

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Science biotechnologiques

Spécialité : Mycologie et biotechnologie fongique.

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

La spectrométrie de masse MALDI TOF et ses applications dans la mycologie clinique

Présenté par: DEKKAR KENZA IKRAM

Le 20/06/2022

HARIZI IMENE

CHERAK RAYENNE

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme. MEZIANI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : Mme. BENKHOUL Malika (MCA- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : Mme. DJAMA Ouahiba (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciement

Après avoir rendu grâce à Dieu le tout puissant qui nous a mis sur le bon chemin et nous a aidés à accomplir ce modeste travail.

Nous tenons à remercier spécialement **Dr.Meziani Meriem** la directrice de ce mémoire, qui fut la première à nous faire découvrir le sujet qui a guidé notre mémoire, nous adressons tous nos reconnaissances à elle pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils.

Nous tenons à exprimer notre grande considération et nos remerciements aux membres de jury : **Dr.Djama Ouahiba** et **Dr. Benkahoul Malika** qui nous ont fait l'honneur d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Nous désirons aussi remercier tous les enseignants de la faculté des sciences de la vie et de la nature en général et ceux du département de microbiologie en particulier.

Un grand merci également à nos collègues et à toutes personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à *mon cher père*, ma fierté que Dieu ait pitié de lui.

A ma chère mère qui me soutient et se tient toujours à mes côtés et qui m'a encouragé
tout le long de mes études.

A mes adorables *sœurs Mira et Zahra* qui m'ont beaucoup soutenu et m'encouragé.

A mes frères qui m'aiment beaucoup *Salah et Oussama*.

*A mes chères amies: Oumaima, Dhikra, Ahlem, Kaouter, Imen et
Intissar* qui m'a beaucoup conseillé.

Kenza

Dédicaces

C'est avec un grand plaisir et une immense fierté et joie que je dédie ce modeste
Travail :

À ma très chère mère Malika

Quoi que je fasse, je ne pourrais te rendre ce que tu as fait pour moi. Si je suis
Arrivée là c'est bien grâce à toi, qu'Allah te donne une longue vie et te protège
pour Moi. Merci pour ton soutien et ton amour. Maman je t'aime.

À mon très cher père Ramdane

Signe de fierté et d'honneur. Que ce travail témoigne de mon respect, ma
Profonde Gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi et de mon grand
amour pour Toi. Merci pour ta confiance. Papa je t'aime.

À mes chères sœurs AMANI INES OUMAIMA

Vous m'avez toujours soutenu durant toutes mes études, je vous souhaite une
vie pleine de joie de bonheur et de succès.

À Mon Binôme Kanza

Merci pour ton soutien au quotidien, tes attentions. Tu me combles de bonheur.

À mes chères cousines Malak Racha Lamis Naila Isra

Je vous souhaite tous les bonheurs dans ta vie, Je t'aime mes amoures

À mes chères Amies Malak Youssra Insaf Amira Izdihar

Merci pour ces beaux moments passés ensemble.

Dédicace spéciale à ma petite princesse Eline Mayassine

À Tout ma famille paternelle et maternelle « HARIZI »

IMENE

Dédicaces

A celle qui m'a donné la vie, symbole de tendresse, celle qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à *ma mère Lynda*.

Au grand homme qui m'a toujours soutenu, veillé tout au long de ma vie à m'encourager, *mon père Chaabane*.

Qu'Allah vous accorde chacun bonheur, santé, prospérité.

A mes chères sœurs Manel et Abir, qui sont toujours là pour moi et me donnent sans cesse leurs précieux encouragement.

A mes chers frères Wassim et Babi.

A toutes mes amies généralement et à *mon amie Djihene* précisément.

A toutes personnes m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller,

M'encourager ou simplement me sourire.

Ce travail vous a dédié.

Rayenne

Résumé

Le diagnostic des mycoses comporte une série des étapes au laboratoire, le prélèvement, l'examen direct, la culture et l'identification de l'agent responsable qui peut être une levure ou un champignon filamenteux. Les méthodes classiques d'identification reposent sur des tests phénotypiques et biochimiques, mais ces derniers prennent plus de temps et la possibilité d'avoir des résultats erronés est élevée. Cependant, le diagnostic doit aboutir à des résultats fiables, à cause de ça des nouvelles techniques moléculaires ont apparues. La spectrométrie de masse MALDI TOF est une méthode alternative des méthodes classiques, cet outil a progressivement trouvé son application en mycologie clinique. Son principe repose sur l'ionisation du mélange échantillon/matrice déposé sur la plaque MALDI par des tirs de laser qui conduit à la génération des ions qui vont ensuite séparer selon leur rapport masse/charge au niveau du l'analyseur TOF, pour atteindre le détecteur qui permet l'obtention des spectres protéiques qui vont ensuite comparer à des bases de données et d'obtenir une correspondance avec une espèce et associée à un score qui reflète la fiabilité de l'identification. L'identification des levures d'intérêt clinique à partir des protocoles simples, soit à partir une colonie ou hémoculture positive en quelques minutes, mais les champignons filamenteux notamment les dermatophytes nécessite une étape d'extraction avant l'analyse, cette divergence est principalement due à la différence morphologique entre les deux. Des études ont été réalisées sur l'intérêt du MALDI TOF MS dans l'identification des levures et des champignons filamenteux d'intérêt clinique ont prouvé sa fiabilité et sa rapidité.

Mots clés : MALDI TOF MS, mycologie clinique, identification, levures, dermatophytes...

المخلص

يتضمن تشخيص الفطريات سلسلة من الخطوات في المختبر، أخذ العينات، الفحص المباشر، الزراعة وتحديد العامل المسؤول الذي قد يكون خميرة أو فطرًا خيطيًا. تستند الطرق التقليدية لتحديد النوع إلى اختبارات النمط الظاهري والكيمياء الحيوية، ولكنها تستغرق وقتًا أطول واحتمال الحصول على نتائج خاطئة مرتفع. ومع ذلك، يجب أن يكون التشخيص ذو نتائج موثوقة، وبناء عليه ظهرت تقنيات جزيئية جديدة. قياس الطيف الكتلي MALDI TOF هو طريقة بديلة للطرق التقليدية، وقد وجدت هذه الأداة تدريجياً تطبيقها في علم الفطريات السريري. ويستند مبدأها إلى تأين مخلوط العينة/المصفوفة المترسب على صفيحة MALDI عن طريق الليزر مما يؤدي إلى توليد أيونات التي ستنفصل بدورها وفقاً لنسبة الكتلة/الشحنة على مستوى محلل TOF ، للوصول إلى الكاشف الذي يسمح بالحصول على أطياف البروتين والذي سيقارن بعد ذلك بقواعد البيانات والحصول على تطابق مع نوع ما ومرتبطة بدرجة تعكس موثوقية النتيجة. تحديد الخمائر ذات الأهمية السريرية وفق بروتوكولات بسيطة، إما من مستعمرة أو زراعة دم إيجابية في بضع دقائق، لكن الفطريات الخيطية بما في ذلك الفطريات الجلدية تتطلب خطوة استخراج قبل التحليل، وهذا الاختلاف يرجع أساساً إلى الاختلاف المورفولوجي بين الاثنين. تم إجراء دراسات حول أهمية MALDI TOF MS في تحديد الخمائر والفطريات الخيطية ذات الأهمية السريرية التي أثبتت موثوقيتها وسرعتها.

الكلمات المفتاحية: MALDI TOF MS، علم الفطريات السريري، تحديد النوع، الخمائر،

الفطريات الجلدية...

Abstract

The diagnosis of mycosis involves a series of steps in the laboratory, sampling, direct examination, culture and identification of the causative agent which may be a yeast or a filamentous fungus. Classical methods of identification are based on phenotypic and biochemical tests, but these are taking more time and the possibility of false results is high. However, the diagnosis must lead to reliable results, for this reason new molecular techniques have appeared. MALDI TOF mass spectrometry is an alternative method to classical methods; this tool has gradually found its application in clinical mycology. Its principle is based on the ionization of the sample/matrix mixture deposited on the MALDI plate by laser shots which leads to the generation of ions which are separated then according to their mass/charge ratio in the TOF analyzer, to reach the detector which allows the obtaining of protein spectra which are then compared to databases and to obtain a correspondence with a species and associated with a score which reflects the reliability of the identification. The identification of clinical yeasts from simple protocols, from a colony or blood positive culture within few minutes, but filamentous fungi including dermatophytes requires an extraction step before analysis; this discrepancy is mainly due to the morphological difference between the two. Studies have been carried out on the interest of MALDI TOF MS in the identification of clinical yeasts and filamentous fungi have proven its reliability and rapidity.

Key words: MALDI TOF MS, clinical mycology, identification, yeasts, dermatophytes...

Table des matières

| | |
|--------------------|---|
| Introduction | 1 |
|--------------------|---|

Chapitre 1 : Mycologie clinique

| | |
|---|----------|
| 1 Généralités sur les champignons..... | 3 |
| 1.1 Morphologie des champignons | 3 |
| 1.2 Mode de reproduction | 3 |
| 1.2.1 Reproduction asexuée | 3 |
| 1.2.2 Reproduction sexuée | 3 |
| 1.3 Conditions de développement..... | 4 |
| 1.3.1 Température | 4 |
| 1.3.2 pH..... | 4 |
| 1.3.3 Humidité..... | 4 |
| 1.4 Phylogénie des champignons..... | 4 |
| 2 Mycologie médicale | 5 |
| 3 Les champignons d'intérêt médical..... | 5 |
| 3.1 Levures..... | 5 |
| 3.1.1 Les candidoses..... | 6 |
| 3.1.2 Cryptococcoses..... | 12 |
| 3.1.3 Malassezioses | 12 |
| 3.2 Dermatophytoses | 12 |
| 3.3 Les moisissures d'intérêt médical..... | 19 |
| 3.3.1 Les Aspergilloses | 20 |

Chapitre 2 : La spectrométrie de masse MALDI TOF et ses applications dans la mycologie clinique

| | |
|---|-----------|
| 1 Diagnostic mycologique par méthodes classiques | 21 |
| 1.1 Le prélèvement | 21 |
| 1.1.1 Prélèvements superficiels..... | 21 |
| 1.1.2 Prélèvements profonds | 22 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.2 | Examen direct | 22 |
| 1.3 | La culture | 23 |
| 1.4 | Identification..... | 23 |
| 1.4.1 | Identification des levures | 23 |
| 1.4.2 | Identification des dermatophytes responsables des teignes | 26 |
| 1.4.3 | Diagnostic des Aspergilloses | 29 |
| 2 | La spectrométrie de masse MALDI -TOF | 31 |
| 2.1 | Definition..... | 31 |
| 2.2 | Principe..... | 31 |
| 2.3 | Préparation de l'échantillon et le choix de la matrice..... | 33 |
| 3 | Applications de la spectrométrie de masse MALDI TOF en mycologie clinique..... | 33 |
| 3.1 | Identification des levures | 34 |
| 3.2 | Identification des champignons filamenteux | 34 |
| 4 | Les protocoles expérimentaux de l'identification des levures par MALDI TOF MS | 35 |
| 4.1 | Identification à partir une colonie d'une culture pure..... | 35 |
| 4.2 | Identification à partir des hémocultures positives | 37 |
| 4.3 | Lecture des résultats..... | 38 |
| 5 | identification des champignons filamenteux par MALDI- TOF | 39 |
| 5.1 | Utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des dermatophytes..... | 39 |

Chapitre 3. Analyse des articles

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Article 1 : Évaluation comparative de la désorption-ionisation laser assistée par matrice et de l'ionisation par temps de vol (MALDI-TOF-MS) et des méthodes conventionnelles de levures cliniquement pertinentes | 42 |
| 1.1 | Matériel et méthodes..... | 42 |
| 1.2 | Analyses par MALDI -TOF MS | 42 |
| 1.3 | Analyses des données | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1.4 | Résultats..... | 43 |
| 1.5 | Discussions | 44 |
| 2 | Article 2 : Identification d'isolats cliniques de dermatophytes obtenus en Iran par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice et ionisation à temps de vol..... | 47 |
| 2.1 | Matériel et méthodes..... | 47 |
| 2.1.1 | Isolats fongiques..... | 47 |
| 2.1.2 | Spectrométrie de masse à temps de vol par désorption/ionisation laser assistée par matrice..... | 47 |
| 2.1.3 | Préparation des échantillons..... | 47 |
| 2.1.4 | Acquisition des données..... | 48 |
| 2.2 | Résultats..... | 49 |
| 2.3 | Discussions | 51 |
| | Conclusion | 54 |
| | Références bibliographiques | |

Liste des abréviations

pH : Potentiel hydrogène

C. albicans : *candida albicans*

C.parapsilosis : *candida parapsilosis*

C.glabrata : *candida glabrata*

C. tropicalis : *candida tropicalis*

C. krusei : *candida krusei*

C. dubliniensis : *candida dubliniensis*

SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise

VIH : virus de L'immunodéficience humaine

E. floccosum: *Epidermophyton floccosum*

T. rubrum: *Trichophyton rubrum*

T. interdigital : *Trichophyton interdigital*

T. schoenleinii : *Trichophyton schoenleinii*

PCB : Pomme de terre – Carotte – Bile

RAT : Riz, Agar, Tween

PCR : Polymérase chaine réaction

ARN : Acide Ribonucléique

M. canis : *Microsporum canis*

M. audouinii : *Microsporum audouinii*

M. ferrugineum : *Microsporum ferrugineum*

T. mentagrophytes : *Trichophyton mentagrophytes*

T. erinacei : *Trichophyton erinacei*

T. verrucosum : *Trichophyton verrucosum*

T. equinum : *Trichophyton equinum*

T.tonsurans : *Trichophyton tonsurans*

T. violaceum : *Trichophyton violaceum*

T. soudanense : *Trichophyton soudanense*

T. schoenleinii : *Trichophyton schoenleinii*

LBA : Lavage broncho-alvéolaire

A.fumigatus : *Aspergillus fumigatus*

MALDI TOF MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight mass spectrometry

Laser: Light amplification by stimulated emission of radiation

DHB: Acide 2,5- dihydroxybenzoïque

CHCA: Acide α - cyano -4- hydroxycinnamique

C. neoformans: *Cryptococcus neoformans*

FDA: Food and Drug Administration

T. duhanse: *Trichophyton duhanse*

T. ovoides : *Trichophyton ovoides*

C.bracarensis : *Candida bracarensis*

SDA: Sabouraud dextrose Agar

CMA: Corn Meal Agar

TFA: Internal Transcribed Spacer

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1: Champignons levuriformes [21]. | 6 |
| Figure 2:(a) Intertrigo candidosique intertrigo inguinale, (b) et inter et sous-mammaire [27]. | 8 |
| Figure 3: intertrigo interdigital candidosique [27]. | 8 |
| Figure 4 : Onychomycose candidosique [27]. | 9 |
| Figure 6: Muguet à <i>Candida</i> [20]. | 10 |
| Figure 7: Perlèche à candida [20]. | 10 |
| Figure 8: Candidose vulvo - vaginale [30]. | 11 |
| Figure 9 : Intertrigo interdigito - plantaire [33]. | 15 |
| Figure 10: Teigne tondantes microscopique [35]. | 16 |
| Figure 11: Teignes favique [38]. | 17 |
| Figure 12: Teignes inflammatoires [6]. | 17 |
| Figure 13: Onychomycose sous Unguéal Distolatérale [27]. | 18 |
| Figure 14: Leuconychie superficielle [36]. | 18 |
| Figure 15: Leuconychie sous -unguéale proximal [27]. | 19 |
| Figure 16: Onychodystrophie [36]. | 19 |
| Figure 17: Champignons filamenteux (<i>Aspergillus</i>) | 20 |
| Figure 18:Aspect du parasitisme pilaire par les dermatophytes à l'examen direct. [35] | 27 |
| Figure 19: Représentation schématique du fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF [47]. | 32 |
| Figure 20:Processus de spectrométrie de masse à temps de vol par désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) pour l'identification des levures [49]. | 36 |
| Figure 21:Représentation schématique des 2 procédures disponibles pour l'identification de levures à partir de colonies isolées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF [1]. | 37 |
| Figure 22:Schéma d'un protocole de l'identification des levures à partir d'hémocultures par MALDI - TOF MS [52]. | 38 |
| Figure 23: Le rôle de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les diagnostics de Mycologie clinique [52]. | 41 |

Liste des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Principales dermatophytoses développées en fonction de l'état physiologique du patient. | 14 |
| Tableau 2: Différents Types des prélèvements profonds selon la localisation des mycoses. | 22 |
| Tableau 3: Détermination des scores pour l'identification | 39 |
| Tableau 4: Comparaison entre la méthode conventionnelle et la méthode MALDI-TOF MS dans l'identification des Candida spp..... | 44 |
| Tableau 5 : Identification des dermatophytes par spectrométrie de masse à temps de vol avec désorption/ionisation laser assistée par matrice (Bruker) à l'aide des critères de score spectral recommandés par le fabricant et comparaison de cette méthode avec les méthodes d'identification moléculaire. | 50 |

INTRODUCTION

Introduction

Le diagnostic mycologique des mycoses constitue une étape cruciale pour l'identification de l'espèce fongique responsable. Dans les laboratoires de mycologie les espèces fongiques d'intérêt clinique à identifier peuvent être des levures ou des champignons filamenteux. L'identification classique se base sur des tests phénotypiques et biochimiques, mais cette méthode est laborieuse, prend un long délai d'identification et le taux d'identifications erronés est élevé. En effet, l'identification doit être précise et rapide afin de guider le traitement antifongique. D'autres méthodes dites génotypiques utilisant des techniques de la biologie moléculaire ont des résultats plus fiables mais elles ont des protocoles complexes.

Une nouvelle méthode de l'identification des micro-organismes a fait une entrée incroyable dans la microbiologie clinique, il s'agit de la spectrométrie de masse MALDI TOF. C'est une technique couplant une source d'ionisation douce MALDI (désorption-ionisation laser assistée par matrice) et un analyseur à temps de vol (TOF). Le mélange échantillon / matrice est ionisé avec un faisceau de laser, puis, les ions génèrent volent dans l'analyseur qui va les séparer selon leur ratio masse/ charge et enfin, il atteint le détecteur [1]. L'identification des micro-organismes en se base sur des spectres de protéines générés et comparés avec des bases de données préalablement créés [2].

Bien que, le concept de l'utilisation de la spectrométrie de masse dans l'identification bactérienne a été proposé pour la première fois par Anhalt et Fenselau en 1970 [3, 4]. C'est en 1990 que MALDI TOF MS a été utilisée pour l'identification bactérienne, car les infections bactériennes ont une incidence plus élevée et elles sont plus faciles à traiter que les champignons [5]. Néanmoins la bactériologie a rapidement bénéficié de l'apport de cette technique mais des adaptations ont été nécessaires pour son application en mycologie clinique. Cette dernière englobe des mycoses de gravité variable telles que les candidoses, les dermatophytoses et l'aspergillose invasive. Contrairement aux méthodes conventionnelles, MALDI TOF MS est une technologie facile à utiliser et rapide, et elle a trouvé son application en mycologie clinique notamment dans l'identification des champignons d'intérêt clinique. Dans cette optique, on pose à la fin la question : quel est l'intérêt de la spectrométrie de masse de type MALDI TOF dans l'identification des levures et des dermatophytes d'intérêt clinique ?

Les mycologues ont adapté des protocoles préexistants pour augmenter la fiabilité de l'identification. Cependant, les champignons filamenteux peuvent également être identifiés,

Bien que leur traitement avant l'analyse par MALDI TOF MS prenne généralement plus de temps que celui des levures [6]. Actuellement, MALDI TOF MS s'implante dans les laboratoires pour sa large application en mycologie clinique.

L'objectif de ce travail, est d'étudier les différentes mycoses, et l'identification des champignons responsables en comparant les techniques d'identification classiques avec la technique d'identification moléculaire MALDI TOF MS. Le contenu est scindé en trois chapitres : mycologie clinique, MALDI TOF MS et ses applications en mycologie cliniques et le dernier est analyse des articles. Dans un premier temps, nous avons mis le point sur les mycoses impliquées dans la pathologie humaine. Ensuite, nous avons parlé de la technique MALDI TOF MS en montrant les protocoles expérimentaux pour l'identification des levures et des dermatophytes d'intérêt clinique. Enfin, nous avons procédé à une discussion des résultats en comparant les résultats des deux articles analysés avec ceux des travaux précédents.

Chapitre 1

1. Généralités sur les champignons

Les champignons nommés aussi les mycètes ou en anglais *fungi*, sont des organismes eucaryotes hétérotrophes unicellulaires ou pluricellulaires qui incluent des espèces macroscopiques dites les macromycètes et des espèces microscopiques dites micromycètes, ils peuvent être d'aspect filamenteux ou levuriformes. Ils assurent leur nutrition par absorption. Cependant, ils se distinguent des plantes par l'absence de chlorophylle et de cellulose dans la paroi [7, 8,9].

1.1. Morphologie des champignons

Les champignons se composent d'une paroi formée de polysides, phospholipides, stérols, des molécules spécifiques aux champignons (chitine, β glucane), et d'une membrane complexe constituée essentiellement par des protéines, phospholipides et d'ergostérol qui entoure le cytoplasme. Leur particularité morphologique est représentée par une liaison étroite des champignons à leur substrat nutritif grâce à un réseau mycélien développé [8].

1.2. Mode de reproduction

Les champignons sont caractérisés par une production intense avec un grand nombre des spores ce qui assure leur diffusion également la contamination. La reproduction peut être à caractère sexuée (champignons téléomorphes ou Parfait) et/ou asexuée (champignons anamorphes ou imparfait). Les deux formes de reproduction peuvent coexister chez un même champignon dit holomorphe [8].

1.2.1. Reproduction asexuée

Elle fait intervenir des spores dites asexués ; c'est les stades anamorphes des champignons. Dans ce mécanisme, la cellule fongique se divise par une simple mitose. Les spores sont produites par des structures différenciées ou spécialisée issues du thalle qui constitue l'appareil végétatif, ces structures varient selon groupes des champignons [7].

1.2.2. Reproduction sexuée

La reproduction est réalisée directement par l'union des gamètes « gamétocystes ». Les gamètes impliqués dans ce processus pouvant être présente soit sur un même mycélium soit sur mycélium différents [9].

1.3. Conditions de développement

Plusieurs moisissures sont adaptées aux conditions de l'environnement intérieur et croissent bien sur les matériaux de construction [10].

1.3.1. Température

La température rencontrée dans un environnement intérieur permet la germination, la croissance et la prolifération des moisissures. Elles se développent dans une gamme de température entre 0 et 40 °C ; mais la plupart se développent bien aux températures entre 20 et 25 °C [11].

1.3.2. pH

Les mycètes supportent à coloniser dans des milieux largement acides, et par leur activité métabolique acidifiant encore plus le milieu [12,13]. Leur croissance est optimale dans un pH entre 4 et 6.5 [14,15].

1.3.3. Humidité

Dans les environnements intérieurs les éléments nutritifs sont généralement abondants et donc agissent souvent d'un facteur limitant pour la germination des spores et le développement des moisissures comme tout organisme vivant, l'eau est indispensable pour des nombreuses activités physiologique et métaboliques des champignons [16].

Présence d'oxygène

Les champignons sont des microorganismes aérobies ; ils ont besoins d'oxygène pour une croissance normal. Toutefois, leur développement est peu affecté par des teneurs d'oxygène dix fois plus faible (2.1%) que celle de l'atmosphère. En conséquence, certaine espèce de moisissures se développe sur des denrées alimentaires conservée dans une atmosphère pauvre en oxygène [17].

1.4. Phylogénie des champignons

La classification de Howks worth, Sutton et Ainsworth (1970) modifier par kwonChung et Bennett (1992), puis par de Hoog (1995), est la plus utilisée actuellement figure 1. Plus de 100000 d'espèces fongiques sont estimées, dont leur classification est basée sur le mode de reproduction, ainsi que sur leur morphologie [8].

On différencie quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée. Les Mastigomycotina (oomycètes Chytridomycotina) les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina, en outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou champignons imparfaits [8].

2. Mycologie médicale

La mycologie médicale ou clinique s'intéresse à l'étude des champignons qui provoquent par eux même l'installation des états pathogènes chez l'homme, ces derniers sont dits les infections fongiques ou les mycoses. Elles sont classées selon leur lieu d'installation par des atteintes superficielles de la peau et des muqueuses, des atteintes sous-cutanées et des atteintes invasives profondes. Cette classification médicale est toutefois artificielle car des champignons comme le candidat parasite la peau et les muqueuses, mais peuvent aussi envahir les tissus dans les coupes histopathologiques [18].

3. Les champignons d'intérêt médical

Les champignons d'intérêt médical peuvent être répartis en deux : Levures et champignons filamenteux.

3.1. Levures

Elles sont des champignons unicellulaires, de petite taille et d'une forme ronde ou ovoïde. (Figure 2).

Elles se reproduisent par bourgeonnement et appartiennent à la flore normale digestive en association avec les bactéries. Les levures sont le plus souvent endo-ou Episaprophytes de la peau et des muqueuses humaines et sont l'une des constituants de la flore présentes dans l'environnement : le sol, l'eau douce et l'eau de mer, mais aussi dans certains aliments, notamment les produits laitiers. Parmi les levures responsables des mycoses on cite : Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Malassezia ... [19,20].



Figure 1: Champignons levuriformes [21].

3.1.1. Les candidoses

Les candidoses sont des infections fongiques provoquées par le genre *Candida*. Les candidoses superficielles sont les plus fréquentes, le plus souvent c'est par le passage d'espèces déjà présent au niveau digestif de l'état commensal à l'état parasitaire [20].

A. Agents pathogènes

Candida est la levure la plus répandue, notamment l'espèce *Candida albicans* est impliquée dans plus de la moitié des candidoses est toujours considérée comme un agent pathogène majeur et émergent. Elle est responsable des infections des muqueuses gynécologiques et digestives, qui peuvent évoluer en maladies systémiques. En effet, Il est difficile de détailler l'ensemble des particularités des différents *Candida*. Durant leur adaptation au commensalisme, certaines espèces sont spécialisées pour certains sites anatomiques. *C.parapsilosis* est une levure fréquente de la peau mais pas du tube digestif, et expose au risque de contaminations manu portées. *C.glabrata* et *C. tropicalis* ont une écologie proche de celle de *C. albicans*. De nombreuses espèces vivent dans le milieu extérieur et peuvent se retrouver accidentellement dans le tube digestif à la suite de leur ingestion (*C. krusei*) et être exceptionnellement responsables d'une infection, le plus souvent chez des patients immunodéprimés ou d'origine nosocomiale issue d'une chirurgie, en particulier la chirurgie digestive. La pandémie de SIDA a entraîné une augmentation des candidoses oropharyngées et œsophagiennes, dont le nombre a ensuite considérablement chuté avec la généralisation des thérapies antirétrovirales [22,23].

B. Origines de contamination et les facteurs favorisants

Fréquemment, il s'agit d'une contamination d'origine endogène : Cavité buccale et digestive (site habituel de champignon.), de Vagin, de l'appareil urinaires (fréquent chez les femmes enceintes), contamination par voie sexuée, contamination par mère à l'enfant ou contamination exogène (air, matériel souillés (pose de cathéter, sonde, solution de diffusion) [24].

▪ Facteurs favorisants

La prolifération de candida est favorisée par des facteurs qui provoquent un déséquilibre de l'organisme. Pour les formes cutanéomuqueuses, les facteurs locaux (macération, irritations...) sont souvent prédominants. Mais les facteurs généraux doivent aussi être pris en considération : diabète, grossesse, l'obésité, âges extrêmes, certaines atteintes de l'immunité cellulaire en particulier au cours du SIDA, corticothérapie et l'antibiothérapie à large spectre. Pour les infections invasives, les facteurs de risque sont plus nombreux et varient selon le terrain (immunodéprimés, chirurgie digestive lourde, patients de réanimation, toxicomanes par voie intraveineuse...) [25,23].

C. Manifestations cliniques des candidoses

Les plus répandues sont les candidoses, parmi cette infection : Intertrigos candidosique, Onyxis et périonyxis, candidoses buccales, Candidose gastro-intestinal, Candidoses génitales.

✓ **Intertrigos candidosique**

C'est une candidose qui se manifeste par une lésion érythémateuse recouvert d'une couche blanchâtre à odeur et limitée par un bord pustuleux ou un col desquamatif. Cette lésion est souvent pruritique et peut devenir infectieuse ou eczématisée. Une candidose de la muqueuse digestive et/ou génito-urinaire [23]. Il existe deux types intertrigos :

✓ **Intertrigos des grands plis**

Une lésion qui touche les plis axillaires, inguinaux et sous mammaire. (Figure 3)

La lésion s'étend de part et d'autre du pli avec un contour irrégulier et parfois une bordure en forme de collerette plus ou moins squameuse. L'intertrigo des grands plis (génitaux cruraux, périnéaux et inter-fesses sous-mammaire) commence au fond du pli, le dommage est en généralement bilatéral et symétrique, et les intertrigos sont facilement associés les uns avec les autres : le malade se plaint d'une sensation de brûlure, ou douleur ou démangeaisons [26].



Figure 2:(a) Intertrigo candidosique intertrigo inguinale, (b) et inter et sous-mammaire [27].

✓ Intertrigos des petits plis

Il s'agit de l'atteinte des plis interdigito-palmaires et plus rarement interdigito-plantaires. Ils sont favorisés chez le sujet dont les mains sont soumises de façon répétée à l'humidité (Figure.4) [24]. L'intertrigo des petits plis (interdigital palmaire ou plus rarement plantaire) atteint de préférence le troisième espace interdigital, parfois le deuxième et le quatrième mais rarement le premier [28].



Figure 3: intertrigo interdigital candidosique [27].

✓ Onyxis et périonyxis

Les onychomycoses ou onyxis candidosique sont des infections des ongles. Elles sont fréquemment rencontrées au niveau des mains et préférentiellement chez les personnes ayant un contact des mains avec l'eau [29].

La pénétration des levures se fait au niveau du repli péri-unguéal. L'onychomycose à candida début par une atteinte des tissus péri-unguéaux (périonyxis) et se traduit par une tuméfaction tendue, érythémateuse parfois, douloureuse entourant la tablette unguéale, la pression de l'œdème fait couleaux du pus. L'évolution peut aboutir à une onycholyse totale. Les lésions affectent à l'origine la partie proximale, pour atteindre la cote et les arêtes distales de l'ongle il prit une coloration jaune, verte, brune ou même noir dans les parties latéraleet distales. Parfois, on observe un onycholyse ; la tablette de l'ongle est alors complètement fragilisée et se débouché facilement de son lit où Presque plus adhère (Figure.5) [29,7].



Figure 4 : Onychomycose candidosique [27].

✓ **Candidoses buccales**

✓ **Muguet**

Le muguet est la forme clinique la plus fréquente de la candidose buccale. L'adhérence des levures à l'épithélium buccale constitue la première étape du développement de l'infection. Celle-ci est toujours favorisée par un facteur sous-jacent. Les populations particulièrement à risque sont les nourrissons, en relation avec le Ph buccale bas, les patients sous antibiothérapie du fait d'une modification de la flore commensale, et les patients infectés par le VIH en raison de leur immuno-déficit (Figure 6) [29].

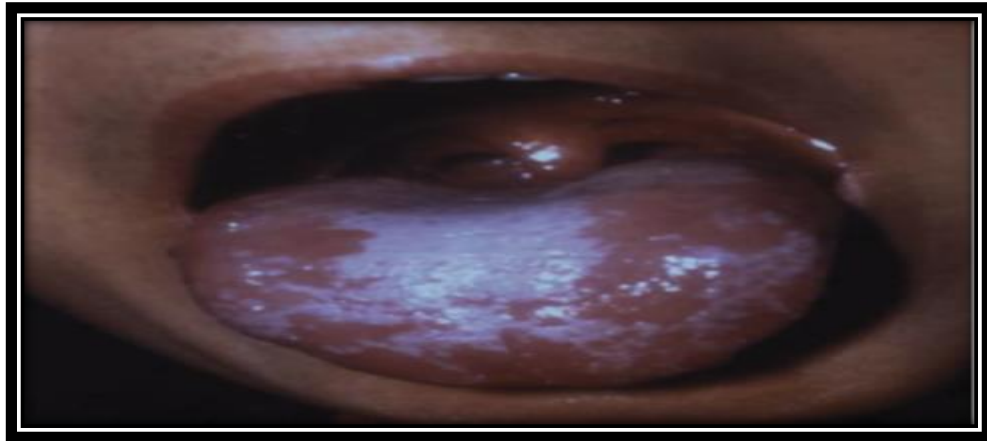


Figure 5: Muguet à *Candida* [20].

✓ **Perlèche**

La perlèche accompagne les candidoses oropharyngées. Elle correspond à une inflammation de labiale et réalise une fissure humide (Figure 7) [30].

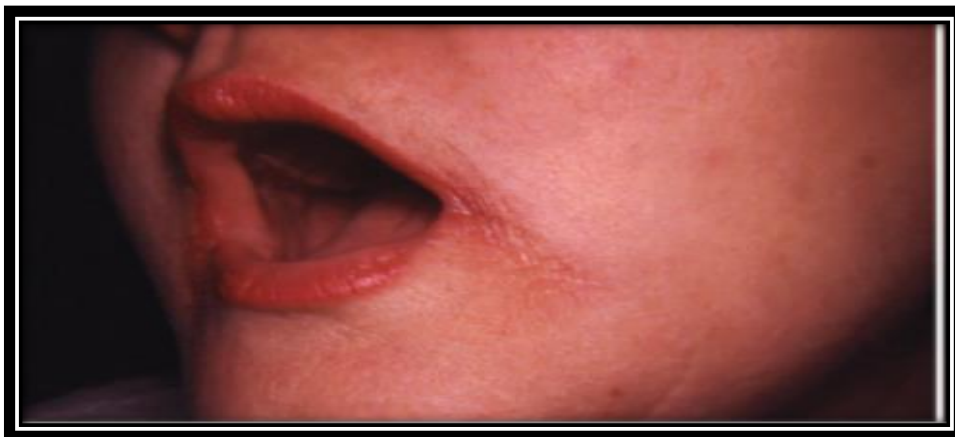


Figure 6: Perlèche à candida [20].

✓ **Candidose gastro-intestinale**

Elle intéresse tout le tube digestif de l'estomac au colon. Elle est rare et se présente cliniquement comme une diarrhée aqueuse, parfois explosive, assortie de couleur, inconstante et d'une légère sensibilité abdominale à la palpation évoluant de puis au moins 3 mois [24].

- ✓ **Candidoses génitales**
 - **Vulvo-vaginale**

La candidose Vulvo-vaginale est l'une de plus fréquentes Infection gynécologiques de la femme en période d'activité génitale. (Figure 08). *Candida albicans* est l'agent responsable des vulvo-vaginales fongique (80%). Elle est un saprophyte des muqueuses, y compris la muqueuse vaginale sa multiplication est favorisée par un pH Local acide [29].



Figure 7: Candidose vulvo - vaginale [30].

- **Balanite**

La candidose génitale se manifeste par une Balanite chez l'homme. Le début de fait dans le sillon Balanopréputial par un érythème qui intéresse la glande et le prépuce, De petite vésicules sont présente à sa surface, ainsi que des papules avec souvent des plaques Blanchâtres [31].

- ✓ **Les candidoses profondes**

La candidose profonde est une affection par les levures du genre candida qui touchent les organes profonds lors d'une déficience immunitaire de l'homme. Elle peut être systémique lorsqu'elle se localise en plusieurs sites profonds ou lors de la dissémination hématogène de l'agent pathogène. Il s'agit d'infections préoccupantes en raison de la morbidité et la mortalité qu'elle engendre [26].

Le mode de contamination est par voie sanguine. L'agent pathogène est essentiellement *candida albicans* mais l'émergence croissante d'autres espèces dites non *albicans* à l'instar de : *C. glabrata*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sont mis en évidence dans cette pathologie.

3.1.2. Cryptococcoses

Cryptococcoses est une mycose cosmopolite, causée par une levure (*Cryptococcus*), survenant le plus souvent chez des sujets immunodéprimés, notamment lymphopéniques. D'autres cas de cryptococcoses ont été rapportés chez des sujets immunocompétents. *Cryptococcus neoformans* est un agent causal. C'est un opportuniste, saprophyte du milieu extérieur, vivant dans le sol et associé aux déjections d'oiseaux (pigeons) [32].

3.1.3. Malassezioses

Pityriasis versicolor est une mycose superficielle, cosmopolite, très répandue dans les pays chauds et humides. L'invasion du pityriasis versicolor par une levure appartenant au genre *Malassezia* qui est kératinophile et lipophile. Elle les zones cutanées les plus riches en glandes sébacées : partie haute du tronc, cou, bras, région sous-mammaire.

3.2. Dermatophytoses

Par définition sont des affections fongiques causées par des dermatophytes logés dans la kératine (peau, ongles et poils ou cheveu). Ce sont des « teignes », des lésions de la peau ou du cuir chevelu. Elle se manifeste aussi bien chez l'homme que chez l'animal, et elles sont souvent contagieuse [24].

A. Agents pathogènes

Les dermatophytes sont des champignons microscopiques appartenant au genre *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*. A partir des produits pathologiques, ils se reproduisent sur le milieu de Sabouraud en formant des filaments (mycélium) et en produisant de façon asexuée des spores appelées conidies (macroconidies et microconidies)[30].

Les dermatophytes sont à l'origine chez l'homme et l'animal caractérisées par des lésions superficielles qui touchent : les ongles (onyxis), les poils (folliculites), les cheveux (teignes), Des manifestations allergiques (dermatophytides ou trichophytides) [30].

Ils restent localisés au niveau des couches superficielles de l'épiderme et très exceptionnellement les muqueuses, les tissus sous cutanées (granulomes, mycétomes ou les viscères. Les atteintes profondes, y compris chez des patients immunodéprimés, sont exceptionnels [33].

B. Origines de contamination et facteurs favorisants

On distingue deux modes de contamination par les spores des dermatophytes :

- **Transmission directe** : par contact avec une personne, un animal infecté ou un porteur sain (espèces anthropophiles et zoophiles) ou alors à l'occasion d'un contact avec de la terre ou du sable souillés (espèces telluriques) [26].
- **Transmission indirecte** : c'est le mode le plus fréquent par contact avec des objets (vêtement, peignes, chaussures...), ou des surfaces souillées :(milieux sportifs, piscines, douches collectives, vestiaire des écoles...) [26].

➤ Facteurs favorisants

Le facteur principal est l'altération épidermique (quel que soit la nature : traumatisme), macération (plis, séchage insuffisant, chaussure fermée ou de sécurité, contact répété avec l'eau. [23]. En plus, l'état physiologique du patient constitue un élément primordial, le tableau suivant comprend les dermatophytoses selon les différents états physiologiques.

Tableau 1 : Principales dermatophytoses développées en fonction de l'état physiologique du patient [34].

| Etat physiologique du patient | Mycose superficielle les favorisées |
|--|--|
| Diabète (diminution des capacités de l'organisme à éliminer les agents pathogènes) | Intertrigos des grands plis dermatophytoses du pied |
| Obésité | Intertrigos des grands plis |
| Insuffisance vasculaire des membres inférieurs (notamment chez le sujet âgé) | Dermatophytoses du pied Onyxis |
| Hypersudation augmentation de la température cutanée et macération | Dermatophytoses du pied. Herpès circiné |
| Immunodépression acquise (comme le SIDA) | Nombreuses mycoses superficielles |

C. Manifestations cliniques

▪ Lésions de la peau glabre

✓ Dermatophytie (l'herpès circiné)

C'est une infection, pouvant survenir à tout âge, l'apparition des lésions se fait 1 à 3 semaines après le contact infectant [35]. La lésion débute par une tache érythémato-squameuse superficielle qui s'étend rapidement d'une façon excentrique. Elle est de taille variable, est caractérisée par sa forme arrondie, parfaitement limitée, avec une zone centrale plus claire d'aspect cicatriciel, et une périphérie marquée par la rougeur des squames ou des vésicules, uniques ou multiples, ces plaques peuvent confluer donnant des placards polycycliques [23].

▪ Lésion des plis (intertrigos)

On distingue 2 types:

✓ Intertrigos des grands plis

C'est habituellement le pli inguinal qui est touché réalisant l'ancien « eczéma marginé de hébra » il s'agit des lésions centrées sur les plis, avec une bordure érythémato-squameuse ou vésiculeuse. Ces lésions sont souvent prurigineuses au creux axillaire, la lésion est également centrée sur le pli, l'atteinte bilatérale est rare. En l'absence de traitement, l'évolution

est chronique les deux Dermatophytes les plus fréquemment retrouvés sont *E. floccosum* et *T. rubrum* [7,35].

✓ **Intertrigo des petits plis**

Les pieds sont beaucoup plus atteints que les mains. *T. rubrum* .et *T. interdigital* sont le plus souvent impliqués, la lésion touche préférentiellement les 3^{ème} et 4^{ème} espace interdigitaux. L'intertrigo inter orteil est une source potentielle de complications qui se diffuse à l'ensemble du pied et même d'autre région du corps [36].

✓ **Intertrigos plantaires et palmaires**

Le plante des pieds est fréquemment la siége de Dermatophytie les lésions sont alors asymethemato-squameuses et prurigineuses parfois, elle se représente comme une pachydermie plantaire. *Trichophyton rubrum*, est l'espèce la plus souvent rencontrer, les lésions palmaires sont plus rares, touchant une seule main elles sont provoquées principalement par *T. rubrum* et plus rarement par *M. persicolor* (Figure .9) [36].



Figure 8 : Intertrigo interdigito - plantaire [33].

▪ **Lésions du cuir chevelu**

On distingue :

✓ **Teignes Tondantes**

Ce sont le plus fréquentes. On distingue deux variétés, les teignes microscopiques, et les teignes trichophytique [27].

✓ **Teignes Tondantes microscopiques**

Due à des Dermatophytes du genre *Microsporum* d'origine animal ou humaine. Elles donnent des plaques alopéciques arrondies uniques ou multiples (Figure10) [37].



Figure 9: Teigne tondantes microscopique [35].

✓ **Teignes tondantes trichophytique**

Elle est due à des Dermatophytes du genre *Trichophyton* d'origine humaine [27]. Ces teignes réalisent de nombreuses petites plaques, de forme irrégulière. Dans certains cas, ces Teignes survenues chez l'enfant, ne guérissent pas à la puberté [23].

✓ **Teignes favique (favus)**

C'est une atteinte grave qui est due à *T. schoenleinii* strictement anthropophile, Elle se rencontrer aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte la teigne favique elle a des symptômes qui son due aux mauvaises conditions d'hygiène. Comme les plaques alopéciques inflammatoires et de petite dépression cupuliforme remplis de croûtes « godet favique » (Figure 11) [37].



Figure 10: Teignes favique [38].

- **Teignes inflammatoires**

Ce type de Teignes inflammatoires ou « kérions de Celse » débutent comme toutes les teignes par une lésion érythématosquameuse, c'est une lésion grave qui s'accompagne d'une chute de cheveux. Figure 12. Les espèces les plus fréquemment responsables *Trichophyton Mentagrophytes*, *Trichophyton Verrucosum* [27].



Figure 11: Teignes inflammatoires [6].

- **Lésion des ongles**

On distingue 4 types d'atteintes cliniques selon le point de départ de l'affection :

- ✓ **Onychomycose sous – unguéale distolatérale**

L'agent mycosique pénètre sous l'ongle dans la couche cornée de l'hyponychium et du lit unguéal. Cet envahissement provoque une hyperkératose et un blanchiment de l'ongle (Figure 13).



Figure 12: Onychomycose sous Unguéal Distolatérale [27].

✓ **Leuconychie superficielle**

Elle se manifeste par des petits îlots blancs, opaques, à limites nettes, qui par coalescence vont atteindre progressivement toute la surface de l'ongle. Celui-ci s'effrite alors par simple grattage à la curette (Figure14) [36].



Figure 13: Leuconychie superficielle [36].

• **Leuconychie sous -unguéeale proximal :**

C'est la traduction d'un envahissement à partir de la face profonde des replis sous - unguéaux, des taches blanches émargent dans la région lunulaire puis s'attendent peu à peu. (Figure15) [27].



Figure 14: Leuconychie sous -unguéeale proximal [27].

- **Onychodystrophie**

Elle due par aggravation progressive des variétés précédentes. Tout la lame devient friable en « bois pourri » et s'effrite peu à peu complètement (Figure 16) [36].

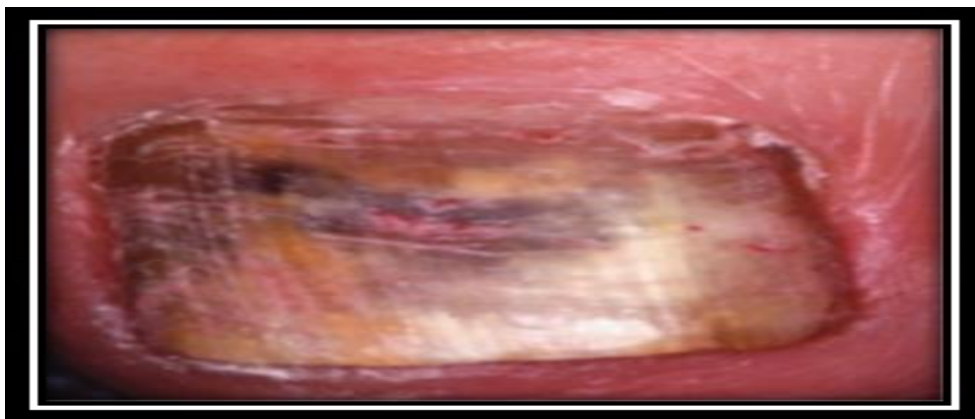


Figure 15: Onychodystrophie [36].

3.3 Les moisissures d'intérêt médical

Ils sont caractérisés par la présence des filaments ramifiés (hyphes) enchevêtrés les uns aux autres dont l'ensemble constitue un réseau appelé le mycélium. Leur multiplication est asexuée généralement par production de spores et fragmentation des hyphes. L'émergence de beaucoup d'espèces en particulier des moisissures autrement dites les champignons filamenteux dans le domaine médical ne cesse pas à s'augmenter, ces derniers qui sont issues du sol, l'air et des contaminants de laboratoires sont souvent impliqués dans un processus pathologique [8].

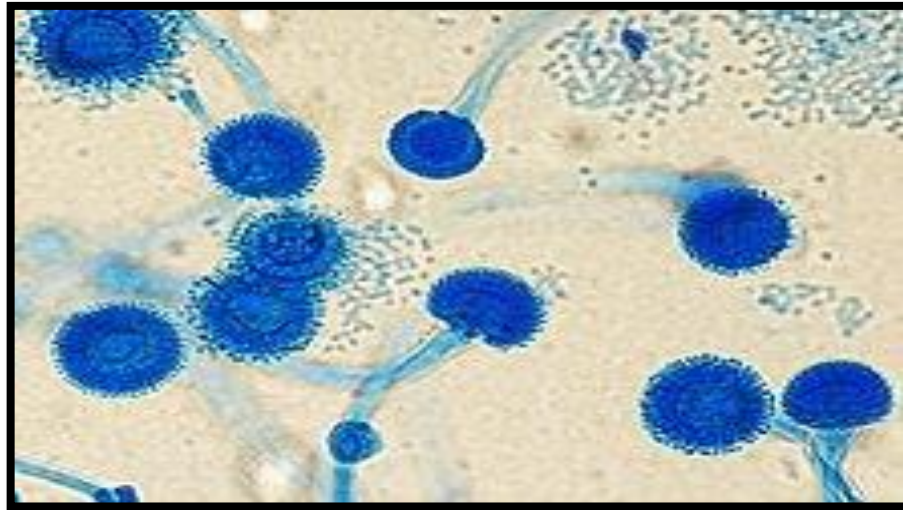


Figure 16: Champignons filamenteux (*Aspergillus*)

3.3.1. Les Aspergilloses

Les aspergilloses sont des mycoses cosmopolites, le plus souvent pulmonaires, souvent mortelle, provoquées par le développement de champignons filamenteux appartenant au genre *Aspergillus*. Les *Aspergillus* sont des pathogènes Opportunistes, leur développement chez l'hôte nécessite l'existence de conditions favorables : locales (caverne tuberculeuse, cancer broncho- pulmonaires, broncho- pneumopathie chronique obstructive), générales (corticothérapie prolongée, hémopathie maligne, chimiothérapie apaisante, SIDA), des facteurs environnementaux (abondance de spores Aspergillaires dans l'air inhalé lors de la manipulation de fumier de foin moisi , liée aux champignons (taille des spores Aspergillaires, thermatolérance, facteurs de virulence).[8]

Chapitre 2

1. Diagnostic mycologique par méthodes classiques

La démarche de diagnostic mycologique d'une mycose suit les étapes correspondantes [39]:

- ✓ Le prélèvement,
- ✓ L'examen direct,
- ✓ La mise en culture,
- ✓ L'interprétation des résultats.

Pour un diagnostic complet, un interrogatoire du patient est nécessaire avant l'étape de prélèvement. Il doit regrouper : l'histoire de la lésion, date d'apparition, la recherche d'autres localisations, le contexte épidémiologique (profession exposée, de contamination vis-à-vis d'un animal, familial...) Le diagnostic nécessite une étroite collaboration entre le médecin et le biologiste [26, 40].

1.2. Le prélèvement

Le prélèvement constitue une étape cruciale qui conduit à la réussite de diagnostic mycologique. Cependant le prélèvement doit être de bonne qualité réalisée par un préleveur qui connaît bien la sémiologie clinique des mycoses, l'échantillon biologique doit être suffisamment abondant. En effet, Il doit être aussi réalisé d'une façon stérile et loin de tout traitement antifongique afin d'éviter des faux négatifs en culture. L'acheminement doit être aussi rapide. [26.33]

1.2.1. Prélèvements superficiels

a. Peau, phanères et muqueuses : [26]

- Pour la peau glabre Il faut privilégier les prélèvements en périphérie des lésions au niveau des zones actives : les squames sont recueillies dans une boîte de Pétri
- Ongles en effectue un grattage au scalpel de la zone de jonction entre l'ongle sain et l'ongle pathologique.
- Les prélèvements muqueux sont réalisés à l'aide d'écouvillons stériles.
- Les lésions sont grattées à leur périphérie à l'aide d'un grattoir de Vidal ou d'une curette, en s'attardant sur les bourrelets inflammatoires quand ceux-ci d'un *pityriasis versicolor* Pour le prélèvement mycologique d'un *pityriasis*

versicolor on utilise la méthode du scotch test qui se réalise par l'application de la cellophane adhésive

- Transparente et l'appliquer sur les lésions puis collée sur une lame porte-objet et examinée au microscope.

b. Teignes du cuir chevelu :

L'examen sous lampe à UV (lampe de Wood) du cuir chevelu permet de visualiser des cheveux fluorescents : en cas de teigne microscopique (fluorescence vert clair) ou favique (fluorescence vert foncé), les teignes trichophytique et suppurées (kérions) n'entraînent pas de fluorescence. On prélève les cheveux suspects (fluorescents) à l'aide d'une pince à épiler ou d'une curette. Un écouvillon stérile, est utilisé en cas de lésions suintantes ou suppurées [26].

1.2.2. Prélèvements profonds

Tableau 2: Différents Types des prélèvements profonds selon la localisation des mycoses [26].

| Localisations des mycoses | Types de prélèvement |
|--|--|
| Localisations broncho-pulmonaires | Lavage broncho-alvéolaire (LBA) Aspiration bronchique, Crachats |
| Localisations pleurales, articulaire et péritonéale. | Ponction pleurale, Liquide de ponction Liquide de dialyse, Redons et drains |
| Localisation cérébrales | Ponction lombaire (PL) |
| Septicémie | Sang ou cathéters centraux |
| Tissus profonds | Biopsie |

1.3. Examen direct

L'examen direct constitue une étape importante dans le diagnostic, il aide d'affirmer la nature fongique d'une infection. En permettant la visualisation des structures fongiques (éléments levuriformes et/ou filaments mycéliens) au sein des produits pathologiques. Cet examen permet d'orienter le diagnostic à un type de mycose particulier. L'observation par exemple de blastopores avec pseudo-mycéliums oriente vers une candidose [33,7].

Il est réalisé facilement en examinant au microscope un peu du prélèvement déposé entre lame et lamelle à l'état frais ou avec une goutte de liquide de montage. Cet examen s'effectue soit directement à l'état frais par montage dans un liquide non coloré (eau distillée ou sérum physiologique stérile), soit en utilisant un colorant permettant de mieux visualiser les blastoconidies : bleu au lactophénol, noir chlorazole [41].

1.4. La culture

La culture est une étape complémentaire de l'examen direct, car elle permet d'une part le diagnostic d'une mycose dans le cas où l'examen direct est négatif et d'autre part de l'identification précise du genre et de l'espèce du champignon causal et la détermination de sa sensibilité aux antifongiques.

✓ Milieux de culture

Le milieu standard de référence pour les champignons est le milieu de Sabouraud (milieu simple contenant un sucre : source de carbone et une peptone : source d'azote), additionné d'antibiotiques (chloramphénicol et/ ou gentamicine) et de cycloheximide (Actidione*). Pour les levures, l'utilisation des milieux chromogéniques auxquels sont ajoutés des substances chromogènes, confèrent aux colonies qui s'y développent une coloration particulière, variable en fonction de l'espèce [26].

1.5. Identification

Elle dépend de la vitesse de pousse (culture positive) qui est variable suivant le champignon : de 48h jusqu'à 2 à 3 semaines pour les levures et de 1 à 4 semaines pour les dermatophytes, aussi, des caractères microscopiques et macroscopiques des colonies et de la température optimale de croissance [26].

1.5.1 Identification des levures

Il existe plusieurs maladies infectieuses dues aux levures mais les plus fréquentes sont les candidoses en pathologie humaine. Beaucoup d'espèces sont émergentes mais l'espèce *Candida albicans* est la plus incriminée et considérée comme l'agent causal et virulent de la plupart des candidoses.

➤ **Diagnostic des candidoses causé par *Candida albicans***

➤ **Aspect macroscopique**

- ✓ Sur milieu Sabouraud, des colonies blanchâtres qui se développent en 24-48 heures et donne une suspicion de *Candida spp* confirmée par l'obtention de filaments et blastopores après repiquage sur milieu (PCB) à 25°C [26].
- ✓ Tous ces milieux chromogéniques permettent au moins d'identifier directement *C. albicans*, les colonies se colorant en bleu (Candida ID® 2, BioMérieux) (Candichrom®, ELITechMicrobio ;ChromID®, bioMérieux), en vert (CHROMagar® Candida, Becton- Dickinson ; OCCA®, Oxoid) ou en rose-violet (CandiSelect® 4, Bio-Rad). L'identification est parfois immédiatement après lecture en milieu chromogène [39].

➤ **Résultats de L'examen direct**

Il permet l'observation des blastopores de 3 à 5µm de diamètre rond ou ovale, à bourgeonnements multipolaires, avec un mince tube germinatif.

- Des tests plus ou moins rapides et spécifiquement adaptés à son identification :

1. Tests physiologiques

L'identification de *C. albicans* reposait historiquement sur l'association de deux tests qui ont été progressivement abandonnés au profit d'autres tests plus rapides et/ou spécifiques de l'espèce.

2. Test de Blastèse (ou germination)

Il est réalisé par incubation de l'isolat pendant 2 à 4 heures en sérum à 35 – 37 °C. L'observation d'un tube germinatif confirme la présence d'un *candida albicans* [41].

3. Test de chlamydosporulation

Ce test repose sur une subculture de 24 à 48 h à 25 – 28 °C de l'isolat en strie profond dans un milieu PCB ou RAT.*C. albicans* est de chlamydospores, structures arrondies de 10 à 15 µm de diamètre à paroi épaisse (aspect de double contour) produites isolément ou en grappe à l'extrémité du pseudomycélium [41].

Ces deux tests ne permettent pas de différencier véritablement *C. dubliniensis* de *C. albicans* ce qui les rend progressivement abandonnés, et ont été remplacés par d'autres tests plus rapides et/ou spécifiques de l'espèce.

4. Tests d'identification rapide

✓ Test immunologique

Ce test repose sur la co-agglutination sur lame. L'apparition d'agglutinats rouges sur fond vert, les colonies fraîchement isolées sont identifiées en quelques minutes comme étant *C. albicans* ou *C. dubliniensis* et la différenciation entre ces deux espèces repose ensuite sur un second dispositif, le bichrodubli® (Fumouze Diagnostics) [41].

✓ Test biochimique

L'identification se repose alors sur l'utilisation de galeries et d'un large panel de dispositifs miniaturisés et standardisés est commercialisés la grande majorité de ces dispositifs repose sur l'étude de l'assimilation des carbohydrates (aux anagrammes) et de leur fermentation (zymogramme). Trois dispositifs sont actuellement commercialisés : Murex *C. albicans*® (Murex Diagnostics), Albicans-Sure® (Clinical Standards Laboratoires) et BactiCard Candida® (Remel CO). Les trois tests consistent en la recherche d'une double activité β -galactosaminidase et L-proline aminopeptidase, positive pour les seules colonies de *C. albicans* [41].

5. Diagnostic sérologique

Dans le cas des candidoses profondes ou systémiques, l'hémoculture est toujours le « gold standard », même si sa sensibilité peut être prise en défaut. Cette sensibilité est ensuite devenu non gênante grâce au arrivés des tests alternatifs qui se repose sur reposent sur la détection d'anticorps (la recherche d'anticorps sériques anti-Candida et la recherche d'antigènes circulants comme D-arabinitol, mannanes, β (1,3)-D glucanes), de métabolites ou d'acides nucléiques. [41]

6. Diagnostic moléculaire

Dans le même contexte de candidoses profondes, le diagnostic moléculaire est représenté par deux techniques qui sont PCR et le typage moléculaire. Elles sont utilisées pour l'identification ou le typage des souches. L'amplification par PCR des régions ITS (internaltranscribedspacer) situées sur les gènes codant pour l'ARN ribosomal 5,8S, 18S et 28S, sont souvent utilisée. Une des approches moléculaires les plus décisifs concerne la différenciation entre *C. albicans* et *C. dubliniensis*. [41]

1.5.2. Identification des dermatophytes responsables des teignes

Le diagnostic de Dermatophytoses à des nombreuses difficultés au vu du manque de sensibilité ou de spécifier des techniques de biologie utiliser. Il est d'autant plus difficile que les signes cliniques sont peu spécifiques.

1. Examen direct

L'examen direct est indispensable compte tenu de la lenteur habituelle de croissance des dermatophytes et des difficultés d'interprétation en cas d'isolement de certaines moisissures habituellement saprophytes [8].

2. Technique

Pour sa réalisation, on déposera le produit pathologique sur une lame porte-objet dans une Goutte de liquide éclaircissant (chloral-lactophénol, ou potasse à 10, 15 ou 20%) afin de Digérer la kératine et faciliter la visualisation des éléments fongiques au microscope, objectif 20 ou 25. De même, l'utilisation du contraste de phase facilitera leur observation Des colorants (noir chlorazole, encre Parker® bleue ou noire) ou des fluorochromes dérivés Du stilbène (Blankophor, Calcofluor, Uvitex 2B) qui se lient spontanément aux polysaccharides à liaisons b présents chez les champignons (et les végétaux), peuvent faciliter le repérage des éléments fongiques . Ils s'associent volontiers aux agents éclaircissants [36].

3. Résultats

Pour les dermatophytes, la présence de filaments mycéliens hyalins, plus ou Moins réguliers, septés, d'aspect en bois mort [36].

➤ Dans les cheveux ou les poils

Le développement des Dermatophytes dans les cheveux ou les poils se traduit, à l'examen Direct, par différents aspects [36].

Le parasitisme endo-ectothrix attaque du cheveu se traduit par la présence de quelques filaments mycéliens intrapilaires. Mais surtout, on observe autour du cheveu, la présence de spores (arthrospores résultant de la dissociation de filaments mycéliens) sur toute la longueur de la zone parasitée.

En fonction de la taille de ces spores et de leur abondance, on distinguera trois types de parasitisme pileaire endo-ectothrix. [8]

✓ **Le type microscopique** : les spores qui mesurent environ 2 mm de diamètre sont très nombreuses et forment autour du cheveu (ou du poil) une gaine dense et épaisse. En relation avec l'abondance des éléments fongiques à leur surface, les cheveux parasités sont fluorescents sous lampe de Wood. Ce type de parasitisme pileaire s'observe Exclusivement

pour certaines espèces du genre *Microsporium* : *M. canis*, *M. audouinii*, et Plus rarement *M. ferrugineum* [36].

✓ **Le type microïde** : la gaine de spores est lâche et les spores mesurent environ 2 mm de Diamètre. Les champignons en cause sont *T. mentagrophytes* et *T. erinacei*[36].

✓ **Le type mégaspore** : dans ce type de parasitisme pileaire qui oriente le diagnostic vers *T. verrucosum* et *T. equinum*, la gaine de spores est continue, et les spores sont plus Grosses, de 4 à 5 mm de diamètre [36].

a. Le parasitisme endothrix

Les filaments mycéliens envahissent le cheveu et se dissocient à maturité en arthrospores Qui finissent par casser le cheveu. Le Cheveu cassé très court apparaît, à l'œil nu, comme un point noir au milieu des squames. Au microscope (objectif 20), il se réduit à l'image d'un petit fragment enroulé simulant un Chiffre ou une lettre. Seules des espèces anthropophiles du genre *Trichophyton* (*T.tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense*, ...) produisent ce type de parasitisme pileaire [36].

b. Le parasitisme favique

Dans ce type de parasitisme pileaire qui est spécifique de *T. schoenleinii*, les filaments mycéliens intrapilaires sont assez nombreux. Cependant, dans la partie distale du cheveu parasité, non cassé, les filaments mycéliens morts laissent dans le cheveu des galeries qui Apparaîtront brunes à l'examen microscopique [36].

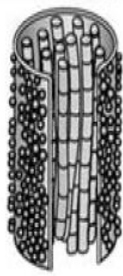

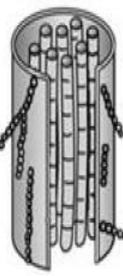
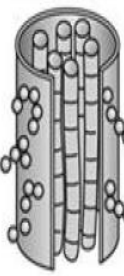

| Aspect clinique des lésions | 1,2,3 plaques alopéciques de quelques mm de diamètre | Très nombreuses plaques alopéciques de quelques mm de diamètre | Teigne inflammatoire (kérion aigu) | Teigne inflammatoire (kérion subaigu) | Teigne favique |
|--|--|--|--|--|--|
| Aspect du parasitisme pileaire à l'examen direct | Microsporique  | Endothrix  | Microïde  | Mégaspore  | Favique  |

Figure 17:Aspect du parasitisme pileaire par les dermatophytes à l'examen direct. [35]

4. Culture

➤ Milieux de culture et ensemencement

Le milieu de référence pour les dermatophytes est le milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques et de cycloheximide (Actidione®). Ce milieu de culture est commercialisé par différentes sociétés sous forme de géloses présentées en boîtes de Pétri ou en tubes. L'usage des boîtes de Pétri semble cependant préférable. Leur manipulation est en effet plus aisée tant pour l'ensemencement que pour la réalisation des montages nécessaires à l'observation microscopique. Toutefois, si des géloses en tubes sont préférées, il conviendra de ne pas visser complètement les tubes, les dermatophytes étant aérobies. Les cultures seront incubées à 20-25°C pendant au moins 3 semaines car certains dermatophytes comme *T. verrucosum* ont une croissance très lente. Elles seront examinées deux fois par semaine, car les aspects macroscopiques caractéristiques sont transitoires. Par ailleurs, certains laboratoires proposent, pour l'ensemencement des prélèvements, le milieu de Taplin commercialisé en tubes ou sous forme de lames gélosées. Ce milieu contient un indicateur coloré, et la croissance des dermatophytes entraînerait son virage au rouge [36].

➤ Démarche de l'identification au laboratoire

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

a. 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 [9].

b. Examen microscopiques des cultures

La culture en boîte de Pétri permet d'observer au microscope par transparence (objectif 10) les filaments mycéliens et de rechercher certains aspects particuliers (aspect en « fil de fer barbelé » chez *T. soudanense*, organes en « bois de cerf » chez *T. schoenleinii*) [42].

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

- 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 [36].
- 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*) [35].
- L'abondance et la morphologie des microconidies (toujours unicellulaires, rondes ou piriformes, solitaires ou disposées en acladium, voire en buissons) [42].
- La présence et la morphologie des macroconidies (toujours pluricellulaires et cloisonnées Seulement transversalement, à paroi lisse chez les *Trichophyton*, ou rugueuse chez les *Microsporum*), et la présence d'autres éléments que l'on appelle ornements [36].
- Excroissances triangulaires caractéristiques de *T. rubrum* (ébauches de macroconidies Naissant latéralement sur les filaments, et de forme triangulaire) [36].
- Organes pectinés (en forme de peigne) chez *M. audouinii* et *T. schoenleinii*
- Vrilles chez *M. persicolor* et *T. mentagrophytes*
- Clous et chandeliers faviques de *T. schoenleinii*,
- Structures proliférantes de *T. erinacei* (observées surtout dans la profondeur de la gélose, et organes nodulaires de *T. schoenleinii* ou des souches dites « nodulaire » de *T. mentagrophytes* [42].

1.1.1 Diagnostic des Aspergilloses

Plusieurs maladies sont causées par les moisissures notamment le genre *Aspergillus* responsable des aspergilloses.

1. Prélèvement

Ils doivent être en rapport avec le site de l'infection et en fonction des signes d'appel. Au niveau endobronchique, LBA représente le prélèvement de choix. Par conséquent Les prélèvements qui se réalisent sous fibroscopie sont en effet de bonnes qualité, d'où l'intéressance des prélèvements bronchiques distaux protégés. En cas d'un problème d'interprétation en évite les crachats d'une culture qui s'avérait positif, s'il s'agit d'examen direct et de culture négative, si la suspicion clinique est forte, il peut être utile de renouveler ces prélèvements.

L'apport des hémocultures est limité, cependant un examen rapide d'importance conséquence peut être une biopsie d'organe. Les biopsies d'organes ont une valeur diagnostique très élevée mais sont de réalisation souvent difficile en raison des possibles Complications hémorragiques chez le sujet neutropénique. Le rapport bénéfice-risque doit être mesuré pour chaque patient [43].

2. Examen direct

On peut réaliser un état frais directement entre lame et lamelle, ou après coloration (bleu de toluidine, Giemsa, acide périodique de Schiff ou Gomori-Grocott). On recherche ainsi la présence de filaments mycéliens. L'examen du LBA ou des tissus ne montre ni spores ni têtes Aspergillaires. Un point important réside dans le fait que la présence de filaments à l'examen direct est très évocatrice d'infection mycologique mais qu'elle ne signe pas la présence d'*Aspergillus sp.* Le diagnostic du genre et de l'espèce ne peut être réalisé qu'au moyen de la culture [40].

3. Culture et identification

L'ensemencement se réalise sur un milieu de Sabouraud-chloramphénicol ou Sabouraud-gentamicine sans actidione à 24, et/ou 37°C. Dans les milieux Czepek ou malt qui facilitent la fructification sa sera une identification facile, De même, une température allant jusqu'à 57°C

La culture se fera généralement en 24 à 48 heures, parfois plusieurs jours, et les têtes Aspergillaires, nécessaires pour l'identification de l'espèce, apparaissent vers le 3ème ou 4ème jour de culture. [43]

Les critères d'identification des différents *Aspergillus* nécessitent 2 étapes :

- L'aspect macroscopique : ras à poudreux, velouté parfois cotonneux, de couleur varié
En fonction de l'espèce au verso, il peut parfois exister un pigment qui diffuse dans la gélose.
- L'aspect microscopique des colonies après coloration au bleu de lactophénol
- Morphologie de la tête Aspergillaires : ronde ou en fuseau, vésicule sphérique où Allongée [43].
- Aspect de conidiophore : long ou court, lisse ou échinulé, droit ou sinueux
A. fumigatus.
- Aspect macroscopique : en recto ses colonies sont blanc-vert à 48-72 h et vert-gris plus tardivement et le verso : incolore, jaune, vert, ou Brun rouge.
- Aspects microscopiques : Portée par le conidiophore (lisse, incolore, Evasement progressif au sommet), la tête Aspergillaires (forme de fructification asexuée) est

composée d'une vésicule, d'une rangée de phialides (cellules conidiogènes) portée ou non par une rangée de métules, et de conidies (ou phialospores) de 2 à 4 micromètres de diamètre [43].

✓ Diagnostic sérologique

Technique précipitation ou d'hémoagglutination indirecte ou d'ELISA pouvant être confirmée par immunoelectrophorèse : on met en évidence des arcs de précipitation : les activités atlastiques et chymotrypsiques sont spécifiques respectivement du genre *Aspergillus* et d'*Aspergillus fumigatus* [44].

Une nouvelle technique protéinique la spectrométrie de masse de type MALDI TOF a devenu une alternative des méthodes phénotypiques dites classiques. Ces dernières sont associées à un taux relativement important d'identifications erronées et nécessitent un long délai d'identification de quelques jours en moyenne. Contrairement à l'outil MALDI TOF MS qui est devenu incontournable dans les laboratoires de microbiologie clinique et également des laboratoires de mycologie clinique, permettent ainsi une identification rapide et standardisée de l'ensemble des microorganismes, bactéries et champignons dans un temps court et un cout réduit.

2. La spectrométrie de masse MALDI -TOF

2.1. Définition

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight mass spectrometry MALDI TOF MS. Par définition est une technique qui associe une source d'ionisation dite douce assistée par une matrice (MALDI) et un analyseur à temps de vol (TOF). L'instrument MALDI TOF MS se compose de trois unités ou phases fonctionnelles : une source d'ionisation, un analyseur de masse (analyseur à temps de vol) et un détecteur. Cette technologie est appliquée en plusieurs domaine notamment le domaine biomédicale, pharmacologie, toxicologie et pour l'identification des micro-organismes [1].

2.2. Principe

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF permet une identification rapide des microorganismes par analyse de leurs protéines totales directement à partir d'une colonie isolée des cultures. L'analyse comporte les étapes suivantes :

1. Ionisation et désorption de l'échantillon : dans cette phase l'échantillon et la matrice sont déposés sur un support métallique (la cible) ou ils vont co-cristalliser après l'évaporation des solvants. L'ensemble de mélange est bombardé avec un faisceau laser,

généralement d'un nombre pré-connu de tirs de laser. Le laser peut avoir une longueur d'onde infrarouge (IR) ou ultraviolet (UV) ; les lasers UV sont de loin les plus courants [45]. La matrice a pour but d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui mène à la vaporisation de l'échantillon, cette étape représente l'étape de la désorption. Par conséquent, l'étape de l'ionisation permet la de générer des ions de différentes masses (Figure.19).

2. **L'analyse à temps de vol :** les ions générés sont accélérés et entrent dans le tube de vol (l'analyseur à temps de vol). L'étape de l'analyse consiste à la séparation des ions en fonction de leur rapport masse sur charge m/z . (Figure.19).
3. **La détection des ions :** à l'extrémité de tube de vol il existe un détecteur qui peut enregistrer le temps de vol et l'intensité relative des ions individuels, ce signal des ions est converti en un courant électrique. C'est-à-dire Le spectre obtenu en TOF est converti en spectre en masse par calibration des masses connues [46]. Chaque pic du spectre correspondra à un rapport m/z ayant atteint le détecteur. Le résultat final permet de générer un spectre de masse sous forme graphique où l'axe des abscisses correspondent au rapport masse sur charge (m/z) et l'axe des ordonnées à l'intensité relative du signal (Figure.19) [1].

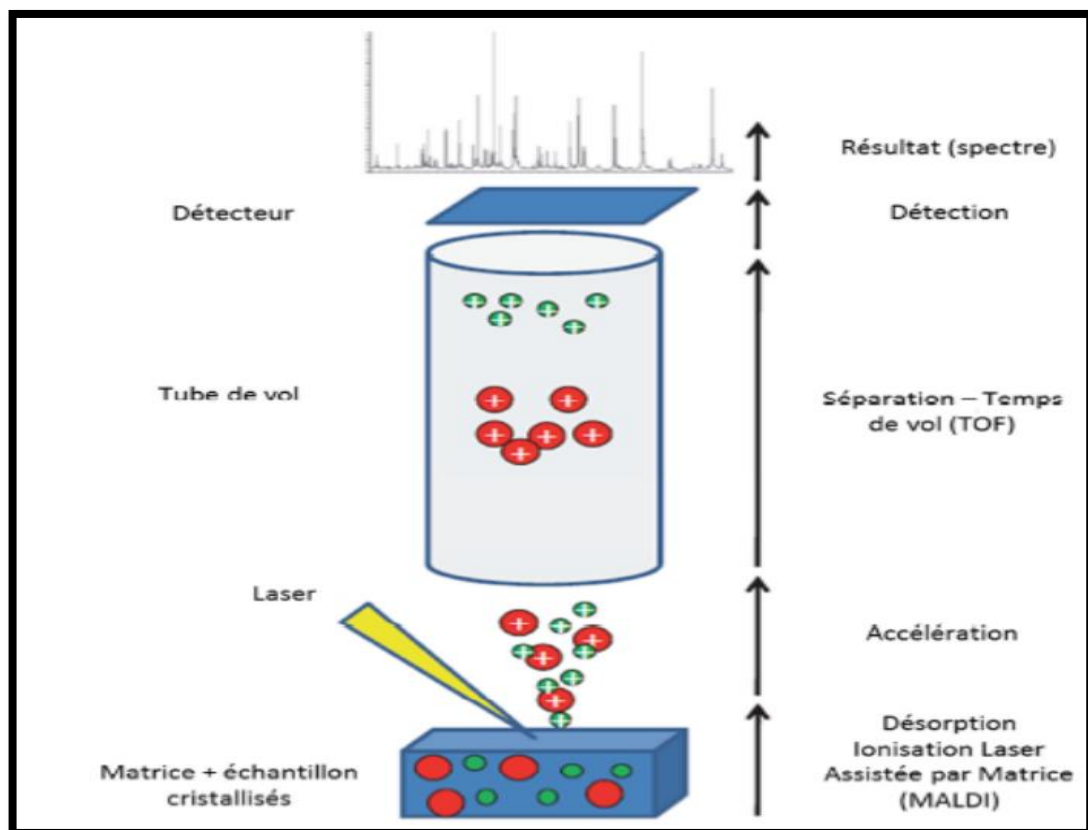


Figure 18: Représentation schématique du fonctionnement d'un spectromètre de masse MALDI-TOF [47].

2.3. Préparation de l'échantillon et le choix de la matrice

Les paramètres expérimentaux : méthode d'extraction des protéines, concentration en NaCl, composition des tampons utilisés, conditions de culture, nature du dépôt (goutte séchée, couche mince, etc.). Modifiant la cristallisation de la matrice avec l'échantillon et, par conséquent, l'efficacité d'ionisation des molécules testées. Ceci influence la qualité des spectres obtenus. La maîtrise et la standardisation de ces variables permet d'optimiser l'identification et d'augmenter la reproductibilité [4].

Le choix de la matrice utilisée est un paramètre principal. Elle doit être adaptée à la nature de l'échantillon et répondre à certains critères physico-chimiques pour obtenir un bon rendement d'ionisation et un spectre de bonne résolution. Les matrices les plus souvent utilisées sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (acide gentisique ou DHB), l'acide trans-3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (acide sinapinique ou SA) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA). Actuellement, le dépôt en goutte épaisse utilisant l' α -CHCA est largement utilisé pour les identifications de routine [4].

3. Applications de la spectrométrie de masse MALDI TOF en mycologie clinique

MALDI TOF MS a été utilisée la première fois en 1990 dans la microbiologie clinique pour l'identification des bactéries car les infections bactériennes ont une incidence plus élevée et les bactéries sont plus faciles à traiter que les champignons [5].

A partir de l'an 2001, après le large éventail de l'application de MALDI TOF MS en bactériologie, les mycologues ont tenté d'adapter cet outil aux champignons [5]. Toutefois, si la bactériologie a rapidement bénéficié de l'apport de cette technique, des adaptations ont été nécessaires pour tenir compte de la spécificité des champignons [2].

Cet outil a devenu indispensable dans la conception des laboratoires de microbiologie [1], et également dans les laboratoires de mycologie clinique pour le diagnostic des fongémies, l'identification des champignons filamenteux et des levures se fait par l'acquisition des spectres de protéines hautement spécifiques. C'est grâce à Tanaka Koichi [48], qui a utilisé MALDI avec des macromolécules biologiques. Malgré leur faible volatilité et leur instabilité thermique inhérentes, les protéines ont suivi l'évolution des techniques d'ionisation ; devenant ainsi les biomarqueurs les plus caractéristiques accessibles pour l'analyse MALDI-TOF MS des microorganismes intacts, sans processus d'extraction, de séparation ou d'amplification [5].

La précision de l'identification repose sur des bases de données créées au préalable (également appelées "bibliothèques") qui comprennent des milliers de spectres de référence obtenus à partir de souches [2].

3.1. Identification des levures

On se focalise sur le genre *Candida*. Cette technique Surpassant les performances de certains systèmes phénotypiques. Elle peut différencier *Candida albicans* de *Candida dubliniensis* ; *C.pararugosa* de *Candida rugosa* ; *Candida krusei*, *Candida norvegensis* et *Candida inconspicua* ; *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* et *C. parapsilosis* ; *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* et *C. parapsilosis* l'un de l'autre et *C. gattii* à partir de *C. neoformans* selon la représentation spectrale de la base de données. Les deux bases de données des deux principaux systèmes MALDI-TOF MS actuellement disponibles, MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne) et VITEK MS/MS Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) comprennent des levures communes isolées dans les laboratoires de microbiologie clinique [49,2].

Beaucoup d'études en réaliser au niveau des hôpitaux en utilisant les différents systèmes commercialisés. Lacroix et al ont démontré que le système Bruker, en utilisant l'extraction de protéines et l'utilisation du seuil d'espèce du fabricant a permis d'identifier 97 % des 1383 isolats de *Candida* régulièrement isolés. En Revanche, le problème posé par la présence de plusieurs espèces n'est pas résolu à l'heure [49, 2].

3.2. Identification des champignons filamenteux

Les champignons filamenteux présentent des phénotypes variables en raison desquels les spectres de protéines peuvent varier. L'hétérogénéité peut être affectée par les conditions de croissance et la zone de mycélium fongique examinée. [49]. Ce n'est qu'au cours des dix dernières années qu'elle a pu être mise en œuvre en routine grâce au développement de protocoles adaptés et des bibliothèques spécifiques, qui a été initié au sein même des laboratoires de mycologie médicale.

Les directives actuelles concernant les conditions de culture et les protocoles de préparation des échantillons varient entre les auteurs, les fabricants de plateformes MALDI-TOF MS ou les fournisseurs de bibliothèques. Le protocole le plus simple, consiste en un dépôt direct d'une petite partie de la colonie et l'ajout d'acide formique sur le même principe que le protocole sur plaque pour la levure, mais la qualité des spectres peut être améliorée en

utilisant des protocoles plus longs nécessitant une sous-culture en milieu liquide ou impliquant une étape de battage des billes et/ou extraction éthanol-acide formique-acétonitrile. [49]

Les champignons filamenteux notamment les dermatophytes peuvent être identifiés avec des bases de données appropriées. *Microsporium audouinii*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, et *Trichophyton violaceum* sont inclus dans le système Vitek MS approuvé/autorisé par la FDA, et aucun dermatophytes dans le système Bruker approuvé/autorisé par la FDA. [49]

L'intérêt et le succès de son utilisation est principalement dû aux faibles coûts opérationnels, à l'universalité et à la flexibilité de la détection, ainsi qu'à la spécificité et à la rapidité de l'analyse [5]. La rapidité repose de l'utilisation systèmes différents qui sont également commercialisés tels que : (Bruker/Biotyper, BioMérieux/Saramis, Andromas) [50]. MALDI TOF MS constitue une excellente alternative des méthodes d'identification classiques des champignons.

4. Les protocoles expérimentaux de l'identification des levures par MALDI TOF MS

4.1. Identification à partir une colonie d'une culture pure

L'identification par MALDI TOF MS est effectuée sur des colonies issues de cultures pures obtenues après 24 à 48 heures d'incubation sur milieux chromogènes ou sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques. Une colonie est prélevée et transférée à l'aide d'une öse (ou un bâton en bois) sur un spot d'une plaque de dépôt et recouverte d'acide formique 70 % puis séchée. Ensuite, 1-2 µl d'une matrice chimique du type CHCA (acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique) est déposée sur l'échantillon et laisser co-cristalliser afin de générer des cristaux et favoriser la vaporisation et l'ionisation. (Figure20). Après séchage, les cristaux formés par le mélange échantillon / matrice sont soumis dans une chambre d'ionisation MALDI TOF MS où ils exposent à des tirs laser pulsés. Des ions monochargés sont générés et séparés en fonction de leur rapport m/z dans le tube de vol. Cependant, Les molécules les plus petites atteignent le détecteur en premier. Des signaux sont détectés et retranscrits sous forme de spectre avec différents pics représentant les molécules ionisées. Par conséquent, ces spectres de masse sont produits et comparés à une bibliothèque comprenant des milliers de

spectres de différents isolats et espèces par le logiciel, ce qui permet d'identifier la levure. La validation de l'identification est basée sur un score et/ou une répétabilité de l'espèce. En utilisant le dépôt direct le délai d'obtention du résultat de la colonie est de moins de 15 minutes [49,51].

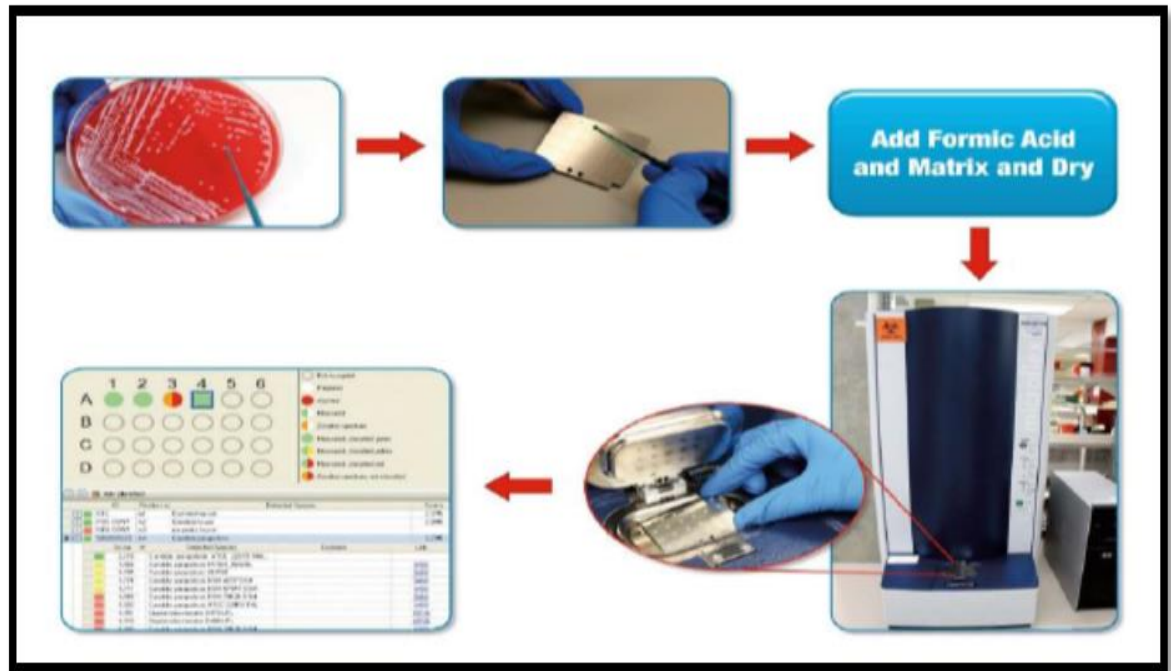


Figure 19:Processus de spectrométrie de masse à temps de vol par désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI-TOF MS) pour l'identification des levures [49].

Cependant, une étape de pré-extraction est parfois nécessaire pour l'identification des levures. Deux protocoles d'extraction sont classiquement décrits : Extraction des protéines sur plaque (ou extraction rapide) par l'addition de l'acide formique ou l'extraction hors plaque à l'éthanol/acide formique (ou longue/complète) mais comme cette dernière prend beaucoup de temps, le protocole d'extraction sur plaque est le plus couramment utilisée [2].

Actuellement, la procédure de préparation des échantillons diffère entre les systèmes Bruker®, Saramis® et Andromas®. Le type de bases de données développées et les systèmes experts d'analyse des pics sont basés sur des algorithmes et des critères d'identification différents. En effet, le protocole des deux procédures qui sont disponibles pour l'identification de levures à partir de colonies isolées par ces systèmes commercialisés dont résumées dans le schéma suivant (Figure 21) [1].

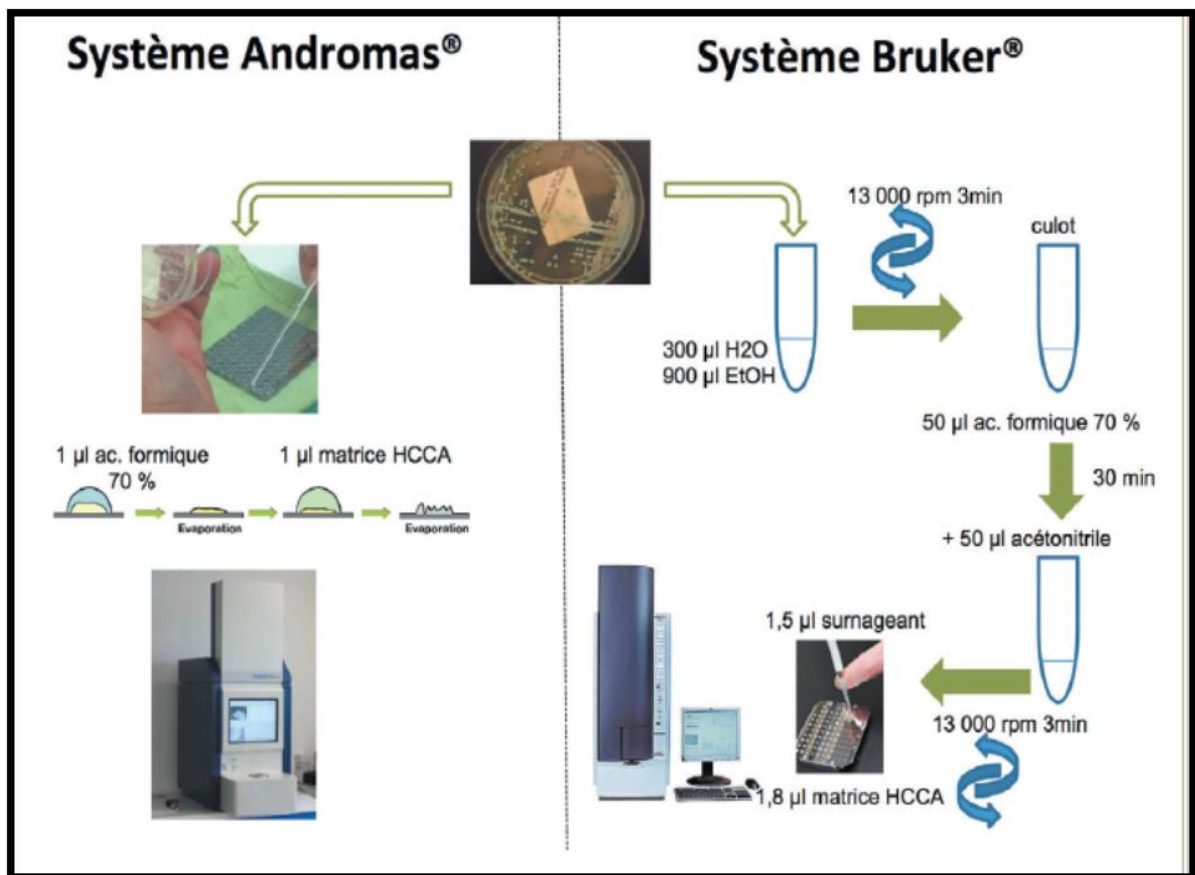


Figure 20: Représentation schématique des 2 procédures disponibles pour l'identification de levures à partir de colonies isolées par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF [1].

4.2. Identification à partir des hémocultures positives

MALDI TOF MS a été présentée comme une nouvelle méthode permettant de détecter et d'identifier directement les organismes présents dans les flacons de hémocultures, beaucoup plus rapidement que les systèmes conventionnels.

La procédure se rapproche de celle utilisée à partir des colonies, mais nécessite des étapes supplémentaires de concentration et de séparation des substances interférentes contenues dans le bouillon d'hémocultures (hématies, milieu de culture). Ainsi qu'un certain nombre de protocoles notamment une étape d'incubation avec un détergent doux tel que la saponine, le dodécylsulfate de sodium. Une aliquote de bouillon provenant de flacons positifs aux levures a été lavée centrifugée, et le culot a été mis en suspension dans 0.1% de tween 80 et incubé pendant 2 minutes après centrifugation, le culot a été soumis à l'extraction des protéines par la procédure d'acide formique. Après l'analyse par MALDI TOF MS les résultats obtenus sont comparés à une banque de donnée afin d'identifier l'espèce [1].

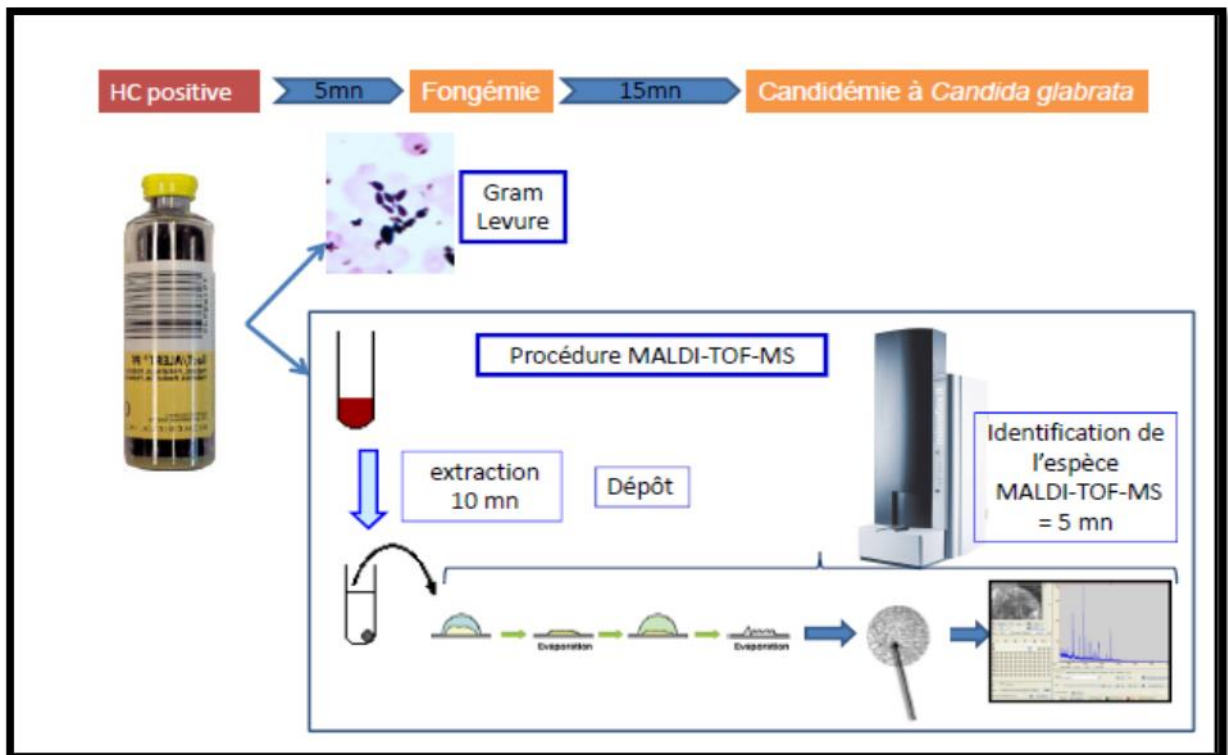


Figure 21: Schéma d'un protocole de l'identification des levures à partir d'hémocultures par MALDI -TOF MS [52].

4.3. Lecture des résultats

Les données acquises sont calculées et transcrites en spectre, en effet chaque pic correspond à un type de molécule. L'identification repose sur la mise en évidence d'un profil spectral qui va être différent d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre. Le spectre de la souche à tester est alors comparé aux pics spécifiques retenus dans la banque de données avec chacun un score d'identification. Selon Bruker, seuls les scores supérieurs ou égaux à 2 obtenus par extraction complètes sont interprétables pour le rendu d'un résultat d'identification présenté dans le tableau 3.

Tableau 3:Détermination des scores pour l'identification [53].

| Score d'identification | identification |
|------------------------------|---|
| <1.7 | Absence d'identification |
| 1.7 < score < 2 | Identification au genre ou plusieurs espèces |
| 2 | Identification de l'espèce |

5. Identification des champignons filamenteux par MALDI- TOF

L'identification des champignons filamenteux par MALDI-TOF est un champ d'innovation en pleine expansion. Bien que très peu d'études soient encore disponibles, les premiers travaux ont montré que la spectrométrie de masse MALDI-TOF permet d'obtenir une identification précise des espèces de champignons filamenteux, y compris au sein des complexes d'espèces. MALDI-TOF MS représente ainsi le premier outil permettant une identification rapide, précise et standardisée des champignons filamenteux. Les bases de données actuellement disponibles doivent être désormais évaluées dans les différents laboratoires de mycologie cliniques et complétées afin d'élargir le spectre des espèces identifiées [47]. Des études plus récentes ont montré une identification rapide et efficace des isolats cliniques de dermatophytes dans la routine de laboratoire par cette méthode.

5.1. Utilisation du MALDI-TOF pour l'identification des dermatophytes

Les performances de l'identification des dermatophytes par SM MALDI-TOF. Varient de 13,5% à 100% Selon les études. Cette hétérogénéité est en partie due à des disparités dans les étapes critiques de la Procédure utilisée par chacun des laboratoires. En effet, la précision de l'identification d'un Micro-organisme dépend de la qualité du spectre obtenu. Les conditions de culture, les méthodes D'extraction des protéines, les méthodes de dépôt de l'échantillon et la nature de la matrice sont autant de paramètres qui peuvent modifier la qualité des spectres obtenus. La base de données de spectres De référence et l'algorithme de comparaison du spectre à identifier sont également importants à Prendre en compte pour espérer une analyse fiable et reproductible [54].

1. Les milieux de culture et période d'incubation

Une identification fiable par SM MALDI-TOF devrait idéalement pouvoir être réalisée indépendamment des conditions de croissance du champignon. Plusieurs études ont démontré que ni le milieu de culture, ni le temps d'incubation de la culture, deux facteurs connus pour modifier les profils protéiques des micro-organismes n'influençaient significativement la performance de l'identification des dermatophytes par MALDI TOF MS [55].

2. L'extraction des protéines et la matrice

MALDI-TOF la méthode qui consiste à déposer une partie de la colonie sur la cible et à la recouvrir d'une goutte d'acide formique à 70%, permettant une lyse chimique de la paroi, est efficace pour les levures. Cependant, elle est difficile à appliquer pour la majorité des champignons filamenteux en raison de leur texture poudreuse et de la volatilité des spores. La méthode parfaitement standardisée de prétraitement et d'extraction à l'acide formique et l'acétonitrile qui a été optimisée et simplifiée est actuellement utilisée de manière courante pour les moisissures et les Dermatophytes. Brièvement, une partie de la colonie est mise en suspension dans un tube contenant de l'éthanol à 70° pour l'inactiver, une fois l'alcool éliminé, la colonie fongique est recouverte par un volume d'acide formique à 70% afin de réaliser une lyse chimique de la paroi, et après incubation de cinq minutes à température ambiante, un volume équivalent d'acétonitrile (dont le rôle est de précipiter les protéines) est ajouté à l'acide formique. Après centrifugation, 1,5 µL de surnageant est déposé sur la cible. Le dépôt est ensuite recouvert par une goutte de matrice. Une matrice est composée de petites molécules d'acide possédant un fort pouvoir d'absorption dans la gamme de longueur d'onde du laser. L'ionisation par laser assisté d'une matrice permet une séparation plus douce des molécules, et donc la détection des biomolécules fragiles comme les peptides, les protéines et les glycoprotéines. Ainsi, le choix de la matrice utilisée en SM MALDI-TOF influe sur la qualité des spectres obtenus en termes de nombre et d'intensité relative des pics. Les principales matrices utilisées sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide sinapinique (SA) et l'acide 2,5-hydrox benzoïque (DHB). Une solution équimolaire d'une de ces molécules est généralement préparée dans un mélange d'eau, de solvant organique (acétonitrile ou l'éthanol) et d'acide trifluoroacétique. Bien que les deux études fondatrices aient utilisé le DHB, le HCCA est désormais la matrice la plus employée et la plus recommandée pour l'identification des Dermatophytes, et des champignons microscopiques en général. [54].

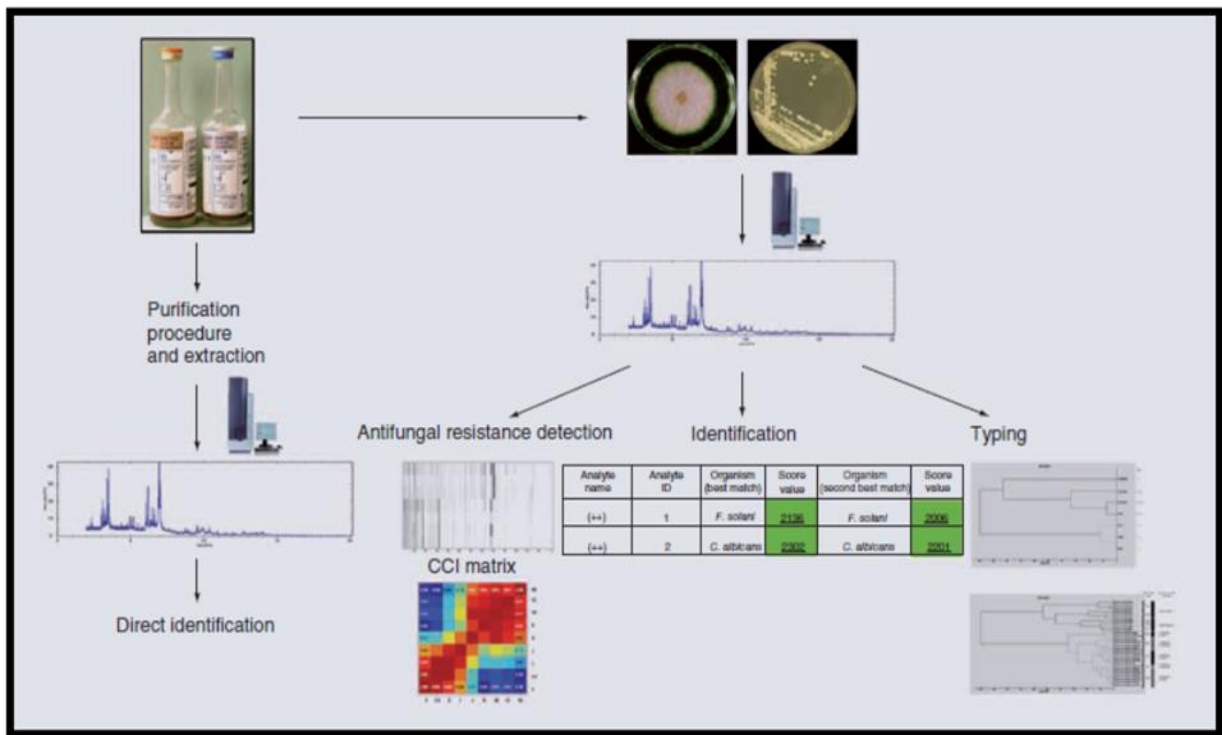


Figure 22: Le rôle de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans les diagnostics de Mycologie clinique [52].

➤ Impact au laboratoire

L'application, utilisée au Laboratoire de Mycologie du CHU, a clairement amélioré les performances de l'identification par MALDI TOF MS des dermatophytes en routine, grâce à l'enrichissement continu de la base de références notamment avec des spectres issus de cultures sur divers milieux et d'âge différents pour s'adapter à la plupart des pratiques de laboratoire. Pour distinguer les espèces moléculairement proches pour lesquelles des erreurs peuvent subsister, les biologistes prennent en compte leurs caractéristiques morphologiques, les données épidémiologiques et le contexte clinique. La SM MALDI-TOF constitue donc une avancée technique majeure et elle est aujourd'hui reconnue comme une méthode d'identification fiable, robuste, reproductible, économique et facile à mettre en œuvre. C'est une alternative pratique à l'identification des Dermatophytes par l'analyse de leur morphologie macroscopique et microscopique, qui est relativement fastidieuse et nécessite une expertise qui devient rare, ou par séquençage de l'ADN. Avec une base de données de spectres de référence de qualité, elle offre une précision comparable à celle du séquençage de l'ADN [54].

Chapitre 3

1 Article 1 : Évaluation comparative de la désorption-ionisation laser assistée par matrice et de l'ionisation par temps de vol (MALDI-TOF-MS) et des méthodes conventionnelles de levures cliniquement pertinentes

✚ Etude de Suneeta Meena *et al* publiés en 2021 [56].

Cette recherche a pour but de comparer les performances de la spectrométrie de masse MALDI-TOF et des méthodes conventionnelles dans l'identification des levures d'intérêt clinique.

1.1. Matériel et méthodes

Ils ont inclus toutes les *Candida* spp isolées à partir d'hémocultures positives signalées au cours de l'année 2019. Ensuite, Ces flacons d'hémocultures reçus ont été incubés dans le système automatisé d'hémoculture BacT ALERT 3D Microbial Identification system (Biomérieux, Boston, USA).

Une coloration de Gram a été effectuée sur tous les flacons, donnant un signal positif pour rechercher des cellules de levures bourgeonnantes. La gélose au dextrose de Sabouraud et la gélose au sang de mouton à 5% ont été utilisées pour la culture de ces isolats positifs. Ils ont été incubés à 37 °C pendant 48 heures.

Les espèces de *Candida* ont été isolées et identifiées avec des méthodes conventionnelles telles que le test du tube de germination, la gélose HiCHROM (Himedia, Mumbai, Inde) et la culture sur plaque Dalmau. Tous les isolats ont été inoculés sur de la gélose à la farine de maïs (CMA) (Himedia) et incubés dans les conditions nécessaires.

Enfin, tous les isolats ont été identifiés au microscope (grossissement 400×) selon leur formation de chlamydozoïdes, de blastozoïdes et/ou d'hyphes.

1.2. Analyses par MALDI -TOF MS

Une colonie de levure a été prélevée à l'aide d'une anse d'inoculation et a été dissoute dans de l'acide formique. 1µl de cette suspension a été déposé sur la plaque MALDI, laissé sécher, puis recouvert de la solution de matrice composée de 40g d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA ; Sigma-Aldrich, Buchs, Suisse) dans 33 % d'éthanol, 33 % d'eau dés ionisée, 33 % d'acétonitrile (ACN ; Sigma-Aldrich) et 3 % d'acide trifluoroacétique

(TFA). La matrice a ensuite été séchée à l'air ambiant et plaque MALDI a été chargée sur l'équipement.

Chaque plaque MALDI a été calibrée extérieurement en utilisant une souche de référence d'*Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, USA) qui a également été déposée simultanément sur les plaques à chaque fois.

1.3. Analyses des données

Les données ont été saisies dans le logiciel MS Excel, Microsoft, Inc. (Redmond, WA, USA), et les rapports de tests utilisant deux méthodes (conventionnelle vs. MALDI-TOF MS) ont été comparés.

La concordance statistique entre les résultats de deux tests sont été analysés à l'aide d'une analyse de fiabilité inter-juges (Kappa de Cohen) dans le logiciel SPSS version 24, IBM, Inc. Une valeur P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

1.4. Résultats

Plus de 114 *Candida spp* cliniques obtenues à partir d'hémocultures positives au cours d'une année ont été isolées et identifiées à l'aide des méthodes conventionnelles et des méthodes automatisées. Dans l'ensemble, la concordance entre les deux méthodes était importante (kappa=0,763) (tableau 1).

Toutes les espèces communes de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, et *C. krusei*) ont été correctement reconnues par les méthodes conventionnelles. Le milieu Hi-CHROM *Candida* a donné des meilleurs résultats après 48 heures d'incubation car la couleur des colonies était plus distinctive. Les souches de *C. parapsilosis* et de *C. glabrata* étaient indiscernables car la couleur ne pouvait pas être différenciée. En outre, l'identification des souches autres que les *Candida spp* communes était limitée. Les isolats ont également été identifiés sur la base de la morphologie de la culture sur plaque Dalmau.

Tableau 4: Comparaison entre la méthode conventionnelle et la méthode MALDI-TOF MS dans l'identification des *Candida* spp.

| N | Levures pathogènes | Total isolats | CMA | MALDI TOF | Cohen de kappa | 95% CI | Degré de concordance |
|--------------|----------------------------------|---------------|--------|-----------|----------------|-----------------|----------------------|
| 1 | <i>C. albicans</i> | 41 | 41 | 41 | 0.981 | (0.975,0.987) | Presque parfait |
| 2 | <i>C. tropicalis</i> | 32 | 31 | 31 | 1.000 | (0.994,1.006) | Presque parfait |
| 3 | <i>C. parapsilosis</i> | 13 | 11 | 13 | 0.865 | (0.859,0.871) | Presque parfait |
| 4 | <i>C. krusei</i> | 4 | 4 | 1 | 0.491 | (0.485,0.971) | modéré |
| 5 | <i>C. glabrata</i> | 4 | 4 | 4 | 0.791 | (0.785,0.797) | important |
| 6 | <i>C. lusitanae</i> | 5 | 3 | 3 | 0.653 | (0.647,0.659) | important |
| 7 | <i>C. auris</i> | 1 | 0 | 1 | -0.004 | (-0.010,0.001) | faible |
| 8 | <i>Wickerhamomyces anomalous</i> | 5 | 0 | 3 | -0.022 | (-0.028,-0.017) | faible |
| 9 | <i>C. guilliermondii</i> | 1 | 1 | 1 | 1.000 | (0.994,1.006) | Presque parfait |
| 10 | <i>Trichosporon asaahii</i> | 2 | 0 | 2 | -0.004 | (-0.010-0.001) | faible |
| 11 | <i>T. duhanse</i> | 1 | 0 | 1 | -0.004 | (-0.010,0.001) | faible |
| 12 | <i>T. ovoides</i> | 1 | 0 | 1 | -0.004 | (-0.010,0.001) | faible |
| 13 | <i>C. neoformans var grubii</i> | 1 | 0 | 1 | -0.004 | (-0.010-0.001) | faible |
| 14 | <i>C. neoformans var gattii</i> | 1 | 0 | 1 | -0.004 | (-0.010-0.001) | faible |
| 15 | <i>Kodamaea ohmeri</i> | 1 | 0 | 1 | -0.004 | (-0.010-0.001) | faible |
| 16 | <i>C. dubliensis</i> | 1 | 1 | 1 | 1.000 | (0.994,1.006) | Presque parfait |
| Total | | 114 | 96/114 | 106/114 | 0.763 | (0.759,0.765) | important |

1.5. Discussions

Les résultats montrent que *C. albicans* et *C. tropicalis* ont été identifiés avec précision au niveau de l'espèce par les deux méthodes (conventionnelle et MALDI- TOF MS). Cependant, il y a eu quelques divergences dans l'identification par les deux méthodes.

C. krusei chez deux patients a été identifié comme *Wickerhamomyces anomalous*. *Trichosporon* spp n'a pu être identifié que jusqu'au niveau du genre par les méthodes conventionnelles. En revanche, le MALDI-TOF MS a pu identifier jusqu'au niveau de l'espèce

en détectant des espèces rares telles que *T. dohaense*. Un isolat identifié comme étant *T. ovoides* par MALDI-TOF MS a été confirmé ultérieurement comme étant *C. krusei* par l'analyse de l'espaceur transcriptionnel interne (ITS).

L'identification par MALDI-TOF MS n'a pris que 15 minutes dans cette étude. Mais en moyenne, un minimum de 24-48 heures est nécessaire pour l'identification des champignons de type levure avec les méthodes phénotypiques. Ce délai peut même atteindre 72 heures pour le *Candida spp* ayant un test de tube germinatif négatif.

Dans cette étude, la majorité des isolats ont été identifiés correctement à la fois avec le système conventionnel et le système MALDI-TOF MS, Plus de 86 % des isolats ont été des *Candida spp* couramment rencontrés qui causent des infections sanguines... Il s'agissait de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata* et *C. krusei*. Par conséquent, la méthode MALDI TOF-MS a permis d'identifier avec succès tous les *Candida* testés et s'est avérée être une méthode rapide, fiable et économique pour identifier les *Candida*.

Elle a également permis d'identifier *Cryptococcus neoformans var. grubii* avec un score supérieur à 2,0, ce qui a aidé à la classification au niveau de l'espèce. Cependant, quatre isolats présentaient des divergences et ont été soumis au séquençage de la région ITS comme méthode de référence. Deux isolats de *C. krusei* ont été mal identifiés comme *Wickerhamomyces anomalous* par MALDI-TOF MS. De même, une autre souche de *C. krusei* a été mal identifiée comme étant *T. ovoides* par MALDI-TOF MS. Ainsi, l'identification correcte de *C. krusei* pourrait trouver un avantage en termes de survie lorsqu'un traitement antifongique précoce et approprié est administré, car l'identification des pathogènes fongiques au niveau de l'espèce est essentielle pour la prescription de la thérapie antifongique appropriée.

Des études de la période de 2010-2020 ont abordés des résultats similaires, en commençant du plus anciens au récents.

Selon **Steven et al (2010)** les résultats montrés indiquent que la méthode conventionnelle a reporté que la méthode conventionnelle n'est pas pu identifier toutes les espèces et aucuns isolats de levure n'a été identifié tort une autre espèce. De plus, la méthode était peu couteuse et prend beaucoup de temps et les résultats sont parfois imprécis. En revanche le MALDI-TOF MS identifié 192 isolées (90%) correctement au niveau de l'espèce donc elle a été donnée des résultats efficaces, précises et rapides (24 – 48 h) [57].

Lacroix et al (2014) ont utilisés les deux méthodes conventionnelles ainsi que celle de MALDI-TOF pour faire l'identification des espèces de candida. La méthode conventionnelle a permis d'identifier avec précision (96.5%), 44 isolats (3.5%) ont été mal identifiés et 3 isolats n'ont pas été identifiés (2 *C. albicans* et 1 *C. bracarensis*). Cependant MALDI TOF MS montre une l'identification précise des espèces de candida fournissant tous deux un taux élevé d'identification correcte au niveau des espèces de candida (98,2%) et un taux très faible des isolats qui ont mal identifiés. ALDI TOF a donné des résultats efficaces, plus précis, fiables et rentables et en plus rapides lors de l'identification des espèces de candida cliniquement pertinentes [58].

Sema et al (2015) montrent des résultats compatibles concernant l'identification des candidats par les deux méthodes. Notamment, les méthodes conventionnelles utilisées identifient candida correctement. MALDI TOF MS a été donnée des résultats rapides et fiables (93.7%) qui sont ensuite confirmées par séquençage des régions ITS de l'ADNr [59].

Selon une étude récente de **Chanika et al (2020)** montre des résultats presque similaires concernant l'utilisation des deux méthodes MALDI TOF MS et conventionnelle n'a pas une différence statiquement significative. Cependant, MALDI TOF MS a des performances plus efficaces dans l'identification des levures avec un taux de 100%, alors que la méthode conventionnelle le taux était 93.2%. Ainsi, le délai d'exécution est plus rapide que la méthode conventionnelle au moins 24 heures alors que pour la méthode conventionnelle était 48-72 heures [60].

L'utilisation de MALDI TOF MS peut être utiliser en laboratoires, tandis que la méthode conventionnelle peut entrainer des erreurs dans l'identification pour de nombreuses raisons essentiellement dues à la limitation des tests biochimiques, qui sont différemment utilisés dans chaque laboratoire, couvrent tous les isolements de levures qui voudraient identifier ou non et des résultats faux positifs ou faux négatifs doivent être suspectés. Cependant, il est nécessaire pour MALDI TOF MS d'ajuster le seuil de la gamme de score en fonction de la méthode d'identification afin d'augmenter le taux d'identification sans affecter la spécificité, la précision et la fiabilité de l'identification au niveau des espèces. , ceci permet les médecins de décider le traitement antifongique approprié [60].

La méthode de MALDI TOF MS a présenté des excellentes performances dans l'identification des levures d'intérêt clinique. Néanmoins, elle réduit le délai d'exécution par rapport aux méthodes conventionnelles mais aussi elle montre une grande précision et fiabilité

dans l'identification des levures au niveau des espèces ce qui donne l'occasion aux médecins de préciser le traitement anti-fongique approprié pour les patients des états graves et de la rendre disponible au niveau des laboratoires de mycologie clinique [60].

2 Article 2 : Identification d'isolats cliniques de dermatophytes obtenus en Iran par spectrométrie de masse à désorption laser assistée par matrice et ionisation à temps de vol.

✚ Etude de Mohammad Taghi Hedayati *et al* publié en 2019 [61].

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'utilité de la spectrométrie MALDI-TOF dans l'identification de routine d'isolats cliniques de dermatophytes obtenus dans diverses régions géographiques d'Iran.

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1 Isolats fongiques

Un total de 93 souches de dermatophytes a été isolées à partir d'échantillons cliniques (la peau, les ongles et les cheveux). Les isolats ont été cultivés sur de la gélose Sabouraud dextrose (SDA ; BD, Heidelberg, Allemagne) complétée par du chloramphénicol et du cycloheximide. Ils représentaient trois genres et cinq espèces, dont *T. Interdigitale* (n=44), *T. Rubrum* (n=40), *T. Tonsurans* (n=4), *Microsporum canis* (n=4) et *E. Floccosum* (n=1). Les isolats de dermatophytes ont été acquis dans deux villes d'Iran, à savoir Téhéran (n=79) et Sari (n=14). L'identité des souches cliniques au niveau de l'espèce a été confirmée par la PCR et le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP) de la région ITS de l'ADN ribosomal et le séquençage par PCR du gène de la calmoduline, comme décrit précédemment.

2.1.2 Spectrométrie de masse à temps de vol par désorption/ionisation laser assistée par matrice

L'analyse par MALDI-TOF MS a été réalisée au département de microbiologie de la faculté de médecine de l'université d'Akdeniz, Antalya, Turquie.

2.1.3 Préparation des échantillons

L'extraction des protéines à l'acide formique et à l'éthanol a été réalisée conformément aux recommandations de Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Allemagne). Brièvement, tous les

isolats ont été subcultures sur des plaques de gélose SDA et Mycosel (BD), puis incubés pendant 48 à 72 heures à 28°C. Dans l'étape suivante, les cellules physiologiquement actives ont été sélectionnées à partir de cultures fraîches pour être inoculées dans des tubes de 8 ml dans un milieu d'infusion cerveau-cœur. Les tubes ont été incubés sous agitation à 26°C jusqu'à ce qu'une croissance fongique suffisante soit observée. Les cultures ont ensuite été laissées au repos pendant environ 10 minutes.

Jusqu'à 1,5 ml de sédiment fongique filamenteux a été recueilli au fond du tube et transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml. Les échantillons ont été centrifugés pendant 2 minutes à pleine vitesse (15 682 g). Après élimination du surnageant, 1 ml d'eau désionisée a été ajouté au culot et l'échantillon a été mélangé par vortex. La centrifugation a été répétée, puis 300 μ l d'eau désionisée ont été ajoutés au culot, et l'échantillon a été mélangé soigneusement. Ensuite, 900 μ l d'éthanol à 100% ont été ajoutés au mélange.

Après la centrifugation de la suspension à 15, 682 g pendant 2 minutes, le surnageant a été éliminé, et l'éthanol a été complètement éliminé par une étape de centrifugation supplémentaire. Dans l'étape suivante, le culot a été séché à 26°C, 50 μ l d'acide formique ont été ajoutés, et l'échantillon a été soigneusement mélangé par vortex. Ensuite, un volume égal d'acétonitrile a été ajouté, et l'échantillon a été à nouveau centrifugé. Le surnageant (1 μ l) a été transféré sur une plaque cible MALDI (cible en acier rectifié MSP 96 BC ; Bruker Daltonics) et a été laissé sécher à 26°C. Enfin, l'échantillon a été recouvert de 1 μ l de solution saturée d'acide -cyano-4-hydroxycinnamique (matrice HCCA ; Bruker Daltonics). On a laissé la matrice et l'échantillon co-cristalliser à 26°C.

2.1.4 Acquisition des données

Les analyses ont été réalisées à l'aide de l'instrument Microflex de Bruker, du logiciel Biotyper (version 3.0) et de la base de données (version 3.1.66 ; Bruker Daltonics). L'identification microbienne a été réalisée en utilisant le mode linéaire à ions positifs dans une gamme de masse de 2000 à 20 000 Da. L'appareil était équipé d'un laser à azote de 60 Hz. Pour chaque spectre cumulé, 240 tirs laser ont été obtenus à différentes positions d'une tache d'échantillon.

Le standard de test bactérien (BTS ; Bruker Daltonics) a été appliqué pour l'étalonnage de masse conformément aux directives du fabricant et a montré un profil de peptides et de protéines alpha typique d'*Escherichia coli* DH5 avec des pics de protéines supplémentaires

(données non présentées). La solution BTS de Bruker (1 l) a été placée sur le point approprié de la plaque cible MALDI, recouverte de 1 l de matrice HCCA, et laissée sécher à 26°C. Chaque phase analytique comprenait un contrôle d'extraction négatif et une solution BTS.

Les données relatives à l'identification des espèces générées par le MALDI-TOF MS ont été classées en suivant les instructions du fabricant. À cet égard, les valeurs de log-score de $\geq 2,0$, 1,7-1,99, et $< 1,7$ ont indiqué l'identification de l'espèce, l'identification représentée au niveau du genre, et l'identification non fiable (NRI), respectivement.

2.2. Résultats

Spectrométrie de masse

Les 93 isolats cliniques de dermatophytes ont été soumis à une analyse MALDI-TOF MS pour une identification au niveau de l'espèce. Selon les scores spectraux recommandés par le fabricant, 38 (40,9 %) et 78 (83,9 %) isolats ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce et du genre, respectivement. Lorsque des scores spectraux plus faibles ont été pris en compte (valeur log-score de $\geq 1,7$ au lieu de $\geq 2,0$), l'identification des espèces a été considérablement améliorée, et 73 (78,5 %) isolats cliniques de dermatophytes ont été correctement identifiés. En outre, lorsqu'aucun score spectral seuil minimum n'a été fixé, 87 (93,5 %) isolats ont été correctement identifiés (tableau 1). Dans l'ensemble, 78 (83,9 %) souches ont été identifiées aux valeurs de log-score de 2,0 et de 1,7-1,99, tandis que 15 (16,1 %) isolats ont été classés comme NRI à la valeur de log-score $< 1,7$ selon les critères de Bruker Daltonics

Tableau 5 : Identification des dermatophytes par spectrométrie de masse à temps de vol avec désorption/ionisation laser assistée par matrice (Bruker) à l'aide des critères de score spectral recommandés par le fabricant et comparaison de cette méthode avec les méthodes d'identification moléculaire.

| Espèce | PCR (+) | Aperçu du MALDI-TOF (Identification au niveau des espèces) | | Nombre d'isolats identifiés aux valeurs de Bruker score spécifiées | | |
|------------------------|------------|---|---|--|-----------------|----------------|
| | | Accord | Discordant | ≥ 2 | 1.7-1.99 | < 1,7 |
| <i>T. interdigital</i> | 44 | 40 | 4 | 16 ^b | 19 | 6 |
| | | | <i>T. rubrum</i> (n=3) <i>T. tonsurans</i> (n=1) | | | |
| <i>T. rubrum</i> | 40 | 38 | 2 | 17 | 19 ^c | 5 ^c |
| | | | <i>T. interdigital</i> (n=1) <i>T. tonsurans</i> (n=1) | | | |
| <i>T. tonsurans</i> | 4 | 4 | - | 4 ^d | 1 ^e | 1 |
| <i>M.canis</i> | 4 | 4 | - | 1 | 1 | 2 |
| <i>E. floccosum</i> | 1 | 1 | - | 0 | 0 | 1 |
| Total | 93 | 87 | 6 | 38 | 40 | 15 |

^a Les données sont présentées en nombre de résultats. Le score fait référence au niveau d'identification des micro-organismes.

^b Une souche de *T. Rubrum* a été mal identifiée comme étant *T. Interdigitale* à la valeur de log-score de $\geq 2,0$.

^c Trois souches de *T. Interdigitale* ont été identifiées par erreur comme étant *T. Rubrum*.

^d Une souche de *T. Rubrum* a été identifiée par erreur comme étant *T. Tonsurans* à la valeur de log-score de $\geq 2,0$.

^e Une souche de *T. Interdigitale* a été identifiée par erreur comme étant *T. Tonsurans*.

MALDI-TOF : Désorption laser assistée par matrice/ionisation à temps de vol.

Sur les 44 isolats de *T. interdigitale*, 15 (34,1%) et 19 (43,2%) espèces ont été identifiées aux valeurs de log-score de $\geq 2,0$ et 1,7-1,99, respectivement. Dans le même temps, les isolats de *T. interdigitale* ont été identifiés comme étant *T. tonsurans* [13 (29,5%) et 15 (34,1%) espèces aux valeurs de log-score de $\geq 2,0$ et 1,7-1,99, respectivement]. D'autre part, les isolats de *T. tonsurans* ont été identifiés comme *T. tonsurans* [3 (75 %) isolats] ou *T. interdigitale* [2 (50 %) isolats] aux valeurs de log-score de $\geq 2,0$.

Parmi les représentants de trois genres et cinq espèces évalués dans la présente étude, le taux d'identification des isolats était au niveau le plus élevé pour les isolats de *T. rubrum* (identification correcte de 95% des isolats). *Epidermophyton floccosum* et *M. canis* ont été identifiés à des valeurs de log-score $< 1,7$. Étant donné que seul un faible nombre d'isolats d'*E. floccosum* et de *M. canis* était disponible, aucune autre conclusion ne peut être tirée quant à l'utilité du MALDI-TOF MS pour l'identification de ces deux espèces.

Mauvaises identifications et désaccords

Au total, 6 (6,5 %) souches de dermatophytes (4 souches de *T. interdigitale* et 2 souches de *T. rubrum*) n'ont pu être identifiées au niveau de l'espèce en utilisant le système MALDI-TOF MS Bruker (tableau 1). Plus particulièrement, 2 souches de *T. rubrum* ont été mal identifiées comme étant *T. interdigitale* (n=1) et *T. tonsurans* (n=1) aux valeurs de log-score de $\geq 2,0$. De plus, 4 souches de *T. interdigitale* ont été mal identifiées en tant que *T. rubrum* (n=3) et *T. tonsurans* (n=1) à la valeur de log-score de 1,7-1,99, sauf pour une souche de *T. rubrum*, dont l'identification a été faite à une valeur de log-score $< 1,7$.

2.3. Discussions

Jusqu'à présent, seules quelques études se sont penchées sur l'identification des dermatophytes en utilisant le MALDI-TOF MS. La présente étude est la première tentative ciblée sur l'analyse de 93 isolats de dermatophytes d'intérêt clinique obtenus en Iran en utilisant le système MALDI-TOF MS Bruker (version de base de données 3.1.66). L'utilisation des scores de coupure spectrale recommandés par le fabricant a entraîné une identification relativement faible au niveau du genre et de l'espèce. Cependant, l'efficacité de l'identification au niveau des espèces a été considérablement améliorée lorsque le seuil du score logarithmique a été réduit. Des études (de Karabiçak *et al.* Et Theel *et al.*) citées par les auteurs sont en accord avec les résultats ont montré que l'abaissement des scores spectraux augmente la précision de l'identification.

Les taux d'identification des dermatophytes rapportés par MALDI-TOF MS varient de 13,5 % à 100 % pour les dermatophytes. Cependant, l'efficacité de cette technique repose principalement sur la bibliothèque standard fournie par le fabricant ou sur une bibliothèque supplémentaire fournie par le fabricant. L'utilisation de cette bibliothèque standard est à l'origine des résultats variables rapportés, car l'expansion de la bibliothèque améliore l'identification précise des dermatophytes par MALDI-TOF MS. L'identification efficace des espèces de dermatophytes dépend du nombre et de la variété des isolats disponibles dans la bibliothèque spectrale de référence.

En raison des limitations majeures des bibliothèques spectrales de référence commerciales, des bibliothèques de référence internes ont été introduites dans la plupart des études précédentes. Par conséquent, une bibliothèque spectrale de référence commerciale devrait être développée pour englober un large éventail de souches différentes. Cependant, dans la présente étude, nous n'avons utilisé qu'une bibliothèque spectrale de référence commerciale. Il est probable qu'une bibliothèque interne permettrait une meilleure identification correcte des isolats de dermatophytes.

Dans la présente étude, 38 (95%) et 40 (90,9%) isolats de *T. rubrum* et *T. interdigitale*, respectivement, ont été correctement identifiés par MALDI-TOF MS. Dans les laboratoires de mycologie médicale, la différenciation entre *T. rubrum* et *T. interdigitale* sur la base des caractéristiques morphologiques est difficile.

Des études de la période de 2013-2020 ont abordés des résultats similaires, en commençant du plus anciens au récents.

Les résultats de **Coralie L'Ollivier et al (2013)** démontrent que (97,8 %) des isolats cliniques ont été correctement identifiés. Deux isolats de *Microsporum canis* ont donné des spectres non informatifs et un isolat de *M. audouinii* a été mal identifié. Les résultats sont obtenus en 3 à 6 jours. Alors qu'une identification conventionnelle nécessite notamment des milieux de cultures complémentaires demandent 2 à 3 semaines [62].

Sophie DE RESPINIS et al (2013), 135 de 141 (95,8 %) souches ont été correctement identifiées par le MALDI-TOF MS contre 128/141 (90,8 %) par morphologie [63].

Nilgün Karabiçak et al (2015), un total de 126 dermatophytes (115 isolats cliniques et 11 souches de référence supplémentaires) ont été testés. Les résultats ont été évalués en fonction des seuils recommandés par le fabricant et des seuils abaissés. La spectrométrie de

masse MALDI-TOF a permis d'identifier correctement 122 (96,8 %) et 113 (89,7 %) des isolats avec les scores abaissés et en utilisant la base de données complétée, respectivement [64].

Coralie L'Ollivier et Stéphane Ranque(2017), L'examen des dix études publiées entre 2008 et 2015 montre que la précision de l'identification basée sur le MALDI-TOF MS variait entre 13,5 et 100 % pour les dermatophytes. Cette variabilité était en partie due à des incohérences concernant des étapes critiques du processus de routine du laboratoire clinique [55].

Jin Shao et al (2020), un total de 113 dermatophytes. Soixante et onze isolats (série *T. rubrum*, *Benhamiae*, *T. mentagrophytes* et *T. schoenleinii*) ont été isolé et identifié. Les résultats démontrent que les taux d'identification correcte au niveau de l'espèce et du genre étaient de 90,1 % et 91,5 %, respectivement, en utilisant la bibliothèque Bruker Filamentous Fungi 1.0 combinée à la nouvelle base de données [65].

Des erreurs d'identification peuvent provenir d'un certain nombre de facteurs, notamment la ressemblance morphologique des deux espèces sur SDA, la texture similaire des colonies, la dispersion des micro-conidies et la production de pigments jaune-orange ou mélanoïdes par certains isolats. Etant donné que les bibliothèques spectrales commerciales actuellement disponibles ne sont pas idéales pour l'identification de routine des dermatophytes, le développement d'une bibliothèque de référence interne semble nécessaire pour augmenter la crédibilité de cette technique, ce qui justifie une étude plus approfondie.

Les études abordées dans ce chapitre confirment que la spectrométrie de masse MALDI TOF pourrait constituer une bonne alternative pour l'identification des levures et des dermatophytes d'intérêt clinique. En outre, cette méthode est très avantageuse grâce à ses excellentes performances, sa rapidité, le faible cout et surtout la fiabilité des résultats. Ce qui soutient l'utilité de MALDI TOF MS comme outil d'identification précise de routine dans les laboratoires cliniques.

Conclusion

Conclusion

Le MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight) est une technique basée sur la spectrométrie de masse, en plein essor en mycologie pour l'identification des espèces fongiques. Cette technique s'intéresse au protéome du microorganisme et elle permet d'obtenir un spectre protéique de la souche à identifier. Ce spectre est ensuite comparé à une base de données de spectres de référence, ce qui permet d'obtenir une correspondance avec une espèce associée à un score qui reflète la Fiabilité de l'identification. Les principaux avantages de cette technique sont sa rapidité et sa Facilité de mise en œuvre mais surtout, un temps d'analyse très court, de moins d'une heure. L'identification par MALDI-TOF présente d'autres avantages : elle ne prend que quelques minutes, est facile à mettre en œuvre et ne nécessite pas une formation longue des techniciens de laboratoire. De nombreux travaux montrent que cette technique présente de très bonnes performances d'identification par rapport aux techniques conventionnelles et permet même d'identifier des germes nécessitant sinon l'utilisation de techniques longues de biologie moléculaire.

L'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI TOF pour identification repose le plus souvent sur l'analyse d'une colonie obtenue à partir d'une culture et le résultat peut être connu en quelques minutes pour les levures et quelques heures à une semaine pour les dermatophytes, donc beaucoup plus rapidement que par les techniques classiques.

L'identification par spectrométrie de masse offre donc des perspectives séduisantes pour l'identification à partir des typages des souches et selon la sensibilité aux antifongiques, un grand nombre de souches qui devront encore être testées pour confirmer la fiabilité de la méthode et de pouvoir affirmer son équivalence avec les techniques de référence.

Références bibliographiques

1. Bougnoux M.E., Angebault C., Leto J., Bretti J.L. (2013). Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Revue francophone des laboratoires*, 450, 63-69.
2. Robert M.G., Cornet M., Hennebique A., Rasamoelina T., Caspar Y., Pondérand L., Bidart M., Durand H., Jasquet M., Garanaud C. and Maubon, D. (2021). MALDI-TOF MS in a medical mycology laboratory: On stage and backstage. *Microorganismes*, 9(6), 1283.
3. Anhalt J. P., Fenselau C. (1975). Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 47(2), 219-225.
4. Carbonnelle E., Nassif X. (2011). Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *médecine/sciences*, 27 (10), 882-888.
5. Posteraro B., De Carolis E., Vella A., Sanguinetti M. (2013). MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert review of proteomics*, 10 (2), 151- 164.
6. Patel R. (2019). A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *Journal of Fungi*, 5 (1), 4.
7. Chabasse D. (2013). Apport de l'examen direct dans les mycoses superficielles et profondes. *Journal de Biologie Médicale*, 1(4), 250-255.
8. Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B., et Penn P. 2002. Cahier de Formation Biologie médicale, Les moisissures d'intérêt médical, France : Bioforma. 160p.
9. Adelaïde N. (2008). Évaluation de l'aérocontamination fongique dans les environnements Intérieurs : Sciences agricoles. Thèse de Doctorat, Université Paris XII VAL DE MARNE, Français, p.189.
10. Gravensen S., Nielsen P.A., Iversen R., Nielsen K.F. (1999). Microfungal contamination of damp buildings-examples of risk constructions and risk materials. *Environ Health Perspect*, 107 Suppl 3 : 8 – 505
11. Halewyn M.A., Leclerc J.M., King M.N., Bélanger M., Legris M., Frenette Y. (2002). Les risques à la santé associés à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut national de santé publique du Québec. 159 p.
12. Botton B., Breton A., Fevre M., Ganthier S., Gux P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990) . Moisissures utiles et nuisibles importances industrielles. Deuxième Edition. Dunod. 512 p.

13. Nicklin J., Graeme-Cook k., Paget T., Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. *Berti*. Paris. pp.210-216.
14. Davet P., Rouxel F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. *Edition Quae*. France. 201p.
15. Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle. *Lavoisier*. Paris. Pp. 317-320.
16. Delphine M. (2012). Exposition aux moisissures en environnement intérieur : Méthodes de mesure et Impacts sur la santé. Thèse de Doctorat. Université Européenne de Bretagne. France.187p
17. Tabuc C. (2007). Flore Fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines : pathologie, mycologie, génétique et nutrition. Thèse de doctorat d'état .L'université de Bucarest, p.190
18. Christian R. (2013). Mycologie médicale. Lavoisier. Paris. 750 pages.
19. AFSSA. (2009). Risques liées à la présence de moisissures et levures dans les eaux conditionnées. 53p
20. Bouchara J. P., Pihet M., Gentile L., Chabasse D. (2010) .Cahier de formation biologie médicale, les levures et levures. France: *Bioforma*. 113p.
21. Denes E. (2005).Les infections fongiques systémiques. Actualités pharmaceutiques Hospitalieres. n° 3. Page 12.
22. Leleu G.,Aegerter P., Guidet ,B.(2002). Collège des utilisateurs de base de données en réanimation. Systemic candidacies in intensive care units: *a multicenter, matched-cohort study*. 17, 168-75.
23. Association Française des Enseignants de Parasitologie Mycologie Médicale, In : AFEP, ANOFEL, (2002).Parasitologie Mycologie, *Format Utile* ,299-378 p .
24. Nicolas J.C. (2003). Parasitoses et mycoses courantes de la peau et des phanères. Edition Elsevier, 146p.
25. Musy-Preault C. (1994). Les maladies de la peau: acné, eczéma, mycose, herpès, allergies solaires. Collection: santé. Albin Michel S.A. Paris. pages 69-81.
26. El Hassani N. (2013). Les mycoses : Etude d'une série répertoriée au service de parasitologie-mycologie médicale de l'hôpital Ibn Sina de Rabat sur une période de 5 ans (2007-2011) thèse de doctorat en pharmacie. Université Mohamed V -souissi- rabat. Maroc .199p.
27. Mokni M., Dupin N et Del Giudice P. (2014). Dermatologie infectieuse. Elsevier Masson SAS. 331 pages.

28. . Crickx B, Géniaux M, Bonerandi JJ. (2003) Infections cutanéomuqueuses à *Candida Albicans*. *Ann. Dermatol. Venereol*, 13: 3S53-3S58.
29. Piraccini B.M. Tosti A. White Superficial Onychomycosis. Epidemiological, Clinical, and Pathological Study of 79 patients. *Arch Dermatol* 2004; 140 :69601.
30. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie. (2014). Édition ANOFEL. 15 pages.
31. Chabasse D., Pihet M. (2014). Méthodes de diagnostic d'une onychomycose. *Journal de mycologie médicale*, 24(4), 269-278.
32. Rousseau A., Cornet M., Carnot F., Brasnu R., Bruneval P et Badoual C. (2005). Les mycoses en otorhinolaryngologie. *Ann Pathos*. Volume 25(2). Pages 104-16.
33. Chabasse D., Contet-Audonneau N., Bouchara J.P., et Basile A.M. 2008. Moisissures, dermatophytes, levures, du prélèvement au diagnostic. *Edition Biomérieux*. 186p.
34. Delattre C, Les Mycoses Superficielles, Conseils à l'Officine et Traitements. Thèse de doctorat. Lille. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques ; 2000.
35. Zagnoli A., Chevalier B et Sassolas B. (2005). Dermatophyties et dermatophytes. France. EMC-Pédiatrie 2. Pages 96-115.
36. Chabasse D., Bouchara J.P., Ludovic G, Sophie B., Bernard C et Pascale. P. (2004). Les dermatophytes. Cahier de formation: biologie médicale. N°31. France. 158 pages.
37. Item 87 – Infections cutaneo-muqueuses bactériennes et mycosiques. (2012). *Annales de dermatologie et de Vénérologie*, Volume 139, Issue 11, Pages A47-A51
38. Chabasse D, Contet-Audonneau N. (2003) .Mycoses superficielles à dermatophytes observées En France métropolitaine, In : Chabasse D, Caumes E. Parasitoses et mycoses courantes de La peau et des phanères, Guide MEDI-BIO, *Elsevier*, Paris : 77-96.
39. Chabasse D., Pihet M. (2008). Les dermatophytes: les difficultés du diagnostic mycologique. *Revue francophone des laboratoires*, 406, 29-38.
40. El Djouhari F.Z. (2008). Particularisme des champignons dits « émergents » en pathologie humaine. Thèse de doctorat Université Mohamed V, Rabat, Maroc, 177p.
41. Pihet M., Marot A. (2013). Diagnostic biologique des candidoses. *Revue francophone des laboratoires*, 450, 47-61

42. Chabasse D., Contet-Audonneau, N. (2011). Dermatophytes et dermatophytoses. EMC – Maladies Infectieuses, 8(2), 1–15.
[https://doi.org/10.1016/s1166-8598\(11\)56491-9](https://doi.org/10.1016/s1166-8598(11)56491-9)
43. Coulibaly O. (2014). Dermatophytoses en milieu scolaire au Mali .thèse de doctorat faculté de médecine parasitologie-mycologie Université Aix-Marseille, 151p.
44. Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie ANOFEL. (2016). Candidose. UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone, 15 p.
45. GROSS J.H. (2017). A textbook. In: Mass spectrometry. Heidelberg (Germany): Springer .518p.
46. Dortet L. (2017). MALDI – TOF MS et détection de la résistance aux antibiotiques. 8^{ème} séminaire des centres nationaux de références. Santé publique, France. [En ligne]. (Consulté 28 / 04 / 2022).
<https://fr.readkong.com/page/maldi-tof-ms-et-detection-de-la-resistance-aux-antibiotiques-9526420>
47. Quero L. (2018). Développement de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides. Université de Bretagne occidentale Brest, France, 169 p.
48. Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita, S., Yoshida Y .and Yoshida T. (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2(8), 151-153.
49. Patel R. (2019). A moldy application of MALDI: MALDI-ToF mass spectrometry for fungal identification. *Journal of Fungi*, 5 (1), 4.
50. Alanio A. (2013). La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique : avantages réels, écueils potentiels. *Journal des Anti-infectieux*, 15(2), 71-82.
51. Chatellier S. (2012). Caractérisation des bactéries, moisissures et levures par la spectrométrie de masse MALDI-TOF. *Biomerieux*, p02.
52. Bougnoux M.E. (2012), Intérêt des nouvelles techniques de diagnostic et d'identification pour la prise en charge des mycoses invasives. Unité Biologie et pathogénicité Fongiques, Institut Pasteur, Paris(France). (consulté le 25/05/2022 : <http://www.infectiologie.com/UserFiles/File/medias/JNI/JNI12/2012-JNI-identific>)

53. Sauget M. (2016). Identification de marqueurs épidémiologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF : application aux principales espèces bactériennes responsables d'infections nosocomiales (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté).141p.
54. Etcheverria C. (2020). Les dermatophytes : à propos des espèces isolées au CHU de Bordeaux (2014-2020) et actualités taxonomiques, diagnostiques et thérapeutiques. Thèse pour l'obtention de diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université Bordeaux, France, 91 p.
55. L'Ollivier C., Ranque S. (2017). MALDI-TOF-based dermatophytes identification. *Mycopathologia*, 182(1), 183-192.
56. Meena S., Mohanty A., Kaistha N., Sasirekha U., Meena J .(2021). Comparative Assessment of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) and Conventional Methods in the Identification of Clinically Relevant Yeasts. *Cureus*, 13(6).
57. Stevenson L. G., Drake, S. K., Shea, Y. R., Zelazny, A. M. And Murray P.R. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3482-3486.
58. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, Morio F, Desoubieux G, Chandenier J, Kauffmann-Lacroix C, Hennequin C, Guitard J, Nassif X, Bounoux M.E .(2014). Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4) ,153-158.
59. Keçeli S .A. , DüNDAR D., Tamer G .S (2016). Comparaison de la spectrométrie de masse à temps de vol par désorption/ionisation laser assistée par matrice Vitek par rapport aux méthodes conventionnelles d'identification de *Candida*. *Mycopathologie* , 181 (1), 67-73.
60. Maenchantrath C., Nutalai D., Samosornsuk W., Sakoonwatanyoo P. (2020). Identification of yeasts from clinical samples using MALDI-TOF MS. *Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine*, 64(4), 297-310.
61. Taghi Hedayati M., Ansari S., Ahmadi B ., Taghizadeh Armaki M., Tahereh., Shokohi ., Abastarbar M ., Halil Er ., Özhak B ., Ögünç D ., Ilkit M ., Seyedmojtaba . And seyedmousavi . (2019).Identification of clinical dermatophyte isolates obtained from Iran

by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Current Medical Mycology*, 5(2), p22.

62. L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonneau N, Hendrickx M, Fourquet P, Coulibaly O, Piarroux R, Ranque S. (2013). A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Medical mycology*, 51(7), 713-720.
63. De Respinis S., Tonolla M., Pranghofer S., Petrini L., Pettrini O., Bosshard P.. (2013). Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Sabouraudia*, 51 (5), 514-521.
64. Karabıçak N., Karatuna O., İlkit M., Akyar I. (2015). Evaluation of the Bruker matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system for the identification of clinically important dermatophyte species. *Mycopathologia*, 180(3), 165-171.
65. SHAO J., WAN Z., Li .R. Yu J. (2020). Species identification of dermatophytes isolated in China by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Mycoses*, 63(12), 1352-1361.

Image à partir du web

Ufficio Comunicazione, Azienda Ospedaliera S.S., Antonio E., Biagio E., Cesare Arrigo.,
Alessandria and Biblioteca Biomedica Centro di Documentazione (13Décembre2019)

[Image] IN: wikipédia: Aspergillus fumigatus. Disponible sur :
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Antonio_e_Biagio_e_Cesare_Arrigo_Aspergillus_fumigatus_01.jpg (Consulté le 31/05/2022).

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : DEKKAR KENZA IKRAM,
HARIZI IMENE
CHERAK RAYENNE

La spectrométrie de masse MALDI TOF et ses applications dans la mycologie clinique

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en mycologie et biotechnologie fongique

Le diagnostic des mycoses comporte une série des étapes au laboratoire, le prélèvement, l'examen direct, la culture et l'identification de l'agent responsable qui peut être une levure ou un champignon filamenteux. Les méthodes classiques d'identification reposent sur des tests phénotypiques et biochimiques, mais ces derniers prennent plus de temps et la possibilité d'avoir des résultats erronés est élevée. Cependant, le diagnostic doit aboutir à des résultats fiables, à cause de ça des nouvelles techniques moléculaires ont apparues. La spectrométrie de masse MALDI TOF est une méthode alternative des méthodes classiques, cet outil a progressivement trouvé son application en mycologie clinique. Son principe repose sur l'ionisation du mélange échantillon/matrice déposé sur la plaque MALDI par des tirs de laser qui conduit à la génération des ions qui vont ensuite séparer selon leur rapport masse/charge au niveau du l'analyseur TOF, pour atteindre le détecteur qui permet l'obtention des spectres protéiques qui vont ensuite comparer à des bases de données et d'obtenir une correspondance avec une espèce et associée à un score qui reflète la fiabilité de l'identification. L'identification des levures d'intérêt clinique à partir des protocoles simples, soit à partir une colonie ou hémoculture positive en quelques minutes, mais les champignons filamenteux notamment les dermatophytes nécessite une étape d'extraction avant l'analyse, cette divergence est principalement due à la différence morphologique entre les deux. Des études ont été réalisées sur l'intérêt du MALDI TOF MS dans l'identification des levures et des champignons filamenteux d'intérêt clinique ont prouvé sa fiabilité et sa rapidité.

Mots-clés: MALDI TOF MS, mycologie clinique, identification, levures, dermatophytes...

Laboratoires de recherche: (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur: Mme. MEZIANI Meriem (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1: Mme. BENKHOUL Malika (MCA - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2: Mme. DJAMA Ouahiba (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).