <i>Mass Spectrometry</i>
<b>pb</b>	: Paires de base
<b>PCR</b>	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>RAPD</b>	: <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<b>RFLP</b>	: <i>Restriction Fragments Length Polymorphism</i>
<b>SC</b>	: Sabouraud-Chloramphénicol
<b>SCA</b>	: Sabouraud-Chloramphénicol-Actidione
<b>SCG</b>	: Sabouraud-Chloramphénicol-Gentamicine
<b>SIDA</b>	: Syndrôme d'Immunodéficience Aquise
<b>TBE</b>	: Tris Borate EDTA
<b>TCC</b>	: Teigne de cuir chevelu
<b>USAID</b>	: <i>United States Agency for international development</i>
<b>VIH</b>	: Virus d'Immunodéficience humaine

## Sommaire

---

<b>Remerciements et Dédicaces .....</b>	<b>II</b>
<b>Hommages .....</b>	<b>VI</b>
<b>Illustrations.....</b>	<b>IX</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>Première PARTIE : Rappels bibliographiques.....</b>	<b>1</b>
1. GENERALITES SUR LES DERMATOPHYTES ET LES DERMATOPHYTOSES.....	3
1.1. Les dermatophytes .....	3
1.1.1 Taxonomie et Classification .....	3
1.1.2 Morphologie.....	4
1.1.3 Origine et mode de contamination .....	6
1.1.4 Répartition géographique .....	6
1.2. Les dermatophytoses.....	7
1.2.1 Facteurs favorisants.....	7
1.2.2 Aspects cliniques .....	7
1.2.2.1 Les teignes du cuir chevelu ou <i>tinea capitis</i> .....	8
1.2.2.2 Les épidermophyties ou <i>tinea corporis</i> .....	10
1.2.2.3 Les onychomycoses ou <i>tinea unguium</i> .....	10
1.2.2.4 Les autres atteintes dermatophytiques .....	11
1.3. Diagnostic biologique des dermatophytoses.....	12
1.3.1 Le prélèvement.....	12
1.3.2 Examen direct .....	14
1.3.3 Cultures .....	15
1.3.4 Identification des dermatophytes .....	16
1.3.4.1 Examen macroscopique des cultures .....	16
1.3.4.2 Examen microscopique des cultures .....	17
2. APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE A L'IDENTIFICATION DES DERMATOPHYTES.....	20
2.1. Etude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) .....	20
2.2. La technique d'amplification aléatoire du fragment d'ADN polymorphe (RAPD) .....	20
2.3. Le séquençage du gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse de la chitine (la chitine synthase).....	21
2.4. Le séquençage de la région ITS .....	21
<b>Deuxième PARTIE : Travail Expérimental .....</b>	<b>23</b>
1. CADRE D'ETUDE.....	24
1.1. Le CHU Aristide Le Dantec .....	24
1.2. Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Aristide Le Dantec .....	24
1.3. L'Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection .....	25
2. PERIODE ET TYPE D'ÉTUDE .....	25

3. POPULATION D'ÉTUDE .....	25
3.1. Critères d'inclusion .....	25
3.2. Critères de non inclusion .....	26
4. MATERIELS ET MÉTHODES .....	26
4.1. Matériel pour l'isolement, l'identification et la conservation des souches au laboratoire .....	26
4.2. Matériel pour l'étude moléculaire .....	27
4.3. Méthodes de l'étude .....	27
4.3.1 Méthodes d'isolement et d'identification des dermatophytes .....	27
4.3.1.1 Interrogatoire .....	27
4.3.1.2 Prélèvement .....	27
4.3.1.3 L'examen direct .....	28
4.3.1.4 Culture .....	29
4.3.1.5 Identification des dermatophytes .....	29
4.3.2 Identification moléculaire des dermatophytes (Séquençage) .....	29
4.3.2.1 Réisolement des souches de dermatophytes .....	30
4.3.2.2 Extraction de l'ADN .....	30
4.3.2.3 PCR d'amplification .....	32
4.3.2.4 Purification des produits PCR .....	34
4.3.2.5 PCR de séquençage .....	34
4.3.2.6 Purification des produits de séquençage et lancement du séquenceur .....	34
4.3.2.7 Comparaison des séquences aux banques de données .....	36
4.3.3 Analyse statistique .....	36
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>22</b>
5. RÉSULTATS .....	37
5.1. Caractéristique de la population d'étude .....	37
5.2. Répartition des souches de dermatophytes selon le type de lésion .....	37
5.3. Résultats de l'identification des souches selon la méthode phénotypique ..	38
5.4. Résultats de l'identification des souches selon la méthode moléculaire ..	39
5.5. Résultats comparatifs entre les méthodes phénotypique et moléculaire ..	40
6. DISCUSSION .....	41
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>35</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>43</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>44</b>

## **INTRODUCTION**

Les dermatophytes sont des champignons filamentueux microscopiques qui se caractérisent principalement par leur affinité particulière pour la kératine. Ce sont des eumycètes appartenant à la classe des Ascomycètes ; leur reproduction asexuée, observée sur les cultures au laboratoire, permet de décrire trois genres : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton*. Ils sont à l'origine, chez l'homme et l'animal, de lésions superficielles touchant la peau glabre (épidermophyties), les ongles (onychomycoses), les poils (folliculites) ou les cheveux (teignes) [1,2].

La teigne du cuir chevelu en particulier nécessite un traitement spécifique [3,4]. Gräser *et al*, ont cité plusieurs raisons pour lesquelles l'identification des dermatophytes jusqu'au niveau de l'espèce est importante [5]. Premièrement, ils ont donné les circonstances épidémiologiques favorisant la réinfection. En effet, *Microsporum canis* indique généralement une source animale, tandis que *Nannizzia gypsea* (ex *M. gypseum*), causant des lésions similaires, indique un contact avec un sol contaminé. Cette identification de la source de l'infection est importante pour une meilleure prise en charge. Deuxièmement, ils ont invoqué les schémas thérapeutiques spécifiques qui peuvent différer selon les espèces de dermatophytes ; par exemple, *Trichophyton tonsurans* agent de teigne du cuir chevelu a tendance à nécessiter des temps de traitement plus courts que *M. canis* qui, dans une certaine mesure, évite l'exposition au médicament en formant des arthroconidies à l'extérieur de la tige du cheveu. Troisièmement, la distinction des dermatophytes des pseudo-dermatophytes qui ne répondent pas au traitement anti-dermatophytique et provoquant des pseudodermatophytoses, a été soulignée en particulier dans l'onychomycose. L'exemple classique est une pseudodermatophytose à *Neoscytalidium dimidiatum*. De même, les dermatophytes doivent être distingués des champignons non pathogènes ressemblant aux dermatophytes, tels que *T. terrestris*, *Aphanoascus fulvescens* et *Myriodontium keratinophilum*, se développant régulièrement à partir de lésions dermatophytiques.

Récemment, la résistance à la terbinafine des isolats cliniques de *Trichophyton* est de plus en plus signalée en Asie, en particulier en Inde [6]. D'où encore l'importance de l'identification des dermatophytes jusqu'au niveau de l'espèce.

Les isolats de dermatophytes peuvent être identifiés jusqu'au genre et/ou à l'espèce par des méthodes phénotypiques, basées sur l'étude de leurs aspects macroscopiques et microscopiques ainsi que des tests biochimiques tels que le test à l'uréase de Christiansen's [3]. Ces méthodes phénotypiques peuvent être précises lorsqu'elles sont effectuées par des

techniciens qualifiés, en utilisant des référentiels normalisés pour reconnaître et identifier les caractéristiques exactes de l'espèce [7]. Toutefois, cette identification morphologique des espèces de dermatophytes en culture peut être parfois difficile ou incertaine car il existe des variations d'un isolat à l'autre et des caractères qui se chevauchent entre les espèces [4]. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des méthodes plus fiables d'identification des dermatophytes [7].

De plus en plus, des techniques de biologie moléculaire sont adaptées à l'identification des dermatophytes et sont plus efficaces que les tests classiques [8]. Plusieurs techniques d'analyse du génome des dermatophytes ont été proposées, et la stratégie basée sur le séquençage de fragments génomiques standardisés (*Barcode* ou code-barres ADN) est très utile pour une identification précise. Elles s'intègrent progressivement aux cotés des méthodes mycologiques classiques, tendant à se généraliser dans les laboratoires spécialisés dans le diagnostic et le suivi des infections fongiques. Le polymorphisme des espaces internes transcrits (ITS1 et ITS2) flanquant la séquence d'ADN codant pour l'ADNr 5.8S est très sensible et fiable pour distinguer les différentes espèces de dermatophytes [4, 8]. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposés de réaliser cette étude avec comme objectif principal de comparer les résultats de l'identification phénotypique et celle moléculaire par une analyse des séquences nucléotidiques de la région des espaces internes transcrits (ITS) d'une collection des souches cliniques de dermatophytes isolées au laboratoire de Parasitologie et Mycologie (LPM) de l'hôpital Aristide Le Dantec (HALD) de Dakar, Sénégal en 2017. Les objectifs secondaires seront de :

- répartir les souches de dermatophytes selon leur site d'isolement ;
- spécifier les concordances et discordances d'identification entre les méthodes phénotypique et moléculaire.

Cette présente étude sera articulée autour de deux (2) axes : la première partie sera consacrée à une synthèse bibliographique sur les dermatophytes, et les dermatophytoses ainsi que sur l'apport de la biologie moléculaire dans l'identification des dermatophytes ; la deuxième partie présentera les résultats obtenus au cours de ce travail, suivi de la discussion des résultats avant de finir par une conclusion et des recommandations.

**PREMIÈRE PARTIE: RAPPELS  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## 1. GENERALITES SUR LES DERMATOPHYTES ET LES DERMATOPHYTOSES

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux, au mycélium cloisonné produisant des spores (macroconidies, microconidies et chlamydospores). Ils appartiennent aux genres *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton*. Par leur reproduction sexuée, ils sont affiliés aux Ascomycètes, au genre *Arthroderma* et à l'ordre des Onygénales [2,9]. Cosmopolites, ils sont bien adaptés à la vie parasitaire en assimilant la kératine humaine et animale. Les dermatophytes ont trois origines : tellurique, animale et humaine. Des études phylogéniques ont montré que les espèces pathogènes rencontrées chez l'homme descendent d'espèces issues du sol. Le passage du sol à l'animal, puis de l'animal à l'homme semble être l'évolution phylogénique naturelle de ces champignons [10]. Les dermatophytes sont à l'origine de lésions chez l'homme appelées dermatophytoses. Ce sont les mycoses superficielles les plus fréquentes [2]. Elles touchent la peau (épiderme) et les phanères (cheveux, poils, ongles) et très exceptionnellement les muqueuses, les plis, les tissus sous-cutanés (granulomes, mycétomes) ou les viscères (maladie dermatophytique). Les dermatophytoses évoluent chez l'homme selon un mode chronique et volontiers récidivant, elles prennent des aspects cliniques très variés, d'où l'importance du prélèvement mycologique et du diagnostic qui doit être systématique avant la mise en œuvre du traitement spécifique.

### 1.1. Les dermatophytes

#### 1.1.1 Taxonomie et Classification

Les dermatophytes sont des Eumycètes appartenant à la classe des Ascomycètes ; leur reproduction asexuée, observée sur les cultures du laboratoire, permet de décrire trois genres [10] :

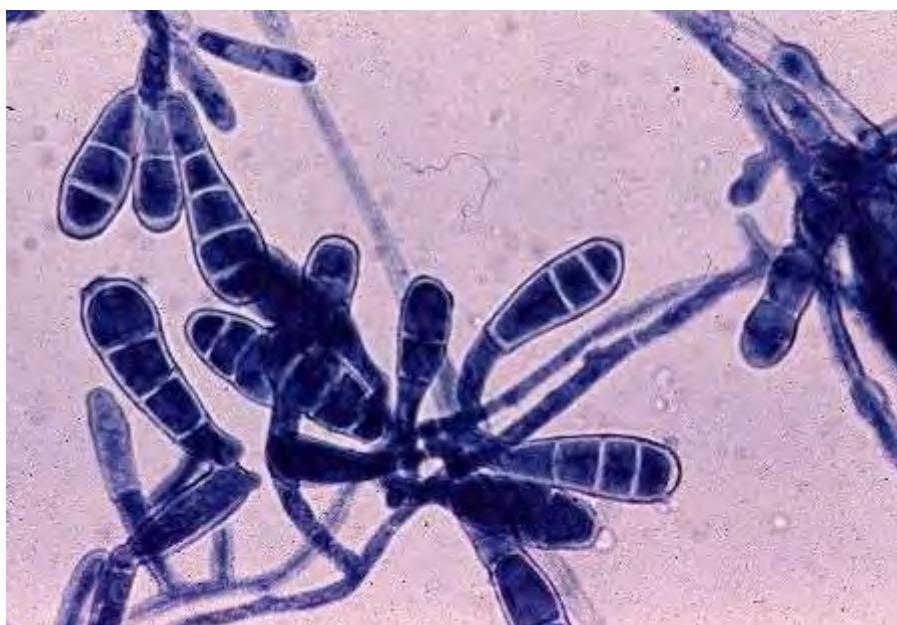
- le genre *Epidermophyton* qui ne comprend qu'une seule espèce, *E. floccosum* qui n'attaque jamais les cheveux, les poils ou les ongles ;
- le genre *Microsporum* qui regroupe une dizaine d'espèces dont cinq en pratique peuvent être retrouvées chez l'homme. Elles parasitent la peau et les cheveux mais attaquent rarement les ongles ;
- le genre *Trichophyton* est le genre dont est issu la majorité des dermatophytes (plus d'une vingtaine d'espèces répertoriées). En pratique, plus d'une dizaine seulement peuvent parasiter la peau et les phanères de l'homme [2,9].

Cependant, selon la taxonomie actuelle proposée et basée sur des données phylogénétiques [11], le genre *Trichophyton* contient 16 espèces, le genre *Epidermophyton* une espèce *E. floccosum*, le genre *Nannizzia* en contient neuf, le genre *Microsporum* contient trois espèces, *Lophophyton* une espèce, *Arthroderma* vingt et une espèces et *Ctenomyces* une espèce [11,12], mais des études plus détaillées restent nécessaires pour établir les limites des espèces. Chaque espèce a maintenant un seul nom valide. Deux nouveaux genres sont introduits : *Guarromyces* et *Paraphyton* [12].

### 1.1.2 Morphologie

Les trois genres de dermatophytes sont définis d'après les caractères morphologiques des éléments de reproduction asexués (macroconidies, microconidies et chlamydospores) rencontrés en culture [2,9].

Le genre *Epidermophyton* est caractérisé par des macroconidies en massue à parois et cloisons minces et par l'absence de microconidies. Une seule espèce, *Epidermophyton floccosum* intéresse la mycologie médicale (**Figure 1**).



**Figure 1 : Macroconidies du genre *Epidermophyton***

(Source : [https://fr.iliveok.com/health/lagent-causal-de-lepidermophyte-inguinal-epidermophyton-floccosum\\_70341i16099.html](https://fr.iliveok.com/health/lagent-causal-de-lepidermophyte-inguinal-epidermophyton-floccosum_70341i16099.html))

Le genre *Microsporum* est caractérisé par des macroconidies en fuseau, de grande taille, avec des parois épaisses à surface échinulée. Les microconidies sont piriformes (**Figure 2**).



**Figure 2 : Macroconidies et microconidies du genre *Microsporum***

(Source : [http://untori2.crihan.fr/unspf/2010\\_Paris\\_Simon\\_Mycologie\\_Medicale/co/092\\_microsporum.html](http://untori2.crihan.fr/unspf/2010_Paris_Simon_Mycologie_Medicale/co/092_microsporum.html))

Le genre *Trichophyton* est caractérisé par des macroconidies fusiformes, à parois toujours minces. Ces macroconidies peuvent être rares, voire absentes sur les milieux de culture usuels. Les microconidies sont rondes ou piriformes (**Figure 3**).



**Figure 3 : Macroconidies et microconidies du genre *Trichophyton***

(Source : <https://mycology.adelaide.edu.au/virtual/2007/ID2-Apr07.html>)

### 1.1.3 Origine et mode de contamination

Il est habituel et classique de classer les dermatophytes selon leur habitat originel. Ainsi, on distingue trois groupes d'espèces.

- **Les espèces anthropophiles**, parasites exclusivement humains, se transmettent soit directement par contact interhumain soit indirectement par le linge, les vêtements, le sol des salles d'eau, des piscines ou des plages, etc.
- **Les espèces zoophiles** se transmettent à l'homme par le contact d'un animal contaminé ou par l'intermédiaire de ses poils parasités.
- **Les espèces géophiles**, qui se trouvent dans le sol, sont plus rarement impliquées en pathologie humaine et se transmettent par contact avec un sol souillé [9,14].

### 1.1.4 Répartition géographique

Les dermatophytes sont cosmopolites. Toutefois, certaines espèces sont rencontrées particulièrement dans certaines parties du globe (Figure 4). Par exemple, *T. violaceum* en Afrique du Nord, *T. soudanense* en Afrique subsaharienne, *M. audouinii* en Afrique de l'Ouest et Centrale, *M. ferrugineum* en Asie et en Afrique du nord et *T. concentricum* en Asie notamment en Indonésie.

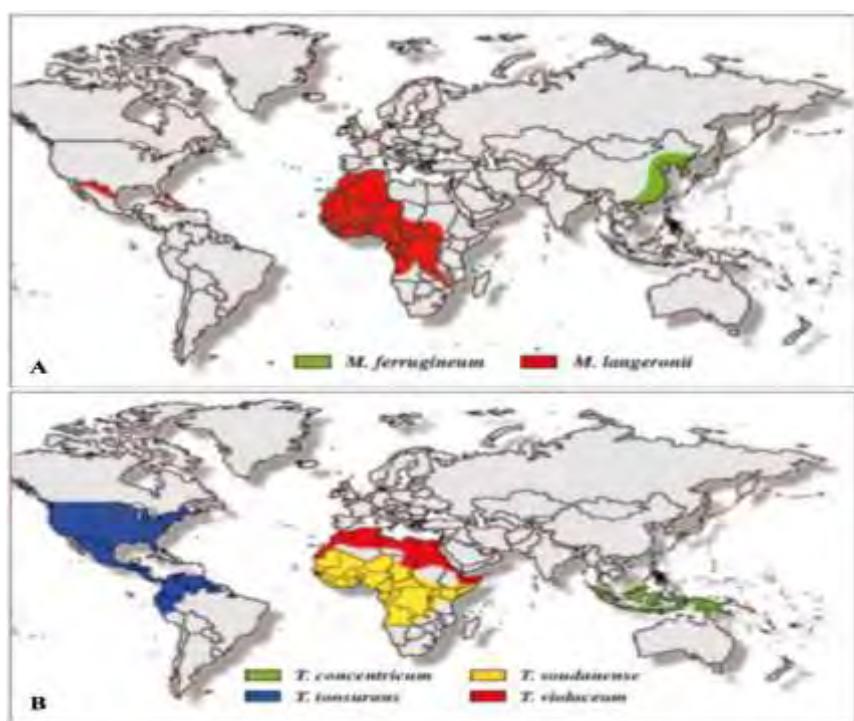


Figure 4 : Répartition géographique des espèces microsporiques (A) et aire de répartition des espèces trichophytique (B)[9]

## 1.2. Les dermatophytoses

### 1.2.1 Facteurs favorisants

Ils sont nombreux, d'ordre physiologique ou pathologique pour certains, mais le plus souvent lié au mode de vie (profession, loisirs, ...) [2,9]. Il convient de souligner en effet le rôle :

- **des facteurs hormonaux** : les teignes surviennent principalement chez l'enfant, et guérissent spontanément à la puberté pour la plupart ;
- **des facteurs immunologiques** : comme l'immunodépression liée à un SIDA, une corticothérapie, un traitement immunosupresseur, ou une chimiothérapie ;
- **de la profession** : agriculteurs, éleveurs de bovins et vétérinaires sont particulièrement exposés à une contamination par une espèce zoophile (*T. verrucosum* et *N. praecox*). De même, les maître-nageurs sont fréquemment sujets à des intertrigos interdigito-plantaires déterminés par des espèces anthropophiles (*T. rubrum*, *T. interdigitale*, ...) ;
- **de certaines habitudes** : en matière de coiffure chez les africains (rasage de garçons, nattage des filles), à l'origine de la transmission des dermatophytes anthropophiles (*M. audouinii*, *T. soudanense*, ...) ;
- **L'hygiène corporelle** : une ascension nette des dermatophytes est constatée lorsque l'hygiène est déficiente ;
- **La présence d'animaux de compagnie** : qui présente une éventuelle source de parasitisme des dermatophytes zoophiles ;
- **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 certains types de sports** : équestres, de la natation, des sports en salle (arts martiaux, gymnastique...).

### 1.2.2 Aspects cliniques

Les dermatophytes peuvent déterminer des infections de la peau glabre (*tinea corporis*), des ongles (onychomycose ou *tinea unguium*) et des cheveux (*tinea capitis*) [14,15]. Les aspects de ces différentes lésions doivent être parfaitement connus du préleveur.

### 1.2.2.1 Les teignes du cuir chevelu ou *tinea capititis*

Les teignes correspondent à l'atteinte des cheveux par un dermatophyte. On distingue trois types principaux (**Figures 5**) :

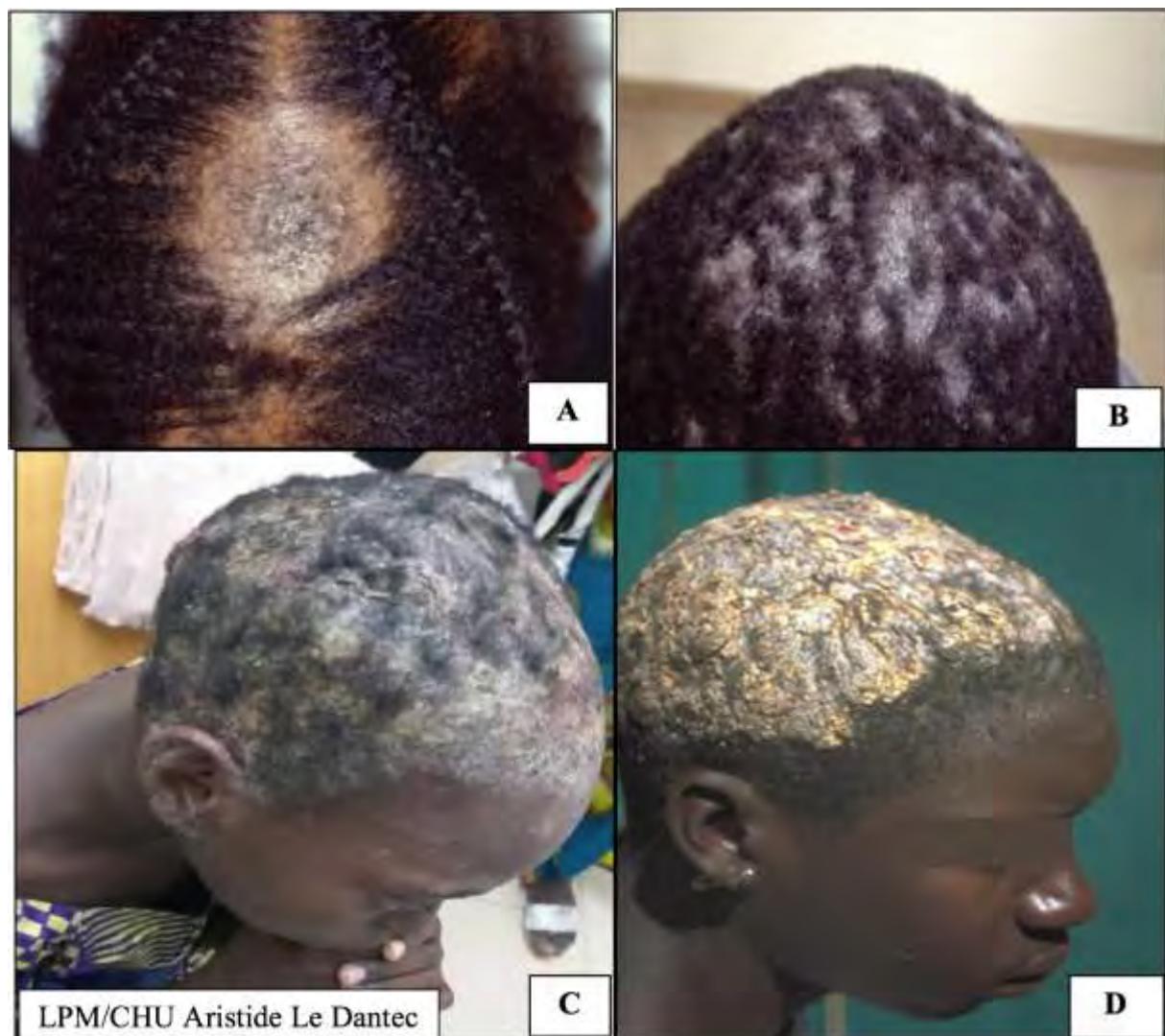
- **les teignes tondantes sèches**, à grandes plaques et petites spores dites microsporiques (**Figure 5A**), et à petites plaques dites trichophytiques (**Figure 5B**).

Pour les premières cités, elles sont dues aux dermatophytes appartenant au genre *Microsporum* : *M. audouinii*, *M. canis*, *M. ferrugineum* (d'où l'appellation : teignes microsporiques). Les plaques d'alopecie sont peu ou pas inflammatoires, de 1 à 3 cm de diamètre, les cheveux sont cassés à quelques millimètres du cuir chevelu, les plaques alopeciques ont un aspect grisâtre et sont habituellement fluorescentes en lumière de Wood [2,9,16]. Les teignes à petites plaques sont en revanche uniquement dues à des espèces anthropophiles du genre *Trichophyton* (*T. soudanense*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. tonsurans*). Les cheveux cassés courts au ras du cuir chevelu et sont englobés dans des squames ou croûtes. Les zones d'alopecie au départ de très petite taille rendent le diagnostic difficile. Plus tard, les plaques d'alopecie fusionnent donnant de plus grandes plaques mais non arrondies. Cependant, des cheveux parfois longs restent présents sur ces plaques. Les cheveux parasités ne sont pas fluorescentes en lumière de Wood, c'est un critère distinctif important.

Elles touchent principalement l'enfant d'âge scolaire, entre 4 et 10 ans, surtout les garçons chez qui la guérison à la puberté est la règle. Chez les femmes à l'âge adulte, on peut retrouver des lésions identiques. Il existe aussi de nombreux « porteurs sains », notamment chez les femmes adultes, peu ou pas symptomatiques, assurant la dissémination de l'infection dans l'environnement familial [2,9,16].

- **les teignes suppurées** ou kérions. Elles sont généralement dues à des espèces zoophiles (*T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*) ou telluriques (*N. gypsea*) peu adaptées à l'homme et rarement anthropophiles (*M. audouinii*, *T. violaceum*). Les teignes suppurées se présentent comme des placards ronds, très inflammatoires, limités puis confluents de plusieurs centimètres de diamètre et volontiers surélevés (**Figure 5C**). Très rapidement, ces placards se recouvrent de pustules laissant couler un pus jaunâtre. Les cheveux ou les poils s'éliminent spontanément. Chez l'homme, le cuir chevelu est très rarement atteint, à l'inverse de l'enfant chez qui les kérions ne sont pas rares en région d'élevage, en revanche les lésions au niveau de la barbe appelées sycosis et de la moustache sont habituelles chez l'adulte. Chez la femme les kérions du cuir chevelu ne sont pas exceptionnels [2,9].

- la **teigne favique** (ou favus) due à *T. schoenleinii*, espèce anthropophile, est devenue rare aujourd’hui (**Figure 5D**). Les cheveux ne cassent pas, ils se détachent car ils sont atteints par la base. L’accumulation du mycélium va entraîner la formation d’une petite croûte jaunâtre, friable, centrée par un cheveu : le « godet favique ». Les cheveux décollés vont tomber, donnant une alopecie définitive. Les godets peuvent ensuite fusionner donnant des éléments de plus grande taille : les croûtes faviques. Dans le favus, contrairement aux autres teignes, il n’y a pas de guérison spontanée à la puberté, l’évolution se poursuit tant qu’il existe des cheveux. Les cheveux malades sont fluorescents sur toute leur longueur [2,9].



**Figure 5 : Aspect clinique des différentes types teignes du cuir cheveu, teigne tondante microsporique (A), teigne tondante trichophytique (B), teigne inflammatoire ou kérion (C) et teigne favique (D) [9].**

### 1.2.2.2 Les épidermophyties ou *tinea corporis*

Autrefois appelées herpès circiné, les lésions débutent par une petite zone érythémateuse qui progressivement, en 8 à 15 jours, s'étend de façon centrifuge dessinant un anneau inflammatoire parsemé de petites vésicules (**Figure 6**). Les lésions siègent dans n'importe quelle partie du corps. Elles sont isolées ou multiples, et dans ce cas parfois confluentes. De nombreuses espèces peuvent être rencontrées, principalement *E. floccosum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *T. erinacei*, *M. canis*, *N. persicolor* et *N. gypsea*. En règle générale, les épidermophyties d'origine animale sont plus inflammatoires que celles d'origine humaine[2,9].



**Figure 6 : Epidermophyties confluentes de deux avant bras**

(Photo : K. Diongue, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Aristide Le Dantec)

### 1.2.2.3 Les onychomycoses ou *tinea unguium*

Les ongles des pieds sont beaucoup plus souvent atteints que ceux des mains. L'aspect clinique le plus souvent observé correspond à l'onychomycose disto-laterale, c'est-à-dire une onychomycose avec une atteinte du bord libre de l'ongle sous forme de tâche blanche ou jaunâtre qui s'étend vers la matrice. Les autres aspects cliniques sont moins fréquents : onychomycodystrophie totale (évolution d'une onychomycose distale non traitée, (**Figure 7**), leuconychie superficielle, onychomycose proximale (ongle attaque initialement au niveau de

la matrice)[14,17,18]. Cette atteinte proximale, plus rare, surviendrait préférentiellement chez l'immunodéprimé (patients séropositifs pour le VIH).



**Figure 7 : Onychomycodystrophie totale des ongles de la main épargnant le pouce**

(Photo : K. Diongue, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Aristide Le Dantec)

#### 1.2.2.4 Les autres atteintes dermatophytiques

Parmi les autres atteintes, on peut noter :

- **les folliculites** qui correspondent à l'envahissement du follicule pileux par le dermatophyte. Le sycosis correspond à des folliculites aggrégées au niveau de la barbe ou de la moustache
- **les intertrigos** qui sont des lésions des plis qui siègent surtout au niveau des orteils avec prurit, des plis inguinaux (anciennement eczéma marginé de Hebra) ou cruraux. Ce qui caractérise la lésion dermatophytique c'est la bordure inflammatoire en périphérie des lésions. Au niveau de ces grands plis la lésion est souvent asymétrique.
- **les kératodermies palmo-plantaires**, qui s'observent fréquemment au cours des infections chroniques anciennes à *T. rubrum*. La peau est épaisse, avec une consistance cartonnée, et présente un aspect squameux.
- **Les mycétomes à dermatophytes** qui sont des affections très rares dans lesquelles le dermatophyte a aussi franchi la barrière cutanée mais il forme des grains dans le derme. Les auteurs anglo-saxons préfèrent le terme de pseudomycétome car l'agent pathogène, présent sur le cuir chevelu, n'est pas d'origine exogène comme les autres agents de mycétomes. Ces mycétomes sont dus essentiellement à *M. audouinii*, mais aussi *T. rubrum*, *M. canis*, *M. ferrugineum*, *T. tonsurans*, *T. soudanense* ou *T. schoenleinii*. Les lésions se présentent sous

forme de tumeur bourgeonnante ou de nodules hypodermiques érythémateux, douloureux, centrés par un cheveu ou un poil. Ils peuvent s'ulcérer. Une teigne concomitante, proche de la lésion, due à la même espèce, est aussi souvent observée [2,9,14].

### 1.3. Diagnostic biologique des dermatophytoses

La démarche du diagnostic mycologique d'une dermatophytie comporte les étapes successives suivantes : le prélèvement, l'examen direct, la mise en culture, l'identification du ou des dermatophytes isolés et l'interprétation des résultats (confrontation clinico-biologique).

#### 1.3.1 Le prélèvement

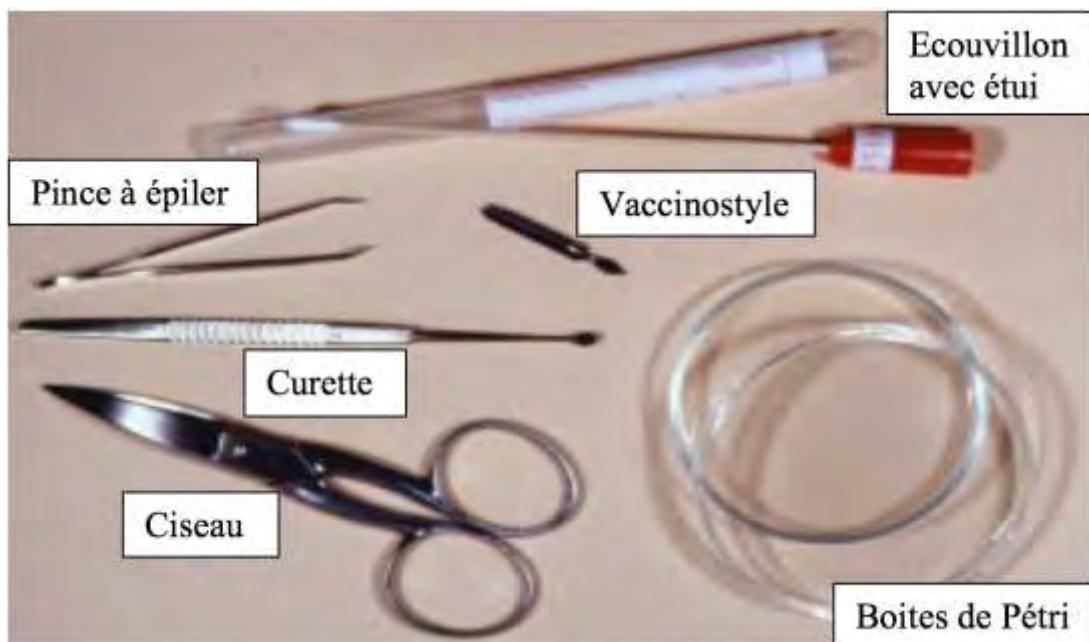
Le prélèvement est une étape décisive dans l'établissement du diagnostic mycologique. Un certain nombre de difficultés doivent être maîtrisées à ce niveau. Le prélèvement doit d'abord permettre de recueillir un matériel suffisamment abondant, afin d'assurer dans de bonnes conditions la réalisation d'un examen direct et de cultures.

Il convient par ailleurs de respecter un principe essentiel, c'est-à-dire de réaliser le prélèvement **au niveau de la jonction entre la zone saine et la zone atteinte**, car c'est à cet endroit que se situent les parties les plus actives du champignon. Un autre élément important, à ne pas sous-estimer, est la notion d'un traitement antifongique spécifique déjà institué. Ainsi, le prélèvement devra être réalisé dans la mesure du possible à distance de tout traitement antifongique local ou systémique, sinon il faudra observer une fenêtre thérapeutique de 15 jours environ pour la peau et de 3 mois pour les ongles en cas d'utilisation d'une solution filmogène [14]. Un certain nombre de renseignements pourront en outre être collectés par le préleveur, comme la notion d'un voyage récent, d'un contact avec des animaux ou d'une pratique de sports particuliers ainsi que la profession du patient. Comme nous venons de le voir, la réalisation du prélèvement doit être confiée à un personnel expérimenté, ayant une bonne connaissance sémiologique des dermatophyties.

Le prélèvement peut être réalisé au cabinet de consultation par le clinicien. Dans ce cas il est sous la responsabilité de ce dernier. Les produits pathologiques de chaque site prélevé doivent être recueillis dans des récipients stériles différents et faire l'objet d'un étiquetage correct. Il n'y a pas besoin de milieu de transport particulier et l'acheminement pourra être différé, puisque les éléments fongiques susceptibles d'être collectés ne seront pas rapidement altérés. La crainte pour le biologiste qui sera ensuite chargé du diagnostic mycologique est donc que le prélèvement soit effectué par un préleveur non entraîné qui peut être source de

contamination ou de faux négatif. Il est préférable de réaliser le prélèvement au laboratoire par un biologiste lui-même ou par un personnel bien formé sous sa responsabilité [2,14,19]. Pour la réalisation d'un bon prélèvement un certain nombre de matériel est nécessaire (**Figure 8**).

- **Pour les teignes du cuir chevelu**, le prélèvement sera précédé d'un examen sous lampe de Wood dans une pièce où l'obscurité est totale. Une fluorescence verte orientera le diagnostic vers une teigne tondante microsporique ou une teigne favique. On prélèvera ensuite dans la zone d'alopecie les squames, les cheveux cassés et les croûtes avec une curette et une pince à épiler. Un écouvillon préalablement humidifié avec de l'eau distillée stérile sera ensuite appliqué sur la plaque d'alopecie.
- **Pour les onychomycoses**, dans les atteintes distales ou latérodistales, la périphérie de l'ongle sera coupée à la pince ou aux ciseaux, et éliminée, puis on prélèvera avec une curette ou un vaccinostyle la zone unguéale pathologique, à la lisière de la partie saine et de la partie malade (où le dermatophyte est le plus actif). Le lit de l'ongle sera alors raclé pour recueillir la poudre. En cas de leuconychie, on grattera l'ongle à sa surface.
- **Pour les folliculites et les sycosis**, les poils et les duvets seront prélevés à la pince à épiler, puis un écouvillon préalablement humidifié sera appliqué sur les lésions suintantes.
- **Les lésions cutanées** seront grattées avec une curette, un grattoir ou un scalpel mousse, en périphérie de la lésion (sur le bourrelet inflammatoire) sur laquelle on appliquera ensuite un écouvillon préalablement humidifié avec de l'eau distillée stérile [9].



**Figure 8 : Materiel nécessaire pour le prélèvement des dermatophytoses [9]**

### 1.3.2 Examen direct

La deuxième étape du diagnostic biologique d'une dermatophytie est l'examen direct microscopique de l'échantillon. Il est indispensable, d'abord parce qu'il affirme la présence du champignon à l'état parasitaire au sein de la zone prélevée, ensuite parce qu'il permet de donner au médecin prescripteur un premier résultat justifiant la mise en œuvre rapide d'un traitement spécifique.

Pour sa réalisation, on applique sur le prélèvement recueilli et déposé sur une lame de verre, un produit éclaircissant contenant habituellement de l'hydroxyde de potassium(KOH) ou potasse à 10% avec un léger chauffage de la préparation au bec Bunsen, qui permet de ramollir la kératine. L'emploi de bleu coton, de lactophénol ou de chloral-lactophénol d'Amann permet d'éclaircir et de conserver indéfiniment les préparations [2,14,19].

Des colorants (noir chlorazol, rouge Congo) ou des fluorochromes dérivés de stilbène (Blankophor, Calcofluor, Uvitex 2B) qui se lient spontanément aux polysaccharides présents chez les champignons, peuvent faciliter le repérage des éléments fongiques. Ils s'associent volontiers aux agents éclaircissants.

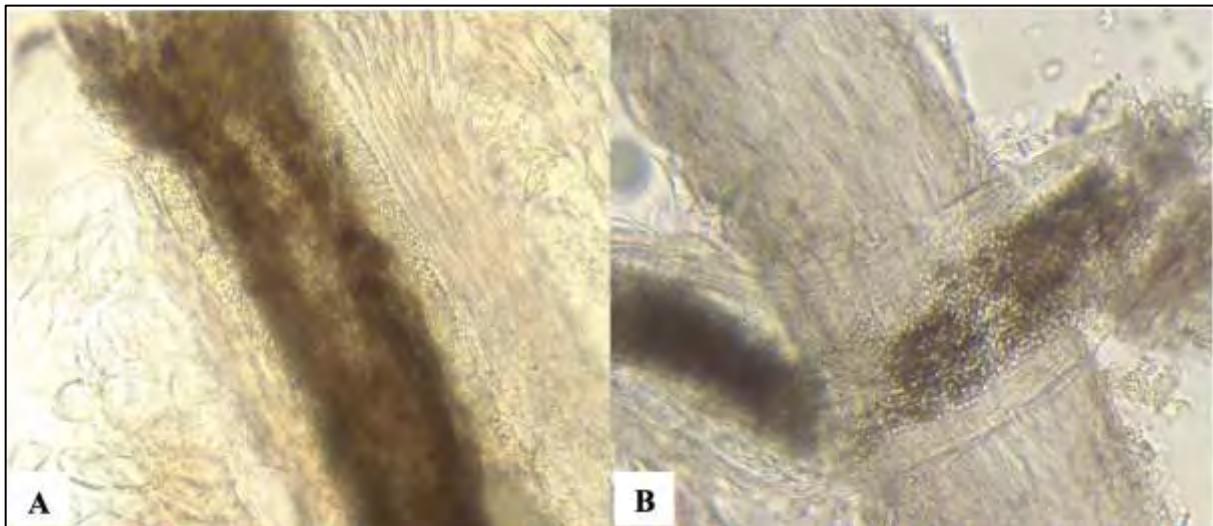
Pour les prélèvements de squames, de peau ou d'ongle, l'examen direct doit mettre en évidence des filaments plus ou moins cloisonnés (arthrosporés) quelle que soit l'espèce qui sera isolée par la suite (**Figure 9**).



**Figure 9 : Examens direct des squames montrant des filaments dermatophytiques arthrosporés (x40)**

Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Aristide Le Dantec, Dakar (Sénégal)

Au niveau des cheveux on peut observer cinq types de parasitisme pilaire [19,20]. Les deux types les plus fréquents sont les parasitismes ecto-endothrix (microsporique) et endothrix (trichophytique). La teigne favique est exceptionnelle de nos jours (**Figure 10**).



**Figure 10 : Parasitismes pilaires ecto-endothrix (A) et endothrix (B)**

Source : Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Aristide Le Dantec, Dakar (Sénégal)

### 1.3.3 Cultures

La mise en culture des prélèvements, étape indispensable pour le diagnostic d'espèce, doit être systématique [19]. Le milieu de référence pour les dermatophytes est le milieu de Sabouraud additionné d'un antibiotique (chloramphénicol ou gentamicine) et de cycloheximide (Actidione®). Ce dernier est un antiseptique qui inhibe la croissance de la plupart des moisissures et aide ainsi à l'isolement des dermatophytes. La culture peut se faire en tubes ou sur boîtes : l'expérience montre que l'usage des boîtes est préférable, au moins dans les primocultures. La difficulté de l'utilisation du tube est la surface réduite de la gélose qui rend difficile l'individualisation d'un dermatophyte si une moisissure, de croissance plus rapide, est associée. Cette dernière peut masquer sa présence. À l'inverse, la manipulation des dermatophytes en boîte est plus aisée tant pour l'ensemencement (plusieurs points d'ensemencements peuvent être bien individualisés) que pour la réalisation des montages (technique du drapeau) nécessaires à l'observation microscopique. Le produit pathologique est déposé, en l'appuyant légèrement sur la surface de la gélose et en disposant les dépôts bien séparés les uns des autres. Si l'ensemencement est fait en tube, les dermatophytes étant aérobies, il conviendra de laisser un passage pour l'air, donc ne pas visser hermétiquement le bouchon.

L'ensemencement en boîte nécessite, en revanche, d'humidifier l'étuve pour éviter le desséchement. Les cultures sont incubées à 25-30 °C. La contrainte pour le laboratoire est de conserver les boîtes ou les tubes au moins quatre (04) semaines, en raison de la pousse très lente de certaines espèces comme *T. verrucosum*. Il convient de souligner également que pour un « pseudodermatophytes » comme *Arachnomyces nodosetosus* (ex *Onychocola canadensis*), agent d'onychomycose et d'intertrigo, la pousse est aussi très lente (environ quatre semaines) [18]. La nécessité de conserver les boîtes ou les tubes de culture est donc incontournable. La lecture des cultures se fait habituellement deux fois par semaine (certains aspects caractéristiques apparaissant au départ de façon transitoire comme les corémies chez *T. rubrum*). Chaque espèce de dermatophyte présente un délai de pousse optimale où la culture est bien caractéristique.

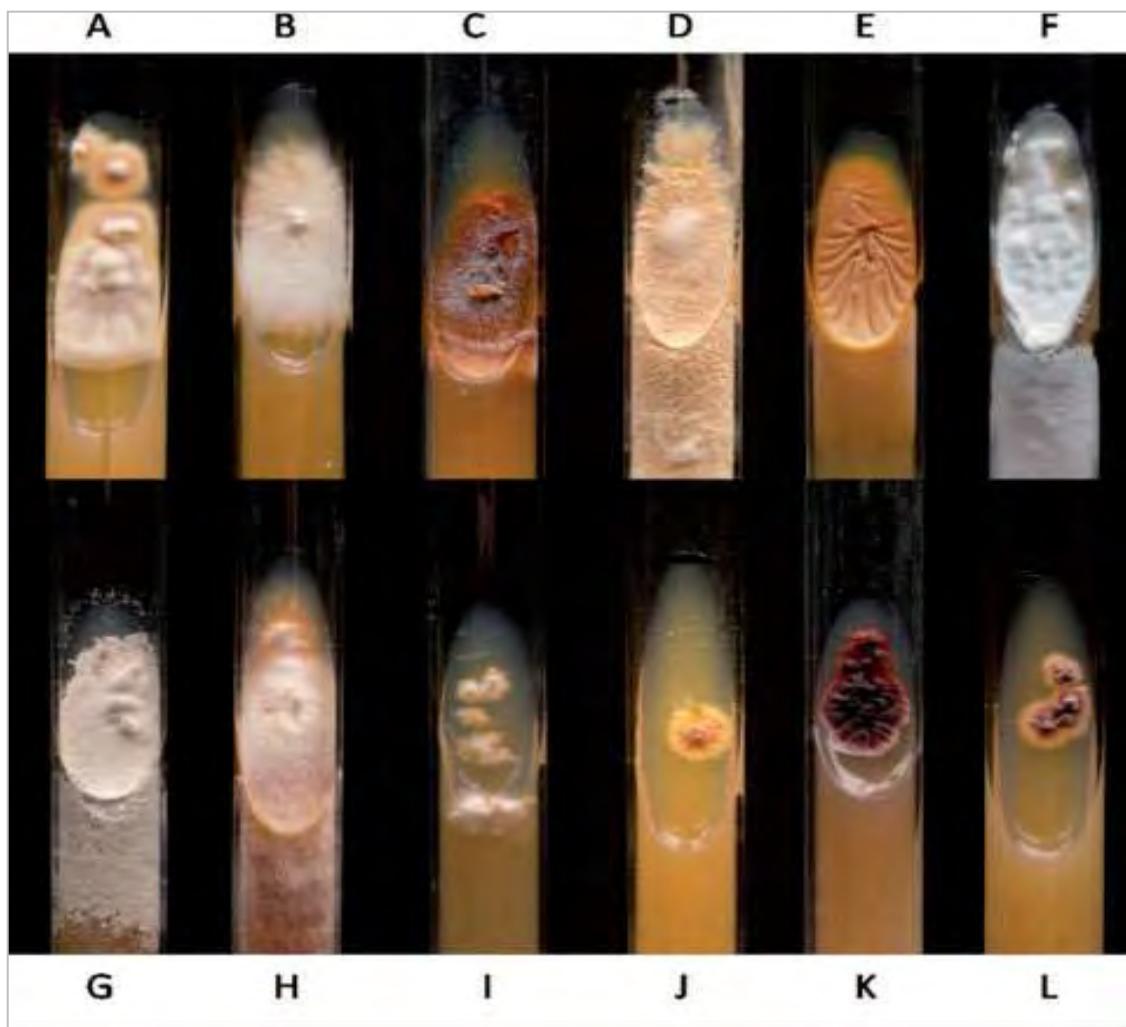
### 1.3.4 Identification des dermatophytes

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

#### 1.3.4.1 Examen macroscopique des cultures

L'examen macroscopique comporte l'analyse :

- de la couleur des colonies (au recto et au verso) ;
- de leur forme (rondes, étoilées, ...) ;
- de leur relief (plates, plissées, ...) ;
- des caractéristiques de leur surface (duveteuse, poudreuse, granuleuse, glabre, ...) ;
- de leur consistance (molle, élastique, cartonnée, ...) et de leur taille (réduite ou au contraire étendue). On recherchera également la présence d'un pigment diffusant dans la gélose (**Figure 11**).



**Figure 11 : Examen macroscopique de quelque dermatophytes [12]**

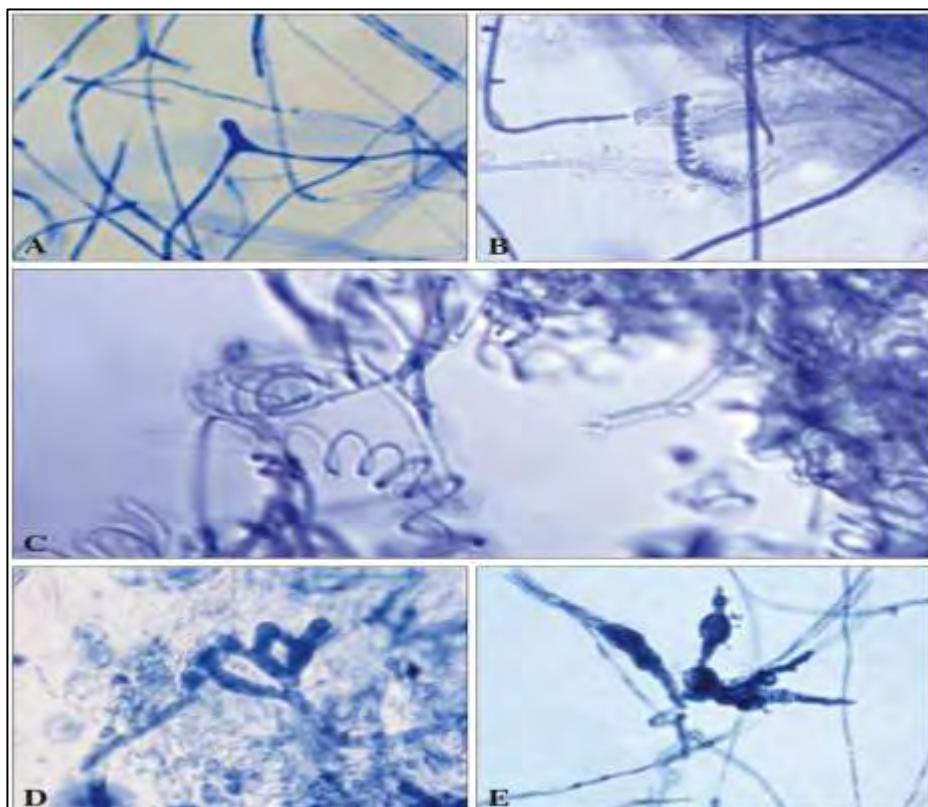
**A** : *T. rubrum* ; **B** : *T. interdigitale* ; **C** : *T. tonsurans* ; **D** : *N. gypsea* ; **E** : *T. benhamiae* (phénotype jaune) ; **F** : *T. benhamiae* (phénotype blanc) ; **G** : *T. mentagrophytes* ; **H** : *M. canis* ; **I** : *T. verrucosum* ; **J** : *T. soudanense* ; **K-L** : *T. violaceum* (deux phénotypes différents).

#### 1.3.4.2 Examen microscopique des cultures

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

Un montage entre lame et lamelle à l'objectif 40 sera ensuite réalisé dans du bleu lactique, à l'aide de cellophane adhésive transparente (ou scotch), ou par dissociation d'un fragment de colonies au vaccinostyle. On étudiera :

- **l'aspect des filaments mycéliens.** Les dermatophytes sont des Septomycètes, les filaments mycéliens sont donc cloisonnés, de diamètre habituellement régulier, mais ils présentent parfois des dilatations successives (images en raquette),
- **la présence de chlamydospores** parfois disposées en chaînettes (filaments toruloïdes chez *T. verrucosum*, *T. violaceum* et *T. schoenleinii*), ou au contraire isolées et terminales (*M. audouinii*),
- **l'abondance et la morphologie des microconidies** (toujours unicellulaires, rondes ou piriformes, solitaires ou disposées en acladium, voire en buissons),
- **la présence et la morphologie des macroconidies** (toujours pluricellulaires et cloisonnées seulement transversalement, à paroi lisse chez les *Trichophyton*, ou rugueuse chez les *Microsporum*),
- **la présence d'autres éléments que l'on appelle ornementations (Figure 12)** : excroissances triangulaires caractéristiques de *T. rubrum*, les organes pectinés (en forme de peigne) chez *M. audouinii* et *T. schoenleinii*, les vrilles chez *M. persicolor* et *T. mentagrophytes*, clous et chandeliers faviques de *T. schoenleinii*.



**Figure 12 : Les ornementations chez les dermatophytes**

Excroissances triangulaires (A), organe pectiné (B), vrille (C), chandelier favique (D) et structure proliférante (E) [9].

De façon résumée, l'identification d'une souche de dermatophyte donnée, basée sur l'observation macroscopique et microscopique suit une clé d'identification proposée par Chabasse et al, [9] (Annexe).

Dans un certain nombre de cas le dermatophyte peut rester non identifiable : souche stérile ou critères culturaux macroscopiques et/ou microscopiques atypiques. Devant ces difficultés le biologiste doit avoir recours à d'autres milieux afin de favoriser la conidiogénèse et la production du pigment comme :

**Le milieu peptoné à 3 %** (Sabouraud conservation) pour différencier *N. persicolor* qui devient rose en huit jours de *T. mentagrophytes* qui est blanc sur ce milieu.

**Le milieu de Borelli** (milieu au lactrimel) pour favoriser la fructification des *Microsporum* (*M. canis* ou *M. audouinii*) et la production du pigment rouge vineux de *T. rubrum* et jaune de *M. canis*.

**Le milieu à l'urée-indole** (ou gélose à l'urée de Christensen's) contenant un réactif coloré, pour différencier *T. rubrum* variété duveteuse de *T. interdigitale*. *T. rubrum* est uréase -, *T. interdigitale* est uréase +, il vire le milieu au rose fuchsia en deux jours (milieu liquide urée-indole) ou en sept jours (milieu gélosé de Christensen's).

**Le milieu BHI gélosé** (*brain heart infusion*) et les géloses au sang pour favoriser la pousse de *T. verrucosum* [21] ; une incubation à 32 °C est idéale pour ce dermatophyte.

Les limites du diagnostic morphologique sont le polymorphisme des souches, leurs atypies et l'absence de fructifications sur les milieux sensés favoriser leur conidiogénèse ainsi que la durée longue des cultures [2,9,14].

Les multiples repiquages à réaliser du fait de la faiblesse du diagnostic morphologique, plaignent pour les nouvelles techniques d'identifications comme la spectrométrie de masse MALDI-TOF et la biologie moléculaire.

Le MALDI-TOF repose sur la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) et permet d'obtenir sous forme de spectre le profil protéique des champignons. Le champignon est identifié en comparant son spectre avec ceux d'une bibliothèque de spectres de référence. Cette méthode permet de discriminer des champignons au niveau de l'espèce, en donnant des résultats comparables à ceux obtenus par les méthodes d'identification moléculaire [22,23].

## **2. APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE A L'IDENTIFICATION DES DERMATOPHYTES**

Devant les résultats parfois décevants des techniques de biologie classique, en raison du caractère polymorphe des champignons, augmentée de plus par les variations de la composition des milieux, de la température de culture, des techniques de biologie moléculaire basées sur l'amplification d'ADN de dermatophyte ont été mises au point. La séquence d'ADN des dermatophytes choisie pour être amplifiée varie selon les techniques et les équipes [24]. Ce sont des techniques coûteuses nécessitant un équipement spécialisé [25,26].

### **2.1. Etude du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (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 [27,28]. Depuis 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 [24]. Maintenant ce même principe est utilisé en ciblant d'autres parties du génome comme 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 [28,29].

### **2.2. La technique d'amplification aléatoire du fragment d'ADN polymorphe (RAPD)**

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe, plus connue sous le nom de *RAPD* (pour *random amplified polymorphic DNA*) est une technique d'analyse de l'ADN utilisée en biologie moléculaire. Il s'agit d'une réaction de PCR dans laquelle les segments d'ADN amplifiés ne sont pas choisis par l'expérimentateur, mais amplifiés "au hasard".

Dans cette technique l'expérimentateur crée plusieurs amorces courtes de séquence définie arbitrairement. Il procède ensuite à une amplification par PCR d'ADN génomique en utilisant

les amorces précédemment définies. Si ces amorces s'hybrident avec l'ADN testé, il pourra y avoir une amplification de certains fragments. Cela suppose que deux amorces s'hybrident de part et d'autre d'un segment d'ADN d'une taille compatible avec l'amplification. L'amplification est donc aléatoire [28,30].

Un intérêt de la technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissance préalable de l'ADN cible, les amorces utilisées vont s'hybrider de façon "aléatoire" dans la séquence, sans que l'on sache exactement où. Une des limites de la RAPD est qu'elle doit être utilisée sur des fragments d'ADN génomiques "intacts", les résultats obtenus avec des fragments d'ADN dégradés ne seront pas exploitables [30,31].

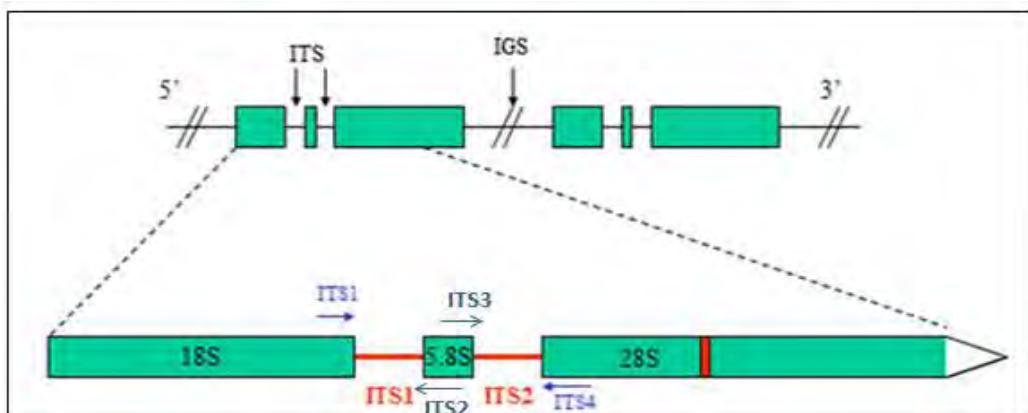
### **2.3. Le séquençage du gène codant pour une enzyme impliquée dans la synthèse de la chitine (la chitine synthase)**

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 plusieurs années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN. De par sa précision, le séquençage est un excellent outil tant pour le diagnostic que pour des études épidémiologiques et phylogénétiques [24]. Différents gènes cibles ont été séquencés, notamment le gène codant pour la chitine synthase [32,33]. En Tunisie, le séquençage de ce gène a permis l'identification d'une souche de *M. ferrugineum* pour la première fois en 2010 tandis que la méthode morphologique n'avait pu aboutir qu'à une identification au niveau du genre [32]. La difficulté 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 [34].

### **2.4. Le séquençage de la région ITS**

L'approche moléculaire utilisée pour identifier les champignons est souvent basée sur l'analyse de séquence de l'ADN ribosomal (ADNr) et en particulier sur l'espace interne transcrit (ITS). Le polymorphisme des régions ITS1 et ITS2 flanquant la séquence d'ADN codant pour l'ARNr 5.8S s'est avéré approprié pour l'identification des espèces de dermatophytes [24,35,36].

En mycologie moléculaire, les espaces internes transcrits (ITS) possèdent la plus haute probabilité d'identification et permettent une différentiation à un niveau inter et intra spécifique. La région ITS est une région très polymorphe. Elle inclut ITS1 et ITS2 qui sont séparés par le gène 5,8S qui se trouve lui-même entre le gène 18S et 28S (**Figure 13**). La région ITS est très intéressante pour le séquençage de substrats contenant une faible quantité d'ADN [37]. Une partie de ces molécules est hautement conservée et utilisée comme support pour l'étude de la divergence des espèces entre taxons. Les régions conservées alternent avec les régions variables. Les régions ayant la vitesse d'évolution la plus rapide sont celles qui séparent les gènes codant pour les ARN, à savoir les ITS et les espaces intergéniques (IGS) [38]. Les séquences des régions ITS et IGS des différentes espèces appartenant à un même genre ne sont donc pas strictement identiques et, de ce fait, leur polymorphisme est utilisé comme support pour l'identification moléculaire des espèces fongiques [38].



**Figure 13 : Réprésentation schématique des espaces internes transcrits [37,38]**

Les rectangles indiquent les régions codantes. Les amores concensus et les positions d'hybridation sont illustrées par les flèches bleues. La bande rouge symbolise le domaine variable D1/D2

**DEUXIÈME PARTIE: TRAVAIL  
EXPÉRIMENTAL**

## 1. CADRE D'ETUDE

Ce travail a été réalisé en deux phases dans deux structures différentes. La première partie consacrée à l'identification phénotypique des dermatophytes a été réalisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologique du CHU Aristide Le Dantec de Dakar et la deuxième partie (identification moléculaire) a été effectuée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU méditerranée infection de Marseille où ces souches ont été identifiées par séquençage.

### 1.1. Le CHU Aristide Le Dantec

Le CHU Aristide Le Dantec est situé au 30 Avenue Pasteur de Dakar. Cet hôpital universitaire regroupe plusieurs spécialités réunis en “pôles d’activités” que sont :

- **Pôle chirurgie et spécialités chirurgicales** : la Cancérologie, la Chirurgie générale, la Chirurgie pédiatrique, l’Orthopédie, l’Urologie, l’Ophtalmologie, la Stomatologie, l’Odontologie et la Chirurgie plastique ;
- **Pôle médecine** : la Néphrologie, la Gastrologie, l’Hématologie clinique, la Rhumatologie, la Dermatologie, la Cardiologie et la Médecine interne ;
- **Pôle urgences** : la Réanimation, les urgences des spécialités médicales et chirurgicales;
- **Pôle mère-enfant** : la Chirurgie pédiatrique, la Pédiatrie, la Maternité et les spécialités chirurgicales de l’enfant ;
- **Pôle service de soutien** : la Pharmacie et la Maintenance;
- **Pôle d'aide aux diagnostics** : les Laboratoires (Parasitologie-Mycologie, Bacteriologie-Virologie, Biochimie, Hematologie, Cytologie-Embryologie, Anatomopathologie) et la Radiologie.

### 1.2. Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU Aristide Le Dantec

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie est l’un des laboratoires du pôle d'aide aux diagnostics du CHU Aristide Le Dantec. Il est constitué de deux parties :

- une partie consacrée au diagnostic de routine dans le domaine de la parasitologie et de la mycologie ;
- une partie abritant l’unité de recherche avec un plateau technique hautement relevé comprenant notamment les dernières générations de séquenceurs. Les thèmes de recherche s’articulent autour du paludisme avec les projets GATES et d’efficacité thérapeutique (ET),

mais également sur les agents infectieux et la génomique de manière générale avec le Centre africain d'Excellence sur la Genomique des maladies infectieuses (ACEGID), les projets H3 Africa et USAID/Broad Illimuna dans la recherche Genetique pour le Sénégal.

### **1.3. L’Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection**

L’Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection est situé au 19-21, boulevard Jean Moulin – 13005, Marseille (France). Cette structure spécialisée dans les maladies infectieuses et tropicales, regroupe diagnostic, soin, recherche, surveillance et information contre ces types de maladies. Parmi les plus connues, on peut énumérer le VIH, la tuberculose ou encore le paludisme.

Le bâtiment, de 27 000 m<sup>2</sup> sur quatre niveaux, est divisé en trois parties distinctes : une première avec des laboratoires de diagnostic et de recherche, une deuxième consacrée à l’hospitalisation des patients et une dernière destinée aux bureaux et aux étudiants. Au total, toutes les activités concernant la lutte contre les maladies infectieuses sont regroupées dans cette même structure : diagnostic, soin, recherche, surveillance, information et même incubation de startups.

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l’IHU est également scindé en laboratoire de diagnostic avec un plateau technique relevé allant des techniques microscopiques au sequencage en passant par la PCR et le MALDI-TOF, et en laboratoire de recherche.

## **2. PERIODE ET TYPE D’ÉTUDE**

Nous avons réalisé une étude rétrospective allant du 1<sup>er</sup> Janvier au 31 Décembre 2017.

## **3. POPULATION D’ÉTUDE**

La population d’étude était constituée par tous les patients reçus au laboratoire pour examen mycologique, devant une suspicion de mycose durant la période d’étude.

### **3.1. Critères d’inclusion**

- Tous les patients consentant à participer à cette étude après avoir pris information de son déroulement (**voir fiche de consentement en Annexe**) ;
- Patients chez qui un dermatophytes a été isolé après analyse mycologique.

### **3.2. Critères de non inclusion**

- Les patients dont les informations ou variables étudiées ont été mal renseignées ou inexploitables n'ont pas été inclus dans cette étude ;
- Idem pour les patients pour lesquels, les dermatophytes isolés n'ont pu être re-isolé pour le séquençage.
- Les patients non consentants.

## **4. MATERIELS ET MÉTHODES**

Le matériel utilisé durant ce travail a été constitué de matériels de laboratoire de mycologie notamment pour l'isolement, l'identification et la conservation des souches destinées à une identification moléculaire.

### **4.1. Matériel pour l'isolement, l'identification et la conservation des souches au laboratoire**

Il comprend entre autres :

- Registres de paillasse, stylos et marqueurs ;
- Bec Bunsen, briquet, anse de platine ;
- Microscope optique binoculaire couplé à un appareil photo ;
- Lames porte-objets et lamelles couvre-objets ;
- Boîtes de Petri 90 mm et 55 mm en plastique, stériles ;
- Lame de Bistouri, scotch, ciseaux ;
- Pipettes de transfert stériles, pipette Pasteur et micropipette ;
- Milieux de Sabouraud-chloramphénicol avec et sans cycloheximide (Actidione<sup>®</sup>) ;
- Eclaircissants et colorants (potasse à 20%, bleu de lactophenol) ;
- Etuves pour incubation réglées à +25 °C et +37 °C ;
- Manuels d'identification (cahier de formation Bioforma, n°31) ;
- Réfrigérateur (+8 °C) ;
- Congélateur (-20 °C).

## **4.2. Matériel pour l'étude moléculaire**

- Kit d'extraction EZ1;
- Centrifugeuse pour tube nunc (FastPrep<sup>®</sup>-24) ;
- Automate d'extraction EZ1 Advanced XL (Qiagen<sup>®</sup>);
- Thermocycleur ABI 2720 (Applied Biosystems, Inc.);
- Trans-illuminateur, E-Gel<sup>®</sup> Imager (Life Technologies) ;
- Poudre Sephadex<sup>®</sup> G-50 superfine;
- Sequenceur 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.);
- Autres matériels de laboratoire de biologie moléculaire.

## **4.3. Méthodes de l'étude**

### **4.3.1 Méthodes d'isolement et d'identification des dermatophytes**

L'étude mycologique au laboratoire a comporté les étapes suivantes :

#### **4.3.1.1 Interrogatoire**

Cette étape a été la première après l'accueil du patient au laboratoire. Les informations recherchées ont concerné l'historique de la lésion, sa date d'apparition, son évolution. Il a permis de rechercher d'autres localisations, de préciser le contexte épidémiologique (traitement ou pathologie sous-jacente, pratique sportive, profession exposée, notion de voyage, de contamination vis-à-vis d'un animal familier, voire de rente ou d'élevage). Ces informations ont été enregistrées directement sur le registre de paillasse avant d'être transférées sur un fichier Excel.

#### **4.3.1.2 Prélèvement**

La nature, les modalités et le matériel du prélèvement dépendaient de l'analyse mycologique demandée par le clinicien par son hypothèse diagnostique.

**Les squames.** - elles ont été prélevées, au-dessus d'une boîte de Petri entre ouverte, avec une lame de Bistouri, sur le relief vesiculeux périphérique d'une lésion circinée, en périphérie d'une fissure interdigitoplantaire.

Les lésions suintantes ont été prélevées avec 2 écouvillons, un pour faire l'examen direct, un autre pour la culture. En cas de lésions discrètes et de squames peu abondantes, en plus du prélèvement à l'écouvillon, un ruban adhésif (Scotch<sup>®</sup>) a été apposé pour l'examen direct.

**Les cheveux, poils et duvets.** - Au moins une quinzaine de cheveux ou poils parasités, ont été prélevés avec une lame de Bistouri en grattant avec le dos de la lame avec une légère traction après un examen avec la lampe de wood. Les poils parasités n'offrent aucune résistance, alors qu'il est inutile d'insister sur un poil ne venant pas spontanément. En cas de lésion suppurée, une gouttelette de « pus » au niveau de l'ostiole, a été recueillie sur un écouvillon humidifié avec du liquide physiologique stérile.

**Les fragments d'ongles et la matière sous-unguéale.** - Le prélèvement a été constitué par un maximum de fragments d'ongles et de matière sous-unguéale après un raclage superficiel pour minimiser les souillures éventuelles. En cas d'onychomycose sous-unguéale, toute la matière sous-unguéale, jusqu'à la limite de décollement de la tablette a été recueilli à l'aide d'un scalpel, cette limite signant le front d'avancée du champignon (les derniers fragments prélevés renferment les filaments les plus jeunes). Seule la présence de tâches de leuconychie superficielle a justifié le prélèvement de fins copeaux réalisés par grattage de la surface de la tablette unguéale, ou du matériel finement crayeux obtenu en creusant chaque plaque blanchâtre.

**Les grains (dans le cas du mycétome dermatophytique).** - le prélèvement a été constitué par un maximum de grains collectés en exerçant une légère pression sur la lésion fistulisée. Les grains sont recueillis à l'aide d'un écouvillon puis déchargés dans de l'eau physiologique.

#### 4.3.1.3 L'examen direct

Pour l'examen direct, le prélèvement a été déposé dans une goutte d'éclaircissant (la potasse à 20%), sur une lame porte-objet puis couvert d'une lamelle. Ce montage a été ensuite observé au microscope optique à l'objectif 10 puis 40 à la recherche de filaments dans les squames et les fragments d'ongles, et un parasitisme pilaire dans les cheveux.

#### **4.3.1.4 Culture**

Les produits pathologiques solides ont été inoculés en trois points bien séparés sur deux milieux de culture : la gélose de Sabouraud additionnée de chloramphenicol (SC) et la gélose de Sabouraud additionnée de chloramphenicol et d'Actidione<sup>®</sup> (SCA). Les produits liquides ou d'écouvillonnage ont été par contre ensemencés en stries. Ces milieux, ensemencés ont été incubés à l'étuve à 25°C pendant au moins quatre semaines avant de déclarer une culture négative.

#### **4.3.1.5 Identification des dermatophytes**

La technique de drapeau a été utilisée pour le montage des cultures positives pour l'identification des champignons sur sabouraud. Il a consisté à :

- coller un fragment de cellulose adhésive transparente (Scotch<sup>®</sup>) sur l'extrémité de l'anse de platine ;
- appliquer la partie collante sur la culture à examiner ;
- mettre ensuite le fragment de Scotch<sup>®</sup> sur une lame porte-objet dans une goutte de bleu de lactophenol.

Leur identification a été basée sur un certain nombre de critères selon le manuel de Biopharma sur les dermatophytes numéro 31. Il s'agit notamment de :

- la vitesse de croissance ;
- les aspects macroscopiques et microscopiques ;
- tests complémentaires (test à l'uréase).

Les dermatophytes isolés et identifiés ont été conservés par subcultures sur SCA à température de 8 °C en attendant l'identification moléculaire. La régularité des subcultures a été de 3 à 6 mois.

#### **4.3.2 Identification moléculaire des dermatophytes (Séquençage)**

Cette partie de l'étude s'est déroulée à l'institut hospitalo-universitaire (IHU) méditerranée infection de marseille.

#### 4.3.2.1 Réisolement des souches de dermatophytes

Les dernières cultures ont été repiquées, dans un poste de sécurité microbiologique (PSM) exclusivement dédié aux filamenteux, sur géloses de Sabouraud additionnée de chloramphénicol et de gentamycine (SCG). Ces milieux ont été ensuite entourés de film de parafine pour éviter leur contamination mais également pour éviter la génération de spores dans l'étuve d'incubation qui a été réglée à une température de 25 °C.

#### 4.3.2.2 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisé avec l'automate EZ1 Advanced XL, Qiagen® (**Figure 14**) à partir des nouveaux isolats de champignons. Elle s'est faite comme suit :

- Transférer le champignon isolé sur gélose SCG en culture de 4 à 10 jours à 25 °C, dans un tube à billes de céramique contenant 700 µL de tampon de lyse G2 (fourni avec le kit EZ1, Qiagen®) ;
- Effectuer une lyse mécanique avec le FastPrep® -24 : 2 runs, puis centrifuger à 10 000 rpm pendant 1 minute ;
- Prélever et déposer 200 µL du surnageant dans un tube plat EZ1 ;
- Lancer l'automate EZ1. Pour cela, insérer la carte EZ1 dans la fente correspondante et mettre l'appareil sous tension. Puis suivre les données selon les instructions qui s'affichent à l'écran. Configurer la table de travail et démarrer le protocole. Recueillir les acides nucléiques purifiés et les décontaminés sous ultraviolet (UV).



**Figure 14 : Automate d'extraction EZ1 Advanced XL, Qiagen®**  
(Photo K. Diongue, IHU, Marseille)

L'automate EZ1 Advanced XL, fonctionne selon le principe de la technologie des particules magnétiques qui associe la vitesse et l'efficacité de la purification d'acides nucléiques sur silice à la manipulation pratique des particules magnétiques. Cette procédure de purification est conçue pour garantir le traitement sans risques et reproductible d'échantillons potentiellement infectieux. Elle comporte 4 étapes que sont : la lyse, la fixation, le lavage et l'élation (Figure 15).

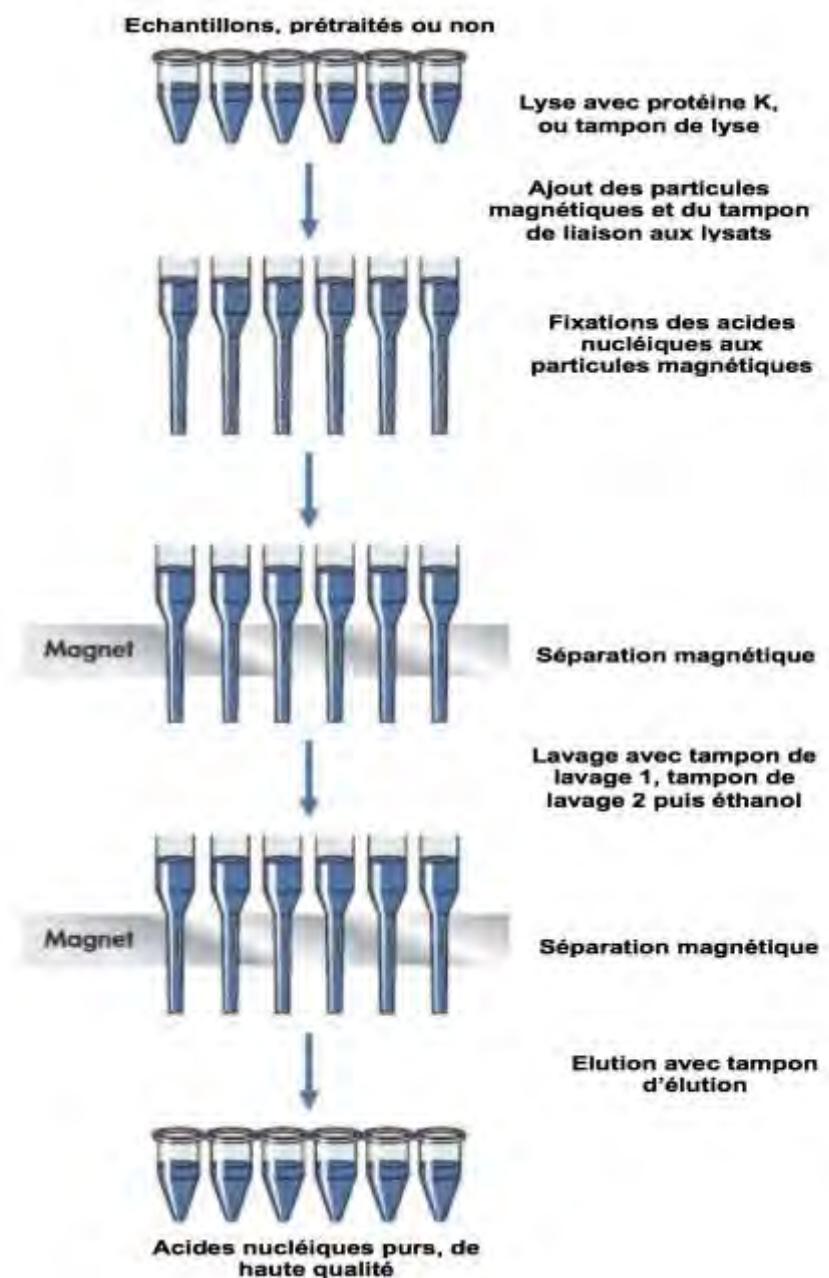


Figure 15: Procédure de l'EZ1 DNA investigator

(Source : EZ1 DNA Investigator Handbook 07/2014 : p8; consulté le 28 décembre 2020 ; [file:///Users/khadim/Downloads/EZ1-DNA-Investigator-Handbook%20\(2\).pdf](file:///Users/khadim/Downloads/EZ1-DNA-Investigator-Handbook%20(2).pdf))

#### 4.3.2.3 PCR d'amplification

Les amores utilisées pour la PCR sont celles ciblant les espaces internes transcrits (ITS 1 et 2).

Les séquences des amores ITS ainsi que les régions amplifiées sont illustrées ci-dessous (**Tableau I**).

**Tableau I : Amores universelles ITS et régions amplifiées [38]**

Nom/couple	Amores universelles Sequence (5'→ 3')	Regions amplifiées
<b>ITS1/ITS2</b>	ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS2 : 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'	Extremite 3' 18S, ITS1 et extremite 5' 5,8S
<b>ITS3/ITS4</b>	ITS3 : 5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3' ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Extremite 3' 5,8S, ITS2 et extremite 5' 28S
<b>ITS1/ITS4</b>	ITS1 : 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Extremite 3' 18S, ITS1, 5,8S, ITS2 et extremite 5' 28S

Pour une réaction de PCR, le volume de travail était constitué de :

- AmpliTaq Gold® 360 *Master Mix* (Applied Biosystems®): 25 µL
- H<sub>2</sub>O sterile DNase/RNase free: 17 µL
- Amorce F (20 µM) : 1,5 µL
- Amorce R (20 µM) : 1,5 µL

Pour chaque série de réaction, nous avons volontairement ajouté un volume supplémentaire pour deux réactions de plus pour tenir compte du volume mort. Les réactifs ont été auparavant bien mixés et homogénéisés avec un vortex®.

Pour chaque réaction de PCR nous avons procédé comme suit :

- distribuer 45 µL de ce milieu réactionnel dans chaque puits des microtubes ;
- ajouter 5 µL d'ADN dans chaque tube selon le plan de travail défini ;
- lancer les thermocycleurs selon le programme suivant :

**Programme ITS** : 10 min à 94 °C / 40 cycles de 94 °C 20 sec ; 53 °C 30 sec ; 72 °C 1 min / 7 min à 72 °C puis + infini à 15 °C.

La détection de l'ADN sur gel d'agarose 1,5% s'est faite comme suit avec en première étape la préparation du gel :

- Ajouter 50 mL d'eau distillée avec 50 mL de triborate EDTA (TBE) 10X permettant d'obtenir du TBE 0,5X ;
  - Mettre 400 mL de TBE 0,5X avec 6 g d'agarose dans un ballon à fond plat ;
  - Faire bouillir à la microonde de façon à dissoudre complètement la poudre;
  - Ajouter 6  $\mu$ L d'agent intercalant (SYBR<sup>®</sup> safe) au mélange obtenu dans un flacon et le remplir pour un volume total de 50 mL;
  - Couler dans le moule rapidement, enlever les bulles avec un cône si besoin ;
  - Laisser reposer 15 min avant de déposer les produits PCR dans les puits.
- La deuxième étape consiste à faire migrer pendant 25 minutes à 135V avec l'échelle de poids moléculaire ;
- Lire enfin le gel avec le trans-Illuminateur E-gel<sup>®</sup> Imager (**Figure 16**).



**Figure 16: Egel<sup>®</sup> Imager**  
(Photo K. DIONGUE, IHU, Marseille)

#### 4.3.2.4 Purification des produits PCR

Cette étape avait pour but d'éliminer dans les produits d'amplification PCR tous les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. Pour le faire nous avons :

- Ajouter 50 µL d'eau à chaque échantillon positif ;
- Transvaser les échantillons dans une plaque de purification blanche opaque, Macherey Nagel® (reutilisable jusqu'à 3 fois maximum) ;
- Utiliser la pompe à vide pendant 10 minutes afin d'aspirer les primers et autres réactifs de la PCR. L'ADN amplifié est quant à lui retenu par le filtre ;
- Récupérer la plaque et ajouter 50 µL d'eau pour remettre l'ADN en suspension ;
- Agiter 10 min à l'aide de l'agitateur pour plaques.

#### 4.3.2.5 PCR de séquençage

Les amorces utilisées ont été les mêmes que pour la PCR avec un *mix* constitué de :

- Une amorce: 0, 5 µL
- Big dye (BigDye® Terminator): 2 µL
- H<sub>2</sub>O: 2,5 µL
- Tampon big dye : 1 µL

Le programme a été le suivant en mettant 6 µL de *mix* avec 4 µL d'ADN : 1 min à 96 °C / 25 cycles de 96 °C 30 sec (ou 10 sec) ; 50 °C 5 sec ; 60 °C 3 min / + infini à 15°C.

#### 4.3.2.6 Purification des produits de séquençage et lancement du séquenceur

La purification s'est faite sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans les plaques MultiScreen.

**Pour la préparation des colonnes**, il faut charger la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine dans les puits d'une plaque MultiScreen HV, format HTS (*High throughput screening*) en utilisant le chargeur de colonne de 45 µl comme suit :

- déposer la résine Sephadex® G50 dans chaque puits (45 µl) du chargeur de colonne ;
- retirer l'excès de résine avec une raclette ;

- placer la plaque MultiScreen HV à l' envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble ;
- taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque ;
- Ajouter 300 µl d'eau ultra pure dans chaque puits contenant de la résine, fermer la plaque avec son couvercle et laisser incuber 2 heures à température ambiante.

Une fois que les mini-colonnes sont gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être stockées à 4 °C. Pour plus de deux semaines, stocker les plaques entourées de parafilm ou dans une boîte en plastique étanche contenant un élément qui assurera une atmosphère humide et limitera ainsi le déssechement des colonnes.

- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits et centrifuger l'ensemble 5 minute à 910 g pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.

**Filtration des produits de séquençage :** Le produit de séquençage a été dilué avec un volume de 50 µL d'eau ultra pure :

- déposer délicatement les échantillons à purifier au centre des minicolonnes ;
- placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger 5 minutes à 910 g. Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

Une fois le produit purifié, il a été soumis au séquençage qui a été réalisé avec le 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.) (**Figure 17**).



**Figure 17 : Séquenceur 3500 XL Genetic Analyser<sup>®</sup>**  
Photo K. DIONGUE, IHU, Marseille

#### **4.3.2.7 Comparaison des séquences aux banques de données**

Après séquencage, nous avons considérés comme exploitables les séquences d'au moins 200 pb avec des pics bien individualisés, sans superpositions de pics laissant suspecter un mélange ou la présence de paralogues.

Les séquences ainsi obtenues ont été corrigées avec le programme CodonCode Aligner, puis blastées en format FASTA sur la banque de données mycobank (FunCBS) et sur NCBI (BLAST). Une identification a été prise en compte si la similitude avec la séquence de référence a été d'au moins 99% et que l'identification moléculaire a été cohérente par rapport à la culture.

#### **4.3.3 Analyse statistique**

L'ensemble de données a été saisie sur le logiciel Microsoft Excel 2016 puis transféré au logiciel Epi-info<sup>7</sup> où elles ont été analysées. Le test du Chi<sup>2</sup> a été utilisé pour comparer les différences statistiques avec un seuil de signification fixé à p<0,05.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

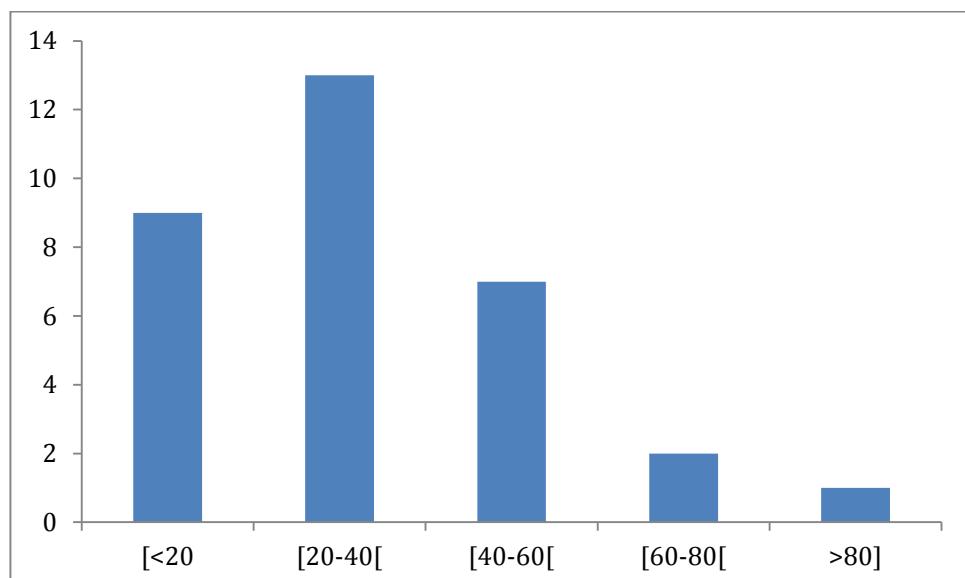
---

### **5. RÉSULTATS**

#### **5.1. Caractéristique de la population d'étude**

Au total, nous avons travaillé avec une collection de 32 souches de dermatophytes isolés chez 32 patients selon la démarche décrite dans les méthodes. Sur ces 32 patients, 20 (62%) étaient de sexe masculin contre 12 (38%) de sexe féminin avec un sexe-ratio de 1,7.

L'âge des patients variait entre 6 et 84 ans avec un âge médiane de 29 ans. La classe d'âge modale a été celle de 20 à 40 ans. La répartition de la population selon les tranches d'âges avec une amplitude de 20 ans est illustrée ci-dessous (**Figure 18**).



**Figure 18 : Répartition de la population selon la classe d'âge**

#### **5.2. Répartition des souches de dermatophytes selon le type de lésion**

La répartition des souches isolées en fonction de la lésion clinique montre une origine plus importante au niveau des teignes du cuir chevelu avec la moitié des patients (**Tableau II**).

**Tableau II : Distribution des souches de dermatophytes selon le site d'isolement**

Numéros d'inscription sur GenBank	N° ID <i>D</i>	Lésion d'origine	Numéros d'inscription sur GenBank	N° ID <i>D</i>	Lésion d'origine
MN691044	<i>1</i>	TCC	MN691060	<i>17</i>	IIO
MN691045	<i>2</i>	TCC	MN691061	<i>18</i>	IIO
MN691046	<i>3</i>	TCC	MN691062	<i>19</i>	IIO
MN691047	<i>4</i>	TCC	MN691063	<i>20</i>	IIO
MN691048	<i>5</i>	TCC	MN691064	<i>21</i>	IIO
MN691049	<i>6</i>	TCC	MN691065	<i>22</i>	IIO
MN691050	<i>7</i>	TCC	MN691066	<i>23</i>	IIO
MN691051	<i>8</i>	TCC	MN691067	<i>24</i>	IIO
MN691052	<i>9</i>	TCC	MN691068	<i>25</i>	IIO
MN691053	<i>10</i>	TCC	MN691069	<i>26</i>	ONY
MN691054	<i>11</i>	TCC	MN691070	<i>27</i>	ONY
MN691055	<i>12</i>	TCC	MN691071	<i>28</i>	ONY
MN691056	<i>13</i>	TCC	MN691072	<i>29</i>	ONY
MN691057	<i>14</i>	TCC	MN691073	<i>30</i>	ONY
MN691058	<i>15</i>	TCC	MN691074	<i>31</i>	EPD
MN691059	<i>16</i>	TCC	MN691075	<i>32</i>	MYC

TCC : teignes du cuir chevelu ; IIO : intertrigo inter-orteils ; ONY : onychomycose ;  
MYC : mycétome ; EPD : épidermophytie ; ID : identification (à l'isolement primaire).

### 5.3. Résultats de l'identification des souches selon la méthode phénotypique

Selon l'identification phénotypique, six espèces de dermatophytes ont été identifiées à des fréquences variables dont 81,25% (n = 26) du genre *Trichophyton*, 18,75% du genre *Microsporum* et aucune du genre *Epidermophyton*. Les isolats ont été identifiés comme *T. soudanense* dans 13 cas (40,6%), comme *T. interdigitale* dans 10 cas (31,3%), comme *M. audouinii* dans 5 cas (15,6%), et dans 1 cas (3,1%) pour le reste d'espèce. Il s'agissait de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* et d'une souche non identifiée au niveau d'espèce rendue comme *Trichophyton sp.* (**Tableau III**).

**Tableau III : Les différentes espèces identifiées par la méthode phénotypique (n = 32)**

Genres/Espèces	Effectif	Fréquence (%)
<i>Trichophyton</i>	26	81,25
<i>T. soudanense</i>	13	40,6
<i>T. interdigitale</i>	10	31,3
<i>T. rubrum</i>	1	3,1
<i>T. mentagrophytes</i>	1	3,1
<i>Trichophyton sp.</i>	1	3,1
<i>Microsporum</i>	6	18,75
<i>M. audouinii</i>	5	15,6
<i>M. canis</i>	1	3,1

#### 5.4. Résultats de l'identification des souches selon la méthode moléculaire

L'analyse des séquences nucléotidiques de la région ITS a montré 99-100% de similitude après BLAST (*Basic Local Alignement Searcg Tool*) pour les six espèces identifiées avec la méthode phénotypique dans notre étude. Ainsi, nos isolats ont été identifiés par séquençage de l'ADN de la région ITS, dans 13 cas (40,6%) comme *T. soudanense*, dans 9 cas (28,1%) comme *T. interdigitale*, dans 6 cas (18,8%) comme *M. audouinii*, dans 3 cas (9,4%) comme *T. rubrum* et dans 1 cas (3,1%) comme *M. canis*. Le résultat du séquençage est résumé dans le **Tableau IV**.

**Tableau IV : Les différentes espèces identifiées par séquençage de la région ITS (n = 32)**

Genres/Espèces	Effectif	Fréquence (%)
<i>Trichophyton</i>	25	78,125
<i>T. soudanense</i>	13	40,6
<i>T. interdigitale</i>	09	28,1
<i>T. rubrum</i>	03	9,4
<i>Microsporum</i>	7	21,875
<i>M. canis</i>	01	3,1
<i>M. audouinii</i>	06	18,8

## 5.5. Résultats comparatifs entre les méthodes phénotypique et moléculaire

La comparaison des résultats de l'identification phénotypique à ceux obtenus par séquençage de la région ITS de nos souches a montré que la méthode phénotypique a été confirmée par le séquençage de l'ADN dans 27 cas sur 32 (84,4%) au niveau de l'espèce et dans 31 cas sur 32 au niveau du genre (96,875%).

*T. soudanense* et *M. audouinii* ont été les espèces de dermatophytes les mieux identifiées par méthode phénotypique avec respectivement des proportions de 92,3% (12/13) et 83,3% (5/6).

La proportion d'identification phénotypique révélée par la méthode moléculaire comme étant erronée était de 15,6% (5/32). Les détails de ces discordances entre la méthode phénotypique et la méthode moléculaire sont illustrés sur le tableau ci-dessous (**Tableau V**).

**Tableau V : Les discordances d'identification entre les méthodes phénotypique et moléculaire (n = 5)**

N°	Site	Identification		
		d'origine	Phénotypique	Moléculaire
MN691067	IIO		<i>Trichophyton interdigitale</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
MN691068	IIO		<i>Trichophyton interdigitale</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
MN691058	TCC		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton soudanense</i>
MN691059	TCC		<i>Trichophyton soudanense</i>	<i>Trichophyton interdigitale</i>
MN691075	MYC		<i>Trichophyton sp.</i>	<i>M. audouinii</i>

IIO : intertrigo inter-orteils ; MYC : mycétoma; TCC : teigne du cuir chevelu.

## 6. DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons séquencé la région ITS de l'ADNr de 32 souches de dermatophytes isolées à Dakar, de patients souffrant de teigne du cuir chevelu, d'épidermophytie, d'intertrigo inter-orteils, d'onychomycose et de mycetome du cuir chevelu. Notre objectif était de comparer ces résultats de séquençage avec les données obtenues à l'aide de la méthode phénotypique pour évaluer l'exactitude de l'identification des espèces.

L'identification phénotypique de nos souches a été confirmée par la méthode de séquençage de l'ADN de la région ITS à 84,4% (27/32). Ce résultat est en phase avec celui trouvé par Li *et al*, avec 81% (102/126) de corrélation entre l'identification phénotypique et le séquençage de la région ITS des espèces de dermatophytes, en utilisant une collection d'isolats cliniques [36]. Par ailleurs, d'autres auteurs ont rapporté une meilleure proportion d'identification correcte avec 94% de corrélation entre l'identification phénotypique et celle moléculaire par séquençage de la région ITS avec une collection de 32 isolats cliniques de dermatophytes [39].

En se focalisant sur l'identification des espèces incluses dans cette étude, nos résultats montrent que *T. soudanense* et *M. audouinii* étaient les espèces de dermatophytes les mieux identifiées par la méthode phénotypique avec des proportions de 92,3% (12/13) et 83,3% (5/6), respectivement.

Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que ces espèces sont les dermatophytes les plus isolées au Sénégal [40] et que les mycologues ont l'habitude de les identifier.

Une souche non identifiée par la méthode phénotypique a finalement été identifiée par séquençage de l'ADN comme étant *M. audouinii*. Cette souche, atypique (numéro d'inscription GenBank MN691075), a été isolée de grains beiges à jaunâtres d'un mycétome du cuir chevelu. L'examen microscopique de ces grains à l'examen direct avec de l'hydroxyde de potassium à 20%, après lavage dans une solution physiologique et écrasement entre la lame et la lamelle, avait montré des filaments fongiques hyalins et cloisonnés. La biopsie du cuir chevelu avait montré de gros grains composés d'une masse compacte de mycélium et de vésicules, et un cas rapporté sur cette souche a été récemment publié au journal de mycologie médicale [41].

Il a été récemment souligné que le séquençage de l'ADN, bien qu'il s'agisse d'une technique fiable pour l'identification des espèces fongiques, ne pouvait pas distinguer correctement *T. rubrum*, *T. violaceum* et *T. soudanense* [42]. Ces trois derniers champignons forment le complexe *T. rubrum* qui est en constante évolution. Selon Graser *et al*, en 2007 [7], le complexe d'espèces anthropophiles de dermatophytes *T. rubrum* comprenait deux taxons, *T. rubrum* et *T. violaceum*, endémique en Afrique et causant principalement des teignes du cuir chevelu et des épidermophyties. Plus tard, *T. soudanense* a été rétabli comme faisant partie d'une «population africaine» de *T. rubrum* [5]. Puis, plus récemment selon la révision de la classification des espèces de dermatophyte et la nomenclature de ces champignons par de Hoog *et al*, en 2016, *T. soudanense* a été considéré comme une espèce distincte de *T. violaceum* [11]. Ainsi, *T. violaceum*, *T. soudanense* et *T. rubrum* peuvent être considérés comme des espèces indépendantes malgré leur étroite similitude. Sur la base du codage à barres de l'ADN ribosomal de la région ITS « *barcoding* », ils peuvent être distingués en tant que groupes. Le groupe de *T. violaceum* contient *T. violaceum* var. *indicum* et *T. glabrum*. Le groupe *T. soudanense* comprend *T. circonvolutum*, *T. gourvillii* var. *intermedium* et *T. gourvillii*, et le groupe *T. rubrum* contient des souches types de *T. fischeri*, *T. flavum*, *T. fluviomuniense*, *T. kanei*, *T. pedis*, *T. raubitscheckii* et *T. rodhainii*, qui toutes, par conséquent, peuvent être considérés comme des synonymes avérés de *T. rubrum* [43].

Selon la base de données utilisée pour le BLAST, *T. soudanense* a été identifié comme tel ou comme *T. rubrum* (population africaine).

Par conséquent, le site anatomique d'isolement pourrait être très utile comme critère d'orientation car *T. violaceum* et *T. soudanense* se trouvent principalement sur le cuir chevelu (80,85% et 71,43% des souches d'origine humaine, respectivement), alors que *T. rubrum* est trouvé principalement sur la peau glabre (6,98% des souches d'origine humaine) [43].

En raison de l'augmentation des déplacements et de la migration des personnes, l'origine géographique des souches est moins fiable. À quelques exceptions près, il a été constaté que *T. rubrum* et *T. violaceum* ont une distribution mondiale, alors que *T. soudanense* est limité à l'Afrique [43]. Cependant, *T. violaceum* se trouve principalement autour du bassin méditerranéen (en particulier en Afrique du Nord), ainsi qu'en Afrique centrale, au Moyen-Orient et en Europe de l'Est [9].

Sur la base de ces considérations, il est apparu raisonnable que nos cas de *tinea capitidis* soient dus à *T. soudanense* puisque cette espèce est prédominante en Afrique de l'Ouest en particulier au Sénégal [44,45].

Cinq cas de divergences ont été notés sur les 32 identifications au niveau de l'espèce. Ils concernaient dans 2 cas, *T. rubrum* mal identifié comme *T. interdigitale*.

Contrairement à nos résultats, la plupart des écarts (11/14) rapportés par Li *et al*, concernaient *T. mentagrophytes* mal identifié comme *T. interdigitale* [36]. De plus, Pryce *et al*, ont observé deux résultats d'identification discordants entre l'identification phénotypique et l'identification basée sur la séquence ITS, dont un cas de *T. mentagrophytes* mal identifié comme *T. interdigitale* et un autre avec *Chrysosporium indicum* mal identifié comme *T. interdigitale* [39].

En 2015, des auteurs iraniens, utilisant la méthode PCR-RFLP, ont noté la même discordance que celle que nous avons observée mais avec 80,8% (76/94) de *T. rubrum* mal identifié comme *T. interdigitale* [46]. De même, des auteurs tunisiens ont rapporté cette même erreur d'identification, *T. rubrum* mal identifié comme *T. mentagrophytes* ou inversement 16,6% (4 cas sur 24) [32]. Il faut dire que les auteurs tunisiens n'ont pas précisé de distinction entre *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale* dans le complexe d'espèces *T. mentagrophytes*.

Ces observations pourraient être justifiées lorsque l'identification est basée uniquement sur une approche phénotypique car morphologiquement, *T. rubrum* présente un spectre de caractères qui se chevauchent. C'est pourquoi tant de variétés ou de synonymes ont été décrits dans le passé (cités ci-dessus). De même que la culture sur gélose pourpre de bromocrésol (BCP), l'hydrolyse de l'urée et le test de perforation des cheveux ont été inclus dans la gamme de test de confirmation de *T. rubrum* [47].

Dans la classification actuelle, le nom de *T. interdigitale* est réservé aux isolats exclusivement anthropophiles, principalement trouvés dans les cas d'onychomycose et d'intertrigos inter-orteils, par opposition aux isolats zoophiles de *T. mentagrophytes*, qui peuvent également être trouvés dans des atteintes cliniques autres que les infections des ongles et des pieds comme dans les teignes du cuir hevelu [48].

Cette considération est en accord avec nos résultats avec 88,9% (8/9) des isolats de *T. interdigitale* provenant d'intertrigos inter-orteils (6/8) et d'onychomycoses (2/8).

Taghipour *et al*, en 2019 ont noté une différence statistiquement significative dans la distribution du génotype ITS entre les différentes sites anatomiques infectés [48]. En revanche, ils n'ont trouvé aucune souche de *T. interdigitale* isolée à partir de cas de teigne du cuir chevelu contrairement à nos résultats avec un cas de teigne du cuir chevelu à *T. interdigitale* (MN691059).

Par ailleurs, pour nos souches, seul un test d'uréase a été réalisé sur un tube urée-indole qui a été utile pour distinguer *T. interdigitale* (uréase positif en 48 heures) à *T. rubrum* (test négatif pour le même délai).

Bien que cette étude se soit concentrée sur la comparaison de l'identification phénotypique avec celle moléculaire des dermatophytes à l'aide du séquençage de l'ADNr de la régions ITS, il serait intéressant de l'étendre et d'y inclure d'autres marqueurs moléculaires à fort pouvoir discriminatif, car une forte diversité génétique pourrait suggérer une meilleure capacité d'adaptation sous une pression sélective [49].

## **CONCLUSION**

Les dermatophytes sont les principales causes des mycoses superficielles. Ils sont responsables chez l'homme et l'animal, de lésions superficielles touchant la peau glabre (épidermophyties), les ongles (onychomycoses), les poils (folliculites) ou les cheveux. Ils sont généralement identifiés sur la base de l'aspect macroscopique, ainsi que de l'examen microscopique des cultures. Cette étude qui avait pour objectif de comparer l'identification morphologique à celle moléculaire basé sur le séquençage de la région des espaces internes transcrits (ITS) s'est déroulée en deux étapes. Une première qui a concerné l'isolement par culture sur gélose SCA et l'identification phénotypique par examens macroscopique et microscopique des cultures a été réalisé au laboratoire de parasitologie et mycologie de l'hôpital Aristide Le Dantec de Dakar (Sénégal). La deuxième étape consacrée à l'identification moléculaire, quant à elle, s'est déroulée à l'institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection de Marseille (France). Pour cela les colonies ont été repiquées sur SCG avant d'être soumis à une extraction de l'ADN génomique qui a servi pour le séquençage. A l'issue de cette étude, nous avons obtenu une similitude entre les méthodes phénotypique et moléculaire à 84,4% (27/32). Les souches de *T. soudanense* et *M. audouinii* étaient les espèces de dermatophytes les mieux identifiées par méthode phénotypique avec des proportions de 92,3% (12/13) et 83,3% (5/6). La proportion de cultures identifiées phénotypiquement révélée par la méthode moléculaire comme ayant été mal identifiée était de 15,6% (5/32) et dans 2 cas, cela concernait *T. rubrum* mal identifié comme *T. interdigitale*. Également, une souche identifiée phénotypiquement comme étant un *Trichophyton* sp. s'est révélée être *M. audouinii*.

En définitive, les méthodes phénotypiques ne semblent pas poser de problème de diagnostic concernant l'identification des dermatophytes pour les principales espèces de dermatophytes communément isolées au Sénégal d'après notre étude. Cependant, il semble insuffisant en cas de morphologie atypique ou de pléomorphisme. Ainsi, les techniques moléculaires doivent prévaloir dans nos laboratoires pour mieux identifier dans le but d'assurer de meilleurs soins aux patients.

Pour cela, nous recommanderons une accélération de la part des autorités du processus de transfert de technologie afin de pouvoir réaliser ces méthodes dans nos laboratoires.

Comme perspectives à cette étude, nous allons cibler d'autres régions d'intérêt telle que la  $\beta$ -tubuline ou encore la TEF-alpha pour une étude comparative entre ces différentes cibles.

## **REFERENCES**

- [1] **Coulibaly O, L'Ollivier C, Piarroux R, Ranque S.** Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Med Mycol* 2018;56:145–61.
- [2] **Chabasse D, Contet-Audonneau N.** Dermatophytes et dermatophytoses. *EMC - Mal Infect* 2011;8:1–15.
- [3] **Ghannoum MA, Isham NC.** Dermatophytes and dermatophytoses. *Clin Mycol* 2009;375–84.
- [4] **Verrier J, Monod M.** Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia* 2017;182:193–202.
- [5] **Gräser Y, Scott J, Summerbell R.** The new species concept in dermatophytes - A polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008;166:239–56.
- [6] **Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, et al.** Terbinafine resistance of Trichophyton clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:1–
- [7] **Gräser Y, Fröhlich J, Presber W, De Hoog S.** Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2007;56:1058–65.
- [8] **Tartor YH, Abo Hashem ME, Enany S.** Towards a rapid identification and a novel proteomic analysis for dermatophytes from human and animal dermatophytosis. *Mycoses* 2019;62:1116–26.
- [9] **Chabasse D, Bouchara J-P, De Gentille L, Brun S, Cimon B, Penn P.** Les dermatophytes. *Cahier de Formation Biologie Médicale*, vol. 31 2004:159p.
- [10] **Chabasse D.** Les dermatophytes: d'où viennent-ils? Comment sont-ils devenus des parasites? *J Mycol Med* 2008;18:27–35.
- [11] **de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al.** Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia* 2017;182:5–31.
- [12] **Monod M.** Récente révision des espèces de dermatophytes et de leur nomenclature.

*Rev Med Suisse* 2017;13:703–8.

- [13] **HAJAR MK.** Etude comparative des performances de sept milieux de culture proposés pour l'identification de dermatophytes. mohamed V Rabat, 2012.
- [14] **Chabasse D, Pihet M.** Difficulties encountered in the mycological diagnosis of dermatophytosis. *Rev Fra Lab* 2008;38:29–38.
- [15] **Guiguen C, Chabasse D.** Parasitoses et mycoses courantes observées chez les personnes âgées en France métropolitaine. *Rev Fra Lab* 2016;2016:73–84.
- [16] **Chabasse D, Contet-Audonneau N.** Tinea capitis. *Rev Fra Lab* 2013;2013:49–57.
- [17] **Anonyme.** Onycomyoses : Modalités de diagnostic et prise en charge. *Ann Dermatol Venereol* 2007;134:7–16.
- [18] **Chabasse D.** Onychomycoses, recommandations pour les modalités de diagnostic et de prise en charge. *J Mycol Med* 2007;17:241.
- [19] **Chabasse D.** Les principes et les pièges de l'identification des dermatophytes. *J Mycol Med* 2016;26:66–73.
- [20] **Chabasse D, Guiguen C. Dermatophytes** : difficultés d'interprétation et pièges du diagnostic mycologique. *Rev Fra Lab* 2019;2019:26–35.
- [21] **Courtellemont L, Chevrier S, Degeilh B, Belaz S, Gangneux JP, Robert-Gangneux F.** Epidemiology of *Trichophyton verrucosum* infection in Rennes University Hospital, France: A 12-year retrospective study. *Med Mycol* 2017;55:720–4.
- [22] **L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonneau N, Hendrickx M, et al.** A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol* 2013;51:713–20.
- [23] **L'Ollivier C, Ranque S.** MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia* 2017;182:183–92. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0080-x>.
- [24] **Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D.** Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infect Genet Evol* 2013;20:336–51.

- [25] **Rolland C.** Apport d ' une technique de biologie moléculaire ( ONYCHODIA ® , Bioadvance ) dans le diagnostic biologique des onychomycoses. Mémoire DES-BM. *Université Joseph Fourier Grenoble* 2006;116p.
- [26] **Dobrools A, Stacey P, Kasuba A, Kolsa M.** PCR-RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in Central Poland. *J Dermatol Sci* 2006;42:71–4.
- [27] **Symoens F, Jousson O, Packeu A, Fratti M, Staib P, Mignon B, et al.** The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: Intraspecies variability and mating behaviour. *J Med Microbiol* 2013;62:377–85.
- [28] **Charlent A-L.** Le complexe *Trichophyton mentagrophytes*, caractérisation mycologique et moléculaire d ' un nouveau variant : *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae*. *Thèse Université Lorraine, Sciences pharmaceutiques*. 2011. fhal-01739135f2011.
- [29] **Bontems O, Hauser PM, Monod M.** Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *Br J Dermatol* 2009;161:791–6.
- [30] **Hagger JA, Atienzar FA, Jha AN.** Genotoxic, cytotoxic, developmental and survival effects of tritiated water in the early life stages of the marine mollusc, *Mytilus edulis*. *Aquat Toxicol* 2005;74:205–17.
- [31] **Didehdar M, Shokohi T, Khansarinejad B, Ali Asghar Sefidgar S, Abastabar M, Haghani I, et al.** Caractérisation des dermatophytes cliniquement importants dans le nord de l'Iran en utilisant la PCR-RFLP de la région ITS. *J Mycol Med* 2016;26:345–50.
- [32] **Neji S, Makni F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Ayadi A.** Identification moléculaire des dermatophytes isolés à Sfax-Tunisie. *J Mycol Med* 2010;20:85–90.
- [33] **Hirai A, Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Hasegawa A.** Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol* 2003;83:11–20.
- [34] **Dhib I, Fathallah A, Charfeddine IB, Meksi SG, Said MB, Slama F, et al.** Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of

dermatophyte onychomycosis. *J Mycol Med* 2012;22:249–55.

- [35] **Ninet B, Jan I, Bontems O, Léchenne B, Jousson O, Panizzon R, et al.** Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. *J Clin Microbiol* 2003;41:826–30.
- [36] **Li HC, Bouchara JP, Hsu MML, Barton R, Su S, Tsung CC.** Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol* 2008;57:592–600.
- [37] **Dugat M.** Apport de la spectrométrie de masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamentueux au laboratoire de mycologie médicale. Thèse medecine. *université de limoge* 2014;132p.
- [38] **Espinasse M-EBF.** Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale. *Rev Française Des Lab* 2003:49–53.
- [39] **Pryce TM, Palladino S, Kay ID, Coombs GW.** Erratum: Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Med Mycol* 2003; 41: 369-381.
- [40] **Diongue K, Diallo MA, Ndiaye M, Badiane AS, Seck MC, Diop A, et al.** Champignons agents de mycoses superficielles isolés à Dakar (Sénégal) : une étude rétrospective de 2011 à 2015. *J Mycol Med* 2016;26:368–76.
- [41] **Diongue K, Boye A, Bréchard L, Diallo MA, Dione H, Ndoye NW, et al.** Dermatophytic mycetoma of the scalp due to an atypical strain of *Microsporum audouinii* identified by MALDI-TOF MS and ITS sequencing. *J Mycol Med* 2019;29:185–8.
- [42] **Normand AC, Packeu A, Cassagne C, Hendrickx M, Ranque S, Piarroux R.** Nucleotide sequence database comparison for routine dermatophyte identification by internal transcribed spacer 2 genetic region DNA barcoding. *J Clin Microbiol* 2018;56:1–13.
- [43] **Su H, Packeu A, Ahmed SA, Al-Hatmi AMS, Blechert O, Ilkit M, et al.** Species distinction in the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 2019;57:1–14.

- [44] **Ameen M.** Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol* 2010;28:197–201.
- [45] **Ndiaye D, Ndiaye M, Badiane A, Seck MC, Faye B, Ndiaye JL, et al.** Dermatophyties diagnostiquées au laboratoire de parasitologie et mycologie de l'hôpital Le Dantec de Dakar, entre 2007 et 2011. *J Mycol Med* 2013;23:219–24.
- [46] **Ahmadi B, Mirhendi H, Shidfar MR, Nouripour-Sisakht S, Jalalizand N, Geramishoar M, et al.** A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. *J Mycol Med* 2015;25:29–35.
- [47] **Ellis D, Davis S, Alexiou H, Handke R, Bartley R.** Descriptions of medical fungi. The National library of Australia, Parkes, Australia, 2<sup>nd</sup> edition 2007.
- [48] **Taghipour S, Pchelin IM, Zarei Mahmoudabadi A, Ansari S, Katiraei F, Rafiei A, et al.** *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations. *Mycoses* 2019;62:1084–91.
- [49] **Gong J, Wu W, Ran ML, Wang X, Liu W, Wan Z, et al.** Population differentiation and genetic diversity of *Trichophyton rubrum* as revealed by highly discriminatory microsatellites. *Fungal Genet Biol* 2016;95:24–9.

## **ANNEXES**

## **Clé d'identification des dermatophytes proposée par Chabasse et al, en 2004**

---

La clé d'identification proposée ici a pour objectif de permettre une orientation diagnostique, à partir de l'observation macroscopique et microscopique d'une souche donnée. Elle repose sur un nombre limité de critères, les premiers étant la présence ou non de microconidies et de macroconidies à l'examen microscopique de la culture, et l'aspect lisse ou échinulé des macroconidies éventuellement présentes. Une même espèce pourra donc, selon les souches, être retrouvée plusieurs fois au cours de cette clé.

### **Filaments septés, fins et réguliers, hyalins**

- 1. Absence de macroconidies et de microconidies
- 2. Présence exclusive de macroconidies
- 3. Présence exclusive de microconidies
- 4. Présence de macroconidies et de microconidies
  - 4.1. macroconidies à paroi lisse
  - 4.2. macroconidies à paroi échinulée

## 1. Absence de macroconidies et de microconidies

Croissance rapide et extensive

*M. audouinii*  
(chlamydospores)



Colonies violettes

*T. violaceum*  
(filaments irréguliers)



Croissance lente, plutôt restrictive

Colonies jaunes à rouille

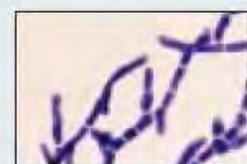
Filaments  
en tiges de bambou

*M. ferrugineum*



Filaments  
en "fil de fer barbelé"

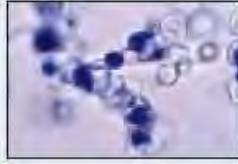
*T. soudanense*



Colonies blanc-crème

Filaments toruloïdes

*T. verrucosum*



Clous et chandeliers faviques

*T. schoenleinii*

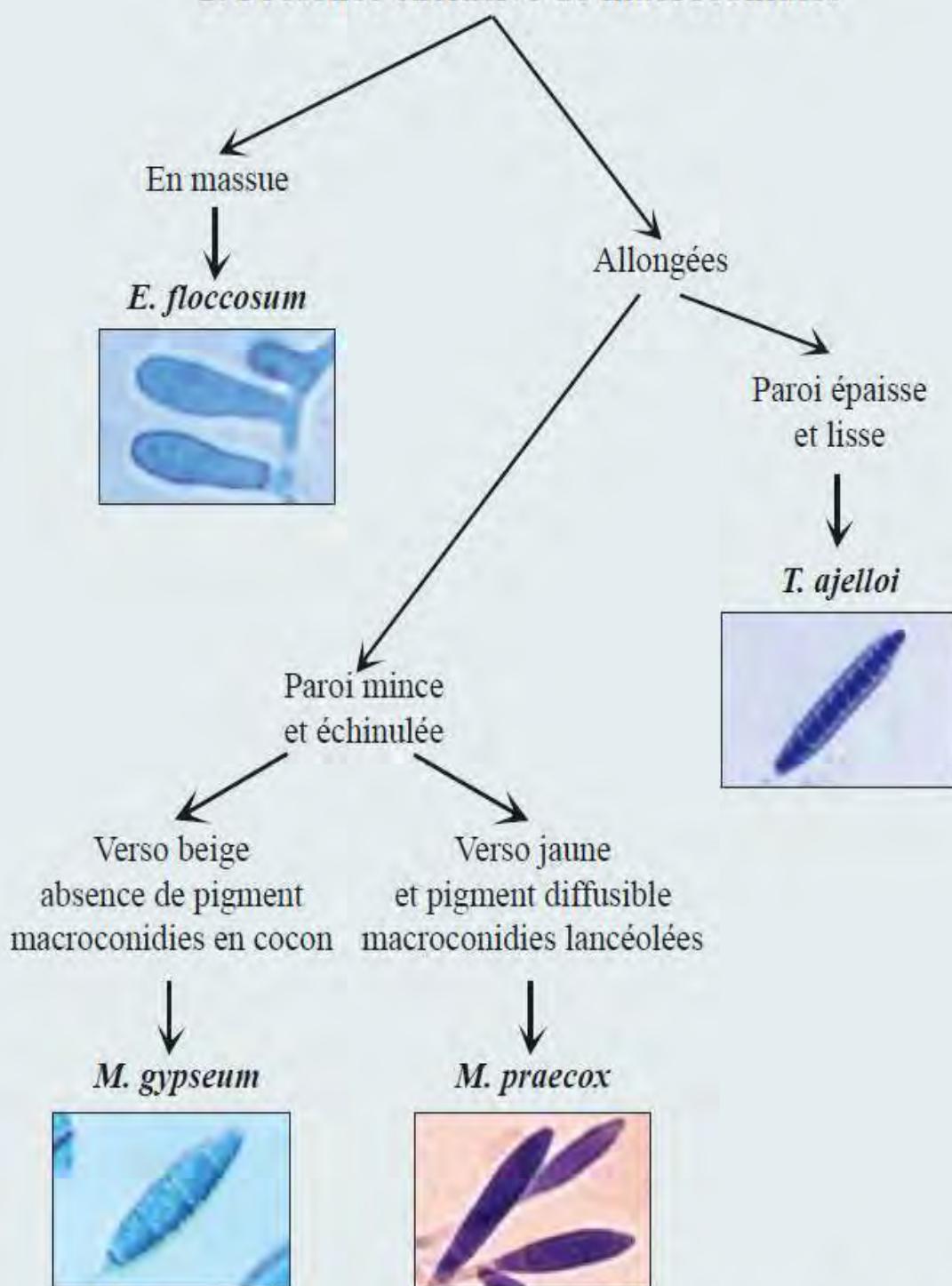


Filaments irréguliers

*T. violaceum*  
var. *glabrum*

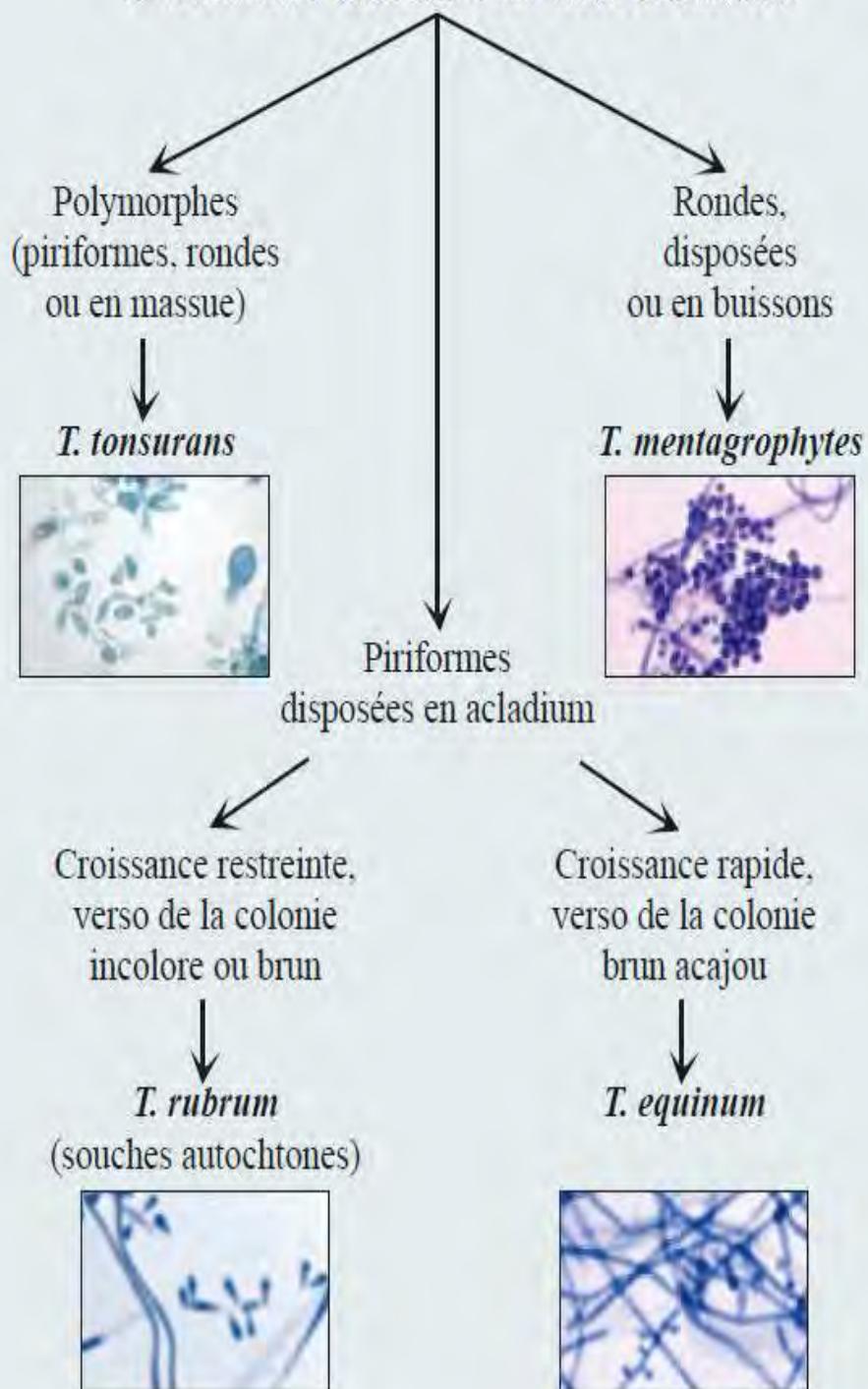


## 2. Présence exclusive de macroconidies



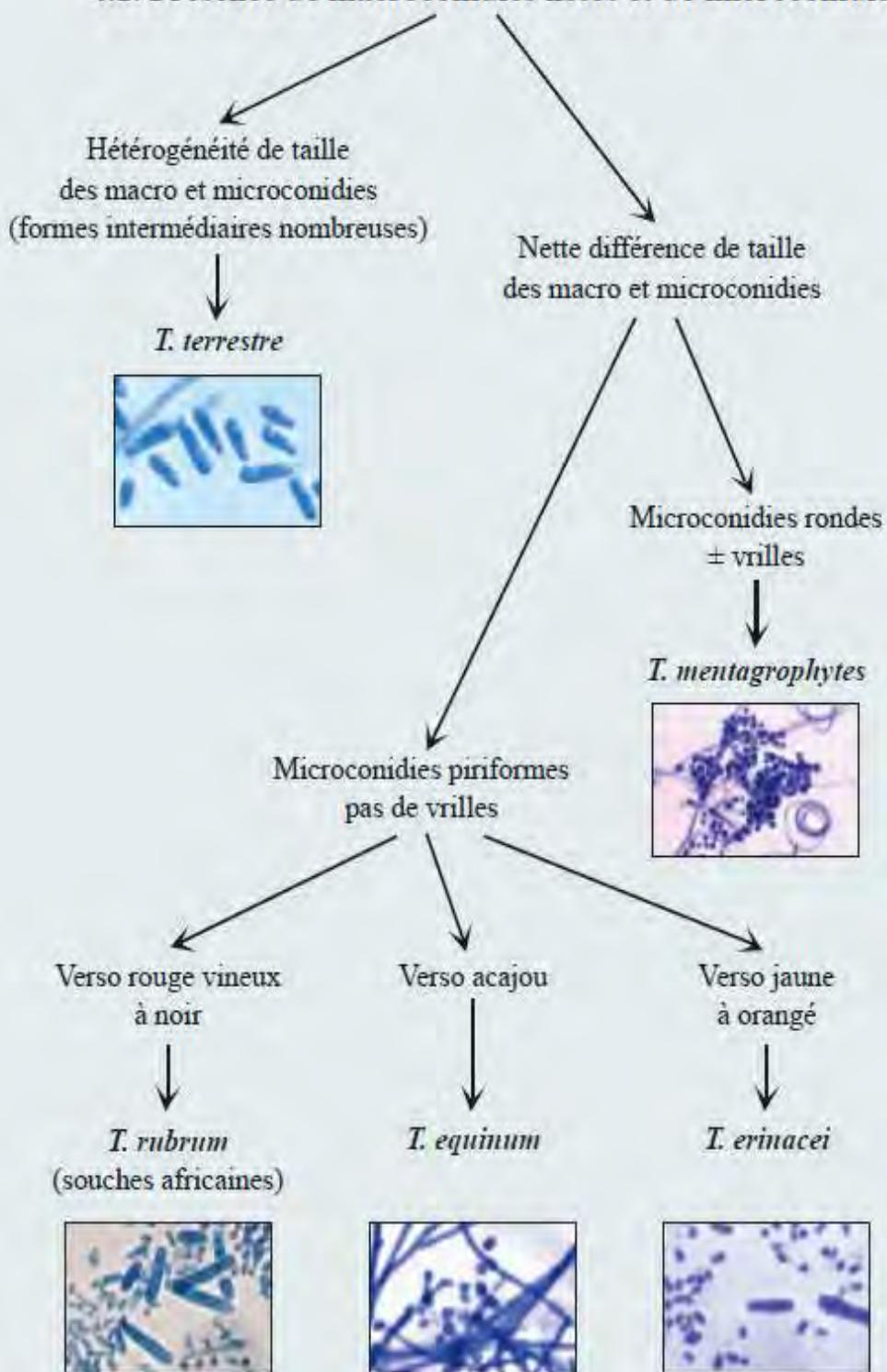
\* Plus rarement, la présence exclusive de macroconidies peut être observée pour certaines souches de *M. audouinii* et de *M. canis*.

### 3. Présence exclusive de microconidies



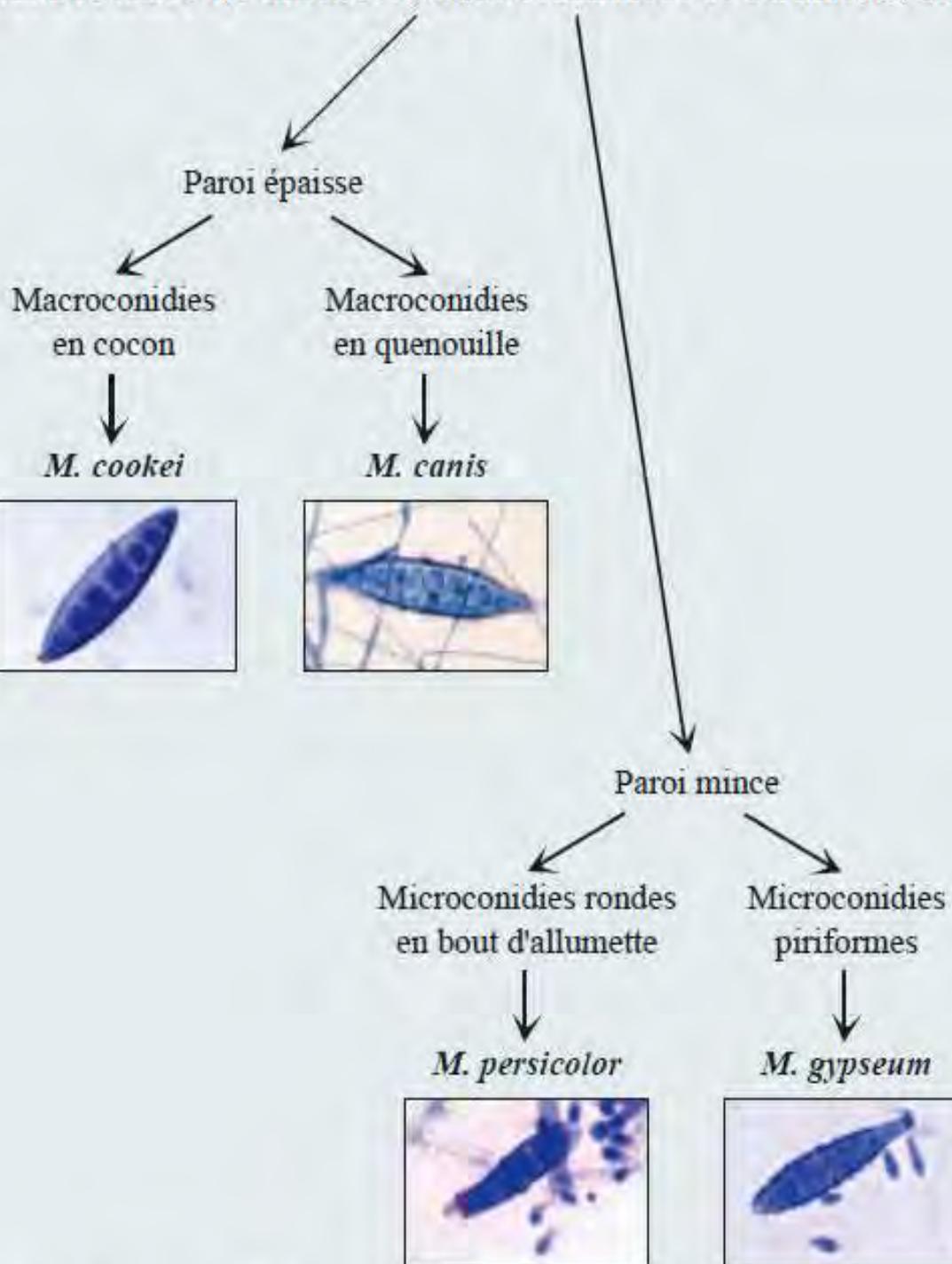
\* Plus rarement, la présence exclusive de microconidies peut aussi être observée pour certaines souches de *M. audouinii*, de *M. persicolor*, de *T. erinacei* et de *T. soudanense*.

#### 4.1. Présence de macroconidies lisses et de microconidies



\* Plus rarement, la présence simultanée de macroconidies lisses et de microconidies peut être observée pour certaines souches de *T. tonsurans*.

#### 4.2. Présence de macroconidies échinulées et de microconidies



\* Plus rarement, la présence simultanée de macroconidies échinulées et de microconidies peut être observée pour certaines souches de *M. audouinii*.

## Fiche de consentement

---

### FORMULAIRE DE CONSENTEMENT :

Titre de l'étude : Identification de dermatophytes isolés à Dakar (Sénégal) : étude comparative entre la méthode phénotypique et le séquençage de la région des espaces internes transcrits (ITS)

Lettre de Consentement libre et éclairé

Madame, Mademoiselle /Monsieur,

Vous avez été sélectionné pour participer à notre étude visant à comprendre l'épidémiologie des dermatophytes.....

Veuillez lire (ou vous faire lire) attentivement la lettre d'information qui vous a été remise afin de prendre connaissance des modalités de l'étude.

Il est important que vous preniez connaissance du déroulement de l'étude, des examens cliniques et de la réalisation des différents types de prélèvements(squames, cheveux, ongles...) qui seront effectuées. La lettre d'information est obligatoire pour votre information et nécessaire pour vous permettre de prendre votre décision sur la participation à cette étude de façon libre et éclairée.

Notre équipe reste à votre disposition pour vous donner tout complément d'information que vous jugeriez nécessaire.

Je soussignée, Madame, Mademoiselle/Monsieur.....

Certifie avoir pris connaissance de la lettre d'information de l'étude qui sera réalisée par **Dr Mamadou Alpha DIALLO** et avoir reçu des réponses satisfaisantes à mes questions concernant cette étude.

Ma décision de participer à l'étude, matérialisée par ma signature ci-dessous, est volontaire et gratuite.

Le.....

Signature précédée de la mention « lu et approuvé »

Je soussignée,

- **Pr Mouhamdou NDIAYE**.....

- Directeur de mémoire / Service de Parasitologie-mycologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et D'odontostomatologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar

- M'engage au respect des termes du consentement éclairé par la lettre d'information.

Le.....

Signature précédée de la mention « lu et approuvé »

## Résumé

---

**Introduction.** - Classiquement, les dermatophytes sont identifiés par des méthodes phénotypiques même si ces méthodes restent parfois difficiles ou incertaines. D'autre part, l'analyse de la séquence nucléotidique des espaces internes transcrits (ITS) de l'ADNr s'est avérée être une méthode utile pour l'identification des dermatophytes. L'objectif de cette étude était de comparer la méthode phénotypique avec le séquençage de l'ADN de la région ITS pour l'identification des espèces de dermatophytes isolées à Dakar, Sénégal.

**Matériel et méthodes.** - Du 1<sup>er</sup> janvier au 31 décembre 2017, des souches de dermatophytes ont été isolées de patients diagnostiqués avec teignes du cuir chevelu (n =16), intertrigos inter-orteils (n=9), onychomycoses (n=5), épidermophyties (n=1) et mycétome du cuir chevelu (n=1) au laboratoire de parasitologie et de mycologie du CHU Aristide Le Dantec de Dakar. Le diagnostic des dermatophytoses a été fait sur la base d'un examen mycologique comprenant un examen direct et une culture. Les échantillons positifs à dermatophytes ont été identifiés sur la base des caractéristiques macroscopique et microscopiques des colonies et parfois biochimiques (test à l'uréase). Après identification, les colonies de dermatophytes ont été maintenues par sub-cultures régulières. À titre de comparaison, l'analyse de la séquence nucléotidique de la région ITS a été appliquée à tous ces isolats de dermatophytes.

**Résultats.** - Au total, 32 souches de dermatophytes ont été collectés. L'identification phénotypique a révélé *Trichophyton soudanense* (n=13), *T. interdigitale* (n=10), *Microsporum audouinii* (n=5) et une souche pour chacune des espèces suivantes : *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* et *M. canis* et une souche non identifiée. Les séquences ITS ont montré, après BLAST, 99 à 100% de similitude. L'identification des isolats de dermatophytes par des méthodes conventionnelles a été confirmée par séquençage de l'ADN de la régions ITS dans 84% des cas. Les discordances concernent principalement *T. rubrum* mal identifié comme *T. interdigitale*.

**Conclusion.** - Le séquençage a fourni un excellent outil pour l'identification des souches de dermatophytes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques typiques. Il a également pu mener à l'identification d'une souche atypique de *M. audouinii* responsable d'un mycétome du cuir chevelu.

**Mots-clés :** Dermatophyte ; Séquençage ; Identification morphologique ; ITS ; Dakar