

Mémoire de Maîtrise en médecine

Identification des dermatophytes causant des teignes de la peau glabre (*Tinea glabra*) et du cuir chevelu (*Tinea capitis*) par PCR

Etudiant

Lukas Krähenbühl, BMed

Tuteur

Prof. Michel Monod
Service de Dermatologie, CHUV

Expert

Dr. Philippe Hauser, MER
IMUL, CHUV

Lausanne, 20.09.2012

Abstract

Background : Dermatophyte identification in *tinea capitis* is essential for choosing the appropriate treatment, and in various *tinea* to identify the possible source of the infection. The failure of fungi to grow in cultures frequently occurs, especially in case of previous antifungal therapy.

Objective : To develop a fast and reliable method for the identification of the infecting dermatophyte *in situ* by PCR/sequencing in cases of *tinea pedis*, *tinea glabra* and *tinea capitis*.

Methods: Fungal DNA was extracted from both skin (N=22) and hair (N=5) samples with positive (N=26) and negative (N=1) direct microscopical examination. Dermatophytes were identified by sequencing a 28S ribosomal DNA subunit amplicon generated by nested-PCR.

Results: Only nested PCR allowed to obtain sufficient amounts of amplicon to proceed to sequencing. In 4 out of 5 cases of *tinea pedis*, 10 out of 12 cases of *tinea glabra* and 4 out of 4 cases of *tinea capitis* in which a dermatophyte could be identified by culture, the same species was found by PCR/sequencing. Once out of 28 times, a dermatophyte different from that determined by cultures was identified by PCR/sequencing. This result could be due to missidentification using macroscopical and microscopical characters. In one case each of *tinea pedis* and *tinea corporis*, a dermatophyte was identified by PCR/sequencing, while culture assays remained sterile.

Conclusions: This method was found to be fast (24 h instead of two weeks for fungal culture), highly sensible and very specific. It can be particularly helpful in cases of *tinea capitis* in which appropriate treatment is essential and patients subject to heavy systemic treatment are mostly children.

Keywords: *Trichophyton*; *Microsporum*; *tinea capitis*; *tinea corporis*; *tinea pedis*; mycosis; molecular diagnosis

Résumé

Contexte: Le nombre de teignes du cuir chevelu et de la peau glabre étant en nette augmentation, l'identification du pathogène qui est indispensable pour un traitement ciblé, a, par conséquent, un grand intérêt pour la santé publique. Dans divers cas, un animal de compagnie peut être identifié en tant que source du pathogène. La fréquence de cultures restant stériles est particulièrement élevée en cas de prétraitement antifongique.

Objectif: Le but de ce travail est de mettre au point une méthode rapide d'identification du dermatophyte pathogène *in situ* par PCR/séquençage dans les cas de teignes du cuir chevelu et/ou de la peau glabre.

Matériel et méthodes : De l'ADN a été extrait de squames (N=5) et cheveux (N=21) dont l'examen direct démontrait une infection fongique (N=26) ou se révélait négatif (N=1). Ensuite, une première PCR du segment 28S de l'ADN ribosomale fongique a été effectuée, suivie par une PCR nichée intérieure à ce segment. L'amplicon a été séquencé et le champignon est identifié par alignement.

Résultats : Seule la PCR enchainée a permis d'obtenir une quantité suffisante d'amplicon pour permettre le séquençage. Dans 4 cas sur 5 de *tinea pedis*, 10 sur 12 de *tinea glabra*, respectivement 4 sur 4 de *tinea capitis*, dans lesquels un dermatophyte a été identifié en culture, le même dermatophyte a été identifié par PCR/séquençage. Une fois sur 27 prélèvements, un autre dermatophyte a été identifié par PCR/séquençage. Ce résultat pourrait être dû à une fausse identification du champignon en culture. Dans un cas de *tinea pedis* et un cas de *tinea corporis*, la culture est restée stérile, mais un dermatophyte a pu être identifié par PCR et séquençage.

Conclusions : La méthode décrite est à la fois rapide (24 h au lieu de deux semaines pour la culture), sensible et très spécifique. Elle est particulièrement utile dans les cas de teigne du cuir chevelu, dans lesquels le traitement est différent selon l'espèce de dermatophyte et où il s'agit d'un traitement systémique lourd, souvent chez l'enfant.

Mots-clés : *Trichophyton*; *Microsporum*; *tinea capitis*; *tinea corporis*; *tinea pedis*; mycose; diagnostic moléculaire

Table des matières

1	Les champignons en microbiologie médicale	6
2	Les mycoses cutanées.....	8
2.1	Tinea pedis	8
2.2	Tinea cruris.....	8
2.3	Tinea corporis	9
2.4	Tinea capitis	9
2.5	Tinea barbae	9
2.6	Tinea unguium (dermatophytoses unguéales)	10
3	Techniques usuelles de laboratoire en mycologie dermatologique	11
3.1	L'examen direct	11
3.2	Les cultures de champignons	11
3.3	Identification des champignons in situ dans les prélèvements.....	12
3.4	Identification des champignons dans les ongles par PCR	13
3.5	Identification des champignons dans les prélèvements cutanés et les cheveux par PCR.....	14
4	Objectif du travail de Master	15
4.1	Contexte	15
4.2	Objectif	15
4.3	Résultats et plus value escomptés	15
5	Matériel et Methodes.....	16
5.1	Prélèvements.....	16

5.2	Examens mycologiques directs.....	16
5.3	Cultures	17
5.4	Extraction de l'ADN des champignons dans les squames et les cheveux infectés.....	17
5.5	Amplification de l'ADN codant pour la sous-unité 28S des ribosomes.....	17
5.6	PCR nichée ou Nested PCR	18
6	Résultats et discussion	19
6.1	Développement d'une méthode d'identification des dermatophytes dans les prélèvements cutanés.....	20
6.2	Identifications des dermatophytes dans les prélèvements cutanés	21
7	Conclusions.....	24
8	Table des illustrations	26
9	Bibliographie	27

1 Les champignons en microbiologie médicale

Les champignons regroupent des organismes aussi différents que les levures, les dermatophytes, les *Penicillium* et les champignons à lamelles. S'il est difficile de donner une définition brève et concise des champignons, leurs principaux caractères se résument comme suit :

1. Ce sont des eucaryotes et doivent donc être absolument distingués des bactéries par ce caractère.
2. Ils sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils utilisent une source de carbone organique. Ils n'ont pas de chlorophylle.
3. Ils vivent sous la forme de colonies de cellules isolées (levures) ou de mycélium. Un mycélium est un réseau de filaments (ou hyphes) cloisonnés transversalement. Dans chaque segment ou cellule fongique se trouvent un à plusieurs noyaux haploïdes ou diploïdes.
4. La cellule fongique est délimitée par une paroi de β 1-3 et β 1-6 glucane, et de chitine.
5. La reproduction se fait par des spores de manière sexuée, c'est-à-dire suite à une méiose, ou asexuée, suite à une mitose. Les spores sexuées sont généralement dans des sporanges microscopiques ou macroscopiques.

Chez l'homme, les champignons peuvent infecter la peau, le cuir chevelu, les ongles, les organes internes ainsi que l'oreille, les sinus, la cornée, etc. Les champignons en mycologie médicale sont divisés en trois grands groupes à des fins pratiques.

1. Les dermatophytes qui sont des champignons filamenteux parasites spécialisés et se développent dans les tissus kératinisés. Ils sont la cause de la plupart des mycoses de la peau et des ongles, mais envahissent également les poils et les cheveux. En pratique, seule la forme produisant des conidies est isolée. Cependant, des confrontations expérimentales de souches de certaines espèces zoophiles et géophiles permettent d'obtenir une forme sexuée appartenant aux ascomycètes. Trois genres de dermatophytes sont reconnus: *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton* (Mignon *et al.*, 2011).

2. Les levures (et les champignons dimorphes) : *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* et *Histoplasma capsulatum* sont les plus importants en pathologie humaine.

3. Les champignons filamenteux non dermatophytes qui forment un groupe hétérogène d'un point de vue systématique. Ils comprennent notamment les *Aspergillus*, les *Fusarium* et les *Mucorales*.

2 Les mycoses cutanées

Les champignons causant des infections de la peau et/ou de ses annexes (ongles, poils, cheveux) peuvent être des dermatophytes, des levures ou des moisissures. Cependant, les dermatophytes sont les champignons les plus fréquemment rencontrés dans la pratique courante. On distingue trois groupes écologiques de dermatophytes : les espèces anthropophiles dont le milieu naturel est l'homme, les espèces zoophiles dont l'habitat naturel est les animaux, et les espèces géophiles dont le milieu naturel est le sol.

On appelle teigne ou *tinea* une mycose de la peau, des cheveux ou des ongles causée par un champignon. Ce terme est souvent pris comme équivalent de dermatophytose. Toutefois, *tinea nigra* n'est pas causée par un dermatophyte, mais par *Hortaea werneckii*.

2.1 Tinea pedis

On appelle *tinea pedis* les mycoses des pieds (mycoses plantaires ou intertrigo interorteil). Ce sont des infections très fréquentes. Les principales espèces incriminées sont *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton interdigitale* (environ 80% et 20% des cas, respectivement) (Monod *et al.*, 1992) . L'aspect clinique montre une desquamation sèche ou macérée plus ou moins prurigineuse pouvant être associée à des fissures et des vésicules. Les ongles peuvent être aussi atteints. Les intertrigos peuvent s'étendre à la plante et au dos du pied ou se disséminer à d'autres régions du corps. S'ils ne sont pas traités, ils évoluent chroniquement. En cas de foyer plantaire très inflammatoire, une réaction à distance à type de dysidrose palmaire peut se rencontrer.

2.2 Tinea cruris

Ce terme désigne les infections dermatophytiques des plis inguinaux-cruraux. La contamination se fait par contact interhumain ou par le partage de vêtements et de

linges. Une auto-inoculation à partir d'une dermatophytose des pieds est possible et doit être systématiquement envisagée.

2.3 Tinea corporis

Ce terme désigne les dermatophytoses de la peau glabre. Elles sont le plus souvent dues à des dermatophytes d'un animal domestique parasité et quelquefois à une contamination d'un dermatophyte des pieds. Les agents les plus fréquemment responsables des dermatophytoses de la peau glabre sont *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* (espèces zoophiles) et *Trichophyton rubrum* (espèce anthropophile) (Monod *et al.* 1992). L'infection peut se localiser dans n'importe quelle région non pileuse du tronc, des extrémités ou du visage (à l'exception des zones de la barbe), préférentiellement dans les zones découvertes du corps.

2.4 Tinea capitis

On appelle *tinea capitis* les dermatophytoses du cuir chevelu. Les teignes du cuir chevelu sont des infections qui concernent habituellement les enfants avant la puberté. L'aspect clinique est variable d'un individu à l'autre selon l'agent pathogène et les réactions immunitaires de l'hôte (Hay *et al.*, 2001). L'inflammation est particulièrement forte si l'espèce pathogène est zoophile. L'examen en lumière de Wood (rayonnement UV d'une longueur d'onde de 365 nm) permet d'identifier teignes à *Microsporum canis* en émettant une fluorescence verte (Mignon *et al.*, 2011).

2.5 Tinea barbae

Les teignes de la barbe sont des infections qui concernent habituellement les adultes et sont causées par *Trichophyton verrucosum*. Le réservoir naturel de ce champignon est le bétail (Mignon *et al.*, 2011).

2.6 Tinea unguium (dermatophytoses unguéales)

Les onychomycoses dermatophytiques sont des affections très courantes (Chabasse, 2004) souvent secondaires à une mycose des espaces interdigitaux ou plantaire. Les principaux dermatophytes responsables sont *Trichophyton rubrum* (environ 80% des cas), *Trichophyton interdigitale* (environ 20%) et *Epidermophyton floccosum* (<1%) (Bontems *et al.*, 2009). Toutefois les agents infectieux des onychomycoses ne sont pas seulement des dermatophytes, mais aussi des levures du genre *Candida* et des moisissures. La fréquence des onychomycoses à moisissures est estimée à 20-30% des cas, sans compter les infections mixtes (10%). Les statistiques données à ce sujet dans la littérature varient énormément (Gupta *et al.*, 2001 ; Summerbell *et al.*, 2005 ; Verrier *et al.*, 2012).

3 Techniques usuelles de laboratoire en mycologie dermatologique

3.1 L'examen direct

Le diagnostic d'une mycose est basé sur la mise en évidence d'un champignon dans les lésions (il n'y a pas de mycose sans champignon), l'isolement du champignon en culture, et son identification. En dermatologie, l'examen direct est essentiel et prime sur le résultat de la culture. Le prélèvement cutané (squames, poils, cheveux) est déposé sur une lame dans une goutte de réactif (KOH 10% ou solution de sulfure de sodium) avec ou sans colorant, et recouvert d'une lamelle. L'encre Parker et le chlorazol black E permettent de contraster les éléments fongiques dans le KOH. Des fluorochromes permettent de contraster les éléments fongiques dans la solution de sulfure de sodium (Monod *et al.*, 1989). En mycologie médicale, les techniques de fluorescence sont particulièrement appréciées pour détecter les éléments fongiques lorsqu'ils sont peu nombreux. En outre, elles permettent une meilleure observation de la morphologie des champignons (Baudraz-Rosselet *et al.*, 2005).

3.2 Les cultures de champignons

L'isolement du champignon se fait après avoir déposé les prélèvements (squames ou liquide) sur un milieu nutritif gélosé. Le milieu le plus utilisé et de référence pour les champignons est le milieu de Sabouraud. Il est impératif de sélectionner les dermatophytes des germes associés, c.-à-d. des bactéries et des champignons filamenteux saprophytes contaminants. Le problème est résolu en ajoutant 50 µg/ml de chloramphénicol (pour inhiber la croissance des bactéries) et 50-100 µg/ml d'actidione (ou cycloheximide) au milieu de culture. L'actidione inhibe la croissance de la plupart des champignons filamenteux, mais pas celle des dermatophytes résistants à cette substance. Au laboratoire du service de dermatologie du CHUV, les prélèvements sontensemencés simultanément sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol ainsi que sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol + actidione. Les levures se développent en 24-48 heures, les champignons filamenteux tels que

les *Aspergillus* et la plupart des espèces de saprophytes contaminants se développent en 2-4 jours. Les dermatophytes, à croissance plus lente, ne peuvent être identifiés qu'après 7-15 jours (Monod *et al.*, 1992 ; De Hoog *et al.*, 2000).

3.3 Identification des champignons *in situ* dans les prélèvements

L'identification des champignons incriminés dans les mycoses par le biais des cultures posent plusieurs problèmes.

1. Les dermatophytes ont une croissance lente et l'identification de l'espèce ne se fait qu'après 15 jours. (Baudraz-Rosselet *et al.*, 2005).
2. Souvent les tubesensemencés demeurent stériles. Il a été démontré qu'aucun champignon ne pousse dans environ 35% des cas où une onychomycose a été détectée par un examen mycologique direct positif (Verrier *et al.*, 2012).
3. En se focalisant sur le cas des onychomycoses, on observe que de nombreuses espèces de moisissures sont isolées. Il est souvent difficile d'affirmer si une moisissure est réellement l'agent infectieux d'une onychomycose, ou s'il s'agit d'une contamination à partir de spores isolées dans les ongles. Seul l'isolement répétitif d'une moisissure à partir de plusieurs prélèvements permet avec certitude de conclure à son implication dans une onychomycose (English, 1976).

Face à ces problèmes, l'identification du champignon *in situ* dans les prélèvements présente un grand intérêt. Plusieurs techniques par PCR ont été développées à ces fins. L'ADN des champignons est extrait des prélèvements après un traitement protéolytique ou réducteur pour séparer les hyphes et les spores des kératinocytes. Pour identifier l'espèce de champignon incriminée dans une onychomycose, soit un fragment amplifié est séquencé, soit son profil de digestion par des enzymes de restriction est analysé (Bontems *et al.*, 2009 ; Verrier *et al.* 2012)

3.4 Identification des champignons dans les ongles par PCR

L'identification des champignons *in situ* dans les ongles par PCR permet de substantielles améliorations du diagnostic et du traitement des onychomycoses :

1. L'identification de l'agent infectieux peut être obtenue en 48 heures versus 1-3 semaines avec des cultures. L'identification d'un dermatophyte a été confirmée dans 100% des cas quand *Trichophyton rubrum* ou *Trichophyton interdigitale* avait poussé en culture (Bontems *et al.*, 2009 ; Verrier *et al.* 2012).

2. Il a été possible de montrer que la majorité des *Fusarium*, *Acremonium* et *Scopulariopsis brevicaulis* identifiés en culture étaient en fait l'agent infectieux. Ceci est très important car un grand nombre des onychomycoses à *Fusarium* spp. et *Acremonium* spp. s'est révélé insensible aux traitements standards par les azoles et la terbinafine (Baudraz-Rosselet *et al.*, 2010).

3. L'agent infectieux peut être identifié dans au moins 70% des cas où des moisissures autres que *Fusarium* spp. et *Scopulariopsis brevicaulis* étaient isolées en culture ou lorsque les essais de cultures demeuraient stériles (Bontems *et al.*, 2009 ; Verrier *et al.* 2012).

4. L'identification par PCR des champignons dans les ongles a mis en évidence la prévalence élevée des moisissures dans les onychomycoses. Nous estimons la fréquence des onychomycoses à moisissures à 20-30% des cas, sans compter les infections mixtes (10%) (Bontems *et al.*, 2009 ; Verrier *et al.*, 2012). Les statistiques données à ce sujet dans la littérature varient énormément.

Les résultats obtenus par PCR donnent un image de l'infection à l'instant où a été fait le prélèvement, c'est un état des lieux. Il est possible qu'au fil du temps certaines moisissures identifiées aient infecté l'ongle après un autre champignon (par exemple *Trichophyton rubrum*).

3.5 Identification des champignons dans les prélèvements cutanés et les cheveux par PCR

La problématique de l'identification des champignons dans les prélèvements cutanés et les cheveux est différente de celle de l'identification des champignons dans les onychomycoses car seuls des dermatophytes sont incriminés. Alors que deux espèces uniquement sont à l'origine d'onychomycoses (*T. rubrum* et *T. interdigitale*), une bonne dizaine d'espèces de dermatophytes causent des teignes de la peau glabre et du cuir chevelu. L'efficacité du traitement des teignes du cuir chevelu dépend de l'espèce de dermatophyte incriminé (Mock *et al.*, 1998). De plus, certaines espèces de dermatophytes qui se ressemblent morphologiquement sont souvent difficiles à identifier en culture.

De nombreuses techniques de biologie moléculaire, comme l'analyse de fragments de restriction (restriction fragment length polymorphism ou RFLP) ou bien les techniques d'hybridation, ont été développées pour identifier les dermatophytes en cultures (Turin *et al.*, 2000 ; Ninet *et al.*, 2003 ; De Baere *et al.*, 2010) et directement à partir du prélèvement. Toutefois, à partir du prélèvement, seul deux espèces de dermatophytes ont été identifiées, *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* (Alexander *et al.*, 2011).

4 Objectif du travail de Master

Identification des dermatophytes causant des teignes du cuir chevelu (*Tinea capitis*) et de la peau glabre (*Tinea glabra*) par PCR.

4.1 Contexte

Le nombre de teignes du cuir chevelu et de la peau glabre est en augmentation et ces teignes constituent un réel problème de santé publique. L'identification du dermatophyte incriminé au niveau de l'espèce est importante afin de prescrire le traitement adéquat et de déterminer la source de contamination dans le cadre des teignes zoophiles. Ceci permet de prendre des mesures d'hygiène et de prévention pour les personnes en contact avec l'hôte primaire du champignon.

4.2 Objectif

Le but de ce travail est d'identifier les espèces de dermatophytes *in situ* dans les cheveux et de la peau avec des méthodes rapides et efficaces de diagnostic par PCR.

4.3 Résultats et plus value escomptés

Nous espérons une augmentation de la sensibilité de l'identification du champignon incriminé car de nombreuses cultures demeurent stériles. Un gain de temps devrait être assuré car l'identification par PCR ne dure que 24 heures alors qu'un dermatophyte ne peut être identifié qu'après avoir incubé les cultures pendant 15 jours au moins.

5 Matériel et Méthodes

5.1 Prélèvements

Des squames et/ou des cheveux ont été prélevés de patients enregistrés au CHUV pour une suspicion clinique de dermatophytose (Table 1). Le matériel prélevé a été divisé en 3 parties. La première partie a été utilisée pour effectuer un examen mycologique direct. La seconde partie a été utilisée pour isoler le champignon en culture. La troisième partie a été utilisée pour extraire l'ADN des champignons infectieux et effectuer des réactions de PCR.

5.2 Examens mycologiques directs.

Les examens mycologiques directs ont été effectués en utilisant le réactif au sulfure de sodium contenant un fluorochrome. Le réactif a été préparé en dissolvant 1g de Na_2S dans 7.5 ml d'eau distillée, puis en ajoutant 2.5 ml d'éthanol à 95% ; 10 μl de Tinopal UNPA-GX (fluorescent brightener 28 ; Sigma, USA) ont été ensuite dilués dans cette solution. Le mélange reste stable à température ambiante pendant au moins 3 mois à l'abri de la lumière. Le prélèvement est prêt à l'examen après une incubation de 1 min (squames) à 5 min (ongles). L'examen a été fait à l'aide d'un microscope à fluorescence avec un filtre bleu (400-440nm). La qualité du contraste est due à l'affinité du fluorochrome pour les polysaccharides de la paroi fongique (Monod *et al.* 1989).

5.3 Cultures

Les prélèvements ont étéensemencés simultanément sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol (50 µg/ml) ainsi que sur milieu de Sabouraud + chloramphénicol (50 µg/ml) + actidione (400 µg/ml). Après incubation des essais de cultures 15 jours à 30°C, l'identification des champignons a été effectuée d'après les caractères macroscopiques et microscopiques (De Hoog *et al.*, 2000).

5.4 Extraction de l'ADN des champignons dans les squames et les cheveux infectés

Les squames et les cheveux infectés ont été dissous dans un tube d'Eppendorf de 1.5 ml avec la solution de sulfure de sodium (Na₂S) pendant une nuit. Après centrifugation (6000 rpm pendant 2min) le précipité a été lavé deux fois avec de l'eau distillée. L'ADN a été ensuite extrait à l'aide d'un kit commercial (DNeasy Plant Mini kit, Qiagen, Suisse) en suivant le protocole établi par le fournisseur.

5.5 Amplification de l'ADN codant pour la sous-unité 28S des ribosomes

3µl de l'ADN extrait ont été ajoutés à 25µl de Ready Mix Taq PCR (Sigma-Aldrich, USA), 17µl H₂O, 2.5µl d'amorce sens LSU1 à 42.5 nM (LargeSubunit1, 5'-GATAGCGMACAAGTAGAGTG-3'), (Microsynth, Suisse) et 2.5µl d'amorce antisens LSU2 (LargeSubunit2, 5'-GTCCGTGTTTCAAGACGGG-3) (Microsynth, Suisse). Un contrôle négatif a été fait en parallèle avec 3µl de H₂O à la place des 3µl d'ADN extrait. La réaction en chaîne par polymérase a été effectuée avec un thermocycler ABI 2720 (Applied Biosystems, Etats-Unis). Le mélange a été dans un premier temps dénaturé à 94°C pendant une minute. Ensuite, le mélange a été soumis à 30 cycles

de 30s à une température de 94°C, 30s de à une température de 55°C et 30s à une température de 72°C. La réaction a été terminée par une incubation pendant 10 min à 72°C avant refroidissement à 4°C.

5µl des produits de réactions ont été contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose (0.8%) (Invitrogen, UK). Le marqueur de poids moléculaire DNA Molecular Weight Marker XIV (Roche, Allemagne) a été utilisé pour estimer la taille des fragments amplifiés. La visualisation des bandes sous la lumière UV à environ 310bp valide la PCR (Verrier *et al.*, 2012).

5.6 PCR nichée ou Nested PCR

La PCR nichée, ou nested PCR, a consisté en un enchainement de 2 réactions de PCR, avec 2 couples d'amorces différentes. Le second couple d'amorces s'hybride à une séquence interne au premier amplicon.

Pour éviter des interférences avec les amorces LSU1 et LSU2, une purification du produit PCR a été effectuée en utilisant un kit de purification [High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Allemagne)] selon les recommandations du fournisseur. Le mélange pour la PCR nichée a consisté en 3µl de produit PCR purifié, 25µl de Ready Mix Taq PCR, 25µl H₂O, 1µl d'amorces D003 (5'-GTAGAGTGATCGAAAGGTTA-3') et D004 (5'-GACGGGCCGCTTACGGCCAT-3', Microsynth, Suisse) à 100µM. Ces amorces, élaborées au laboratoire, sont spécifiques des dermatophytes (amorces testées pour plusieurs autres champignons dont l'ADN ribosomique n'a pas été amplifié, résultats non montrés ici). Nous avons utilisé un programme PCR identique à celui décrit pour effectuer la première amplification de l'ADN codant pour la sous-unité ribosomique 28S.

6 Résultats

Cette étude a été effectuée avec 27 prélèvements de patients souffrant de *tinea corporis*, *tinea capitis* et *tinea pedis*. A l'exception d'un seul (L-22, l'infection a pu être démontrée par PCR), l'examen direct de tous les prélèvements s'est révélé positif. Des essais de cultures ont révélé les résultats suivants: *T. rubrum* (8 cas), *T. mentagrophytes* (7 cas) *Arthroderma benhamiae* (2 cas), *T. tonsurans*, *M. audouinii*, *M. canis* et *T. soudanense* (1 cas chacun) (Table 1).

Localisation	REFERENCE	CULT ID	origine	ED	Séquençage nested 28s	Genbank accession number	Résultats
	L1	A benhamiae	squame	+++f&s	A ben/ T verr	EU362735/AY234993	OK
	L-19	A benhamiae	squame	+++f&s	A benhamiae	AY234993	OK
PIED	L-16	T mentagrophytes	squame	++f +++s	A ben/ T verr	EU362735/AY234993	miss ID
	L-14	T rubrum	squame	++f	T rubrum	AF378734	OK
	L-13	T tonsurans	squame	++f	T tonsurans	AF448547	OK
	L-15	Calbicans	squame	++f ++cl	FAIBLE		useless signal for sequencing
	L-2	stérile	squame	++f +cl	T rubrum	AF378734	OK
	L-4	T mentagrophytes	squame	++f	T menta II	AF378739	OK
	L-6	T mentagrophytes	squame	rare f	T menta I	AF378738	OK
CORPS	L-7	T mentagrophytes	squame	++f	T menta II	AF378739	OK
	L-12	T mentagrophytes	squame	++f +cl	T menta II	AF378739	OK
	L-17	T mentagrophytes	squame	++f	T menta I	AF378738	OK
	L-3	T rubrum	squame	++f	T rubrum	AF378734	OK
	L-8	T rubrum	squame	+f +s	FAIBLE		useless signal for sequencing
	L-11	T rubrum	squame	++f	T rubrum	AF378734	OK
	L-5	T rubrum	squame	++f	T rubrum	AF378734	OK
	L-18	T rubrum	squame	+f +s	T rubrum	AF378734	OK
	L-20	T rubrum	squame	+f	T rub/T sud	AF378734/AF378735	trop court
	L-10	T rub C alb	squame	++f	T rubrum	AF378734	OK
	L-21	C parapsilosis	squame	++cl	signal superimposed	(AY497686)	non-dermatophyte
	L-22	contaminant	squame	-	A benhamiae	AY176742	OK
	L-9	stérile	squame	++f	FAIBLE		useless signal for sequencing
	L-24	Mauduinii	ch&squ	+++s ++f	Mauduinii	AF448549	OK
TETE	L-25	M canis	cheveux	++f +++s	M canis	AF448550	OK
	L-26	T mentagrophytes	ch&squ	+++f +s	T menta III	AF378740	OK
	L-27	T soudanense	squame	+f +++s	T soudanense	AF378735	OK
	L-23	stérile	squame	+f +++s	FAIBLE		useless signal for sequencing

Table 1: Tableau des résultats

CULT ID: identification par culture, ED: examen direct au microscope à fluorescence, f: filaments, s: spores, OK: identification par séquençage compatible avec celle en culture, miss ID: identification par séquençage divergente de celle en culture

6.1 Développement d'une méthode d'identification des dermatophytes dans les prélèvements cutanés

L'ADN génomique total des champignons a été extrait de chacun des prélèvements afin d'identifier directement *in situ* l'agent infectieux. L'ADN codant pour la sous-unité 28S des ribosomes a été amplifié comme décrit dans la section Matériel et Méthodes en utilisant les amorces LSU1 et LSU2 identiques à deux régions conservées dans l'ADN ribosomique des champignons. 5µl des produits de réactions ont été ensuite contrôlés par électrophorèse en gel d'agarose (0.8%). Dans un grand nombre de cas aucun ADN amplifié n'a été observé. Dans les autres cas de faibles quantités d'ADN ont été révélées (Figure 1). Il n'était par conséquent pas possible d'identifier le champignon en séquençant les produits d'amplifications.

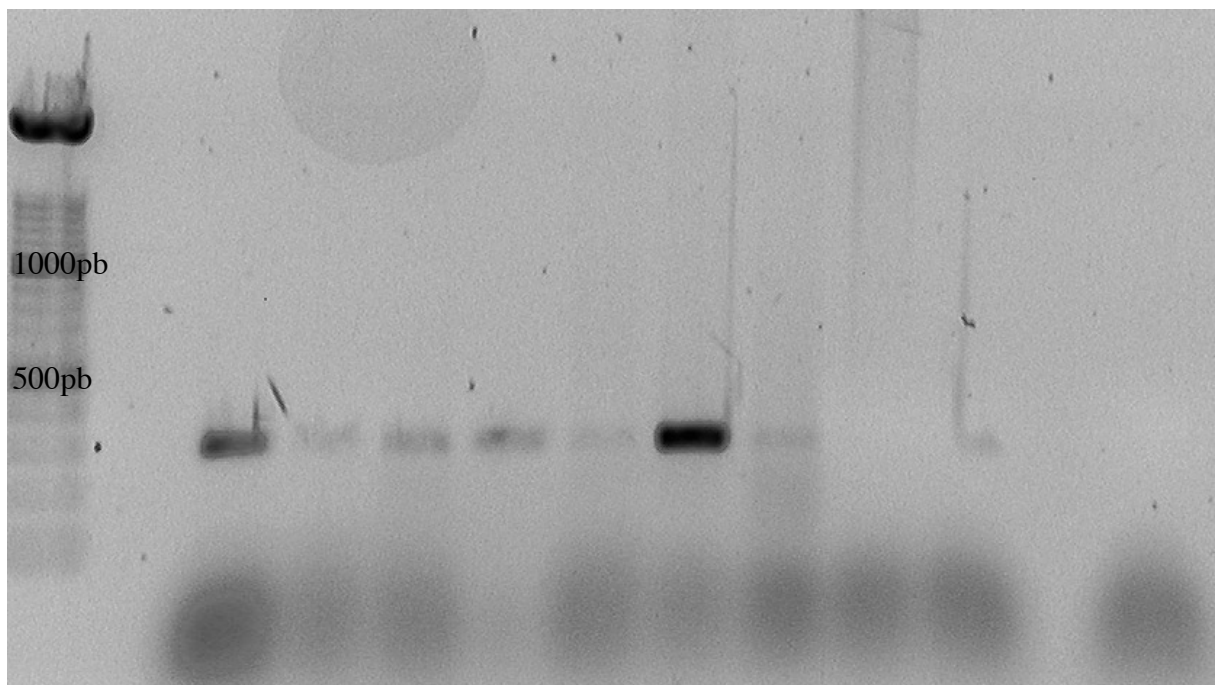


Figure 1: Produit d'ADN ribosomique 28s de 310bp obtenu après la première réaction d'amplification sur gel d'agarose 0.8% Echelle de 100 paires de bases : DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche

C'est pourquoi nous avons tenté d'amplifier une partie interne de l'ADN codant pour la sous-unité ribosomique 28S qui avait été précédemment amplifié avec des amorces spécifiques des dermatophytes élaborées dans notre laboratoire. On a ainsi effectué ce que l'on appelle une amplification nichée sur un premier produit d'amplification (en anglais « nested PCR »). L'examen des produits d'amplification sur gel d'agarose a montré dans 23 cas un amplicon de 250 paires de bases, soit 70 paires de bases plus court que l'amplicon obtenu en utilisant les amorces LSU1 et LSU2. Les produits d'amplification étaient en quantité et de qualité suffisantes pour être séquencés (Figure 2).

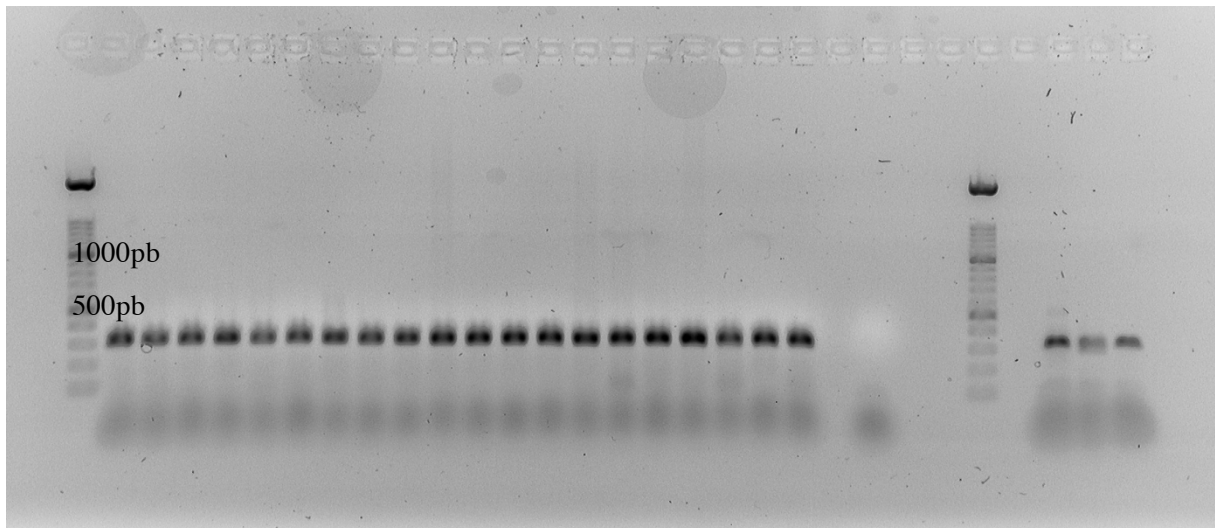


Figure 2: ADN ribosomique de dermatophyte amplifié par nested-PCR sur gel d'agarose 0.8% Echelle de 100 paires de bases : DNA Molecular Weight Marker XIV, Roche

6.2 Identifications des dermatophytes dans les prélèvements cutanés

La comparaison des séquences obtenues avec celles déposées dans GenBank (Figure 3, Table 1) pour 15 espèces de dermatophytes a révélé les résultats suivants :

Dans 18 cas, le dermatophyte identifié par la séquence du produit PCR était identique au dermatophyte identifié en culture.

Dans un cas (L-16), l'espèce identifiée par séquençage (*A. benhamiae*) était différente de celle identifiée en culture (*T. mentagrophytes*). Il est tout à fait possible, que cette dernière espèce ait été mal identifiée sur la base de caractères macroscopiques et microscopiques.

Dans 2 cas (L-2 ; L-22) où aucun dermatophyte n'avait poussé en culture, un dermatophyte a été identifié par PCR et séquençage.

Dans 6 cas, aucun dermatophyte n'a pu être identifié par PCR. Il s'agissait d'infections à levures dans deux cas (L-15 ; L21). Dans les autres cas, l'examen direct a révélé de rares filaments à l'examen direct (selon les critères du laboratoire).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY234989.1	Trichophyton rubrum isolate CL042 large subunit ribosomal RNA gene, p	399	399	100%	2e-109	100%	
AY234987.1	Trichophyton rubrum isolate SW089 large subunit ribosomal RNA gene, p	399	399	100%	2e-109	100%	
AY213629.1	Trichophyton rubrum strain UWFP 763 28S ribosomal RNA gene, partial s	399	399	100%	2e-109	100%	
AF378734.1	Trichophyton rubrum 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	399	399	100%	2e-109	100%	

```

> gb|AF378734.1|AF378734 Trichophyton rubrum 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=324

Score = 399 bits (216), Expect = 2e-109
Identities = 216/216 (100%), Gaps = 0/216 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query  1      AAGGGAAGCGCTTGC GGCCAGACTCGGGGGGCGGGGTTGAGCGGGCGCTCGTCGCCCGTG 60
          |||
Sbjct  83      AAGGGAAGCGCTTGC GGCCAGACTCGGGGGGCGGGGTTGAGCGGGCGCTCGTCGCCCGTG 142

Query  61      CACTGCCCGCTCCCCGGGCCAGCATCAGCTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCCGCGGAATGT 120
          |||
Sbjct  143     CACTGCCCGCTCCCCGGGCCAGCATCAGCTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCCGCGGAATGT 202

Query  121     GTCGTCTCTAGGGACGCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGAGACTGAGGAAAC 180
          |||
Sbjct  203     GTCGTCTCTAGGGACGCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGAGACTGAGGAAAC 262

Query  181     GCGCTCCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAG 216
          |||
Sbjct  263     GCGCTCCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAG 298

```

Figure 3: exemple d'alignement de séquences pour identifier une espèce de dermatophyte (ici, *T. rubrum*)

7 Conclusions

Cette étude a montré que les dermatophytes peuvent être identifiés *in situ* dans les cas de *tinea pedis*, *tinea glabra* et *tinea capitis* par PCR en utilisant le DNA total isolé des prélèvements dermatologiques. Toutefois, en raison du peu de matériel prélevé ou de la faible quantité d'éléments fongiques dans les prélèvements, une réaction de PCR nichée s'est avérée nécessaire pour obtenir de bons résultats. Les produits d'amplification étaient dès lors en quantité et qualité suffisantes pour être séquencés. La sensibilité de la méthode d'identification des dermatophytes par PCR s'est révélée égale à 81% (21/26) en considérant les prélèvements où l'examen direct était positif. Dans cette étude, le pourcentage est égal à celui de la sensibilité d'identification des dermatophytes en faisant des cultures.

A la différence des mycoses de la peau et du cuir chevelu, les essais d'identification des champignons infectieux dans les onychomycoses sont très sensibles et spécifiques sans pour autant devoir réaliser une PCR nichée ; ceci en raison de l'abondance du matériel prélevé et/ou de la grande quantité d'éléments fongiques dans les prélèvements. Les agents infectieux dans les mycoses des ongles peuvent être des espèces qui ne sont pas des dermatophytes. Il est important d'identifier ces espèces car de nombreuses ne répondent pas aux traitements standards avec la terbinafine ou avec des azoles (Baudraz-Rosselet *et al.*, 2010 ; Lurati *et al.*, 2012).

Identifier le dermatophyte infectieux est intéressant dans les cas de *tinea capitis* où le traitement approprié dépend de l'espèce incriminée. Si la terbinafine et les azoles sont efficaces pour traiter les teignes du cuir chevelu causées par les deux espèces anthropophiles *T. soudanense* et *T. violaceum*, ces antifongiques sont inefficaces

contre *Arthroderma benhamiae*, *A. vanbreuseghemii* (*T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*) et *T. tonsurans*. La griséofulvine reste la molécule de choix pour traiter ces teignes (Mock *et al.*, 1998). Dans tous les cas, il s'agit de traitements systémiques lourds appliqués souvent chez les enfants.

L'identification du dermatophyte pathogène dans les mycoses de la peau glabre est moins importante car la majorité des cas répondent bien aux traitements topiques avec de la terbinafine ou des azoles. Toutefois comme dans les cas de teignes du cuir chevelu l'identification de l'espèce de dermatophyte permet souvent de soupçonner un animal de compagnie comme source de l'infection et de prendre des mesures adéquates afin que d'autres personnes dans l'entourage du patient ne soient pas infectées à leur tour. L'identification du dermatophyte pathogène dans les mycoses des pieds ne présente pas un grand intérêt car il s'agit de *T. rubrum* ou *T. interdigitale* et le traitement par terbinafine ou aux azoles est efficace.

En conclusion, vu les coûts nettement supérieurs à ceux de l'identification par culture et la sensibilité comparable, une identification par nested PCR devrait en principe rester réservée aux cas particuliers. Nous utiliserons cette technique avant tout dans les cas particuliers de *tinea capitis*.

8 Table des illustrations

Table 1: Tableau des résultats

Figure 1: Produit d'ADN ribosomique 28s obtenu après la première réaction d'amplification sur gel d'agarose 0.8%

Figure 2: ADN ribosomique de dermatophyte amplifié par nested-PCR sur gel d'agarose 0.8%

Figure 3: exemple d'alignement de séquences pour identifier une espèce de dermatophyte (ici, *T. rubrum*)

9 Bibliographie

Alexander C.L., Shankland G.S., Carman W., Williams C. 2011. Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *Br. J. Dermatol.* 164:966-972.

Arabatzis M., Bruijnesteijn van Coppenraet L.E.S, Kuijper E.J., de Hoog G.S., Lavrijsen A.P.M., Templeton K., van der Raaij-Helmer E.M.H., Velegraki A., Gräser Y., Summberbell R.C. 2007. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *British Journal of Dermatology* 157: 681-689.

Baudraz-Rosselet F., Panizzon R.G., Monod M. 2005. Diagnostic et traitement des onychomycoses. *Rev Med Suisse.* I :1069-1073.

Baudraz-Rosselet F., Ruffieux C., Lurati M., Bontems O., Monod M. 2010. Onychomycosis insensitive to systemic terbinafine and azole treatments reveals non-dermatophyte moulds as infectious agents. *Dermatology* 220: 164-168.

Bontems O., Hauser PM., Monod M. 2009. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and non-dermatophyte identification in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 161: 791 – 796.

Chabasse D. 2004. Epidémiologie et étiologie des onychomycoses. Dans Baran R et Piérard GE (ed), Onychomycoses. Masson, Paris, France. 1-35.

De Baere T., Summerbell R., Theelen B., Boekhout T., Vanechoutte M. 2010. Evaluation of internal transcribed spacer 2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. *J. Med. Microbiol.* 59: 48-54.

De Hoog G.S., Guarro J., Gen Jé Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Netherland.

English MP. 1976. Nails and fungi. *Br. J. Dermatol.* 94:697-701.

Gupta A.K., Cooper E.A., MacDonald P., Summerbell R. 2001. Utility of inoculum counting (Walshe and English Criteria) in the clinical diagnosis of onychomycosis caused by nondermatophytic filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2115-2121.

Hay R.J., Robles W., Midgley G., Moore M.K. 2001. Tinea capitis in Europe : new perspective on an old problem. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology* 15: 229-233.

Lurati M., Baudraz-Rosselet F., Vernez M., Spring P., Bontems O., Fratti M., Monod M. 2012. Efficacious treatment of non-dermatophyte mould onychomycosis with topical amphotericin B. *Dermatology* 223: 289-292.

Mignon B., Monod M. 2011. Zoonotic infections with dermatophyte fungi. *In : Oxford Textbook of Zoonoses, Brown (ed.).*

Mock M., Monod M., Baudraz-Rosselet F., Panizzon R.G. 1998. Tinea capitis Dermatophytes : Susceptibility to Antifungal Drugs Tested in vitro and in vivo. *Dermatology* 197: 361-367.

Monod M., Baudraz-Rosselet F., Ramelet A.A., Frenk E. 1989. Direct Mycological examination in dermatology : a comparison of different methods. *Dermatologica* 179: 183-186.

Monod M., Baudraz-Rosselet F., Porchet S., Frenk E. 1992. In der Schweiz vorkommende Dermatophyten : Vorschlag eines einfachen Bestimmungsschlüssels. *Der Hautarzt.* 43: 294-297.

Ninet B., Jan I., Bontems O., Léchenne B., Jousson O., Panizzon R., Lew D., Monod M. 2003. Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. *J. Clin. Microbiol.* 41: 826-830.

Summerbell RC., Cooper E., Bunn U., Jamieson F., Gupta AK. 2005. Onychomycosis : A critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med. Mycol.* 43: 39-59.

Turin L., Riva., Galbiati G., Cainelli T. 2000. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur. J. Clin. Invest.* 30: 511-518.

Verrier J., Pronina M., Peter C., Bontems O., Fratti M., Salamin K., Schürch S., Gindro K., Wolfender J-L., Harshman K., Monod M. 2012. Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 50: 553-561.