

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université des Frères Mentouri - Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**

N° d'Ordre : 12/ D3C/ 2017  
N° de Série : 01/ Micro/ 2017



*Thèse*

En vue de l'obtention du diplôme de

**Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle**

**Option : Bioprocédés et Biotechnologie, Applications Mycologiques**

**Evaluation, *in vitro*, du potentiel du chitosane pour la  
lutte contre les champignons responsables des  
Onychomycoses à Constantine**

Présentée par :

**HAFIRASSOU Anissa Zohra**

**Soutenue : Le 13/ 03/ 2017**

***Devant le jury :***

Président :	M <sup>f</sup> DEHIMAT L.	Prof. Université des Frères Mentouri - Constantine
Directrice de thèse :	M <sup>me</sup> MIHOUBI I.	Prof. Université des Frères Mentouri - Constantine
Co-directeur:	M <sup>f</sup> PICOT S.	Prof. Université Claude -Bernard, Lyon1
Examineurs :	M <sup>f</sup> GUECHI A.	Prof. Université Ferhat Abbas-Sétif
	M <sup>f</sup> HAMIDECHI A.	Prof. Université des Frères Mentouri - Constantine

**Année universitaire : 2016-2017**

## *Remerciements*

*Avant tout, je commencerai par remercier Dieu, le Tout Puissant, de m'avoir aidée et donné la volonté et la patience à mener à bien ce travail.*

*Je ne remercierai jamais assez : Madame I. Mihoubi, Professeur à l'Université des Frères Mentouri de Constantine et directrice de ma thèse qu'elle a dirigée avec rigueur et beaucoup d'enthousiasme. Puisse-t-elle trouver, à travers ces lignes, l'expression de mon profond respect et ma parfaite considération.*

*A Monsieur S. Picot, Professeur à l'Université Claude Berard Lyon 1, Lyon, mon co-directeur de thèse, qui a amplement participé à la réalisation et au bon déroulement de ce travail. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire où j'ai beaucoup appris, échangé et tissé des relations avec toute l'équipe.*

*A Monsieur T. Moulahem, Professeur Médecin chef de service du Laboratoire de Mycologie et Parasitologie du CHU Benbadis de Constantine, pour m'avoir accueillie et intégrée au sein de son équipe que je remercie également.*

*Un grand MERCI pour Mme M.J Buitrago, Docteur à l'institut Carlos III, qui a suivi avec diligence, art, savoir-faire et de très près la partie moléculaire (PCR) de mon travail.*

*A Monsieur L. Dehimat, Professeur et Doyen de notre faculté, qui, malgré ses lourdes responsabilités, m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il trouve l'expression de mon profond respect et de ma parfaite considération.*

*Un grand MERCI aux Professeurs A. Guechi et A. Hamidchi qui ont accepté de sacrifier de leur temps pour juger ce travail. Qu'ils me permettent de leur exprimer mes sentiments les plus respectueux.*

*Je n'oublierai pas de remercier Mr Ayachi A.A.H qui m'a beaucoup aidée dans la réalisation de la partie chimique de mon travail de recherche.*

*J'adresse également mes remerciements à Mr D.Khelifi et à Madame A. Mechakra Professeurs à l'université des Frères Mentouri de Constantine de m'avoir ouvert les portes de leurs laboratoires.*

*Je témoigne toute ma gratitude à Mr le Professeur Kacem Chaouche, qui a suivi de près notre formation universitaire.*

## *Dédicace*

*A la mémoire de ma grand-mère, amie et conseillère, symbole de sagesse, patience et de persévérance, qui m'a été d'un très grand soutien.*

*Je dédie ce travail aux êtres les plus chers au monde :*

*Mes parents*

*Que DIEU le tout Puissant les protège, les bénisse et leur accorde une longue vie.*

*A ma chère et unique sœur Amina et à sa famille*

*A mon frère Mohamed Lamine et à sa famille*

*A mes frères Ahmed Yacine et Wail*

*A mon fiancé Ahmed Abdelhakim et à ma belle-famille*

*A tous mes oncles et toutes mes tantes*

*Aux cousins et cousines*

*A toutes mes amies et collègues*

## **Table des matières**

Liste des tableaux.....	i
Liste des figures .....	ii
Liste des abréviations.....	iv
Résumés.....	vi

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

### **Revue de la littérature**

<b>CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'ONGLE ET LES ONYCHOMYCOSES</b> .....	<b>4</b>
1. Structure et anatomie de l'ongle sain.....	4
2. Epidémiologie et étiologie des onychomycoses.....	5
3. Facteurs favorisant les onychomycoses.....	6
3.1. Facteurs individuels.....	6
3.2. Facteurs environnementaux et/ ou comportementaux.....	7
4. Différents types d'onychomycoses.....	8
4.1. Onychomycoses à dermatophytes.....	9
4.1.1. Description.....	9
4.1.2. Classification.....	9
4.1.3. Origines de la contamination par les dermatophytes.....	10
4.1.4. Espèces incriminées.....	11
4.1.5. Mode de vie.....	12
4.2. Onychomycoses à <i>Candida</i> spp.....	13
4.2.1. Description.....	13
4.2.2. Classification.....	13
4.2.3. Origine de la contamination.....	14
4.2.4. Epidémiologie.....	14
4.2.5. Espèces incriminées.....	14
4.2.6. Mode de vie.....	15
4.3. Onychomycoses à moisissures.....	15
4.3.1. Description.....	15
4.3.2. Classification.....	16
4.3.3. Origine.....	16
4.3.4. Espèces incriminées.....	17
4.3.5. Epidémiologie.....	17
5. Démarche diagnostique et traitement.....	18
5.1. Mode de végétation au niveau de l'ongle.....	18
5.1.1. Pénétration fongique sous-unguéale.....	19
5.1.1.1. Variété sous unguéale disto-latérale.....	19
5.1.1.2. Variété sous unguéale proximale.....	19
5.1.2. Pénétration fongique superficielle.....	20
5.1.3. Onychomycoses « endonyx ».....	21
5.1.4. Onychomycodystrophie totale.....	21
5.2. Diagnostic biologique.....	22
5.2.1. Prélèvement.....	22
5.2.2. Examen direct.....	22
5.2.3. Culture mycologique.....	23
5.3. Traitement.....	24
5.3.1. Traitements systémiques.....	24
5.3.2. Traitements locaux.....	26

<b>CHAPITRE II : LE CHITOSANE</b> .....	28
1. La chitine.....	28
2. Le chitosane.....	29
3. Comportement du chitosane en milieu acide.....	30
4. Propriétés physico-chimiques du chitosane.....	30
4.1. Le Degré de désacétylation (DD).....	30
4.2. La Masse moléculaire (Poids moléculaire).....	31
5. Sources du chitosane.....	31
5.1. Extraction à partir des crustacés.....	31
5.2. Extraction à partir de la paroi cellulaire des champignons.....	32
6. Méthodes de caractérisation du chitosane.....	33
6.1. Le degré de désacétylation.....	33
6.2. Le poids moléculaire (PM).....	34
7. Principales applications du chitosane.....	35
7.1. Domaine biomédical et pharmaceutique.....	35
7.2. Application alimentaire.....	36
7.3. Traitement des eaux usées.....	36
7.4. Domaine agricole.....	37
7.5. Nouvelles applications.....	37
 <b>CHAPITRE III : LES ZYGOMYCETES ET LE CHITOSANE</b> .....	 38
1. Généralités sur les zygomycètes.....	38
2. L'espèce <i>Rhizopus oryzae</i> .....	39
2.1. Taxonomie.....	40
2.2. Cycle de vie.....	40
2.3. Morphologie.....	41
3. Métabolisme du chitosane au niveau de la paroi des zygomycètes.....	42

## *Etude expérimentale*

<b>PARTIE I : LES ONYCHOMYCOSES</b> .....	44
1. Patients.....	44
2. Méthodes.....	44
2.1. Prélèvement.....	44
2.2. Diagnostic classique à partir des fragments d'ongles.....	45
2.2.1. Examen direct.....	45
2.2.2. Cultures conventionnelles.....	46
2.2.3. Purification et conservation des souches isolées.....	46
2.2.4. Méthodes d'identification.....	46
2.2.4.1. Identification macroscopique.....	47
2.2.4.2. Identification microscopique.....	47
2.2.4.3. Identification moléculaire des isolats.....	48
2.3. Diagnostic 2 : Détection et identification des espèces responsables d'onychomycoses à partir de la poudre d'ongle.....	50
2.3.1. Extraction d'ADN.....	50
2.3.2. Amplification par RT-PCR.....	50
2.3.2.1. RT-PCR panfongique.....	50
2.3.2.2. RT-PCR pandermatophytes.....	51
2.3.2.3. MX PCR <i>Candida</i> spp.....	52

2.3.2.4. MX PCR <i>Aspergillus</i> spp.....	52
2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	53
<b>PARTIE II : LE CHITOSANE PRODUIT PAR RHIZOPUS ORYZAE</b> .....	54
1. Isolement de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	54
2. Identification de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	54
3. Production du chitosane.....	55
3.1. Fermentation.....	55
3.2. Extraction du chitosane.....	55
3.2.1. Traitement alcalin.....	56
3.2.2. Traitement acide.....	57
4. Caractérisation du chitosane.....	58
4.1. Analyse MEB.....	58
4.2. Analyse par IR.....	58
4.3. Calcul du DD par titration.....	59
<b>PARTIE III : TESTS « in vitro » DU CHITOSANE EXTRAIT, SUR LES ESPECES DE DERMATOPHYTES RESPONSABLES DES ONYCHOMYCOSES</b> .....	60
1. Méthode de micro dilution sur milieu liquide.....	60
1.1. Préparation de l'inoculum.....	60
1.2. Préparation des agents antifongiques.....	61
1.3. Préparation des dilutions (gamme de concentration).....	61
1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	63
2. Méthode de diffusion sur gélose.....	63
3. Analyse statistique.....	63
<b>Résultats et discussion</b>	
<b>PARTIE I : LES ONYCHOMYCOSES</b> .....	64
1. Patients.....	64
2. Prélèvements.....	65
2.1. Résultats du diagnostic classique.....	65
2.1.1. Examen direct.....	65
2.1.2. Cultures.....	67
2.1.3. Identification classique des dermatophytes isolés.....	70
2.1.3.1. <i>Trichophyton rubrum</i> .....	70
2.1.3.2. <i>Trichophyton rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> .....	71
2.1.4. Identification moléculaire.....	72
2.2. Résultats du diagnostic moléculaire des onychomycoses à partir de la poudre d'ongle.....	74
3. Discussion.....	82
<b>PARTIE II : LE CHITOSANE PRODUIT PAR RHIZOPUS ORYZAE</b> .....	88
1. Isolement et identification macro/microscopique de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	88
2. Identification moléculaire de <i>Rhizopus oryzae</i> .....	88
3. Fermentation.....	89
4. Extraction.....	90
5. Identification et caractérisation du chitosane.....	90
5.1. Analyse par microscopie électronique à balayage MEB.....	90
5.2. Analyse par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR).....	91

5.2. Calcul du degré de désacétylation DD par titration.....	93
6. Discussion.....	94

***PARTIE III : EVALUATION IN VITRO DE L'ACTIVITE DU CHITOSANE FONGIQUE  
SUR LES ESPECES DE DERMATOPHYTES ISOLEES***.....98

1. Méthode de microdilution.....	98
----------------------------------	----

2. Méthode de diffusion sur gélose.....	100
---	-----

3. Discussion.....	104
--------------------	-----

<b><i>Conclusion Générale</i></b> .....	107
---	-----

<b><i>Références Bibliographiques</i></b> .....	109
---	-----

***Annexes***

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Les principaux dermatophytes et leur habitat d'origine préférentiel.....	11
<b>Tableau 2:</b> Principales espèces fongiques isolées d'un ongle pathologique selon la localisation et l'origine.....	12
<b>Tableau 3:</b> Comparaison entre l'extraction à partir des crustacées et à partir des champignons.....	33
<b>Tableau 4:</b> Application du chitosane fongique.....	38
<b>Tableau 5:</b> Préparation du Mix PCR .....	48
<b>Tableau 6:</b> Préparation du Mix PCR panfongique.....	51
<b>Tableau 7:</b> Préparation du Mix PCR pandermatophyte.....	51
<b>Tableau 8:</b> Préparation du Mix pour la MXPCR.....	53
<b>Tableau 9:</b> Nombre et types de lésions observées.....	64
<b>Tableau 10:</b> Résultats de l'examen direct.....	66
<b>Tableau 11:</b> Résultats des cultures des prélèvements d'ongles infectés.....	67
<b>Tableau 12:</b> Espèces fongiques isolées à partir des échantillons d'ongles.....	68
<b>Tableau 13:</b> Résultats obtenus en examens directs et en cultures.....	69
<b>Tableau 14:</b> Affiliation phylogénétique des cinq isolats (paires d'amorces universelles) .....	73
<b>Tableau 15:</b> Résultats des examens directs, cultures et des PCR des échantillons d'ongles analysés..	74
<b>Tableau 16:</b> Résultats comparatifs entre les cultures et les PCR.....	79
<b>Tableau 17:</b> Détection par PCR spécifique de <i>Candidasp.</i> et <i>Aspergillus</i> spp. à partir des Echantillons négatifs en PCR panfongique.....	80
<b>Tableau 18:</b> Résultats des 15 prélèvements d'ongles sains testés par les 4 techniques moléculaires..	81
<b>Tableau 19:</b> CMI obtenues vis-à-vis de <i>T.rubrum</i> , <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> et <i>T.interdigitale</i> .....	98

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Coupe anatomique d'un ongle sain .....	4
<b>Figure 2:</b> Schéma de la repousse de l'ongle du doigt et du gros orteil.....	5
<b>Figure 3:</b> Différentes voies de pénétration d'un champignon au niveau de l'ongle.....	18
<b>Figure 4:</b> Onychomycose sous-unguéale disto-latérale (DLSO) .....	19
<b>Figure 5:</b> Onychomycose sous-unguéale proximale (OSP), OSP avec paronychie.....	20
<b>Figure 6:</b> Onychomycose superficielle (OS), OS émergeant sous la cuticule.....	20
<b>Figure 7:</b> Onychomycose endonyx (OE).....	21
<b>Figure 8:</b> Onychodystrophie totale.....	22
<b>Figure 9:</b> Structure de la chitine et du chitosane produit par desacétylation.....	28
<b>Figure 10:</b> Illustration de la versatilité du chitosane. À pH acide (pH < 6), groupements amine protonés.....	30
<b>Figure 11:</b> Cycle de vie des Zygomycetes.....	40
<b>Figure 12:</b> <i>Rhizopusoryzae</i> .....	41
<b>Figure 13 :</b> La formation de chitosane au niveau de la paroi cellulaire des zygomycètes.....	42
<b>Figure 14:</b> Schéma récapitulatif des différentes techniques utilisées pour le diagnostic des onychomycoses.....	45
<b>Figure 15:</b> Electrophorèse sur gel d'agarose.....	53
<b>Figure 16:</b> Photo représentant une banane atteinte par « <i>Rhizopusoryzae</i> ».....	54
<b>Figure 17:</b> Schéma récapitulatif des étapes d'extraction du chitosane à partir de la paroi des champignons.....	56
<b>Figure 18:</b> Précipitation par centrifugation de l'AIM après traitement alcalin.....	57
<b>Figure 19:</b> Montage à reflux pour le traitement acide de l'AIM .....	57
<b>Figure 20:</b> (A) : Procédé de filtration sur Wathman N° 40, (B) : Comptage cellulaire sous microscope optique.....	61
<b>Figure 21:</b> Schéma d'une plaque 96 puits (préparation des dilutions). .....	62
<b>Figure 22:</b> Exemples d'onychomycoses observées lors des prélèvements.....	65
<b>Figure 23:</b> Examen direct montrant des filaments mycéliens dans la poudre d'ongles malades.....	66
<b>Figure 24:</b> Schéma récapitulatif, présentant les résultats des cultures.....	67
<b>Figure 25:</b> Espèces isolées à partir des onychomycoses .....	69
<b>Figure 26:</b> <i>Trichophyton. Rubrum</i> .....	70
<b>Figure 27:</b> <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> .....	71
<b>Figure 28:</b> <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> ensemencé sur milieu solide urée de Christensen après 6 jours d'incubation à 27°C comparé à un témoin négatif.....	72

<b>Figure 29:</b> Arbre phylogénétique de <i>T.rubrum</i> , basé sur l'alignement des séquences ITS de l'ADNr.....	73
<b>Figure 30:</b> Exemple de quelques résultats positifs en RT-PCR en présence fongique.....	77
<b>Figure 31:</b> Exemple de quelques résultats de RT-PCR en présence de dermatophytes .....	79
<b>Figure 32:</b> Exemple de courbes d'amplification des échantillons d'ongles positifs à <i>C.parapsilosis</i> à la longueur d'onde 523-568 nm.....	81
<b>Figure 33:</b> <i>Rhizopusoryzae</i> .....	88
<b>Figure 34:</b> Arbre phylogénétique de <i>Rhizopusoryzae</i> , basé sur l'alignement des séquences ITS de l'ADNr.....	89
<b>Figure 35:</b> <i>Rhizopusoryzae</i> après 3 jours d'incubation à 30°C à 180 rpm.....	89
<b>Figure 36:</b> Extraction du chitosane.....	90
<b>Figure 37:</b> Image de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des deux chitosane.....	91
<b>Figure 38:</b> Spectre IR des chitosane.. ..	92
<b>Figure 39:</b> Détermination du degré d'acétylation (DA) par titration du chitosane dissout dans une solution à 0.1M d'acide hydrochlorique (HCL) par 0.1M d'hydroxyde de sodium (NaOH).....	94
<b>Figure 40:</b> CMI par microdilution (CLSI) vis-à-vis de (A) : <i>Trichophyton rubrum</i> , (B): <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> et (C): <i>T.interdigitale</i> .....	99
<b>Figure 41:</b> Action du Fluconazole (Fl), du chitosane commercial (CC) et du Chitosane extrait (CE) sur <i>T.rubrum</i> .....	100
<b>Figure 42:</b> Diamètres des zones d'inhibitions de <i>T.rubrum</i> en fonction des différentes concentrations des agents antifongiques.....	101
<b>Figure 43:</b> Effet du chitosane commercial et du Chitosane extrait sur <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> .....	102
<b>Figure 44:</b> Diamètres de zones d'inhibitions de <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i> en fonction des différentes concentrations du chitosane commercial et synthétisé .....	102
<b>Figure 45:</b> Effet du chitosane commercial et du Chitosane synthétisé sur <i>T.interdigitale</i> .....	103
<b>Figure 46:</b> Diamètres de zones d'inhibitions de <i>T.interdigitale</i> en fonction des différentes concentrations du chitosane commercial et extrait .....	104

## *Liste des abréviations*

AAIM: Acid Alkali Insoluble Materials.  
AND: Acidedésoxyribonucléique.  
AIM: Alkali Insoluble Materials.  
ATE: Tampon d'Elution de l'AND.  
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.  
CHU: Centre Hospital-Universitaire.  
CMI: Concentration Minimale Inhibitrice.  
CPG: Chromatographie par Perméation de Gel.  
DA: Degré d'acétylation.  
DD: Degré de desacétylation.  
DLSO: Disto-lateral Subungual Onychomycosis.  
dNTP: Mélange des quatre désoxyribonucléotides.  
ED: Examen Direct.  
EDTA: Éthylène Diamine Tétra-Acétique.  
EO: Endonyx Onychomycosis.  
FTIR: Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier.  
FDA: Food and Drug Administration  
GlcN: Glucosamine.  
GlcNAc: N-Acétylglucosamine.  
HPCH: Hydroxypropyl-Chitosane.  
ID: Identification.  
IR: Infra-Rouge.  
ITS: Internal transcribed spacer.  
KBr: Bromure de Potassium.  
kDa: Kilo Dalton.KOH : Hydroxyde de potassium(la Potasse).  
CDA: Chitine- Déacétylase.  
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.  
M38-A: Microdilution des filamenteux.  
MEB: Microscopie Electronique à Balayage.  
MEGA: MolecularEvolutionaryGeneticsAnalysis.

MM: Masse Moléculaire.  
MXPCR: Multiplex PCR.  
NCBI: National Center for Biotechnology Information.  
OS: Onychomycose Superficielle.  
OSP: Onychomycose Sous-unguéale Proximale.  
PCR: Polymerase Chain Reaction.  
PCR –TR: Polymerase Chain Reaction en Temps Réel.  
PDA: Potatoes Dextrose Agar.  
pKa: Equilibre acido-basique.  
RAT: Rice Agar Tween.  
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire.  
SEM: Erreur Standard de la Moyenne.  
SMF: Submerged fermentation.  
SSF: Solid State Fermentation.  
UDP: Uridine Diphosphate.  
UV: Ultra-Violet.  
VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine (SIDA).  
YPD: Yeast Peptone Dextrose.

## Abstract

Onychomycosis are frequent, contagious, benign and chronic nail fungal infections. Dermatophytes are considered as the most implicated pathogens but molds and yeasts can also be colonizers or contaminants. Onychomycosis are often observed at an advanced age and an evolved stage, making their treatment long and difficult because of the lack of less or non-toxic molecules used at therapeutic doses.

In this context, the main objective of the study was to produce, from *Rhizopusoryzae* strain, an FDA-approved biopolymer: the chitosan. And evaluate its antifungal activity on the species responsible for onychomycosis in Constantine.

298 samples of infected nails were collected at the laboratory of Mycology and Parasitology of CHUC and analyzed using conventional diagnosis (direct observation and culture) and molecular RT-PCR methods (panfungal-PCR, dermatophyte-PCR).

The results obtained showed that *T.rubrum* was the predominant species. However, a variety *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* was identified for the first time in Algeria. As for the synthesized chitosan, its characterization by FTIR and titration revealed a good quality with a slightly higher degree of deacetylation than that of commercial chitosan. Furthermore, demonstration of antifungal activity on the most incriminated species in onychomycoses revealed a significant effect with MICs of 2.5, 1.25 and 0.62 mg / ml on *T. rubrum*, *T.rubrum* var. *raubitschekii* and *T.interdigitale*, respectively. These results could open the way to new therapeutic perspectives, not only against dermatophytes but probably against other fungal agents.

**Key-words:** Onychomycosis- Chitosan- PCR- Dermatophytes- Antifungal Activity.

## الملخص

إن الأونيكوميكوز عبارة عن أمراض فطرية مزمنة ومعدية تمس الأظافر التي تتسبب أساسا بوجود فطريات جلدية (الديرماتوفيت) بالإضافة إلى الخمائر والاعفان، يلاحظ الأونيكوميكوز غالبا في مرحلة متقدمة عند كبار السن مما يتطلب لعلاجه استخدام عقاقير لفترات طويلة بالإضافة إلى أدوية لأمراض مزمنة أخرى تهدد صحة الإنسان. ولهذا قمنا في هذه الدراسة باستخلاص مادة الكيتوزان من سلالة فطرية *Rhizopusoryzae* واستخدامه كمضاد ومثبط للفطريات المسببة للأونيكوميكوز بقسنطينة. أخذنا 298 عينة من أظافر أشخاص مشبوهة بهذا المرض وقمنا بتشخيصها بطرق تقليدية (فحص مباشر وزرع) وبطرق التحليل الجزيئي (PCR). كشفت النتائج عن بروز سلالة سائدة هي *T. rubrum* ووجود *T. rubrum* var. *raubitschekii* كنوعية جديدة لأول مرة في الجزائر. أما فيما يخص الكيتوزان المستخلص، أثبتت نتائج التحليل بالأشعة تحت الحمراء والمعايرة انه يتميز بنفس الجودة و النوعية مقارنة بالكيتوزان التجاري. كما سجلت نتائج الاختبار المضاد للفطريات المسؤولة عن الأونيكوميكوز نسبة 0.6، 1.25 و 2.5 مغ/مل كدرجات دنيا لمنع نمو *T. rubrum*، *T. rubrum* var. *raubitschekii* و *T. interdigitale* على الترتيب. بناء على هذه النتائج يمكن لمادة الكيتوزان فتح آفاق علاجية جديدة للأونيكوميكوز، واستعمالها ضد فطريات جلدية متسببة في أمراض أخرى.

**الكلمات المفتاحية:** أونيكوميكوز – الكيتوزان-PCR- الفطريات الجلدية – المضاد الفطري.

# Introduction

Les onychomycoses ou mycoses des ongles sont la cause la plus fréquente des infections unguéales dont elles représentent jusqu'à 90% au niveau des pieds et au moins 50% au niveau des mains (Nzenze Afène *et al.*, 2011; Tanrıverdi et Özer, 2013). Ces affections inesthétiques, parfois douloureuses, sont souvent récidivantes, chroniques, mal supportées et contagieuses.

Les dermatophytes, champignons kératinophiles et kératinolytiques, sont fortement impliqués dans leur étiopathogénie, quoique, moisissures et levures (principalement *Candida* spp.) peuvent aussi, dans près de 10% des cas, en être des agents colonisateurs ou contaminants favorisés par une infection intercurrente ou des facteurs locaux (Tanrıverdi et Özer, 2013). Communes, fréquentes et très répandues, les onychomycoses représentent, selon les séries, 18 à 50% des étiologies des onychopathies et constituent 30 à 40% de l'ensemble des dermatophyties (Chabasse, 2004). Dans la population globale, elles touchent entre 3 et 29% des individus (Halim *et al.*, 2013). Leur taux de prévalence très, variable selon les études et les laboratoires, semble être en augmentation dans la population générale ces dernières années ; selon une enquête épidémiologique, « projet Achille », menée dans onze pays d'Europe, ce taux a varié de 29.6 à 22.1% selon le praticien concerné (dermatologue ou généraliste). En Asie, il est de 22% en moyenne ; en Russie, les onychomycoses représentent 77% de l'ensemble des mycoses et le taux des cultures positives, à partir d'onyxis, est passé, entre 1994 et 2001, de 28.2 à 52.7%. Les onychomycoses également fréquentes au Brésil, en Australie et dans les pays bordant la Méditerranée, sont aussi observées dans les pays développés où leur augmentation serait liée au vieillissement de la population et à une meilleure prise en charge. L'âge avancé, ainsi que certaines affections comme le psoriasis et le diabète sont souvent rapportés comme facteurs de risque (Chabasse, 2004 ; Ngaba *et al.*, 2015).

En Afrique du nord, les données sont fragmentaires et peu nombreuses; une étude menée sur 4 ans dans un service de dermatologie de Tunis a montré 61.1% d'onychomycoses confirmées sur les 255 cliniquement suspectées (Anane *et al.*, 2001). De même, une étude menée sur 5 ans à Casablanca, a confirmé, dans 64,5 % des cas, l'étiologie fongique de 2070 ongles suspects prélevés (Halim *et al.*, 2013).

En Algérie, plus précisément à Alger, dans les services de dermatologie, l'onychomycose a représenté 17% des motifs de consultation et son taux de prévalence a été estimé à 4,6% (Djeridane *et al.*, 2006). A Constantine, elle a constitué 27% de l'ensemble des mycoses superficielles rencontrées au CHU Benbadis (Benmezdad, 2011).

Le diagnostic actuel des onychomycoses est basé sur la combinaison de deux méthodes utilisées en routine dans la plupart des laboratoires ; à savoir, la recherche par examen

microscopique direct, d'éléments fongiques dans les prélèvements d'ongles infectés et la mise en culture de ces mêmes prélèvements afin de procéder à l'identification morphologique du champignon. Mais ces deux méthodes présentent chacune ses limites ; l'examen microscopique direct, rapide et peu coûteux, permet souvent de mettre en évidence des filaments fongiques sans, toutefois, pouvoir en identifier l'espèce ou le genre. Par ailleurs, les cultures, lentes et peu sensibles, donnent 40% de faux négatifs même quand l'examen microscopique direct est positif (Bontems *et al.*, 2009; Monod *et al.*, 2006; Petinataud *et al.*, 2014). Elles sont également peu spécifiques et peuvent parfois être faussement positives suite à une contamination par les moisissures saprophytes environnementales dont la croissance facile et rapide inhibe celle des dermatophytes. D'autre part, l'identification délicate et consommatrice de temps, nécessite un personnel entraîné et, parfois, des tests supplémentaires (Petinataud *et al.*, 2014).

Les techniques moléculaires, développées durant ces dernières années, ont permis de détecter et d'identifier les agents étiologiques directement à partir d'une faible quantité d'échantillons cliniques. Les plus classiques comme la PCR, la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et la PCR en temps réel (Bontems *et al.*, 2009; Petinataud *et al.*, 2014), largement utilisées, sont principalement axées sur la détection des espèces dermatophytiques (Kupsch *et al.*, 2016) et non dermatophytiques (Monod *et al.*, 2013). Selon des travaux récents, les techniques moléculaires constituent des outils prometteurs pour un diagnostic rapide et précis et une avancée dans la prise en charge précoce et adaptée des onychomycoses (Dhib *et al.*, 2012, 2014; Luk *et al.*, 2012; Monod *et al.*, 2013; Petinataud *et al.*, 2014).

Le traitement conventionnel des onychomycoses peut être, selon l'aspect clinique de l'appareil unguéal et selon l'agent étiologique, local et/ou systémique. Plusieurs directives ont été publiées (Chabasse, 2007) pour la bonne gestion de ces infections, mais les traitements probabilistes, prescrits sans preuve étiologique, retardent souvent le diagnostic et la prise en charge thérapeutique adéquate et contribuent ainsi au caractère récidivant, tenace, chronique et extensif de ces infections hautement contagieuses et transmissibles. En somme, l'onychomycose reste, certes, une maladie bénigne mais difficile à gérer ; seuls un diagnostic précoce et précis, un traitement adapté, une compliance et une hygiène rigoureuse sont garants d'une bonne évolution, voire d'une guérison.

Le schéma thérapeutique classique comporte généralement un traitement antifongique systémique (par exemple de la terbinafine à raison de 250 mg/j pendant plusieurs mois) et un traitement local par application d'une crème ou d'une solution filmogène (par exemple du

ciclopirox ou de l'amorolfine) qui contient, entre autres, de l'hydroxypropyl chitosane synthétisé à partir du chitosane. Ce dernier, un dérivé *N*-désacétylé de la chitine, est un polysaccharide de la famille des glycosaminoglycanes. Il est principalement produit par désacétylation chimique de la chitine provenant des déchets de crustacés, mais il peut également être extrait à partir des zygomycètes dont la paroi peut en contenir de grandes quantités. C'est un bio polymère doté d'une large activité contre les champignons, les bactéries et les virus, ce qui a suscité son intérêt dans de nombreux domaines comme l'hydraulique, la cosmétique et la pharmacie. Pour notre part, et dans ce dernier contexte, nous nous proposons, de l'extraire à partir d'un zygomycète, *Rhizopus oryzae*, d'étudier ses caractéristiques et d'évaluer son activité (potentiel) vis-à-vis des souches dermatophytiques responsables d'onychomycoses à Constantine.

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux ongles et aux onychomycoses, au chitosane et enfin aux zygomycètes sources de ce dernier.

La seconde partie, consacrée à l'étude expérimentale, est structurée en trois chapitres composés chacun d'une partie décrivant le matériel et les différentes techniques utilisés et d'une autre partie exposant, discutant et comparant les résultats obtenus.

- Le chapitre 1 concerne le diagnostic conventionnel des onychomycoses à partir des ongles infectés de patients ayant consultés au service de Mycologie et Parasitologie du CHU de Constantine. Une étude comparative est, ensuite, réalisée entre les diagnostics classique et moléculaire par PCR en temps réel (PCR panfongique et pandermatophytes) dans le but de vérifier leur bénéfice (délai diagnostique, sensibilité...).

- Le chapitre 2, décrit les étapes d'extraction du chitosane à partir du Zygomycète, *Rhizopus oryzae*, et sa caractérisation par les techniques appropriées.

- Le chapitre 3 consiste à évaluer, *in vitro*, l'activité antifongique du chitosane vis-à-vis des espèces de dermatophytes les plus incriminées.

Enfin, ce travail est clôturé par une conclusion générale et des perspectives d'avenir.

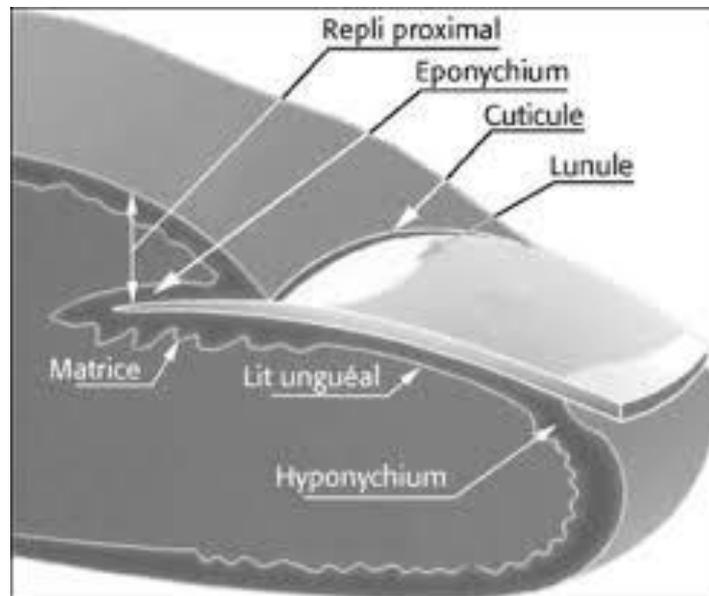
# Partie bibliographique

## CHAPITRE I : GENERALITES SUR L'ONGLE ET LES ONYCHOMYCOSES

### 1. Structure et anatomie de l'ongle sain

L'ongle aussi appelé tablette ou plaque unguéale, est constitué par un tissu semi-transparent appelé kératine, dont le bord libre (souvent coupé) doit sa couleur blanchâtre à la couche d'air sous-jacente (Figure1). Le replis sus-unguéal (syn. Proximal, dorsal ou postérieur) se termine par la cuticule, l'adhérence de cette dernière à la tablette empêche la pénétration de substances étrangères dans la rainure (Baran et Piérard, 2004).

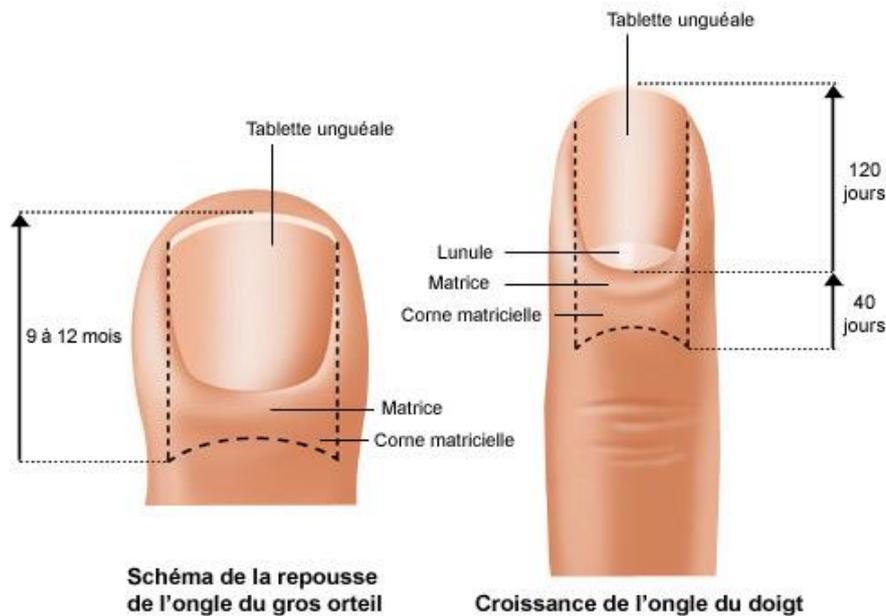
La lunule, blanc opaque à limite arciforme antérieure (croissant blanchâtre), correspond à la partie distale, visible, de la matrice située en avant de la cuticule. Bien dessinée aux pouces, elle peut être absente ou recouverte par la cuticule aux autres doigts. La matrice de l'ongle produit la kératine et fait pousser progressivement l'ongle. Sa partie proximale produit le tiers supérieur de l'ongle, sa partie distale fournit ses 2/3 inférieurs. La plus grande partie de l'ongle repose sur le lit unguéal qu'il protège en lui adhérant fortement (Baran et Chosidow, 2008).



**Figure 1** : Coupe anatomique d'un ongle sain (Baran et Piérard, 2004)

La repousse totale d'un ongle de la main demande 6 mois et celle d'un ongle de pied 1 an. Les ongles des mains poussent approximativement de 3 à 4 mm/ mois (Baran et Chosidow, 2008). La pousse est plus rapide chez l'enfant (0.15 mm/jour) et moyenne chez les seniors (0.06 mm/jour).

La vitesse de croissance des ongles des pieds est la moitié de celle des ongles des mains (Figure 2). Pendant l'enfance l'ongle est flexible, transparent, lisse et convexe. Chez l'adulte, il est plus dur et résistant. En vieillissant, il perd progressivement de sa brillance, il devient opaque, grisâtre, cassant et la lunule tend à disparaître.



**Figure 2 :** Schéma de la repousse de l'ongle du doigt et du gros orteil  
(Baran et Chosidow, 2008)

## 2. Epidémiologie et étiologie des onychomycoses

Les onychomycoses ou onyxis sont définies comme des infections de l'appareil unguéal des mains ou des pieds dues à des champignons microscopiques: levures et champignons filamenteux, parmi lesquels les dermatophytes, les moisissures et, en zone tropicale, les pseudodermatophytes, qui rendent les ongles opaques et épais (Lubeck, 1998).

Ces onychomycoses représentent 50% des onychopathies (Nzenze Afène *et al.*, 2011 ; Halim *et al.*, 2013) . Elles représentent 18 à 50 % des pathologies unguéales dans le monde (Halim *et al.*, 2013). Elles touchent, en fonction des séries, entre 3 et 29 % de la population générale, 6 à 9 % en France (Farhi *et al.*, 2011). En Algérie et particulièrement à Constantine,

elles constituent 27% de l'ensemble des mycoses superficielles rencontrées au CHU de Constantine (Benmezdad, 2011).

Les onychomycoses siègent sur les orteils dans 90 % des cas (Farhi *et al.*, 2011; Tanriverdi et Özer, 2013). Peu fréquentes chez l'enfant, et augmentant avec l'âge, elles atteignent un pic chez les personnes âgées. Elles touchent plus le sexe féminin au niveau des mains (candidose) et peut être une maladie professionnelle.

Cette affection n'est généralement pas grave mais peut être à l'origine de complications à type d'érysipèle et à des problèmes liés à la contagion possible dans les établissements et lieux publics (piscines, hammams, mosquées, salles de sport..). Elles constituent un motif fréquent de consultation, les plaintes des patients se rapportent au caractère chronique de l'affection et vont de la gêne fonctionnelle et l'aspect inesthétique à la douleur locale et souvent à la récursive.

### **3. Facteurs favorisant les onychomycoses**

Les causes de survenue d'une onychomycose sont multifactorielles. Elles dépendent de nombreux facteurs qu'ils soient individuels (âge, sexe), génétiques, immunitaire et héréditaires, mais aussi favorisée par le mode de vie, la profession (militaires, maîtres-nageurs), la pratique sportive (piscine, sports de combat, marathoniens, etc.), c'est-à-dire dus à des facteurs environnementaux (Chabasse *et al.* 2000) ou locaux (microtraumatismes, macérations). Le traitement systémique corticoïde est aussi favorisant (Baran et Piérard, 2004).

#### **3.1. Facteurs individuels**

- **L'âge** : la fréquence des onychomycoses augmente avec l'âge, elle est presque rare chez les enfants, cela peut être expliqué par la rapidité de la pousse de l'ongle et la rareté des traumatismes des pieds observés chez les jeunes enfants qui empêcherait le champignon de s'implanter durablement. Chez les adultes jeunes (20-30 ans), les taux de la prévalence s'élève avec l'âge et oscille entre 0.44 et 3.6%. Concernant la tranche d'âge entre 40 et 60 ans, le taux varie de 15 à 20%. A partir de 60 ans, cette fréquence est de 30 -48%. Cela peut être expliqué par la vitesse ralentie de la pousse de l'ongle, difficulté d'assurer une hygiène

correcte des pieds (ongles difficiles à couper, absence de soin régulier), mais aussi les facteurs locaux (troubles trophique, insuffisance circulatoire) (Baran et Piérard, 2004)

- **Le sexe** : selon les régions et les villes, la prévalence des onychomycoses chez les hommes et les femmes peut changer. Selon une étude finlandaise, les hommes seraient quatre fois plus exposés que les femmes, cette prévalence serait moins importante aux états unis. Contrairement à l'Espagne, au Pakistan, en Iran et en Arabie Saoudite. En Algérie (Constantine), la prévalence des hommes et des femmes était de 54% et 46% respectivement (Benmezdad, 2011).

Les onychomycoses touchent plus volontiers les femmes que les hommes avec une atteinte importante des mains. Ce sont des facteurs culturels et comportementaux, tel que le port des gants, tâches ménagères, aussi les mains se voient plus souvent que les pieds, donc motivent plus fréquemment une consultation.

- **Facteurs génétiques** : selon une étude de cas familiaux, réalisée conjointement à Miami, Bologne et à Cannes a montré que l'atteinte unguéale distale causée par *T. rubrum* est liée à une prédisposition familiale transmise par un mode autosomal dominant (Baran et Piérard, 2004).

- **Selon l'état pathologique sous-jacent** : des études révèlent que le tabagisme, le diabète en raison des troubles trophiques et du déficit circulatoire (microcirculation), le psoriasis (ongles fragilisé et plus facile à coloniser par les levures et dermatophytes), les déficits immunitaires (VIH et dysfonctionnements immunitaires), les maladies héréditaires, traumatismes et malposition des orteils (favorise des leuconychies superficielles sur l'ongle recouvert), sont des facteurs prédictifs indépendants des onychomycoses (Baran et Piérard, 2004).

### **3.2. Facteurs environnementaux et/ ou comportementaux**

- **Facteurs climatiques** : certaines études suggèrent que certaines espèces sont tributaires des climats tropicaux et subtropicaux, tel que les *Scytalidium* (dans les régions tropicales) et *Candida* (régions chaudes et humides) et des pieds. En effet l'implication des levures au niveau des pieds est élevée en Espagne, Arabie Saoudite, Inde et au Liban (Baran et Piérard, 2004).

- **Port régulier de chaussures et de gants :** les atteintes aux dermatophytes sont strictement liées au port prolongé des chaussures fermées. L'incidence est de 15% au pays du Nord, alors qu'elle est de 2 à 3% aux pays économiquement pauvres (régions intertropicales). L'environnement humide et chaud, riche en dioxyde de carbone est propice pour la germination (Baran et Piérard, 2004).

- **Profession ou rites religieux :** les onychomycoses surviennent dans certaines professions notamment chez les militaires, les ouvriers de cimenterie et les maîtres-nageurs. En réalité, c'est aussi la fréquentation répétée des installations sanitaires (douches collectives, sauna, installations thermales) ou la pratique de l'ablution chez les sociétés arabo-musulmanes qui expliquent cette forte prévalence (Baran et Piérard, 2004).

- **Pratique sportive et fréquentation régulière de douches collectives :** ce sont les sports pratiqués pieds nus (sport de combat, sport nautique, judo) où le taux de prévalence est élevé, en raison d'un contact direct avec le sol et aussi par les traumatismes engendrés par la pratique sportive. Les marathoniens semblent être protégés du risque de contamination, mais les pieds se retrouvent dans une atmosphère chaude et humide favorable pour le développement des champignons. Une contamination interhumaine est possible, car les sportifs se retrouvent, dans un moment ou un autre, pieds nus dans des cabines de vestiaires, douches, sauna, hammam (Baran et Piérard, 2004).

- **Transmission intrafamiliale :** il a été rapporté que la contamination familiale a été suggérée parmi les membres de 15/41 familles et dans 10/ 28 couples italiens étudiés. 50% d'entre eux avaient soit un frère, soit une sœur, soit un parent parasité par le même agent (Baran et Piérard, 2004).

#### **4. Différents types d'onychomycoses**

Trois principaux types de champignons peuvent être isolés à l'état parasitaire :

- Les dermatophytes, principalement *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton interdigitale*)
- Les levures, essentiellement *Candida albicans*.
- Les champignons filamenteux non dermatophytiques, ou moisissures à mycélium clairs (hyalohyphomycetes) ou foncés (phaéohyphomycetes ou dématiés). Sont

également responsables de certaines atteintes à une fréquence faible inférieure à 10 %, comme *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp. *Fusarium*spp. (Baran et Piérard, 2004; Tanriverdi et Özer, 2013; Zukervar *et al.*, 2011)

Parmi les moisissures, certains champignons se comportent comme des dermatophytes en occasionnant des tableaux cliniques identiques à ces derniers et ont été pour cela dénommés « pseudo-dermatophytes », tels que *Neoscytalidium dimidiatum*, *Scytaalidium hyalinum* et *Onychocola canadensis*.

## **4.1. Onychomycoses à dermatophytes**

### **4.1.1. Description**

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux kératinophiles, parmi les micromycètes pathogènes pour l'homme, seuls ces champignons possèdent un équipement enzymatique spécial, les keratinases, qui digèrent la kératine (Contet-Audonnet, 2005).

Chez l'homme, les dermatophytes touchent la peau (épiderme), les phanères (cheveux, poils, ongles) et très exceptionnellement les muqueuses, les tissus sous cutanés ou les viscères (maladie dermatophytique). Les dermatophytoses évoluent chez l'homme en mode chronique.

Elles sont souvent récidivantes, prennent des aspects cliniques différents, d'où l'importance du diagnostic reposant sur le prélèvement mycologique avant de donner le traitement spécifique.

Selon une étude multicentrique réalisée en 1997 aux Etats-Unis, *T.rubrum* représentait plus de 97% des dermatophytes isolés de l'ongle. Il est originaire d'Inde, du sud-est asiatique et d'Afrique de l'ouest, inexistant sur les autres continents au début du XXe siècle, c'est dans les années 45 qu'il s'est propagé en Europe et sur le continent Américain, avec le retour des colons et des militaires dans leur pays d'origine (Baran et Piérard, 2004).

### **4.1.2. Classification**

Les dermatophytes, peuvent avoir une reproduction sexuée qui est rare et difficile à obtenir *in vitro* et produisent des ascospores, ils sont donc classés dans le phylum des Ascomycètes, de l'ordre des Onygnales, de la classe des Arthrodermataceae, et du genre *Arthroderma* (Chabasse *et al.*, 2004).

La distinction entre les trois genres : *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton* est basée sur la morphologie et l'abondance des aleuries unicellulaires (microconidies), ou pluricellulaires (macroconidies).

#### **4.1.3. Origines de la contamination par les dermatophytes**

Dans la dernière décennie, des études sur la phylogénie des champignons, ont montré que l'habitat des dermatophytes est le sol (descendent d'ancêtres issus aussi du sol). C'est effectivement dans le sol où leur stade téléomorphe (sexué) a été retrouvé, appartenant au genre *Arthroderma* (Chabasse, 2008).

Classiquement, l'origine de la contamination de l'homme était humaine (espèces anthropophiles), animales (espèces zoophiles) ou telluriques (espèces géophiles) (Tableau 1).

- **Origine humaine** : la plus fréquente, la contamination est souvent interhumaine, elle peut-être directe ou indirecte (salle de bains, salles de sport, douches collectives, piscines, peignes, brosses, vêtements, chaussettes) pouvant véhiculer les squames contenant les spores virulentes.
- **Origine animale** : la contamination se fait par le contact direct avec un animal de compagnie (caresses..) ou indirect (poils virulents laissés sur un fauteuil).
- **Origine tellurique (géophile)**: ce sont des saprophytes dans le sol, la contamination peut se produire à la suite d'un traumatisme d'origine tellurique à partir de sols enrichis en kératine animale contenant l'espèce en cause.

**Tableau 1:** Les principaux dermatophytes et leur habitat d'origine préférentiel.

<b>Espèces anthropophiles</b>	
<i>Microsporum</i>	<i>M. audouinii</i> var. <i>langeronii</i> <i>M. ferrugineum</i>
<i>Trichophyton</i>	<i>T. tonsurans</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. schoenleinii</i> <i>T. concentricum</i>
<i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>
<b>Espèces zoophiles</b>	
<i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i> <i>M. persicolor</i> <i>M. praecox</i> <i>M. equinum</i>
<i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (également tellurique) <i>T. erinacei</i> <i>T. equinum</i> <i>T. gallinae</i> <i>T. verrucosum</i>
<b>Espèces telluriques</b>	
<i>Microsporum</i>	<i>M. gypseum</i> <i>M. fulvum</i>
<i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (également zoophile) <i>T. terrestre</i> <i>T. ajelloi</i>

#### 4.1.4. Espèces incriminées

Aujourd'hui, *T. rubrum* est un parasite très actif de l'ongle et de l'épiderme, mais plus rarement du poil. Il représente 60 à 70% des espèces de dermatophytes isolées. *T. interdigitale* est la deuxième espèce en termes de fréquence. Elle est la plus incriminée dans les leuconychies superficielles et responsable d'intertrigos interdigitaux plantaires. Les autres dermatophytes d'origine humaine sont plus rarement isolés.

*Trichophyton tonsurans*, *T. schoenleinii* mais aussi *T. violaceum* et *T. soudanense* peuvent être retrouvés par auto-contamination au niveau des ongles des mains en association avec une teigne du cuir chevelu qui peut passer inaperçue. *T. violaceum* et *T. soudanense* peuvent aussi être isolés à partir des ongles des pieds (Tableau 2).

Les dermatophytes zoophiles peuvent léser l'ongle des mains, suite à une contamination directe avec l'animal en cause. Il s'agit surtout des *Trichophyton* comme *T. mentagrophytes*, *T. erinacei* et *T. verrucosum*, plus rarement, *Microsporum* (*M. canis* et *M. persicolor*). Certaines espèces sont plus rarement isolées de l'ongle tel que *Trichophyton kuryangii*, *T. gourvilli*

localisé en Afrique noire, *T.krajdieni* en Amérique du Nord, et sous le climat français *T.equinum* ; *Microsporum gypseum*, et *M.racemosum* (Baran and Piérard, 2004).

**Tableau 2 :** Principales espèces fongiques isolées d'un ongle pathologique selon la localisation et l'origine.

Dermatophytes	Localisation		Origine principale
	Mains	Pieds	
<b>Habituels</b>			
<i>Trichophyton rubrum</i>	++	+++	Homme*
<i>Trichophyton interdigitale</i>	+	+++	Homme*
<b>Rares</b>			
<i>Epidermophyton floccosum</i>	+	+/-	Homme *
<i>Trichophyton soudanense</i>	+++	+/-	Homme *
<i>Trichophyton violaceum</i>	+++	+/-	Homme *
<i>Trichophyton tonsurans</i>	+++	+/-	Homme *
<i>Microsporum langeronii</i>	+++	+/-	Homme *
<i>Microsporum canis</i>	+++	+/-	Chat, chien
+++ : fréquents ; ++ : peu fréquents ; + : rares ; +/- : exceptionnels ; * : auto inoculation.			

#### 4.1.5. Mode de vie :

Les dermatophytes représentent, un excellent modèle d'évolution vers le parasitisme. En effet, leur passage de l'état saprophyte, dans le sol, à l'état parasite, chez l'animal et l'homme, a été prouvé plus récemment dans des études moléculaire et phylogénétiques (Chabasse, 2008).

L'engagement parasitaire entraîne une perte progressive de la reproduction sexuée, une raréfaction de la conidiogénèse. Malgré l'absence de reproduction sexuée chez les anthropophiles stricts, leurs descendants sont capables de se maintenir et de se propager intensément dans les populations humaines (Chabasse, 2008).

## 4.2. Onychomycoses à *Candida* sp.

### 4.2.1. Description

Le genre *Candida* est un ubiquitaire répandu dans le monde et forme un commensal parfaitement toléré par l'homme sain dans la bouche, la peau, le système digestif (Mavor *et al.*, 2005). Il devient pathologique et provoque des mycoses (candidose) chez les humains et d'autres animaux quand l'organisme est affaibli (Diabète, hyperparathyroïdie, hypothyroïdie, onycholyse psoriasique, immunodéficiences congénitales ou acquises (SIDA) (Daniel *et al.*, 1998), malnutrition, période postopératoire, tumeurs malignes (hémopathies), malabsorption.

Au niveau des ongles, l'atteinte par *Candida* débute généralement par une paronychie d'évolution subaiguë ou chronique avec dystrophie secondaire de la tablette unguéale qui devient striée et bosselée transversalement avec une coloration marron-verdâtre des zones proximales et latérales. Elle peut être primaire (due presque toujours à *C. albicans*) ou secondaire (due à diverses espèces de *Candida*).

Des études plus récentes considèrent la paronychie chronique, après avoir longtemps été considérée comme d'origine candidosique, comme une dermite allergique (sensibilisation aux protéines en particulier), qui a une prédilection pour les mains des ménagères et les chefs cuisiniers. Les levures retrouvées à ces niveaux sont plus le fait d'une surinfection d'onychopathie d'autre étiologie (lésion préexistante) (Baran et Piérard, 2004).

### 4.2.2. Classification

Le genre *Candida*, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) (Gräser *et al.*, 1996), formant des colonies blanches crémeuses.

Avant, le genre *Candida* était aussi classé parmi les Deuteromycète ou *Fungi imperfecti*. Des recherches sur la classification phylogénique des levures, en utilisant des gènes codant pour les régions variables D1 et D2 de l'ADNr de la sous-unité 25S (García-Sánchez *et al.*, 2004) ont fait déplacer le genre *Candida* dans l'embranchement des Ascomycota, sous embranchement des Saccharomycotina, la classe des Saccharomycetes, sous-classe des Saccharomycetidae, l'ordre des Saccharomycetales, la famille des Saccharomycetaceae et du genre *Candida* (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5476>.

#### 4.2.3. Origine de la contamination

La Candidose, peut être transmise par auto-contamination à partir d'un foyer extra-unguéal (prurit), contact avec des substances sucrées ou agressives (détergents, médicaments, etc...), professions exposées: pâtisseries, femmes de ménage, infirmières, blanchisseuses, plongeurs.

#### 4.2.4. Epidémiologie

Les onyxis à levures représentent entre 5 et 40% des atteintes unguéales. Ils sont prédominants aux ongles des mains avec une proportion de 7 fois sur 10 (onyxis et périonyxis), avec une nette prédominance féminine, surtout pour les séries issues du bassin méditerranéen Cette notion classique (Badille, 1977) reste valable jusqu'à aujourd'hui.

Aux USA, les levures du genre *Candida* représentent 75% des atteintes des doigts des mains et environ 3 à 6% des ongles des pieds (Foster *et al.*, 2004). En Algérie, ces espèces représentent 45% des espèces isolées à partir des onychomycoses (Djeridane *et al.*, 2006).

Par ailleurs, certaines études ont montré une prédominance du genre *Candida* au niveau des pieds des militaires russes dans les sous-marins atomiques (Baran et Piérard, 2004).

#### 4.2.5. Espèces incriminées

L'espèce dominante isolée à partir des mains, en dehors de *C. albicans*, est *C. parapsilosis* qui affectionne aussi les pieds et devient la 2<sup>ème</sup> espèce la plus fréquente après *Candida albicans* (Baran et Piérard, 2004).

Par ailleurs, dans certaines études, *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* sont plus souvent incriminés que *C. albicans* (Foster *et al.*, 2004; Nolting *et al.*, 1994). D'autres espèces colonisent aussi le lit de l'ongle comme *C.tropicalis*, *C. guilliermondii* et *C.famata*. Certains *Candida* comme *C. haemulonii* et *C. ciferrii* affectionnent particulièrement l'ongle des personnes âgées ayant des troubles trophiques des membres inférieurs. D'autres levures appartenant au genre *Trichosporon* (*T.beigelii*) et *Cryptococcus* (*C. laurentii*, *C. albidus*) sont aussi parfois incriminées à l'état parasitaire principalement au niveau de la main dont l'origine peut être interne (autoinoculation) ou externe (manuportage, manipulation de produits divers ou aliments contaminés) (Baran et Piérard, 2004).

#### **4.2.6. Mode de vie**

En milieu extérieur, les *Candida* sont ubiquitaires isolées dans l'environnement (sol, air, fruits, produits laitiers, viandes, céréales...) (Lopandic *et al.*, 2006), ce sont des saprophytes, qui se nourrissent des matières organiques mortes en décomposition.

Chez l'Homme, ils se comportent en commensaux chez les personnes saines et se transforment en parasites chez les personnes immunodéprimés et diabétiques (équilibre hôte-parasite rompu) et deviennent donc opportunistes et envahissent les tissus.

Contrairement aux autres espèces de *Candida*, *C.albicans* est rarement isolée dans la nature, sa présence dans cette dernière peut être liée à une contamination fécale.

### **4.3. Onychomycoses à moisissures**

#### **4.3.1. Description**

Les moisissures sont des champignons filamenteux, saprophytes omniprésents, peuplant chaque recoin de notre environnement, certaines sont dotées d'une virulence latente et peuvent outrepasser ce caractère saprophyte et se transformer en opportunistes et provoquer des infections systémiques chez les patients immunodéprimés et des complications chez les diabétiques.

La liste des moisissures impliquées dans les onyxis ne cesse de s'allonger ces dernières années, les moisissures se sont révélées la cause de l'échec de traitement des onychomycoses (Monod *et al.*, 2013).

Dans la majorité des cas, elles ne sont pas capables de lyser une kératine saine et ne sont pas adaptés à la kératine humaine. En revanche, elles se développent très souvent sur des ongles déjà altérés, par des facteurs locaux (onychopathie préexistante telle que le psoriasis ou antécédents de traumatismes unguéaux) et/ou généraux (troubles circulatoires des membres inférieurs, immunodépression) (Chabasse et Pihet, 2014) ou surinfectent des ongles déjà parasités par un dermatophyte ou un pseudo-dermatophyte.

Pour affirmer le rôle pathogène de ces moisissures saprophytes, la présence d'un examen direct positif est indispensable. Par ailleurs, il faudra impérativement s'assurer qu'il ne s'agisse pas d'une contamination du prélèvement.

#### 4.3.2. Classification

Les moisissures, comme tous les champignons sont classées selon leur mode de reproduction sexuée. La plupart des moisissures opportunistes d'intérêt médical sont classées dans la division des Deutéromycotina « Stade téléomorphe non connu ».

La grande majorité des moisissures responsables d'onychomycoses appartiennent au phylum des Deuteromycotina, à la classe des Hyphomycètes et à l'ordre des Moniliales. Quatre genre sont le plus souvent cités, ils appartiennent à la famille des Moniliaceae (Hyalohyphomycetes), il s'agit de *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Acremonium* (Hwang *et al.*, 2012; Moreno et Arenas, 2010). Les genre appartenant à la famille des Dematiaceae (phaeohyphomycètes) sont plus rares tel que *Chrysosporium*, *Alternaria* et *Curvularia* (Contet-Audonnoeu, 2005; Moreno et Arenas, 2010).

Il existe aussi d'autre micromycètes pathogène pour l'homme, présentant une clinique semblable aux dermatophytes, il s'agit des pseudodermatophytes, qui appartiennent aux genres *Neoscytalidium* et *Onychocola*. Parmi une quinzaine d'espèces connues, seules deux espèces seraient impliquées dans des mycoses humaines ou animales. *Scytaalidium dimidiatum* ou *Fusicocum dimidiatum* et *Scytaalidium hyalinum*, ces espèces sont classées parmi les Ascomycetes, la classe des Dothideomycetes, l'ordre des Botryosphaeriales, la famille des Botryosphaeriaceae et le genre de *Neoscytaalidium* (Crous *et al.*, 2006).

*Onychocola* est un genre isolé en 1990 pour la première fois au Canada par Sigler. C'est aussi un Ascomycète appartenant à la classe des Eurotiomycetes, à l'ordre des Onygnéales et à la famille des Arachnomycetaceae (Sigler et Congly, 1990). Sa forme parfaite *Arachnomycetes nodosetosus* n'a été mise en évidence que quatre années après sa découverte.

#### 4.3.3. Origine

Les moisissures opportunistes sont cosmopolites provenant du milieu extérieur, fréquemment rencontrées dans l'air et sur les sols. Ils sont le plus souvent saprophytes, parfois phytopathogènes ou parasites d'animaux, avec un potentiel de pathogénicité non négligeable (Chabasse et Pihet, 2014; Chabasse *et al.*, 2009).

Quant aux *Scytaalidium*, ce sont des phytopathogènes de plantes et d'arbres fruitiers largement répandus dans le milieu extérieur, souvent isolés en zone tropicale à partir du sol.

*Onychocola* dont le biotope naturel n'est toujours pas connu, elle est donc considérée comme émergente, elle a été isolée à partir des ongles au Canada, Nouvelle Zélande, et puis en Europe (Chabasse et Pihet, 2014).

#### **4.3.4. Espèces incriminées**

Parmi les nombreuses moisissures hyalines issues de l'environnement, le rôle pathogène de certaines semble acquis. Il s'agit avant tout de *Scopulariopsis brevicaulis*, de certains *Fusarium* (*F.oxysporum* et *F.solani*) ; des *Aspergillus* (*A. candidus*, *A.flavus*, *A.terreus*, *A.versicolor* et *A.niger*) ; des *Paecilomyces* et des *Acremonium*. Les espèces appartenant aux champignons noirs (ou dématiés) sont plus rarement incriminées.

Les ongles atteints par les moisissures peuvent être une porte d'entrée d'une infection systémique à moisissure. Il a déjà été décrit que des fusarioses disséminées mortelles dont la porte d'entrée était un *Fusarium* passé inaperçu. *Curvularia lunata* peut aussi se montrer redoutable chez les immunodéprimés ou tout sujet devant prendre un traitement immunosuppresseur (patient en aplasie). *S.hyalinum* et *S.dimidiatum* se comportent comme un dermatophyte anthropophile. Ces espèces fortement kératinophiles et kératinolytiques attaquent les tablettes des ongles mais aussi la couche kératinique des plantes des pieds et des paumes des mains. Une étude a été réalisée au Nigeria sur 250 ouvriers d'une cimenterie, 24% d'entre eux étaient porteurs d'une Scytalidiose.

L'étude de Lacroix *et al.* (2003) qui rapporte une série de 322 patients présentant une scytalidiose, ont été diagnostiqués entre 1994 et 1999, au laboratoire de mycologie de l'hôpital Saint- Louis, Paris, 90% d'entre eux correspondait à des cas importés (migrants ou voyageurs sous les tropiques).

D'autres espèces sont plus rarement retrouvées dans un ongle pathologique. Il convient à ce propos de distinguer les champignons isolés à l'état parasitaire avec preuve histologique ou examen direct positif (Baran et Piérard, 2004).

#### **4.3.5. Epidémiologie**

Les onychomycoses causées par des moisissures sont rares et atteignent plus fréquemment les ongles des sujets âgés et essentiellement les ongles des gros orteils. Cependant, une augmentation de leur prévalence au cours des dernières années (1,45 % à 17,6 %) a été rapportée (Contet-Audonnet, 2005; Hajoui *et al.*, 2012). Gupta *et al.* (2012) estiment qu'elles seraient responsables en moyenne de 10 % des onychomycoses.

Ces différences semblent être la conséquence de la variabilité des techniques d'identification utilisées d'un laboratoire à un autre (Chabasse et Pihet, 2014). Il n'est donc pas toujours facile d'affirmer le caractère pathogène d'une moisissure retrouvée dans un

prélèvement sans une histologie unguéale, ou un examen direct après prélèvement de l'ongle suspect confirmant les filaments mycéliens « *in situ* ».

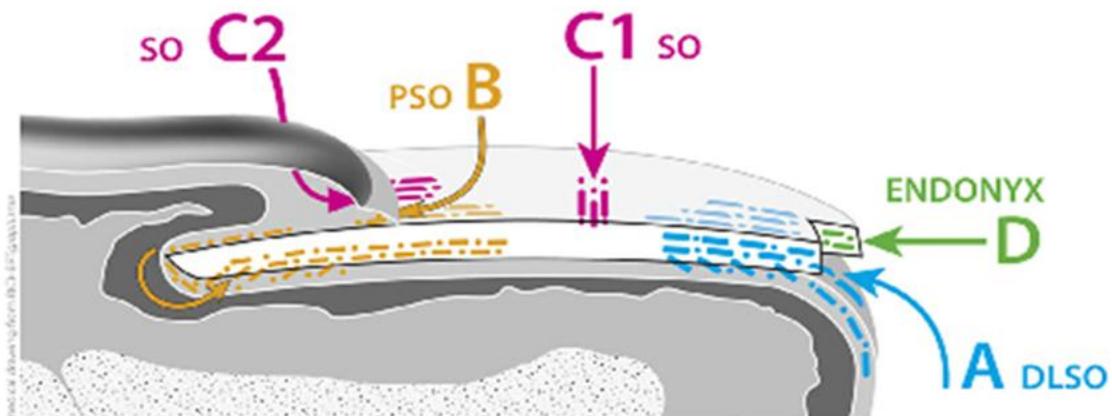
Les *Neoscytalidium* sont endémiques des zones tropicales et subtropicales mais il existe des différences de répartition géographique entre les deux espèces; *Scytalidium dimidiatum* semble prédominer chez les patients issus de l'Océan Indien, de l'Asie et de l'Afrique Centrale à l'inverse de la variété *hyalinium* qui est plus fréquemment retrouvée chez les sujets originaires des indes, d'Amérique du Sud et de l'Ouest africain (Chabasse et Pihet, 2014).

Les infections superficielles à *Neoscytalidium* en zone tropicale peuvent dépasser les affections à dermatophytes. Elles sont responsables de 34 à 47 % des dermatomycoses (Belloeuf *et al.*, 2004). Quant à *Onychocola canadensis*, elle parasite plus particulièrement les ongles des orteils de la femme âgée ayant des troubles trophiques et vasculaires. elle parasite préférentiellement le grand orteil, mais l'atteinte à *Onychocola* reste rare, représentant moins de 1 % des étiologies (Chabasse et Pihet, 2014).

## 5. Démarche diagnostique et traitement

### 5.1. Mode de végétation au niveau de l'ongle

Le mode de pénétration d'un champignon dans l'appareil unguéal se fait de diverses façons qui vont conditionner la variété clinique et la préférence mycologique (Figure 3).



C1: SO Classique  
C2: SO émergente sous la cuticule

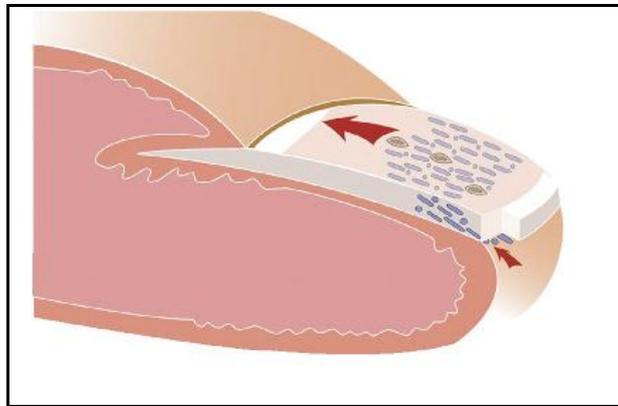
SO: Onychomycose Superficielle  
PSO: Onychomycose sous unguéale proximale.  
DLSO: Onychomycose sous unguéale latérodistale

**Figure 3 :** Différentes voies de pénétration d'un champignon au niveau de l'ongle (Baran et Hay, 2014).

### **5.1.1. Pénétration fongique sous-unguéele**

#### **5.1.1.1. Variété sous unguéele disto-latérale**

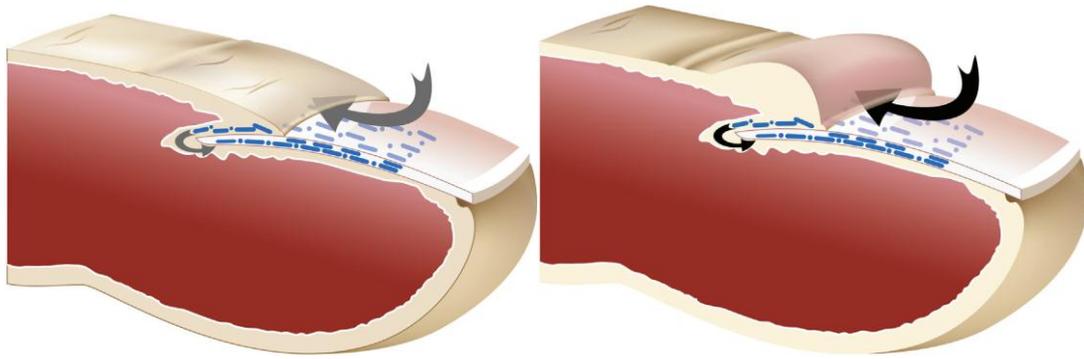
C'est l'aspect clinique le plus souvent observé, souvent avec une hyperkératose sous-unguéele. Le champignon (généralement un dermatophyte) pénètre sous l'ongle à partir du bord libre de la tablette unguéele (Figure 4), dans la couche cornée de l'hyponichium et du lit unguéal. L'envahissement progresse dans le sens opposé de la pousse de l'ongle c'est-à-dire vers la région proximale, ce qui provoque une hyperkératose sous-unguéele et un décollement de l'ongle de son lit. Cette atteinte disto-latérale peut être onycholytique (secondaire), paronychique, ou mélanonychique (Due aux champignons dématiés) (Baran et Hay, 2014).



**Figure 4:** Onychomycose sous-unguéele disto-latérale (DLSO) (Baran et Hay, 2014).

#### **5.1.1.2. Variété sous unguéele proximale**

Cette forme est plus rare. L'infection commence souvent par une leuconychie à partir de la face profonde du repli sus-unguéal (proximal) et au niveau de la lunule (Figure 5), elle s'étend vers la région distale de l'ongle et peut être suivie d'une paronychie chronique (souvent candidosique). Cette atteinte proximale surviendrait préférentiellement chez l'immunodéprimé (VIH positif) (Chabasse et Pihet, 2008).

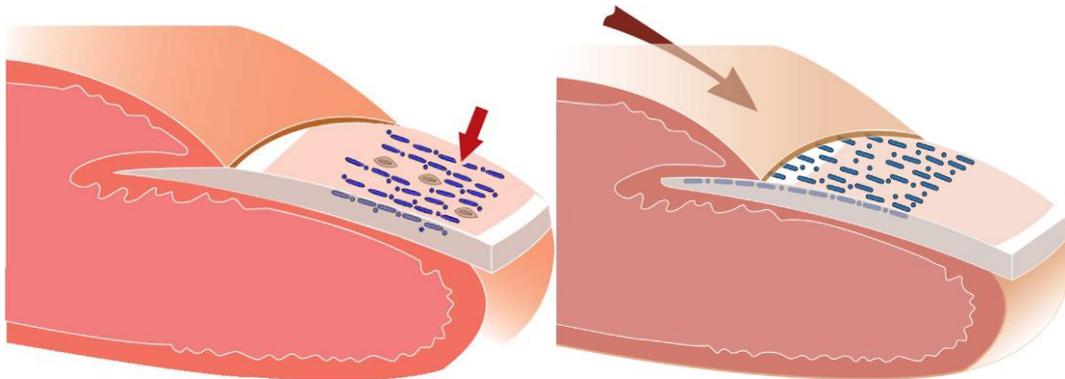


**Figure 5:** Onychomycose sous-unguéale proximale (PSO), PSO avec paronychie (Baran et Hay, 2014).

### 5.1.2. Pénétration fongique superficielle

L'onychomycose superficielle est une atteinte dermatophytique à la face dorsale de la tablette, où le champignon s'installe puis pénètre à l'intérieur formant des petits îlots de couleur blanche (leuconychie), opaques, qui, par coalescence, gagnent toute la surface de l'ongle. Ces leuconychies superficielles se rencontrent chez l'homme comme chez la femme, habituellement causée par *T. mentagrophytes var. interdigitale* dans 90 % des cas (Figure 6).

Elle se manifeste aux orteils, exceptionnellement aux doigts, mais ne se présentent que rarement chez l'enfant où elles sont dues à *C. albicans*.



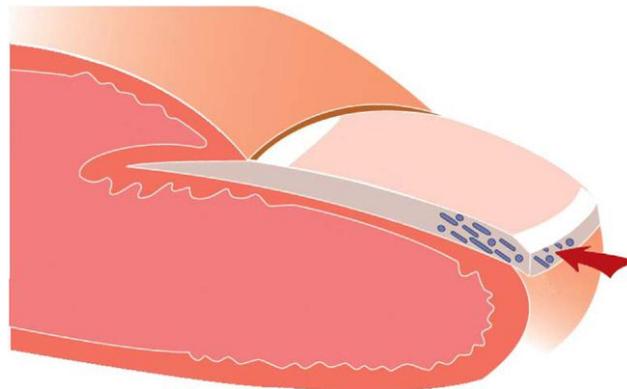
**Figure 6:** Onychomycose superficielle (SO), SO émergeant sous la cuticule (Baran et Hay, 2014).

La malposition permanente de la pulpe d'un orteil sur l'ongle de l'orteil voisin est une circonstance favorisante (Baran et Hay, 2014).

Elle peut être classique (comme décrite précédemment) ou se présenter sous forme mélanonychique (due généralement à *T. rubrum* var. *nigricans* et *N.dimidiatum*) ou sous une forme émergeant sous le repli proximal, ou avec extension profonde (Baran et Hay, 2014).

### **5.1.3. Onychomycoses « endonyx »**

Cette forme peut être considérée comme une variante de la forme disto-latérale, sauf qu'ici le champignon pénètre dans la tablette ventrale, formant des taches blanc-laites sans envahir le lit unguéal (sans l'épaissir) et sans aboutir à une onycholyse.



**Figure 7:** Onychomycose endonyx (OE) (Baran et Hay, 2014).

Elle se manifeste par des dépressions ponctuées, desquamation lamellaire et d'accentuation du relief des lignes longitudinales. Cette variété semble être causée par des agents habituellement responsables de teignes tel que : *T.soudanense* et *T.violaceum* (Baran et Hay, 2014).

### **5.1.4. Onychomycodystrophie totale**

Elle survient secondairement à l'une des formes cliniques précédentes non traitée. Elle peut être primitive, correspondant à l'atteinte de tous les tissus de l'appareil unguéal avec réaction inflammatoire importante (granulome candidosique). Elle peut également être secondaire, par une aggravation des lésions sous-unguéales qui se fait vers une atteinte complète de l'ongle avec lame friable (Figure 8), en bois pourri, avec des réactions hyperkératosiques qui entraînent des effets mécaniques au pourtour, dans les sillons, sur le lit unguéal et sur les orteils adjacents.



**Figure 8:** Onychodystrophie totale  
([http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/onychomycoses\\_ea897f8482d176d93ec53661dbea2561.pdf](http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/onychomycoses_ea897f8482d176d93ec53661dbea2561.pdf)).

## **5.2. Diagnostic biologique**

### **5.2.1. Prélèvement**

Le prélèvement de l'échantillon à analyser est l'étape critique pour assurer la qualité de l'examen. Le patient est adressé dans un laboratoire expérimenté pour cette analyse. Les modalités de prélèvement sont adaptées à la symptomatologie des lésions. Le principe essentiel consiste à prélever sur des ongles propres, préalablement nettoyés à l'alcool afin d'éliminer les moisissures de l'environnement, à la jonction ongle sain- ongle malade (le front d'attaque du champignon), là où le dermatophyte est le plus actif (vivant) ce qui permet la pousse en culture (Chabasse et Pihet, 2008).

Dans la forme disto-latérale la plus fréquente des onychomycoses, il convient d'éliminer les fragments d'ongles les plus externes pouvant être souillés par les moisissures saprophytes et colonisant la tablette unguéale. En cas de leuconychie superficielle, le grattage est effectué à la partie blanche friable en surface après avoir nettoyé la tablette.

### **5.2.2. Examen direct**

L'examen direct est incontournable dans le diagnostic d'une onychomycose, il est simple, et accessible à tous les laboratoires de biologie médicale et permet d'apporter une réponse rapide au médecin prescripteur. Il a pour objectif l'observation de fragments d'ongles, afin de mettre en évidence la présence ou l'absence des éléments fongiques contenus dans les échantillons biologiques issus du grattage. Ces derniers sont examinés au microscope entre lame et lamelle, dans une goutte de produit éclaircissant tel que l'hydroxyde de potassium (potasse à 20 % ou 30 %) ou au chloral-lactophénol d'Amman. Pour améliorer le confort de la lecture et pour une meilleure visualisation des structures fongiques, il est préférable d'associer les liquides éclaircissants avec un colorant.

La présence d'éléments fongiques doit être signalée et précisée, car elle oriente vers la présence d'un champignon à l'état parasitaire (onychomycoses). En outre, certains aspects morphologiques peuvent aider à préciser le type de champignon en cause. Il s'agit d'un :

- **Dermatophyte:** quand les filaments sont réguliers.
- **Pseudo-dermatophyte ou moisissure:** lorsque les filaments sont irréguliers, vésiculeux.
- **Infection candidosique :** en présence de pseudomycelium avec des blastospores.
- **Contaminants:** en présence de blastopores seules ou spores isolées.

Les limites de l'examen direct reposent sur les difficultés de certains prélèvements, réalisés au niveau des parties les plus friables de l'ongle, en cas d'onychodystrophie totale ou d'onychomycose proximale, pouvant révéler des filaments mycéliens ou des spores qui ne correspondent pas au parasitisme fongique. Mais plutôt à une contamination de la tablette par des moisissures saprophytes (Chabasse et Pihet, 2008).

### **5.2.3. Culture mycologique**

La culture est un complément indispensable de l'examen direct. En effet, l'examen direct seul n'est pas suffisant pour identifier l'espèce de champignon responsable de l'onychomycose, l'isolement en culture du dermatophyte et son identification sont importants, puisque la prophylaxie et le traitement peuvent changer selon l'espèce isolée (Chabasse et Pihet, 2008).

En culture, il est indispensable d'utiliser un milieu sélectif, en raison de la présence régulière de contaminants (commensaux, saprophytes) au niveau des phanères. Le milieu utilisé pour l'isolement des dermatophytes est le milieu Sabouraud additionné d'antibiotique(s) (chloramphénicol et/ou gentamicine) à large spectre pour inhiber la croissance des bactéries et de 0,5 à 1 g/L de cycloheximide (Actidione), pour inhiber la croissance de la plupart des moisissures, ainsi que la majorité des espèces de *Candida*.

Une deuxième gélose Sabouraud- antibiotique sans cycloheximide est généralement utilisée en parallèle, en raison de la présence probable d'une moisissure ou d'un pseudodermatophyte pouvant être l'agent étiologique de l'onychomycose.

Les cultures sont incubées habituellement à 25-27°C pendant une durée de 3 semaines avant de rendre des résultats négatifs.

Il serait nécessaire de réaliser un repiquage sur milieu spécifique afin de favoriser la sporulation ou la production de pigment pour faciliter l'identification de certains champignons isolés. L'identification repose essentiellement sur:

**a) Filamenteux :**

- Critères morphologiques : Aspects macro- et microscopiques des cultures.
- Critères physiologiques : Recherche d'organes perforateurs, exigences vitaminiques..

**b) Levures :**

- Etude des caractères biochimiques à l'aide de galeries (ID 32C, bioMérieux ; API 20C AUX, bioMérieux) permettant d'identifier un large panel de levures en 24 heures.
- Utilisation du milieu CHROMagar™ *Candida* qui permet d'apporter une aide dans l'identification. Par exemple, sur ce milieu les colonies de *C. albicans* sont vert clair, et celles de *C. krusei*, sont rose pâle, blanchâtres en périphérie et celles de *C. tropicalis* sont bleu verdâtre à bleu métallisé.

Plus récemment, la contribution de l'outil moléculaire dans l'identification des agents pathogènes, améliore et facilite le diagnostic et permet de rendre une réponse plus rapide au médecin prescripteur.

## **5.1. Traitement**

La prise en charge d'une onychomycose repose sur trois principales stratégies pharmacologiques:

- Avulsion chimique ou mécanique, qui consiste en une suppression de la zone pathologique de l'ongle par découpage après traitement chimique (urée 40 %) ou mécanique (meulage jusqu'au lit de l'ongle), permettant de diminuer la zone parasitée.
- et/ou solution filmogène ou vernis.
- et/ou traitement systémique.

### **5.3.1. Traitements systémiques**

Ces traitements sont généralement utilisés en cas d'atteinte matricielle (Distale ou latéro-distale importantes) ou atteinte de plusieurs ongles (Chauvin, 2011).

Trois différentes molécules sont généralement utilisées dans le traitement des onychomycoses; la griséofulvine, les imidazolés et une allylamine. Ces molécules peuvent

avoir des effets indésirables, d'où la nécessité d'un bon diagnostic avant leur prescription (Monod *et al.*, 2013).

- La griséofulvine (Griséfuline®)

C'est une molécule fongistatique qui n'est active que sur les dermatophytes. Elle a des effets secondaires gastro-intestinaux, plus rarement neurologiques, hématologiques, hépatiques, rénaux, cutanés et généraux. Et ne doit pas être associée à une contraception orale. Son efficacité après un an de suivi est de 40 %, nécessitant des durées de traitements allant de 4 à 12 mois, avec un taux de rechute important.

- kétoconazole (Nizoral®)

C'est un imidazolé fongistatique sur les dermatophytes et les levures. Ce médicament peut provoquer une hépato-toxicité qui limite son emploi. Une élévation des transaminases survient chez 2 à 10 % des malades et une hépatite immuno-allergique potentiellement mortelle survient dans 1/10 000 à 1/50 000 cas.

Après 18 mois de suivi, le taux de récurrence est de 30 %.

Deux triazolés (le fluconazole et l'itraconazole), sont aussi efficaces, mais qui ne sont pas sur le marché en France, elles ont une action fongistatique (Feuilhade de Chauvin, 2014). Et ont pour cible thérapeutique une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (la Lanostérol 14- $\alpha$ - déméthylase).

- La terbinafine (Lamisil®)

Actuellement, c'est le médicament le plus efficace montrant des taux de guérison entre 50 et 80%. Elle est fongicide sur les dermatophytes et fongistatique sur la majorité des espèces de *Candida*. Elle a comme cible thérapeutique une enzyme de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Squalèneépoxydase) (Monod *et al.*, 2013). La posologie recommandée pour une onychomycose des pieds est de 250 mg/j pendant 3 à 6 mois et de 6 semaines à 3 mois pour les ongles des mains. Elle a peu d'interactions médicamenteuses (Feuilhade de Chauvin, 2014). La molécule de terbinafine est généralement bien tolérée. Elle a des effets secondaires comme les troubles gastriques, des éruptions cutanées qui peuvent être graves (psoriasis pustuleux, érythème polymorphe), des céphalées, une perte du goût régressant spontanément. (Monod *et al.*, 2013).

En pratique dermatologique, ni la griséofulvine, ni le kétoconazole sont prescrit pour le traitement des onychomycoses. La terbinafine est à ce jour l'antifongique systémique le plus efficace avec une durée de prescription plus courte.

### **5.3.2. Traitements locaux**

Sont généralement utilisés dans le cas d'une mycose débutante sans atteinte matricielle ou comme complément d'un traitement systémique. Ils inhibent la croissance du champignon responsable grâce à une action anti-métabolique. Quatre familles d'antifongiques sont généralement utilisées: imidazolé, polyène, morpholine et hydroxypyridone. Disponibles sous différentes formes galéniques : crèmes, lotions, solutions, poudres.

- Le bifonazole 1 %, associé à l'urée à 40 % (Amycoronychoset®).

Cette association permet de ramollir la tablette unguéale afin de faciliter son découpage, avec renouvellement quotidien pendant une à trois semaines, puis l'application seule du bifonazole (Amycor crème®) jusqu'à la repousse complète de l'ongle. La guérison mycologique est obtenue dans 50-60 % des cas (Chabasse et Pihet, 2014).

- L'amphotéricine B (Fungizone®)

Elle existe sous forme de lotion dermique. Elle est active *in vitro* sur le genre *Candida* et la plupart des moisissures. Elle ne pénètre pas dans la tablette unguéale, mais s'applique sur le lit de l'ongle après découpage de la tablette (Chabasse et Pihet, 2014; Feuilhade de Chauvin, 2014; Monod *et al.*, 2013).

- L'amorolfine (Loceryl®)

C'est un dérivé de la morpholine avec une activité antifongique et fongistatique, introduite en 1981. Elle inhibe la synthèse de l'érgostérol sur deux niveaux : inhibant delta 14 réductase et delta 7-8 isomérase, qui affecte la synthèse de la membrane de l'agent pathogène.

L'Amorolfine est efficace contre les dermatophytes (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp.), les levures (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Malassezia* spp.), des moisissures (*Alternaria* spp., *Hendersonula* spp., *Scopulariopsis* spp.) et d'autres champignons pathogènes (*Cladosporium*, *Coccidioides*, *Histoplasma*, *Sporothrix*) mais pas contre les bactéries, à l'exception *Actinomyces*. La concentration de cette molécule augmente de 5% à 27% avec l'évaporation du solvant. Les propriétés pharmacocinétiques montrent une bonne

pénétration à travers la tablette unguéale avec une faible absorption de la substance active en circulation (Tabara *et al.*, 2015).

- Le ciclopirox ou l'hydroxypyridone (Mycoster verni®):

Ciclopirox est un dérivé d'hydroxy-pyridone. Il était étudié en 1973 mais utilisé pour la première fois dans les années 1990. Contrairement aux autres antifongiques, cette molécule n'affecte pas le cycle de l'ergostérol. Elle exerce son activité antifongique en chélatant les cations trivalents comme le  $Fe^{3+}$  et  $Al^{3+}$ , ce qui conduit à l'inhibition des enzymes dépendantes d'un métal, en particulier les cytochromes, catalases, peroxydases conduisant à la réduction du transport des ions à travers les membranes cytoplasmiques des agents pathogènes et réduit l'apport en nutriments. À forte concentration, cette molécule altère la perméabilité cellulaire et inhibe l'activité respiratoire des champignons (Tabara *et al.*, 2015).

Le ciclopirox a un large spectre d'action. En effet, Il est actif contre les dermatophytes (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton floccosum*), les levures (*Candida* spp., *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*), les moisissures (*Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium solani*).

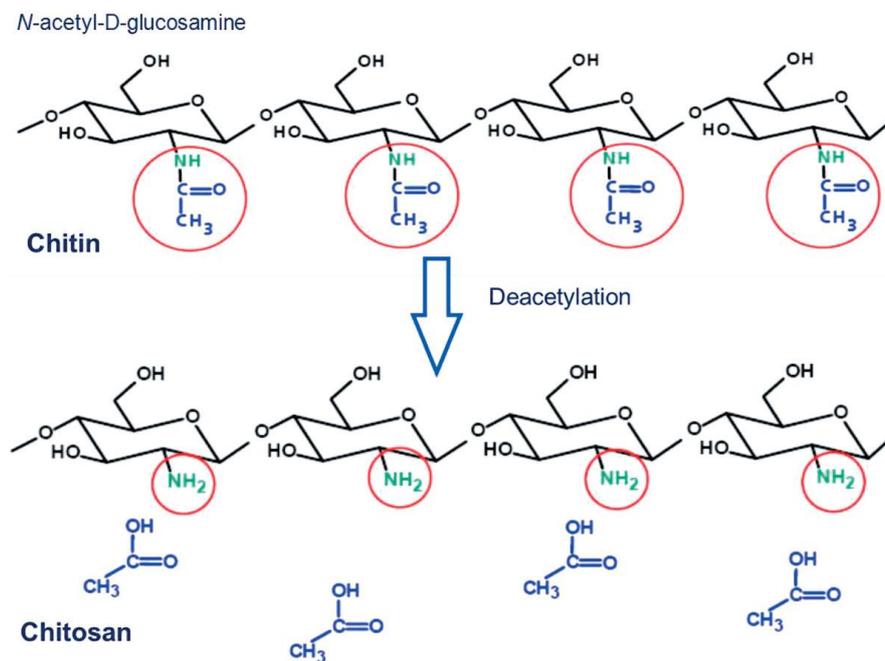
Récemment, pour une meilleure efficacité, d'autres méthodes thérapeutiques améliorant l'absorption du traitement local peuvent également être utilisées tel que l'ionophorèse, le laser et la thérapie photodynamique, les nano-émulsions et enfin des biopolymères hydrosolubles (Tabara *et al.*, 2015). Ces derniers aident à la pénétration du principe actif de l'antifongique dans l'ongle, en utilisant l'hydroxypropyl-chitosane (HPCH), synthétisé à partir du chitosane, comme agent filmogène pour les vernis à base d'antifongiques. Cette technique s'est montré plus efficace en comparant ses résultats avec ceux du vernis classique à base de ciclopirox uniquement. Ces solutions filmogènes, à base de chitosane (L'HPCH) auraient un meilleur contact et une plus forte adhésion avec la kératine unguéale (Baran *et al.*, 2009).

L'amorolfine et le ciclopirox, existent sous forme de solution filmogène à 5% et 8%, respectivement. Elles diffusent rapidement à travers la kératine de la tablette et leur rémanence y est suffisante pour qu'elles conservent leur action fongicide 7 jours après la dernière application pour l'Amorolfine, et de 7-14 jours pour le Cyclopirox.

## CHAPITRE II. LE CHITOSANE

### 1. La chitine

La chitine est le deuxième polysaccharide naturel répandu dans la nature après la cellulose (Kumari et Rath, 2014). C'est un amino-polysaccharide ayant des groupements acétamide en position C-2 à la place des hydroxyles (Figure 9). Sa structure chimique est un enchainement d'unités monomères constitutives N-acétyl-β-D-glucosamine reliées par une liaison glycosidique (1-4) (Kurita, 2006).



**Figure 9:** Structure de la chitine et du chitosane produit par desacétylation  
(Kaur et Dhillon, 2014)

La chitine constitue l'élément structurel de plus de 10<sup>6</sup> espèces, tels que les crustacés, insectes, crevettes, homards, crabes, calamars. Elle est généralement associée à des protéines et forme un complexe orienté de façon définie et contribue à la cohésion des différentes couches qui constituent la coquille des mollusques, la carapace des arthropodes, les cuticules des insectes et la carapace des crustacés. Elle joue un rôle dans des forces mécaniques servant à intégrer les régions flexibles et coordonner le changement au cours de la formation de

coquille. Elle est aussi l'élément de maintien et de rigidité de la cellule, elle contribue aussi au contrôle de la pression osmotique (Crini *et al.*, 2009). Dans le règne végétal, la chitine se trouve dans la paroi de certaines algues chlorophycées. Elle est aussi présente chez la plupart des champignons, certaines bactéries et levures.

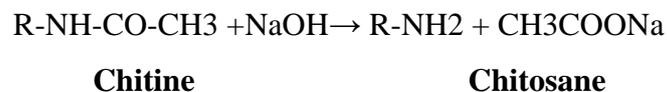
Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la chitine est le composant de base présent dans les cloisons primaires entre cellules mère et fille. Elle joue un rôle vital dans le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire des champignons et du septum, car elle fournit la force à travers les liaisons hydrogènes de plusieurs chaînes de chitine disposées en microfibrilles (Minke et Blackwell, 1978). Elle représente seulement 1-2% du poids sec des levures (Klis, 1994) et environ 40-45% du poids sec des champignons filamenteux (Bartnicki-Garcia et Lippman, 1969).

Cependant, la chitine peut ne pas être présente chez tous les champignons, les quantités de chitine peuvent dépendre des changements physiologiques dans l'environnement naturel ainsi que sur les conditions de fermentation fongique (Kisser *et al.*, 1980).

## 2. Le chitosane

Contrairement à la chitine, le chitosane est peu répandu dans la nature. Il se trouve chez certains champignons (les zygomycètes) et dans la paroi abdominale des reines de termites.

Le chitosane est un polysaccharide appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. La désacétylation de la chitine permet d'obtenir le chitosane qui est un copolymère linéaire à arrangement aléatoire d'unités D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine reliées par des liaisons  $\beta$  (1-4) (Crini *et al.*, 2009).

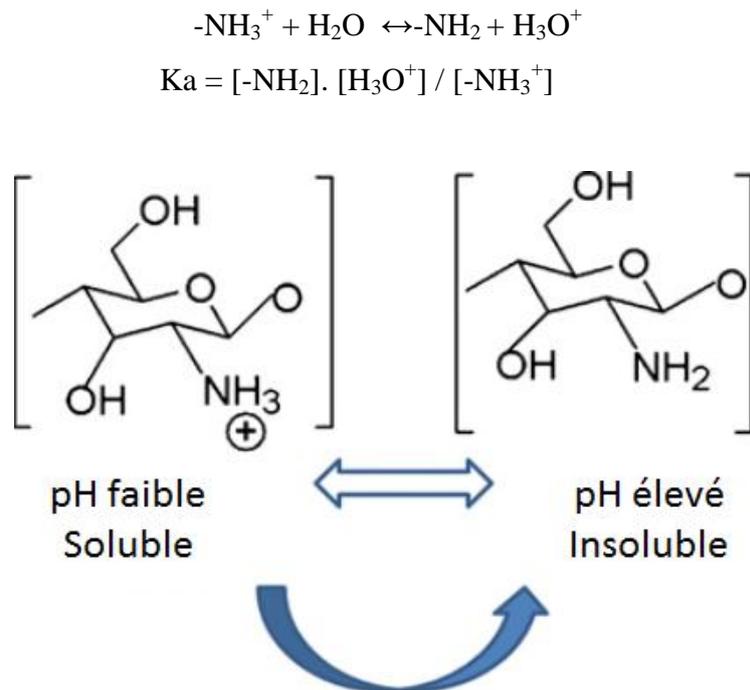


Le terme « chitosane » est donc limité à toute chitine suffisamment N-déacétylée avec un faible degré d'acétylation (DA), pour être soluble en solutions acides. Sa structure chimique idéale est un enchainement de monomères  $\beta$  (1-4) -D-glucosamine.

Le chitosane possède trois groupements fonctionnels réactifs en positions C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>6</sub>, un groupement amine et deux groupements hydroxyyles respectivement (Figure 9).

### 3. Comportement du chitosane en milieu acide

Grâce à ses groupements amines libres, le chitosane est l'un des rares polyélectrolytes naturels cationiques qui se distingue des autres polymères naturels et a un pKa proche à 6,3. Il se dissout en milieu acide par protonation de ses fonctions amine (Figure 10). En dessous de ce pKa, le biopolymère est soluble dans l'eau acidifiée et a une charge positive (Kurita, 2006; Shahidi and Abuzaytoun, 2005; Shahidi *et al.*, 1999).



**Figure 10** : Illustration de la versatilité du chitosane. À pH acide ( $\text{pH} < 6$ ), groupements amine protonés (chargés positivement) (Crini *et al.*, 2009).

### 4. Propriétés physico-chimiques du chitosane

#### 4.1. Le Degré de désacétylation (DD)

Le paramètre DD qui est un paramètre structural et extrêmement important car il influence les propriétés physico-chimiques des chaînes macromoléculaires des polymères et leur comportement en solution, à savoir :

- (1) la solubilité du chitosane
  - (2) la flexibilité des chaînes macromoléculaires
  - (3) la conformation du polymère
  - (4) la viscosité des solutions.
- Il influence également les propriétés biologiques (Chatelet *et al.*, 2001).

En réalité, la distinction entre chitine et chitosane, est fondée indirectement sur le taux de désacétylation ou sur la solubilité du matériau dans une solution d'acide acétique qui a été prouvé par Rouger en 1859. Dans le cas du chitosane commercial, la valeur supérieure à 70%, détermine la limite de solubilité de ce polymère dans des solutions acides diluées ( $2 < \text{pH} < 6$ ).

Généralement, le traitement alcalin donne une désacétylation partielle. En effet, pour obtenir une désacétylation totale, il conviendrait de procéder à une série de traitements successifs avec le risque de voir diminuer la PM du polymère (Crini *et al.*, 2009).

#### **4.2. La Masse moléculaire (Poids moléculaire)**

La seconde caractéristique importante du chitosane est la masse moléculaire (MM), qui peut affecter la solubilité et le DD du chitosane et ses propriétés rhéologiques notamment sa viscosité. Sa PM dépend de sa source et du procédé de fabrication qui peut induire une dépolymérisation ou une dégradation des chaînes macromoléculaires et des conditions de désacétylation telles que le temps d'incubation, la température et la concentration de la base utilisée. Le chitosane obtenu à partir de la désacétylation de la chitine des crustacés peut avoir une PM supérieure à 100 kDa. Par conséquent, il est crucial de réduire la PM par des méthodes chimiques ou enzymatiques pour faciliter ses applications et surtout augmenter son activité biologique.

### **5. Sources du chitosane**

#### **5.1. Extraction à partir des crustacés**

Traditionnellement, la source majeure du chitosane commercial provient de la désacétylation de la chitine d'origine animale tirée des résidus de déchets d'exosquelettes de crustacés comme les crevettes et les crabes, qui représentent les deux sources naturelles les plus abondantes. De nombreuses méthodes ont été développées afin de préparer la chitine à partir des exosquelettes. De manière générale, elles consistent à éliminer les éléments minéraux (déminéralisation), les protéines (déprotéinisation) et la couleur (blanchiment).

La chitine sera donc traitée par désacétylation chimique en utilisant une solution alcaline à haute température  $\geq 100$  °C, concentré (40-50% w / v) pendant plusieurs heures (Roberts, 1992), pour enlever certains ou tous les groupements acétyles de la chitine.

Les carapaces de crustacés contiennent environ 30-40% de protéine, 30-50% de carbonate de calcium, et 20-30% de chitine par rapport au poids sec. Cependant, le chitosane obtenu par de tels traitements souffre de certaines incohérences, comme la contamination des protéines, des degrés de désacétylation non homogènes et haut poids moléculaire (MW), qui se traduisent par des caractéristiques physico-chimiques variables (Knorr and Klein, 1986).

Il y a d'autres problèmes, tels que la pollution de l'environnement, en raison de la grande quantité de déchets (solution alcaline concentrée), la limitation saisonnière de l'approvisionnement de la coquille de fruits de mer et les coûts de production élevés (Tableau 3).

### **5.2. Extraction à partir de la paroi cellulaire des champignons**

Alternativement, les champignons sont la plus grande source de chitine dans le sol avec à peu près 6-12% de chitine allant de 500 à 5000 kg / ha (Shahidi et Abuzaytoun, 2005).

La quantité de chitine peut aller de traces jusqu'à 40-45% de la fraction organique, le reste étant principalement des protéines, lipides, glucanes et mannanes (Roberts, 1992).

Le mycélium de plusieurs champignons a été considéré comme sources possibles de chitine et de chitosane en raison de leur présence dans les parois des cellules. La biomasse fongique est donc considérée comme étant une source de chitine riche et peu coûteuse, pouvant être exploitée pour l'extraction de ces deux polymères par des méthodes non polluantes pour l'environnement.

La production et la purification du chitosane à partir des parois cellulaires des champignons cultivés dans des conditions contrôlées offrent un plus grand potentiel de produits de meilleure qualité (haute pureté, reproductibles, hypoallergéniques). En effet, certaines autorités de la santé suggèrent, éviter les matériaux d'origine animale pour des applications biomédicales, pour des raisons sanitaires liées à l'encéphalite spongiforme bovine (maladie de la vache folle) (Crini *et al.*, 2009).

Le chitosane peut être obtenu par simple fermentation fongique indépendamment de la saison ou de l'emplacement géographique, son extraction peut être considérée comme une approche verte, car elle est réalisée par des traitements acides et alcalins plus doux, en la comparant aux autres procédés d'extraction chimiques (Tableau 3).

En outre, les mycéliums fongiques sont pauvres en matières minérales par rapport aux carapaces de crustacés, et le traitement de déminéralisation n'est pas nécessaire pendant le traitement (Teng *et al.*, 2001). Aussi, l'utilisation des déchets du mycélium fongique résultant de divers procédés biotechnologiques satisfait le concept de bioraffinerie.

**Tableau 3:** Comparaison entre l'extraction à partir des crustacées et à partir des champignons (avantages et inconvénients)

	Carapace des crustacées	Paroi des champignons
<b>Avantages</b>	- Méthode stable pour une production industrielle (Aranaz <i>et al.</i> , 2009)	-Poids moléculaire Moyen-faible qui (approprié pour les applications biomédicales) -DD Plus élevé. -Dépourvu de protéines allergisantes -Poids moléculaire et DD contrôlables (variation des paramètres de fermentation) -Procédé non couteux + substrat bon marché (Marikani Kannan, 2010).
<b>Inconvénients</b>	-Saison limitée, coût élevé, polluante pour l'environnement (Grandes quantités de produits chimiques) -Températures plus élevées, temps de traitement long. -Traitement de déminéralisation nécessaire. -Poids moléculaire important. -Contamination des protéines qui limite ses applications dans le biomédical.	-Ne peut pas être appliqué à grande échelle industrielle (Scale- up)

## 6. Méthodes de caractérisation du chitosane

### 6.1. Le degré de désacétylation

La caractérisation d'un échantillon de chitosane exige la détermination de son DA moyen. La solubilité du chitosane est affectée par la répartition des groupements acétyles (aléatoires ou bloc à bloc) le long de la chaîne.

La recherche de méthode rapide, convivial, économique et précise pour déterminer le DA a été l'une des préoccupations majeures au cours de nombreuses décennies. Il existe plusieurs techniques destructives ou non destructives pour mesurer le DA, telles que IR, FTIR, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectroscopie UV, le gaz de pyrolyse, chromatographie par perméation de gel (CPG), analyse thermique, l'hydrolyse acide, la méthode d'absorption de colorant et diverses méthodes de titration (Kasaai, 2008). La spectroscopie FTIR est considérée comme la technique la plus adaptée car elle est rapide, simple, économique et adaptée pour les deux types d'échantillons solubles et non solubles (Duarte *et al.*, 2002). C'est aussi une technique utile pour la détermination du DA du

chitosane en se basant sur le rapport entre l'absorbance de la bande amide II à environ 1655 cm<sup>-1</sup> et la bande CH à 3450 cm<sup>-1</sup> (Roberts, 1992).

La RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) donne aussi des valeurs de DA, mais plus précises, à condition que le polymère soit parfaitement soluble dans l'eau deutériée en présence d'acide chloridrique par exemple.

La spectroscopie RMN du proton est une méthode pratique et précise pour déterminer la structure chimique du chitosane et ses dérivés (Kasaai, 2008). La mesure par RMN des composés de chitosane sont cependant limitées à des échantillons qui sont solubles dans le solvant, ce qui limite l'analyse de chitosane avec des valeurs inférieures à DA= 0,3.

Des méthodes à coût faible et rapides, telle que la titration ou adsorption du colorant, peuvent également être utilisées. Ce sont des méthodes rapides et pratiques donnant des résultats comparatifs.

## **6.2. Le poids moléculaire (PM)**

La solubilité des échantillons et la dissociation des agrégats souvent présents dans des solutions de polysaccharide est le principal problème rencontré lors du calcul du PM.

La sélection du solvant devient impérative quand le PM doit être calculé à partir de la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  en utilisant la relation de Mark-Houwink Sakurada-  $[\eta] = K \times M^a$ . Où K et l'exposant 'a' sont des constantes viscosimétriques à la fois pour un système de solvant polysaccharide donné bien défini. Les valeurs des paramètres "K" et "a" dépendent à la fois du système polymère-solvant et de la température. L'exposant "a" est un paramètre de conformation polymère qui diminue avec l'augmentation de compacité moléculaire.

Il est bien connu que, dans les solutions aqueuses, les polymères de polyélectrolytes sont élargis par les forces de répulsion électrostatique entre les groupements chargés et, par conséquent, leur viscosité diminue de façon linéaire avec l'augmentation de la force ionique. Afin de caractériser les propriétés des polymères, telles que la viscosité intrinsèque et le PM, il est nécessaire de choisir le système de solvant approprié pour éliminer les effets ioniques.

La PM du chitosane peut également être mesurée par GPC, diffusion de la lumière, ou viscosimétrie (Brugnerotto *et al.*, 2001). Cette dernière est l'une des méthodes les plus couramment utilisées, en raison de sa simplicité, bien que sa précision soit influencée par de nombreux facteurs, tels que la concentration, la température, la force ionique, le pH et le type d'acides ainsi que le PM.

## **7. Principales applications du chitosane**

Le développement d'applications pour le chitosane dans différents domaines a augmenté rapidement ces dernières années en raison des caractéristiques suivantes: (1) possède une structure chimique définie; (2) polycationique, inoffensif, biodégradable et biocompatible avec de nombreux organes, tissus et cellules; (3) physiquement et biologiquement actif; (4) peut être modifié chimiquement ou enzymatiquement et (5) peut être transformé en plusieurs formes, poudres, gels, membranes, éponges, cotons et fibres (Aranaz *et al.*, 2009).

### **7.1. Domaine biomédical et pharmaceutique**

Actuellement, le chitosane a suscité beaucoup d'intérêt dans les domaines médical et pharmaceutique car il est biocompatible, biodégradable et non toxique. Par ailleurs, d'autres propriétés ont également été rapportées (Kumar *et al.*, 2004) comme étant un agent antimicrobien, antioxydant, analgésique, anti-tumoral, hémostatique, mucoadhésif et anti-cholestérol.

L'utilisation thérapeutique du chitosane est plus ou moins récente. Il est utilisé en médecine classique comme systèmes de délivrance « véhicule » de médicaments polaires et d'autres substances thérapeutiques (peptides, protéines, vaccins et ADN) (Aranaz *et al.*, 2009). En effet, le chitosane est révélé être sans danger dans la formulation médicamenteuse au cours des dernières décennies (El-Kamel, 2007). Il a attiré l'attention comme étant un excellent mucoadhésif et bioadhésif naturel qui peut adhérer aux tissus durs et mous. Une bonne adhérence a été trouvée dans les tissus épithéliaux et dans la couche de mucus présente sur la surface des tissus. Zarzycki et Modrzejewska ont montré que celui-ci peut être utilisé dans la fabrication des organes ou des tissus artificiels.

Aussi, les tests cliniques effectués en utilisant des biomatériaux à base de chitosane n'ont pas entraîné d'effets inflammatoires ou allergiques après l'implantation, l'injection, l'application topique ou l'ingestion dans le corps humain (Tharanathan et Kittur, 2003).

Il a été utilisé dans l'immobilisation enzymatique, la cicatrisation des plaies (fils de suture résorbables, pansements, peaux artificielles). Il renforce le système immunitaire, diminue les risques d'hypertension et de cancer, contrôle le niveau de cholestérol et de sucre dans le sang, régule le transit intestinal, prévient le phénomène de vieillissement. C'est aussi un agent antifongique et bactériostatique et un spermicide efficace.

## **7.2. Application alimentaire**

C'est le domaine qui utilise le plus le chitosane. Ce dernier a consommé 1000 tonnes en 2000. Il est souvent utilisé comme ingrédient alimentaire en Asie et plus particulièrement au Japon, le « leader » en production, commercialisation et consommation. On y trouve de nombreux produits alimentaires enrichis en chitosane tel que les nouilles et pâtes de soja, ainsi que des pilules amincissantes pour lutter contre l'obésité et des crèmes cosmétiques régénératrices et antirides, aussi aux Etats unis comme film comestible pour protéger les aliments et enfin en Europe où il est utilisé comme complément alimentaire dans des formulations diététiques).

Ce polysaccharide est considéré comme fibre alimentaire, car il n'est pas complètement dégradé au niveau du tube digestif humain. C'est un composant diététique crucial, il inhibe la métabolisation des graisses grâce aux interactions entre ses fonctions amines et les groupements carboxyliques des lipides il réduit de 20 à 30% le taux de cholestérol absorbé par le corps humain. Il est récemment utilisé pour la perte de poids chez les gens obèses (Mhurchu *et al.*, 2005). Il peut être utilisé pour épaissir, stabiliser et donner une bonne consistance dans la préparation des sauces et les différents plats culinaires. Dans l'industrie des boissons, Grâce à sa propriété floculante (coagulante), il est utilisé pour la clarification des jus ou pour la diminution des composés phénoliques dans les vins. Antioxydant des saucisses, inhibiteur enzymatique de brunissement des pommes, de poires et des pommes de terre.

## **7.3. Traitement des eaux usées**

Les propriétés tels que la non-toxicité, la biodégradabilité et le pouvoir de floculation, régénération et polyélectrolyte, font du chitosane un candidat de choix pour des applications environnementales tel que le domaine du traitement des eaux usées (Gerente, 2007).

Grâce à son caractère polycationique, il ouvre la porte, en traitement des eaux, à de nombreuses applications tels que: la coagulation/floculation, l'adsorption ou l'ultrafiltration, la chélation, pour complexer et concentrer une large gamme de polluants (molécules phénoliques et aromatiques) (Crini, 2006), aussi, des matrices polymères à base de chitosane sont utilisées pour immobiliser les microorganismes ou les boues dans le traitement des eaux usées (Krajewska, 2005).

#### **7.4. Domaine agricole**

Le chitosane semble être un produit très prometteur, par ses propriétés déjà éprouvées en agriculture, il agit comme un vaccin, il déclenche des mécanismes de défense à la plante et induit l'expression accrue de certaines enzymes (phytoalexines, chitinases, pectinases) et lignines. D'une manière intéressante, la présence de chitosane aux environs de la plante lui fait croire à une attaque de champignons pathogènes et ainsi réagit en stimulant sa croissance.

Il permet de résister au gel et améliore les propriétés mécaniques comme support de tiges, favorise une meilleure production de fruits.

En effet, en raison de ses propriétés phytosanitaires, au Japon, une solution diluée de chitosane est utilisée fréquemment avant la cueillette des oranges, afin de diminuer la perte de fruits due aux manipulations pouvant contaminer les fruits (Beaulieu, 2007).

#### **7.5. Nouvelles applications**

Ce sont les membranes et les nanomatériaux à base de chitosane qui suscitent actuellement de nombreuses recherches (Dash *et al.*, 2011). En effet, en chimie, le chitosane trouve son application en tant que super-absorbants, phases stationnaires pour chromatographie et l'osmose inverse, capteurs ou support pour la catalyse (Kaur et Dhillon, 2014).

Un autre domaine potentiel, est celui des peintures, qui constitue la méthode la plus efficace pour lutter contre le développement et l'agglutination des bactéries et des algues sur les parois des navires par exemple. Cette peinture permet d'augmenter leur durabilité et leur hydrodynamicité et diminue ainsi leur consommation du carburant. Ces peintures sont aussi utilisées au niveau des hôpitaux comme peintures antibactériennes (Crini *et al.*, 2009).

Dans l'industrie papetière, le papier synthétisé avec du chitosane (surface plus lisse) résiste mieux à l'humidité, ce qui est avantageux pour le domaine de la photographie.

## CHAPITRE III : LES ZYGOMYCETES ET LE CHITOSANE

### 1. Généralités sur les zygomycètes

Le royaume des champignons comprend quatre embranchements; Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota et Basidiomycota. Les Zygomycota sont divisés en deux classes, Trichomycètes et Zygomycètes (Richardson, 2009), ces derniers sont composés de 4 ordres, 32 familles, 124 genres et 870 espèces, seulement environ 1% des espèces sont connues. Ce sont des champignons filamenteux, non cloisonnés, ubiquitaires et saprophytes, colonisateurs à croissance rapide, se nourrissant de la matière organique morte, et capables de se développer sur une large gamme de substrats sans exigences de croissance (sources de carbone, températures, taux d'oxygénation et valeurs de pH différents) (Ferreira *et al.*, 2013). En effet, ils sont amylolytiques (fermentation de d'amidon) et capables de consommer des pentoses (saccharification).

Compte tenu de leurs propriétés structurales et physiologiques, les Zygomycètes reçoivent une grande attention dans le domaine biotechnologique. En effet, ils ont longtemps été utilisés dans la production alimentaire animale et humaine, en particulier les aliments fermentés en Chine et en Sud-Est d'Asie, tels que le tempeh et le tofu (Ferreira *et al.*, 2013). En outre, la biomasse des Zygomycètes contient des quantités bénéfiques en protéines, lipides, acides aminés et en chitine et chitosane.

Chez les Zygomycètes, ce dernier est produit naturellement dans la paroi cellulaire en plus de la chitine et représente l'ingrédient fibreux majeur de cette classe par rapport aux autres classes de champignons (Synowiecki et Al-Khateeb, 2003; Tan *et al.*, 1996). Il peut occuper jusqu'à 50% de leur paroi (Zamani *et al.*, 2010), en particulier chez l'ordre des Mucorales : *Mucor*, *Absidia* et *Rhizopus* (Hang, 1990; Tan *et al.*, 1996).

Il est à noter que des chitosanes obtenus à partir de différentes espèces de champignons ont été testés dans diverses applications (Tableau 4).

**Tableau 4. Application du chitosane fongique** (Nwe *et al.*, 2011)

Espèce	Applications
<i>A. glauca</i> var. <i>paradoxa</i>	Clarification du jus de pomme
<i>Rhizopus oryzae</i>	Agent antibactérien
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Chélateur des métaux lourds
<i>Aspergillus niger</i>	Support pour chromatographie
<i>Gongronella butleri</i>	Regeneration des tissus Stimulateur de croissance des plantes

La quantité et la qualité de chitosane extrait de mycélium fongique diffère selon l'espèce fongique, le milieu de fermentation et sa concentration en éléments nutritifs, son pH, la durée et le type de fermentation (Solide ou liquide) ainsi que le procédé d'extraction du chitosane (Nwe *et al.*, 2011).

Plusieurs recherches ont été faites dans ce domaine, et l'évaluation du taux de chitosane extrait à partir de plusieurs champignons a été mesuré (*Absidia*, *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*..), en SMF (submerged fermentation) ou en SSF (Solid State Fermentation). Cette dernière technique était meilleure pour la production du chitosane. Cependant, elle peut aussi avoir des inconvénients au moment de la séparation de la biomasse du substrat utilisé (séparation solide/ solide).

En outre, Jaworska et Szewczyk ont rapporté la production de chitosane à partir d'*Absidia* en fermentation batch, fed-batch et continue (Nwe *et al.*, 2011). Ils ont indiqué que la fermentation en batch était la meilleure en donnant de plus grandes quantités en chitosane par rapport aux autres procédés de fermentation.

## **2. L'espèce *Rhizopus oryzae***

*Rhizopus oryzae* semble être parmi les espèces les plus productrices de chitosane avec un degré de désacétylation (DD) élevé. Dans une étude comparative faite par Pochanavanich et Suntornsuk (2002), cette espèce a montré le taux le plus élevé en chitosane et qui était de 138 mg/g de poids sec (14% de chitosane dans sa paroi).

En outre, le taux de désacétylation du chitosane extrait à partir de ce champignon peut atteindre des valeurs de 84- 90% (Nwe *et al.*, 2011). Ces valeurs sont relativement inférieures à celles obtenues à partir des crustacés. Ce paramètre (Le degré de désacétylation) est important, car il affecte les propriétés physico-chimiques du chitosane. En effet, ce biopolymère, avec un haut degré de désacétylation a des charges positives élevées, donc plus approprié pour des applications alimentaires, ou comme agent coagulant, chélateur, de clarification ou d'un agent antimicrobien (Aranaz *et al.*, 2009).

## 2.1. Taxonomie

*Rhizopus oryzae* appartient au phylum des Fungi; sous division des Mucoromycotina; à l'ordre des Mucorales; au sous-ordre des Mucorineae; à la famille des Rhizopodaceae et au genre *Rhizopus* (selon NCBI).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1810496&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

## 2.2. Cycle de vie

Les Mucorales ont une croissance rapide et abondante. Ils sont oligotrophes à mésotrophes et colonisent les substrats riches en hydrates de carbone. Ils sont omniprésents dans la nature au niveau des sols agricoles et forestiers des zones tempérées et sont largement trouvés sur les substrats organiques, y compris le pain, fruits en décomposition, matières et débris végétaux (Richardson, 2009).

Les Zygomycètes, en général, peuvent se développer par la formation de spores sexuées (zygospores), ou quand les conditions sont meilleures par des spores asexuées (mycélium végétatif), la majorité des zygomycètes ont une reproduction asexuée (Figure 11) (Nwe *et al.*, 2011).

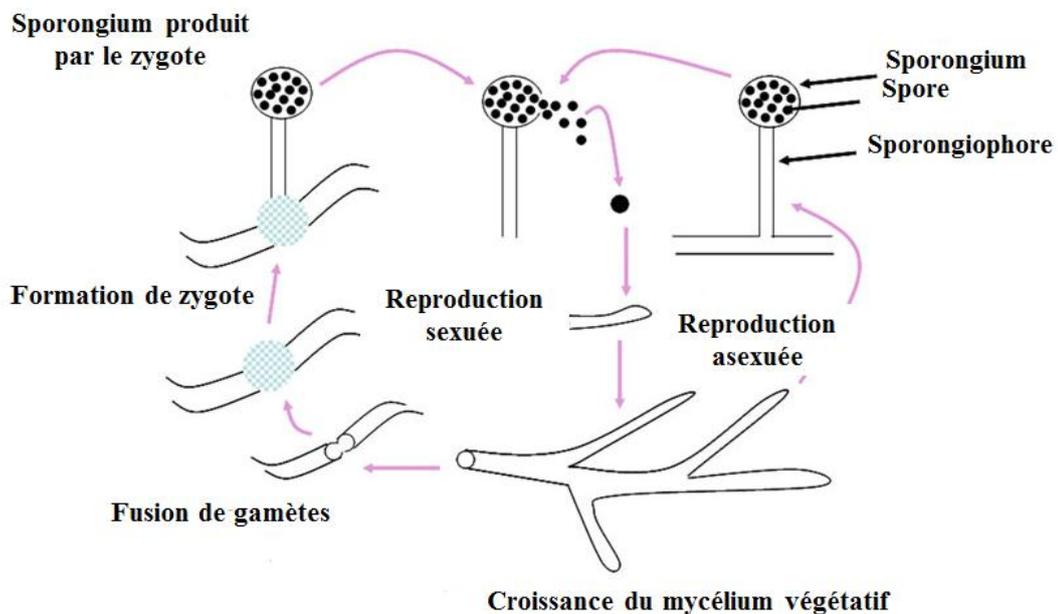
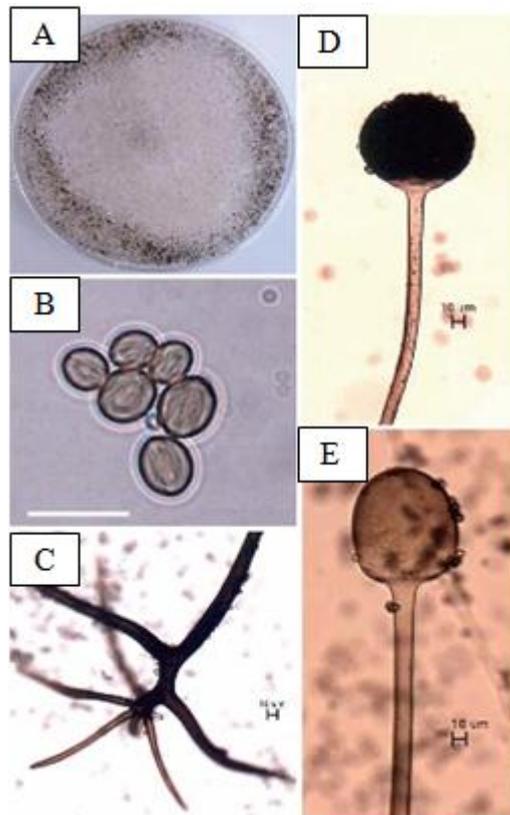


Figure 11: Cycle de vie des Zygomycetes (Nwe *et al.*, 2011)

### 2.3. Morphologie

Les colonies de *Rhizopus oryzae* sont blanches, puis deviennent brun-gris à gris noirâtre, sur le milieu PDA et croient rapidement en donnant des stolons sur le substrat (Figure 12A). La température optimale pour la croissance du mycélium est 30°C, avec une bonne croissance observée à 37°C. Microscopiquement, les sporanges sont globuleux, blancs au début, puis deviennent noirs avec beaucoup de spores (Figure 12), mesurant la plupart du temps entre 30 ~ 200 µm. Les sporangiospores sont très nombreuses, irrégulières, ovales ou en forme de citron, striées, mesurant entre 4 ~ 10 µm (Figure 12B). Les rhizoïdes et stolons sont brun foncé (Figure 12C). Sporangiphores sont généralement longs, à paroi lisse, simple ou ramifié, non cloisonnées (Figure 12D). Au bout des stolons sont nés les rhizoïdes. Les columelles sont globuleuses, brun pâle, mesurant entre 90 ~ 110 µm (Figure 12E) (Kwon *et al.*, 2012).



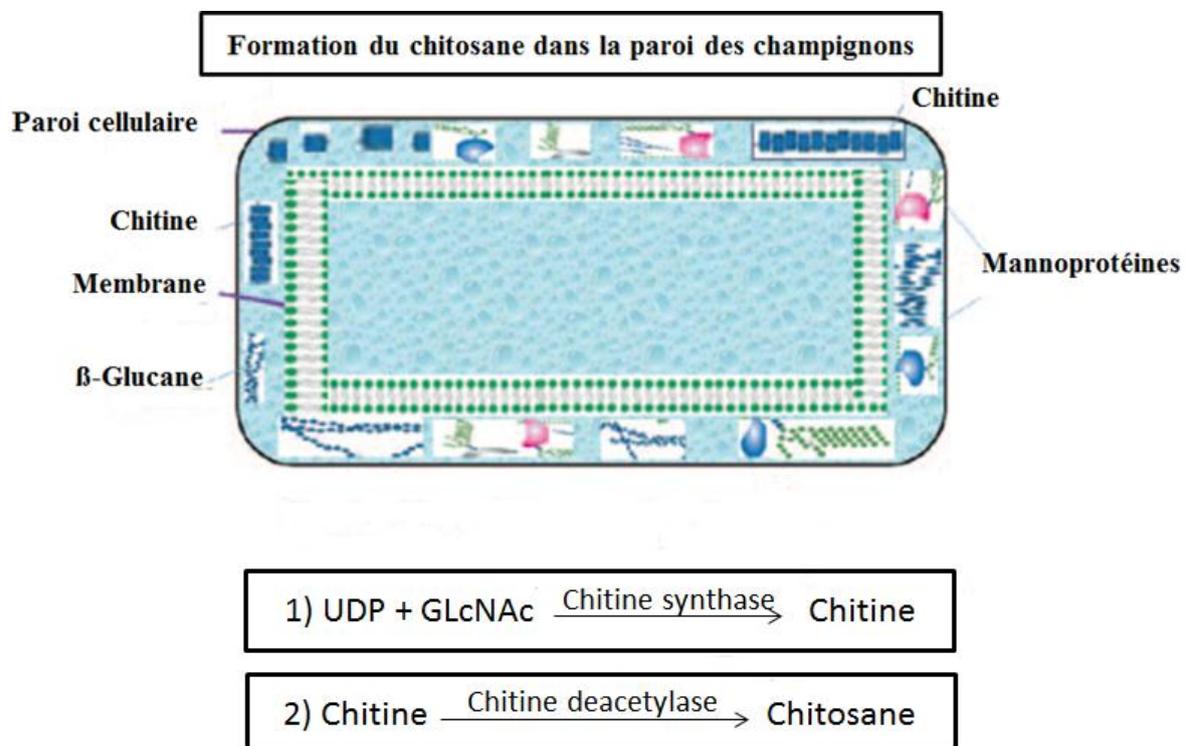
**Figure 12:** *Rhizopus oryzae*; A, Colonies sur PDA après 3 jours d'incubation; B, Sporangiospores (Echelle bar = 10 µm); C, Rhizoïdes; D, Sporangium et sporangiophore; E, Columelle (Kwon *et al.*, 2012).

## 2. Métabolisme du chitosane au niveau de la paroi des zygomycètes

Le chitosane présent dans la paroi des Mucorales est synthétisé par l'enzyme chitine-déacétylase (CDA) qui agit efficacement pour convertir la chitine en chitosane. Cette enzyme est synthétisée à proximité des régions où la chitine traverse la membrane plasmique. Ensuite, elle agit sur les chaînes naissantes de la chitine et les convertit en chitosane.

Les Mucorales produisent le chitosane au cours de la phase de croissance végétative (Orlowski, 1991), tandis que d'autres champignons, tel que *S. cerevisiae*, le produit seulement pendant la phase de sporulation.

La formation de chitosane dans les parois cellulaires de champignons est le résultat d'une synergie complexe de l'CDA (Figure 13).



**Figure 13 :** La formation de chitosane au niveau de la paroi cellulaire des zygomycètes  
(Dhillon *et al.*, 2013)

Dans l'étape initiale, la chitine synthase synthétise une chaîne de chitine en utilisant le précurseur de la chitine, l'uridine-diphospho-N-acétylglucosamine (GlcNAc-UDP). Au cours de la biosynthèse de la chitine, des monomères de GlcNAc sont couplées dans une réaction catalysée par l'enzyme chitine synthase membranaire intégrale, un membre de la famille 2 de glycosyl transférase.

La polymérisation nécessite UDP et GlcNAc en tant que substrat et les cations divalents comme co-facteurs. La biosynthèse de la chitine peut être divisée en trois étapes distinctes:

(1) le domaine catalytique de la chitine synthase face au site cytoplasmique forme le polymère; (2) la translocation du polymère naissant à travers la membrane et sa sortie dans l'espace extracellulaire et (3) les polymères se rassemblent spontanément pour former des microfibrilles cristallines de diamètre et de longueur variable (Merzendorfer, 2006).

Dans la deuxième étape, l'enzyme CDA hydrolyse les groupements acétiques à partir de fragments GlcNAc de chitine, le transformant en glucosamine (GlcN) et enfin former le chitosane, comme illustré dans les équations (1) et (2) (figure 13). Cette dernière étape peut conférer une résistance à l'action des lysozymes (Dhillon *et al.*, 2013).

# Matériel et méthodes

## **PARTIE I : LES ONYCHOMYCOSES**

Dans cette présente partie, l'objectif premier est l'étude comparative de deux méthodes utilisées dans le diagnostic des onychomycoses. Une méthode classique qui a toujours été utilisée et adoptée dans les laboratoires de Mycologie, basée sur l'examen direct et les cultures (diagnostic 1) et une méthode de biologie moléculaire basée sur la PCR en temps réel, afin d'établir un diagnostic de certitude et d'identifier les espèces incriminées dans ce type d'infection (diagnostic 2).

### **1. Patients**

Il s'agit d'une étude réalisée entre Août 2012 et Mai 2014. 269 patients présentant des signes cliniques évoquant une onychomycose au niveau des ongles des mains et/ou des pieds, se sont présentés au niveau du service de Parasitologie et de Mycologie du CHU Constantine (Algérie).

Les patients sont âgés de 17 à 92 ans tout sexe confondu. Les enfants âgés entre 2 et 11 ans représentent 6.7% de l'ensemble des malades. Les malades provenaient de différentes régions de Constantine (Centre-ville, Bkira, Oued el Athmania, Didouche Mourad, El Hamma Bouziane, Ain Smara, Ali Mendjli, El Khroub).

Les patients ayant reçus un traitement local ou par voie systémique (générale) durant les trois mois précédant la consultation ont été exclus de l'étude.

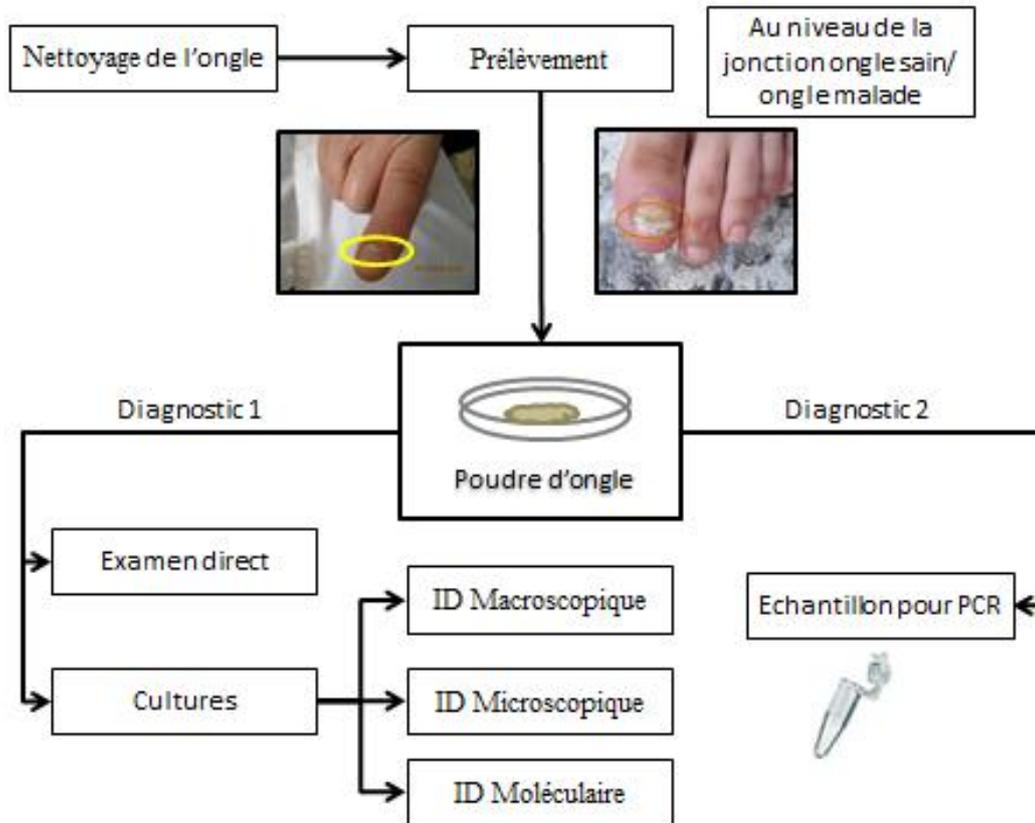
### **2. Méthodes**

#### **2.1. Prélèvement**

Le prélèvement est adapté à la clinique des lésions. Il est effectué là où le champignon est vivant, à la jonction ongle sain- ongle malade (le front d'attaque du champignon), là où le dermatophyte est le plus actif. Ce qui permet la pousse en culture (Chabasse et Pihet, 2008).

Dans la forme sous-unguéale disto-latérale, la plus fréquente des onychomycoses, les fragments d'ongles les plus externes pouvant être souillés par les moisissures saprophytes et colonisant la tablette unguéale sont éliminés. En cas de leuconychie superficielle, le grattage

est effectué à la partie blanche friable en surface après avoir nettoyé la tablette. Le matériel parasité (poussière d'ongle) est recueilli dans une boîte de Pétri, puis divisé en trois portions afin de réaliser (1) un examen direct (ED), (2) une culture sur les deux milieux et (3) Conservation de la poudre d'ongle dans un tube Eppendorf stérile à -20°C jusqu'au traitement par PCR (Figure 14). Au total 298 échantillons unguéaux ont été recueillis.



**Figure 14 :** Schéma récapitulatif des différentes techniques utilisées pour le diagnostic des onychomycoses.

## 2.2. Diagnostic classique à partir des fragments d'ongles (Diagnostic1)

### 2.2.1. Examen direct

Chaque échantillon, a été recueilli et placé directement entre lame et lamelle avec une goutte de KOH à 30% afin de digérer la kératine unguéale et laissant apparaître que les éléments fongiques (comme liquide éclaircissant): les filaments, spores ou levures présents dans le prélèvement. L'observation microscopique est effectuée à l'objectif X 40.

### **2.2.2. Cultures conventionnelles**

En raison de la présence fréquente de nombreuses bactéries et de champignons saprophytes au niveau de la peau ou des phanères, il est indispensable d'utiliser un milieu de culture sélectif.

Les échantillons d'ongles prélevés, ont été ensemencés en tube sur deux milieux gélosés, un milieu Sabouraud, additionné d'antibiotique(s) (chloramphénicol et gentamicine) et un milieu comprenant en plus 0,5 à 1 g/L de cycloheximide (Actidione) (Institut Pasteur, Alger). Cette dernière molécule inhibe la croissance de la plupart des moisissures ainsi que de certaines levures et favorise donc l'isolement des dermatophytes (Chabasse et Pihet, 2014; Nzenze Afène *et al.*, 2011).

Les cultures sont incubées à 27° C pendant 2-4 semaines. Avant de rendre des résultats négatifs, les cultures ont été examinées une à deux fois par semaine pour contrôler la pousse du champignon (Halim *et al.*, 2013; Nzenze Afène *et al.*, 2011). Des identifications macroscopique et microscopique sont réalisées.

### **2.2.3. Purification et conservation des souches isolées**

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, en réalisant des repiquages afin d'obtenir des souches pures. Ces dernières, ont été conservées selon deux techniques (Chabasse et Contet-Audonnoeu, 2007):

- Conservation des dermatophytes en gélose inclinée sur milieu Sabouraud conservation (Milieu peptoné à 3%) à + 4°C.
- Au congélateur à -20 °C dans des tubes à cryo-billes.

### **2.2.4. Méthodes d'identification**

L'identification des isolats fongiques a été réalisée au sein du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbiennes (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri – Constantine.

#### **2.2.4.1. Identification macroscopique**

Lors de l'examen macroscopique, on observe attentivement l'aspect du champignon, toutes les colonies doivent être identiques. En cas d'association, un repiquage des colonies est nécessaire. On note la consistance des colonies (glabre, duveteuse, poudreuse, plâtreuse, etc.), leur surface (plane, en dôme, plissée, cérébriforme), couleur du recto et du verso et enfin, la présence ou l'absence d'un pigment diffusible dans la gélose (Koenig, 1995).

Afin de favoriser la fructification (sporulation) de quelques dermatophytes et de différencier la variété duveteuse autochtone de *T. rubrum* de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Les colonies ont été repiquées sur des milieux spécifiques, tel que Borelli, PDA, Urée de Christensen. Ce dernier possède une uréase qui fait virer la gélose au rose fuchsia après 6 à 7 jours d'incubation à 27°C, tandis que *T. rubrum* autochtone en est dépourvue.

Les levures ont été identifiées en utilisant les caractères morphologiques après subculture à 27°C sur milieu RAT (Rice Agar Tween) et sur sérum (tests de filamentation) afin de détecter, respectivement, les chlamydospores et les pseudo-filaments si présents. Des galeries AuxaColor™ 2 (Bio Rad, France) ont été utilisées dans le but d'identifier avec certitude l'espèce étudiée (dans le cas où les deux tests précédents étaient négatifs).

#### **2.2.4.2. Identification microscopique**

L'examen microscopique a été réalisé selon deux techniques distinctes :

- Prélever un fragment de colonie à l'aide d'une anse de platine, le déposer sur une lame, le dissocier avec une goutte de lactophénol ou le bleu-lactophénol et examiner entre lame et lamelle.
- Technique du drapeau (drapeau de Roth): lorsque l'observation de la conidiogénèse est impossible, à l'aide d'un morceau de ruban adhésif, appliqué à la surface de la colonie le prélèvement est réalisé et déposer entre lame et lamelle, dans le bleu de lactophénol. L'observation est effectuée sous microscope optique à l'objectif X 40 (Chabasse et Contet-Audonneau, 2007; Koenig, 1995).

L'observation microscopique est basée sur la taille des spores, leur forme, la façon dont elles sont rattachées aux filaments (conidiogénèse), en chaîne ramifiées ou non, en amas, produites par des phialides ou non, présence ou absence de chlamydospores, formes, abondances ou absence des macro et microconidies, recherche des ornementsations

(excroissances triangulaires chez *T.rubrum*, organes pectinés, vrilles, organes perforateurs...) (Koenig, 1995).

### **2.2.4.3. Identification moléculaire des isolats**

#### **2.2.4.3.1. Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN pour cette PCR a été réalisée au sein du Laboratoire de Parasitologie et Mycologie de l'Université Claude Bernard-Lyon1 (France), en utilisant le kit d'extraction d'ADN QiaAmp (Qiagen, Germany).

L'ADN a été préparé à partir de cinq isolats purs et jeunes. Un petit fragment de mycélium a été transféré dans un tube de 1,5 mL contenant 200 µL d'eau physiologique, soumis à une sonication pendant 40 min afin de casser les cellules. Le reste de l'extraction a été effectué selon les instructions du fournisseur. L'ADN a été récupéré dans 50 µL de la solution de tampon ATE et 2 µL ont été utilisés pour l'amplification de l'ADN.

#### **2.2.4.3.2. Amplification de l'ADN**

Les deux amorces universelles (ITS 1 et ITS 4) ont été utilisées pour l'amplification en PCR. Leurs séquences sont: ITS 1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (Tm= 58°C) et ITS 4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Tm=65°C). La réaction d'amplification a été réalisée dans un LightCycler (Roche). Le mélange réactionnel (20 µL/ capillaire), contient 10,4 µL H<sub>2</sub>O, 1,6 µL MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de chacune des ITS 1 et ITS 4 (0,5 µM), 2 µL d'ADN isolé, 2 µL Master (SYBR Green + Enzyme ADN polymerase+ dNTP) (Tableau 5). 44 cycles d'amplification sont réalisés comme suit: une dénaturation pendant 10 s à 95°C, une hybridation pendant 10 s à 58°C et une élongation pendant 40 s à 72°C, suivie d'une étape d'extension finale pendant 5 min à 72 °C (dernier cycle). Toutes ces étapes sont précédées par une dénaturation initiale (préincubation) pendant 10 min à 95°C.

**Tableau 5:** Préparation du Mix PCR (pour un échantillon)

<b>Réactifs (Mix)</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentration finale</b>
H <sub>2</sub> O	10,4 µL	
MgCl <sub>2</sub>	1,6 µL	
ITS 1 (0,5 µM)	2 µL	0.5µM
ITS 4 (0,5 µM)	2 µL	0.5µM
ADN extrait	2 µL	
Master (SYBR Green + Enzyme ADN polymérase)	2 µL	

#### **2.2.4.3.3. Purification des produits PCR**

La purification des produits PCR pré-séquençage a été réalisée en utilisant le Kit (QiAquick PCR Purification) avant séquençage. Afin de purifier et laver les produits PCR des impuretés telles que les amorces, dNTP, les nucléotides marqués non incorporés, les enzymes et les sels de PCR. La purification a été effectuée selon les instructions du fournisseur. L'ADN amplifié pur a été récupéré dans 50 µL de tampon d'élution, conservé à +4°C et prêt pour le séquençage.

#### **2.2.4.3.4. Séquençage des produits PCR**

Les produits PCR purs sont séquencés au laboratoire Biofidal (Avenue Gabriel Péri 69120 Vaulx en Velin, Lyon France) selon la méthode de Sanger avec le Kit BigDyeTerminator V3.1 (société Lifetechnologies), en utilisant les amorces ITS1 et ITS4.

Une réalisation d'un mélange réactionnel contenant 0,5 à 1 µL d'Amorces (à 10 µM), 1 µL Ready Mix, 2 µL de dilution Buffer 5 X , 0,1 µL Taq (Termi Pol 5U/µl), 11 µL H<sub>2</sub>O. Pour l'ensemble des réactions, qui ont été reparti dans les puits de la plaque PCR où se trouve l'ADN déjà pur. La plaque a été scellée et placée dans le thermocycleur, 35 cycles ont été réalisés ; une dénaturation pendant 15s à 95°C, hybridation pendant 15 s à 51°C et élongation pendant 3 min à 60°C, refroidissement à 11°C, toutes ces étapes sont précédées par une dénaturation initiale pendant 3 min à 95°C.

Les résultats du séquençage des souches fongiques ont été obtenus sous deux formes : ChromasR (Chromatogramme) et Fasta (Séquences). Les séquences obtenues ont été comparées sur le logiciel BLASTn search sur le site de National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotidedatabase (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>). Afin de trouver des homologues et comparer nos séquences avec celles déposées dans Genbank.

#### **2.2.4.3.5. Analyse phylogénétique**

L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide du logiciel MEGA.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), après alignement des séquences (Kumar *et al.*, 2008). Ce logiciel se base sur des méthodes mathématiques et génère des arbres phylogénétiques représentant les relations entre organismes. Cet arbre est construit à l'aide de Neighborjoining, en utilisant les paramètres de substitution du modèle kimura 2. Le Bootstrap est calculé à partir de 1000 répliquât.

## **2.3. Diagnostic 2 : Détection et identification des espèces responsables d'onychomycoses à partir de la poudre d'ongle.**

Ce deuxième protocole a été effectué au niveau du Laboratoire National de Microbiologie de Madrid (Espagne). Il concerne l'identification des agents causaux des onychomycoses à partir de la poudre d'ongles.

### **2.3.1. Extraction d'ADN**

Les ADN de 70 échantillons ont été extraits à partir d'une petite quantité (15-20 mg) de poudre d'ongles infectés, en utilisant le Mini kit QiAmp Tissue DNA (Qiagen, Izasa, Madrid, Spain), en suivant les instructions du fournisseur. Les ADN extraits ont été récupérés dans 50 µL de tampon ATE et stocké à -20°C jusqu'au traitement par PCR.

### **2.3.2. Amplification par RT-PCR**

Quatre différentes PCR ont été utilisées : la panfongique (Buitrago *et al.*, 2013), la pandermatophyte (Dhib *et al.*, 2014), et deux PCR spécifiques pour la détection des *Candidaspp.* (Fortún *et al.*, 2014) et d'*Aspergillus spp* (Buitrago *et al.*, 2014). Toutes ces techniques ont été basées sur la RT-PCR, effectuées dans un volume final de 20 µL, 2 µL d'ADN extrait de chaque échantillon ont été rajoutés à la réaction. Chaque réaction inclue un témoin positif et un autre négatif.

#### **2.3.2.1. RT-PCR panfongique**

La réaction de PCR-TR a été effectuée dans CFX96 (Biorad, Madrid, Spain). La région ITS1 de l'ADNr a été amplifiée avec les amorces universelles ;

ITS 1: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' (T<sub>m</sub>= 58°C) et

ITS 2: 5'GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'.

Le 2 x SensimixSybr no-ROX Kit (Bioline, Ecogen, Madrid, Spain) a été utilisé. Le mélange réactionnel (20 µL/ capillaire) contient 4.2 µL H<sub>2</sub>O, 0,6 µL MgCl<sub>2</sub>, 1.6 µL de chacune des ITS 1 et ITS 2 (0,8 µM), 2 µL d'ADN isolé, 10 µL Master (Tableau 6). 50 cycles d'amplification ont été réalisés comme suit: une dénaturation pendant 10 s à 95°C, une hybridation pendant 5 s à 54°C et une élongation pendant 30 s à 72°C, suivie d'une étape de

fusion (melting) à partir de 65°C jusqu'à 97°C, 1 min (1°/ seg) puis un refroidissement à 40°C pendant 30 s (Buitrago *et al.*, 2013).

**Tableau 6 :** Préparation du Mix PCR panfongique (pour un échantillon)

Réactifs (mix)	Volume	Concentration finale
H <sub>2</sub> O	4,2 µL	
MgCl <sub>2</sub>	0,6 µL	4,5mM
ITS 1	1.6 µL	0,8 µM
ITS 2	1.6 µL	0,8 µM
Master (SYBR Green + Enzyme ADN polymérase) (2X concentré)	10 µL	
ADN extrait	2 µL	
<b>Volume Total</b>	<b>20µL</b>	

### 2.3.2.2. RT-PCR pandermatophytes

Le gène CHS1 a été amplifié en utilisant les amorces DermF et DermR décrites précédemment par (Dhib *et al.*, 2014). La réaction de PCR a été effectuée dans le CFX96 (Biorad, Madrid, Spain). Le kit 2x SensimixSybr no-ROX (Bioline, Ecogen, Madrid, Spain).

Le mélange de PCR (20 µL) contenait 2 x SensimixSybr kit SYBR Green I bindingdye (Quantace), 0.8 µM de chaque amorces et H<sub>2</sub>O pour atteindre le volume final de 20µL (Tableau 7). Le profil de la réaction était comme suit : une pré-incubation à 95°C/ 10 min. 50-cycles d'amplification: dénaturation pendant 10 s à 95°C, 5 s d'hybridation à 60°C, et 30 s d'élongation à 72°C et finalement un programme de fusion (melting) allant de 65°C jusqu'à 97°C/ 1 min, suivi d'un refroidissement à 40°C pendant 30 S. Les ADN des espèces de *Trichophyton violaceum* (CNM-CM-7447), *T. rubrum* (CNM-CM-7877), *T. interdigitale* (CNM-CM-7803) à différentes concentrations ont été utilisés comme des témoins positifs (2 ng et 200 pg par 20 µL), ainsi que deux contrôles négatifs représentés par H<sub>2</sub>O extra-pure (Contrôle pour la PCR) et un autre témoin négatif (Contrôle pour l'extraction d'ADN).

**Tableau 7 :** Préparation du Mix PCR pandermatophyte (pour un échantillon)

Réactifs (mix)	Volume	Concentration finale
H <sub>2</sub> O	4,8 µL	
DermF	1.6 µL	0,8 µM
DermR	1.6 µL	0,8 µM
Master 2 x SensimixSybr kit SYBR Green I binding dye	10 µL	
ADN extrait	2 µL	
<b>Volume Total</b>	<b>20 µL</b>	

Contrairement aux ITS (multicopies), le gène CHS1 est monocopie, cela signifie qu'il sera peut être difficile de détecter la présence des dermatophytes à une faible concentration d'ADN. Pour cela, les ADN des espèces de *Trichophyton violaceum* (CNM-CM-7447), *T. rubrum* (CNM-CM-7877), *T. interdigitale* (CNM-CM-7803) à différentes concentrations ont été utilisés (20 ng et 20 pg par 20 µL) afin de vérifier le pouvoir de détection de la PCR pandermatophyte.

#### **2.3.2.3. MX PCR *Candida* spp.**

Cette technique a été testée uniquement sur 25 échantillons de malades donnant des résultats négatifs en PCR panfongique, dans le but de vérifier la présence de différentes espèces dans un même échantillon d'ongle atteint d'onychomycoses. Cette MXPCR-TR a été effectuée dans un LightCycler Probes Master Kit (Roche Diagnostic, Madrid, Spain), pour détecter les six importantes espèces de *Candida* spp dans l'ongle. La technique peut détecter *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* et *Candida guilliermondii* en utilisant des sondes spécifiques émettant des signaux fluorescents de différentes couleurs comme elle a été décrite par Fortún *et al.*, 2014. Le mélange de la MXPCR (20 µL) est démontré sur le (Tableau 8).

Les ADN de *Candida albicans* (CNM-CL-5719), *C. parapsilosis* (CNM-CL-5683), *C. tropicalis* (CNM-CL-5742), *C. glabrata* (CNM-CL-5533), *C. krusei* (CNM-CL-7057) and *C. guilliermondii* (CNM-CL-7127) ont été utilisés comme contrôles positifs dans la PCR.

#### **2.3.2.4. MX PCR *Aspergillus* spp.**

Cette PCR est capable de détecter les trois espèces d'*Aspergillus* spp. Les plus importantes (*A. fumigatus*, *A. flavus* et *A. terreus*) comme décrit par (Buitrago *et al.*, 2014).

Les ADN d'*Aspergillus fumigatus* (CNM-CM-237), *Aspergillus terreus* (CNM-CM-3508), *Aspergillus flavus* (CNM-CM-3509) ont été utilisés comme témoins positifs.

Quinze échantillons d'ongles prélevés de 15 volontaires sains ont été inclus dans l'étude comme témoins négatifs.

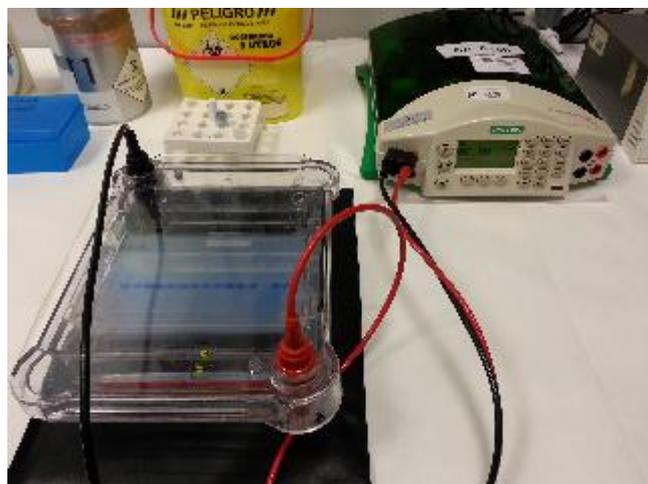
**Tableau 8 :** Préparation du Mix pour la MXPCR (pour un échantillon)

Réactifs (mix)	Volume	Concentration finale
H <sub>2</sub> O	4 µL	
Amorces ( <i>Candida</i> spp ou <i>Aspergillus</i> spp) + CI	2 µL	0.5 µM/ amorce
Sondes ( <i>Candida</i> spp ou <i>Aspergillus</i> spp) + CI	2 µL	0.2 µM/ sonde
Master 2x Sensimix Probe Kit (Quantace, Ecogen, Madrid, Spain)	10 µL	
ADN extrait	2 µL	
<b>Volume Total</b>	<b>20 µL</b>	

CI : Contrôle interne (ADN d'une méduse)

#### 2.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR obtenus des deux techniques panfongique et pandermatophyte ont été déposés sur un gel d'agarose à 2% (Sigma-Aldrich Quimica, Madrid, Spain) (Figure 15) avec Tris-acétate-EDTA afin de vérifier la qualité des amplifias selon le protocole de (Sambrook *et al.*, 1989). La migration a été réalisée à 80 volts pendant environ 20 minutes. Pour chaque série deux témoins négatifs (un témoin de la PCR et un témoin de l'extraction) et un témoin positif ont été déposés ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (marqueur de taille de 1000 pb). La révélation a ensuite été réalisée grâce à un transilluminateur à UV.



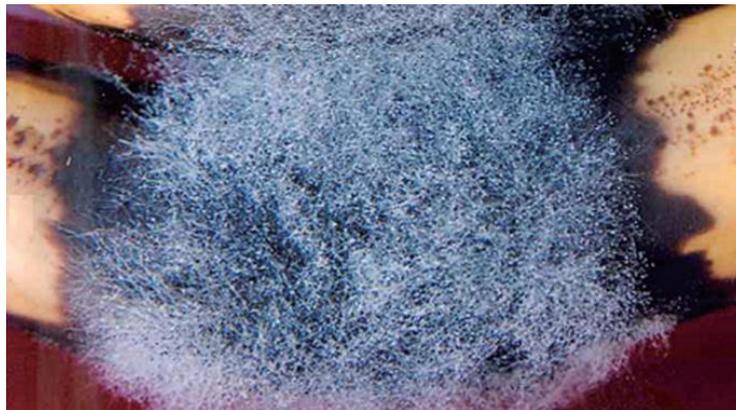
**Figure 15 :** Electrophorèse sur gel d'agarose

Les produits PCR obtenus à partir des deux PCR présentant une seule bande sur le gel d'agarose sont purifiés (voir protocole 1) et séquencés (ABI 3730 XL; Applied Biosystems, Madrid, Spain) avec les amorces ITS1- ITS2 et DermF- DermR, respectivement. Les séquences obtenues sont comparées avec GenBank database <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>.

## **PARTIE II : LE CHITOSANE PRODUIT PAR *RHIZOPUS ORYZAE***

### **1. Isolement de *Rhizopus oryzae***

*Rhizopus oryzae* a été isolé à partir de bananes contaminées (Figure 16). L'isolement a été réalisé à partir du tissu infecté (velouté conidien), à l'aide d'une anse de platine stérilisée. Les conidies prélevées sont déposées en piqûre centrale en boîte de Pétri contenant le milieu PDA + Gentamycine. Plusieurs répétitions ont été effectuées et les boîtes ont été incubées pendant 5 jours à 30°C.



**Figure 16:** Photo représentant une banane atteinte par «*Rhizopus oryzae*»

Les colonies fongiques obtenues ont subi une purification, en réalisant des repiquages jusqu'à obtention d'une souche pure, confirmée par l'observation microscopique. Les souches, ainsi obtenues, ont été conservées selon deux techniques :

- Conservation dans des tubes contenant l'eau physiologique à +4 °C.
- Conservation dans des tubes eppendorfs contenant le milieu Sabouraud liquide et le glycérol comme cryo-protecteur à -20 °C (20 %, v/v)

### **2. Identification de *Rhizopus oryzae***

L'identification de cette espèce est la même que celle adoptée pour les autres espèces de champignons, elle fait également appel aux caractères cultureux (Identification macroscopique), morphologiques (identification microscopique). Une identification moléculaire a été mise en place (Voir méthodes d'identifications. Partie 1).

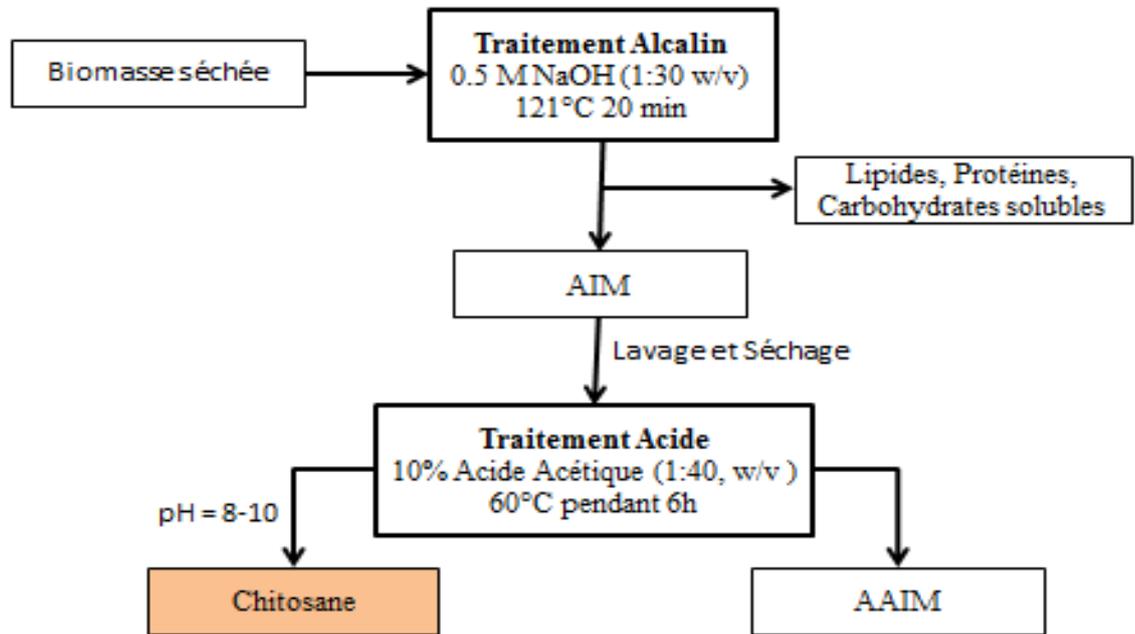
### **3. Production du chitosane**

#### **3.1. Fermentation**

La souche de *Rhizopus oryzae* a été cultivée sur boîte de Pétri contenant le milieu PDA et incubées pendant 5 jours à 30°C. Le milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose) (0.5% yeast extract, 1% peptone et 2% D-glucose, pH ajusté à 4.5) a été choisi comme un milieu pour la production du chitosane. La fermentation a été réalisée dans des Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de milieu de fermentation. Chaque Erlenmeyer contenant le milieu a été inoculé par une suspension sporale de  $10^7$  spores /mL (Pochanavanich and Suntornsuk, 2002) (quatre disques de *Rhizopus oryzae* âgé de 5 jours) et incubés à 30°C pendant 72 h sous agitation à 180 rpm (Wang *et al.*, 2008a, 2008b).

#### **3.2. Extraction du chitosane**

Le chitosane a subi deux types de traitements, un traitement alcalin en utilisant une base forte (NaOH) afin d'éliminer les lipides et protéines formant des liaisons avec le chitosane et un traitement acide en utilisant de l'acide acétique afin de le solubiliser et le récupérer selon le schéma représenté dans la figure 17. Ce dernier traitement a été réalisé au niveau du laboratoire de Chimie organique à Chaabet Ersas, Université des frères Mentouri Constantine.



**Figure 17** : Schéma récapitulatif des étapes d'extraction du chitosane à partir de la paroi des champignons.

### 3.2.1. Traitement alcalin

Après une durée d'incubation de 3 jours à 30°C, le contenu de chaque Erlenmeyer est filtré sur papier Whatman n°4. La biomasse est ensuite récupérée et lavée plusieurs fois à l'eau distillée, jusqu'à obtention d'un filtrat clair. La biomasse est lyophilisée et réduite en poudre (40 mesh) (Wang *et al.*, 2008b). La biomasse sèche est traitée avec une solution de 0.5M NaOH (1 :30, w/v) à 121°C pendant 20 minutes, l'AIM (Alkali Insoluble Material) est centrifugée à 4000g/15 min (Figure 18). lavée à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH neutre (Naghdi *et al.*, 2014).



**Figure 18 :** Précipitation par centrifugation de l'AIM après traitement alcalin.

### **3.2.2. Traitement acide**

L'AIM est ensuite traitée avec 10% d'acide acétique (1:40; w/v) à 60°C pendant 6 h, selon la méthode de (Synowiecki and Al-Khateeb, 1997). Après centrifugation, la fraction insoluble dans l'acide est précipitée, le surnageant contenant le chitosane est isolé, séparé et ajusté au pH entre 8-10 avec 2N NaOH.

Le précipité est récupéré par centrifugation (4000g, 15 min) est lavé à l'eau distillée jusqu'à pH neutre, lavé à l'éthanol, à l'acétone (Figure 19) et séché à 30°C, et stocké à température ambiante (Synowiecki and Al-Khateeb, 1997).



**Figure 19 :** Montage à reflux pour le traitement acide de l'AIM

## **4. Caractérisation du chitosane**

Cette partie du travail a été réalisée au niveau du laboratoire de Céramique, Chaabet Ersas, Université des Frères Mentouri de Constantine.

### **4.1. Analyse MEB**

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon, elle est utilisée dans des domaines allant des sciences des matériaux à la biologie, son principe repose sur la génération de particules et de rayonnement suite à un bombardement de l'échantillon par un faisceau électronique, l'image formée dépend de la nature des particules émises par la surface de l'échantillon.

Dans notre étude nous avons utilisé un MEB HITACHI S-3000N, les images obtenues sont le résultat de l'émission des électrons secondaires par les atomes de l'échantillon produisant un courant électrique, ce dernier détermine la topographie et les nuances de la surface analysée où chaque couleur noire, blanche ou grise représente le résultat de l'intensité détectée.

### **4.2. Analyse par IR**

Les Analyses spectroscopiques Infra-Rouge à Transformer de Fourier (FTIR) ont été réalisées pour les deux échantillons de chitosane avec un appareil (BRUKER IFS66v) à 20°C comme suit : 1 mg de poudre de chitosane a été séché à 60 °C pendant 12h puis mélangé avec du bromure de potassium anhydre (KBr) préalablement déshydratés dans un four à 300 °C pendant 24 h. Le mélange est finement homogénéisé et transformé en pastilles sous haute pression. Le disque est séché pendant 24 heures à 50°C pour enlever le maximum d'humidité (Brugnerotto et al., 2001; Czechowska-Biskup et al., 2012) puis analysé entre  $\lambda = 400$  et 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

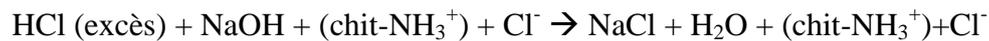
Le degré d'acétylation (DA) est déterminé, en utilisant la ration  $A_{1320}/A_{1420}$  et le calculer selon l'équation suivante (Brugnerotto et al., 2001) :

$$\text{DA}\% = 31.92 A_{1320}/A_{1420} - 12.20$$

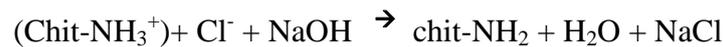
#### 4.4. Calcul du DD par titration

100 mg de chitosane sont déposés dans un vase cylindrique auquel on rajoute 3 ml d'HCl 0,3M et 40 ml d'eau. Mettre en agitation pendant 12 heures (Marei *et al.*, 2016).

- Neutraliser le HCl en excès à l'aide de NaOH 0,1M afin d'obtenir un pH de l'ordre de 4,5 correspondant au pKa -2 de la fraction amines libres. Soit  $V_1$  mL le volume de NaOH versé. (Brugnerotto *et al.*, 2001; Czechowska-Biskup *et al.*, 2012).



- L'addition de NaOH est poursuivie pour obtenir un pH de 8,5 correspondant à pKa +2 de la fraction amines libres. Soit  $V_2$  mL, ensuite la quantité de groupements amines chargés est déterminée:



$$\% \text{ DA} = (1-162 \times Q) / (1+ 43 \times Q)$$

$$Q = (V_{\text{NaOH}} \times 0,1) / (1000 \times \text{Mcs})$$

Sachant que **Mcs** : est la masse sèche de chitosane dans la prise d'essai (g) et  $V_{\text{NaOH}} = V_2 - V_1$   
= volume versé en mL de NaOH 0,1M entre pH 4,5 et pH 8,5.

## **PARTIE III : TESTS « *in vitro* » DU CHITOSANE EXTRAIT, SUR LES ESPECES DE DERMATOPHYTES RESPONSABLES DES ONYCHOMYCOSES.**

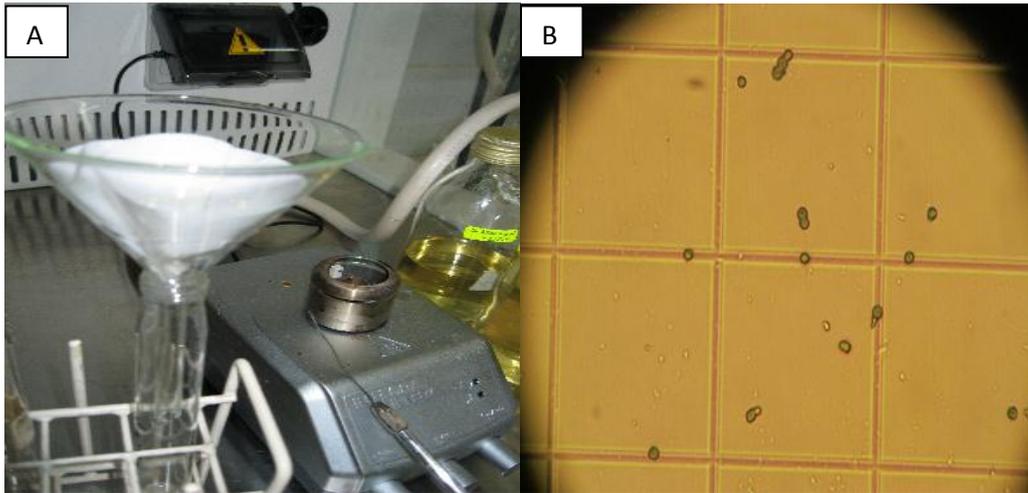
Ce travail a été réalisé conjointement au niveau du laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Université Claude Bernard Lyon1 (Lyon, France) et le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université des Frères Mentouri Constantine. Ces tests *in vitro* ont été réalisés stérilement sous PSM du type II.

### **1. Méthode de micro dilution sur milieu liquide**

#### **1.1. Préparation de l'inoculum**

Les trois agents pathogènes les plus responsables des onychomycoses ont été choisis pour évaluer l'activité antifongique du chitosane. Il s'agit de : *Trichophyton rubrum*, *T. rubrum* var. *raubitschekii* et *T. interdigitale*.

Une suspension sporale de dermatophyte est préparée à partir d'une culture âgée de 7 jours sur PDA à 28°C, pour favoriser la sporulation (Santos et Hamdan, 2005). Les colonies sont inondées avec 5 mL d'eau distillée stérile et la surface est grattée à l'aide d'une anse de platine. Le mélange de conidies et fragments des hyphes est vortexé afin de détacher le maximum de spores, filtré à l'aide du papier Wathman N°40 et collecté dans un tube stérile (Figure 20 A) comme il est recommandé par (Santos *et al.*, 2006). Cette procédure enlève la majorité des hyphes en produisant un inoculum composé de spores. Un comptage cellulaire de l'inoculum est réalisé sous microscope à l'aide d'une cellule de Thoma (Figure 20 B). La turbidité finale est ajustée à  $0.5 \times 10^6 - 5 \times 10^6$  spores/mL à la longueur d'onde de 520 nm et la transmission est ajustée à 65-70% en spectrophotomètre. Tous les inoculum sont ajustés à la dilution finale de 1:50 (v/v) dans du Sabouraud (da Silva Barros *et al.*, 2007).



**Figure 20 :** (A) : Procédé de filtration sur Wathman N° 40, (B) : Comptage cellulaire sous microscope optique.

## **1.2. Préparation des agents antifongiques**

Trois agents antifongiques sont utilisés dans notre étude. Un agent azolé ; le fluconazole (FRESENIUS KABI, France) comme témoin positif de la manipulation, le chitosane commercial (Chitosane- faible poids moléculaire à  $DD \geq 75\%$ , SIGMA-ALDRICH, St Louis, USA) et enfin le chitosane extrait. Tous les agents sont préparés en solution mère, 1 mg/mL pour le fluconazole, 20 mg/mL pour les deux chitosanes, en dissolvant la poudre de chitosane dans l'acide acétique à (1 %, v/v) et en agitant pendant une nuit à température ambiante. Le pH des solutions est ajusté à 5,6 avant de les autoclaver pendant 15 min à 121°C (Hernández-Lauzardo et al., 2008).

Une série de dilutions est préparée selon la méthode M38-A légèrement modifiée (Indira, 2014; da Silva Barros et al., 2007) dans des plaques 96 puits par la méthode de microdilution. Les concentrations de fluconazole sont rangées entre 0.5- 64  $\mu\text{g/mL}$  et entre 0.08- 10 mg/mL pour les deux chitosanes. Toutes les solutions sont conservées à + 4°C jusqu'à utilisation.

## **1.3. Préparation des dilutions (gamme de concentration)**

La méthode d'Eloff (1998) est effectuée afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du chitosane contre les espèces de champignons cités précédemment.

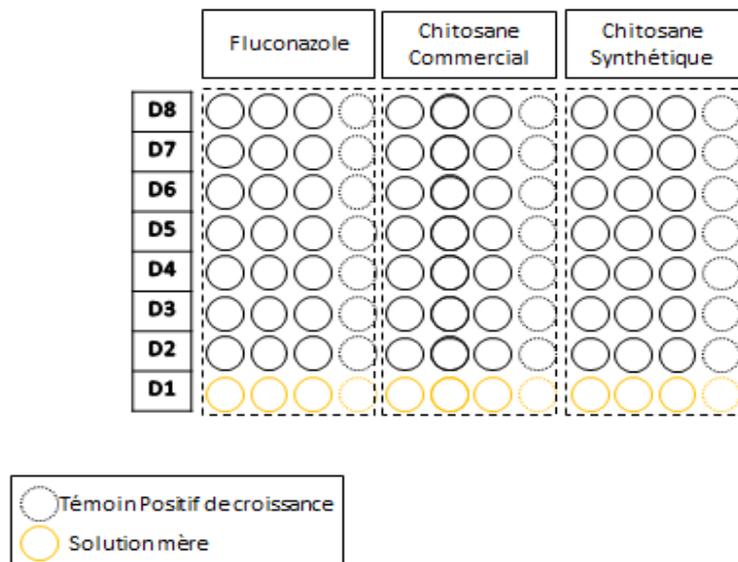
Les tests sont effectués dans des plaques 96 puits, 150 µL du bouillon Sabouraud est transféré dans tous les puits de la plaque (de A jusqu'à G) sauf la première rangée (Ligne H).

Une série de dilution des agents antifongiques est effectuée comme suit : prélever 150 µl de la 1ere ligne H (D1), et les déposer au niveau de la ligne suivante, bien homogénéiser et continuer à faire des dilutions successives au 1/2 afin d'obtenir D2= 10 mg/mL, D3= 5 mg/mL, D4= 2,5 mg/mL, D5= 1,25 mg/mL, D6= 0,62 mg/mL, D7= 0,31 mg/mL et D8= 0,15 mg/mL pour les chitosane et D2= 64 µg/mL, D3= 32 µg/mL, D4= 16 µg/mL, D5 = 8 µg/mL, D6= 4 µg/mL, D7= 2 µg/mL et D8=1 µg/mL pour le fluconazole. Les dilutions sont réalisées en triplicata (Figure 21).

Les témoins positifs de croissance fongique sont inclus ; deux puits sont remplis de 150 µL de sabouraud liquide à 1% d'acide acétique sans chitosane (à pH=5,6) = D<sub>0</sub> à 0 µL/mL et un puit rempli de 150 µL de sabouraud liquide sans Fluconazole = D<sub>0</sub> à 0 µg/mL.

Transférer respectivement à l'aide d'une pipette multicanaux, 100 µL de chaque dilution et les mélanger avec 100 µL de suspension sporale diluée dans du sabouraud (1 :50) (v/v) préalablement déposée dans une nouvelle plaque.

Les microplaques sont recouvertes et incubées à 28°C, lu visuellement après 7 jours d'incubation pour les dermatophytes, comme recommandé par (da Silva Barros *et al.*, 2007).



**Figure 21:** Schéma d'une plaque 96 puits (préparation des dilutions).

#### **1.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)**

La méthode d'Eloff, est modifiée afin de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI).

En utilisant les mêmes microplaques précédentes ; Les valeurs de CMI sont notées. Ce sont les concentrations minimales du composé antifongique qui inhibent complètement la croissance fongique visible après 6 jours (aucun signe de croissance).

## **2. Méthode de diffusion sur gélose**

Nous avons choisi cette technique, afin d'avoir des résultats statistiquement représentatifs, car la lecture en spectrophotomètre (lecteur de plaques) de la plaque 96 puits ne peut être lu en présence de filamenteux. Ces derniers forment une couche compacte et ne permettent pas aux faisceaux lumineux de passer, donnant donc des résultats erronés.

Le milieu de culture utilisé est le Sabouraud agar à pH=6.

L'inoculum est préparé par suspension sporale de dermatophytes dans de l'eau physiologique stérile, la surface de la gélose estensemencée par écouvillonnage avec une rotation de la boîte de Pétri pour assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Après séchage, des disques de (6 mm) de papier filtre stériles sont imprégnés par les molécules à tester (20 µl/ disques) et sont déposés sur la gélose. Les boîtes sont incubées à  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 7 jours. La lecture des résultats se fait par la mesure des zones d'inhibition (mm).

## **3. Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés par des moyennes des zones d'inhibition  $\pm$  SEM après ANOVA suivie par test Tukey ( $p < 0,05$ ). A l'aide du logiciel XLStat 2014. le seuil de signification est de 0.05.

# Résultats et discussion

## PARTIE I : LES ONYCHOMYCOSES

### 1. Patients

Les 269 patients prélevés avaient une moyenne d'âge de 45 ans avec des extrêmes allant de 2 à 92 ans. Le nombre des sujets masculins était de 114 et celui des féminins était de 155 donnant un sex-ratio de 0.74. Le nombre de prélèvements unguéaux provenant des pieds était 204 et celui provenant des mains de 94. Sur le plan clinique, nous avons pu observer quatre types de lésions (Figure 22) : le type sous-unguéal (profond) disto-latéral avec ses 2 variétés « avec hyperkératose » et « avec onycholyse », le type « onychodystrophie totale » qui est toujours secondaire et le type « leuconychie » (Tableau 9).

**Tableau 9** : Nombre et types des lésions observées.

Type de lésions	variété	Nb d'échantillons	Pourcentage (%)
profonde disto-latérale	avec hyperkératose	83	27.85
	avec onycholyse	95	31.87
Leuconychie superficielle		2	0.67
Onychodystrophie totale (atteinte secondaire)		118	39.6
<b>Total</b>		<b>298</b>	<b>100</b>

La forme sous-unguéale (profonde) disto-latérale a été observée 178 fois (60%) ; Ses deux variétés « avec onycholyse » et « avec hyperkératose » ont été retrouvées 95 (31.87%) et 83 fois (28.5%) respectivement. Elle est suivie par l'onychodystrophie totale secondaire retrouvée 118 fois (39.6%). La leuconychie superficielle, observée 2 fois, a donné un taux négligeable de 0.67 %. Le type sous unguéal proximal n'a pas été retrouvé au cours de notre étude. Les différents aspects cliniques observés au cours de notre étude, sont présentés dans la Figure 22, ci-dessous.



**Figure 22:** Exemples d'onychomycoses observées lors des prélèvements (A : Onychomycoses sous-unguëale disto-latérale (DLSO) avec onycholyse, B : Onychodystrophie totale, C : leuconychie superficielle et D : DLSO avec hyperkératose sous-unguëale).

## 2. Prélèvements

Chaque échantillon prélevé a été divisé en trois parties ; la première a été destinée à l'examen direct après éclaircissement à la potasse (KOH) à 30%, la deuxième l'a été pour la culture sur 2 milieux de Sabouraud dont le premier est additionné de chloramphénicol seul et le second de chloramphénicol et de cycloheximide (actidione) et enfin la troisième destinée à l'analyse moléculaire (diagnostic moléculaire directement à partir de la poudre d'ongle).

### 2.1. Résultats du diagnostic classique

#### 2.1.1. Examen direct

Les 298 échantillons unguéaux ont fait l'objet d'un examen direct par éclaircissement à la potasse et observation microscopique à l'objectif 40. Les échantillons positifs, au nombre de 172, ont montré la présence de filaments mycéliens (Figure 23) ou de levures ; leur taux a été de 57.72%. Le nombre des échantillons négatifs à l'examen direct étaient de 126 avec un taux de 42.28%. Le tableau 10, ci-dessous, résume les résultats de l'examen direct.



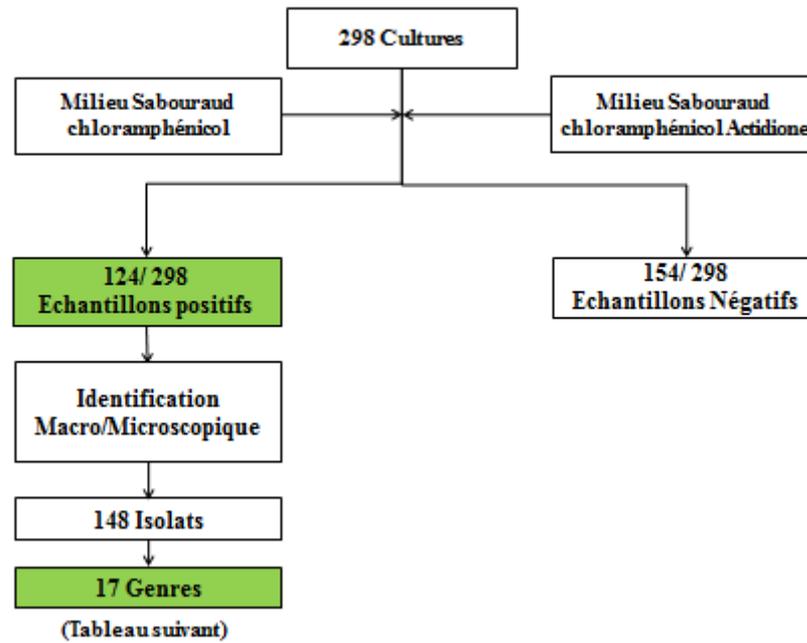
**Figure 23:** Examen direct montrant des filaments mycéliens dans la poudre d’ongles malades.

**Tableau 10 :** Résultats de l’examen direct

<b>Examen Direct</b>	<b>Nombre</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
ED (+)	172	57.72
ED (-)	126	42.28
Total	298	100
<b>Sensibilité</b>		<b>57</b>

### 2.1.2. Cultures

Après examen direct, tous les échantillons ont été systématiquement cultivés sur les deux milieux d’isolement de Sabouraud additionnés de chloramphénicol avec et sans actidione (Figure 24). 124 échantillons ont poussé et donné des colonies sur les milieux de culture, ce qui correspond à un taux de 41.61% versus 58.39% de cultures négatives. Le tableau 11 résume les résultats des cultures de prélèvements d’ongles infectés.



**Figure 24** : Schéma récapitulatif, présentant les résultats des cultures.

**Tableau 11** : Résultats des cultures des prélèvements d’ongles infectés

Résultats des cultures	Nombre d’échantillons	Pourcentage (%)
Culture (+)	124	41.61
Culture (-)	174	58.39
Total	298	100
Sensibilité		<b>41</b>

148 isolats ont été repiqués à partir des 124 cultures positives. En nous basant sur les clés de détermination des genres fongiques, à savoir l’observation macroscopique des caractères cultureux (surface et aspect des colonies, pigment au recto et au verso, vitesse de croissance...) et microscopique des filaments, conidies et autres fructifications (taille, forme et agencement des conidies sur le conidiophore...), 17 genres fongiques, entre dermatophytes, levures et moisissures, ont été identifiés (Tableau 12).

Parmi les dermatophytes isolés, *T.rubrum* était la seule espèce retrouvée. A lui seul, le genre *Trichophyton*, avec l’espèce *T.rubrum*, a été identifié 72 fois, ce qui a correspondu à un taux de 48.64% soit près de la moitié des cas.

Les levures du genre *Candida* ont été retrouvées 32 fois avec un taux de 21.6%; l’espèce *Candida albicans*, isolée 18 fois, a représenté à elle seule 12.16% de l’ensemble des espèces

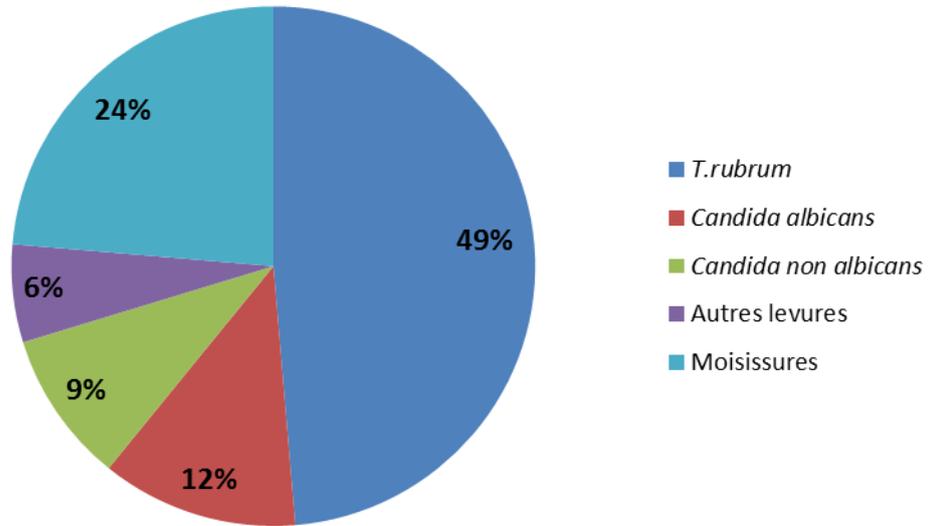
isolées alors que les espèces *non albicans*, retrouvées 14 fois, ont représenté un taux de 9.44%. Les autres levures (*Rhodotorula* spp., *Saccharomyces* spp. et *Trichosporon* spp.), au nombre de 9, ont eu un taux de 6.09%.

Les moisissures, isolées 35 fois avec un taux de 23.65%, ont été représentées par 12 principaux genres à savoir : *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Acremonium* spp, *Alternaria* spp, *Geotrichum* spp, *Exophiala* spp, *Chrysosporium* spp, *Cladosporium* spp, *Mucor* spp, *Trichoderma* spp, *Paecilomyces* spp et *Aureobasidium* spp (Figure 25).

Le genre *Aspergillus* spp., isolé 10 fois, a représenté à lui seul, un taux de 6.75% ; les autres moisissures au nombre de 25 ont eu un taux de 16.89% .

**Tableau 12:** Espèces fongiques isolées à partir des échantillons d'ongles.

Type	Genre	Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<b>Dermatophytes</b>	<i>Trichophyton</i>	<i>T.rubrum</i>	72	48.64
<b>Levures</b>	<i>Candida</i>	<i>C.albicans</i>	18	12.16
		<i>Candida non albicans</i>	10	6.75
		<i>C.parapsilosis</i>	2	1.35
		<i>C.lipolitica</i>	1	0.67
		<i>C. kyfur</i>	1	0.67
	<i>Rhodotorula</i>		4	6.08
	<i>Saccharomyces</i>	<i>S.cerevisea</i>	1	
<i>Trichosporon</i>		4		
<b>Moisissures</b>	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus sp</i>	6	6.75
		<i>Aspergillus niger</i>	4	
	<i>Penicillium</i>		3	16.89
	<i>Acremonium</i>		4	
	<i>Alternaria</i>		4	
	<i>Geotrichum</i>		2	
	<i>Exophiala</i>		3	
	<i>Chrysosporium</i>		1	
	<i>Cladosporium</i>		3	
	<i>Mucor</i>		2	
	<i>Trichoderma</i>		1	
	<i>Paecilomyces</i>	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	
	<i>Aureobasidium</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	
<b>Total</b>	<b>17</b>		<b>148</b>	<b>100</b>



**Figure 25 :** Espèces isolées à partir des onychomycoses.

Les résultats de l'examen direct et de la culture ont été concordants à un taux de 61.75% soit 184 fois ; ils ont été tous deux positifs à un taux de 31.20% soit 93 fois, et ils ont été tous deux négatifs à un taux de 30.53% soit 91 fois.

Ils ont été discordants 114 fois c'est-à-dire à un taux de 38.25% ; l'examen direct a été positif et la culture négative pour 80 échantillons c'est-à-dire à un taux de 26.84% et, vice-versa, l'examen direct a été négatif et la culture positive pour 34 échantillons c'est-à-dire à un taux de 11.41%.

**Tableau 13 :** Résultats obtenus en examens directs et en cultures.

Résultats des ED	Résultats des cultures	Nombre	Pourcentage
ED (+)	Culture (+)	93	31.20%
ED (+)	Culture (-)	80	26.84%
ED (-)	Culture (+)	34	11.41%
ED (-)	Culture (-)	91	30.53%

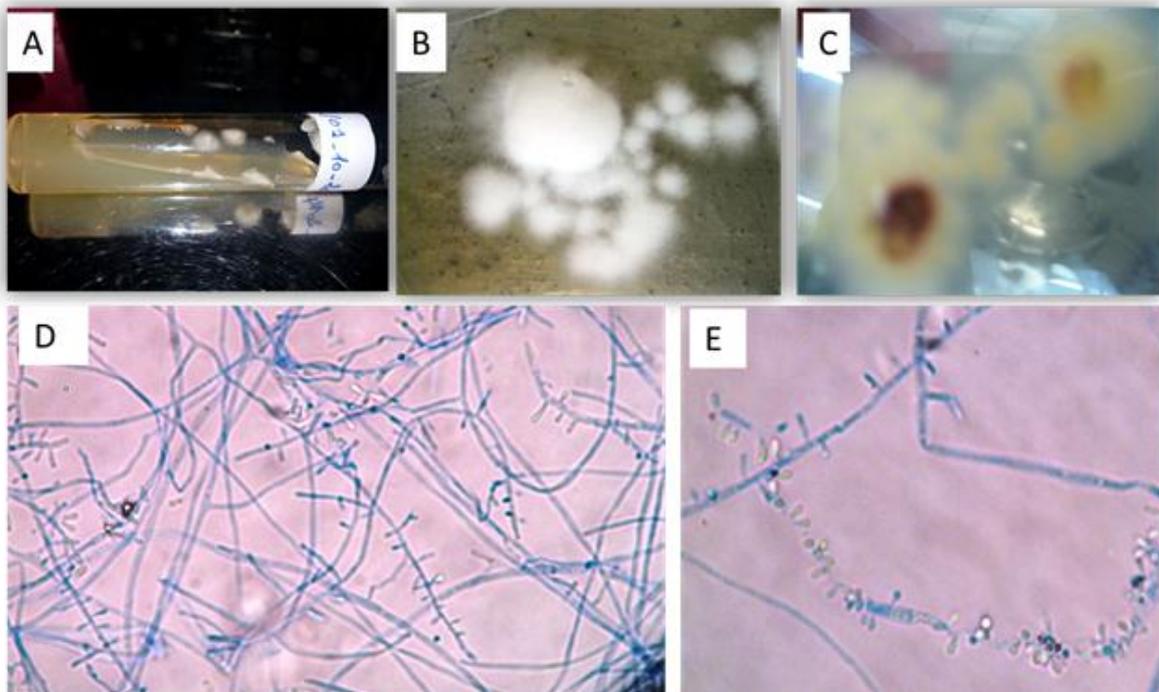
### 2.1.3. Identification classique des dermatophytes isolés

En se basant sur les résultats des cultures, *T.rubrum* semble être l'espèce la plus dominante, elle a donc été considérée comme l'espèce de dermatophyte responsable des onychomycoses dans notre étude. Nous nous sommes donc intéressés à bien l'étudier macroscopiquement, microscopiquement et aussi sur le plan moléculaire.

#### 2.1.3.1. *Trichophyton rubrum*

##### ➤ *Caractéristiques macroscopiques*

Après ensemencement sur les différents milieux de culture gélosés, les colonies des souches apparaissent au bout de 7 jours d'incubation à 27°C. Sur milieu Sabouraud. Il y'a d'abord apparition d'une petite colonie glabre, blanc crème, sur laquelle apparaissent des filaments dressés, puis la colonie devient duveteuse et se couvre de filaments blancs, avec un dôme central (recto blanc) (Figure 26 A et B). Au revers, apparait un pigment rouge foncé, formant un anneau circulaire de couleur rouge-brun (Figure 26 C). Sur milieu urée de Christensen, cette variété est négative, elle ne vire pas le milieu au rose fuchsia.



**Figure 26:** *T. rubrum* (A : Colonie sur Sabouraud Chloramphénicol actidionné, B : Colonies sur PDA après 10 jours d'incubation, C : revers des colonies, D et E : Microconidies X 400).

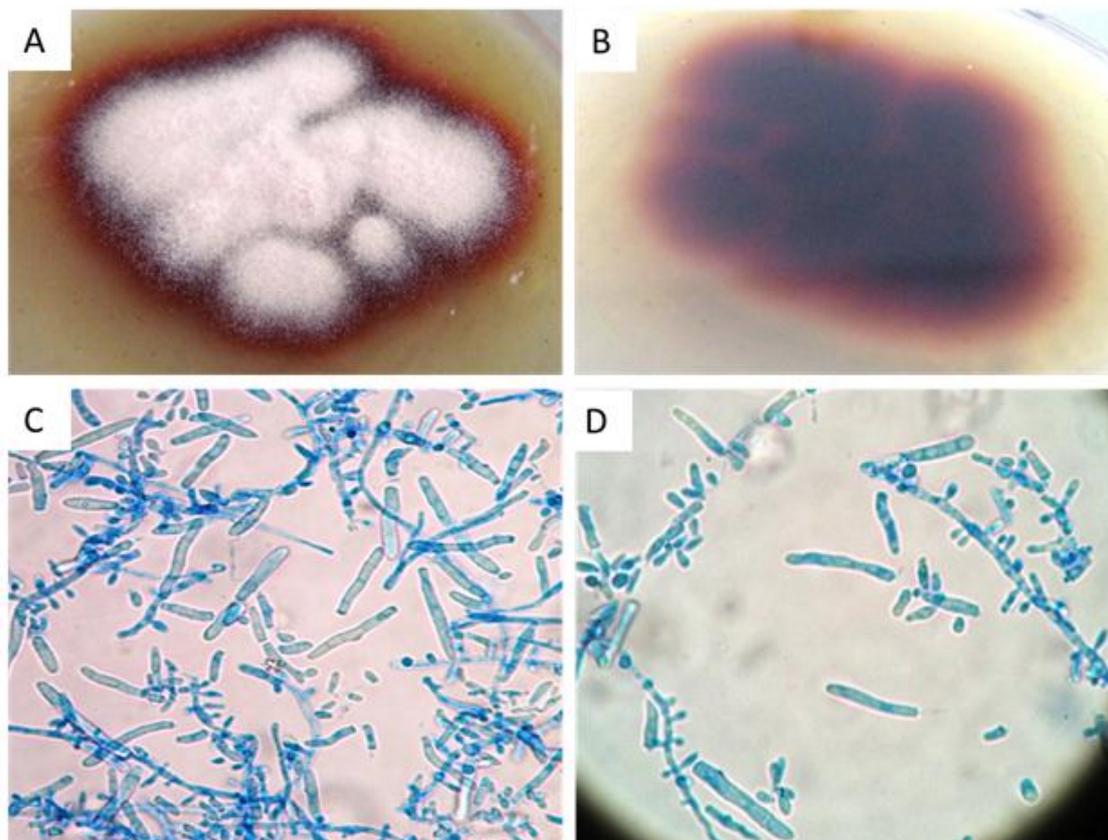
➤ *Caractères microscopiques*

L'observation microscopique a permis de mettre en évidence des filaments fins, avec excroissance triangulaire. On remarque également de nombreuses microconidies piriformes disposées en acladium et absence de macroconidies (Figure 26 D et E).

2.1.3.2. *Trichophyton rubrum var. raubitschekii*

➤ *Caractéristiques macroscopiques*

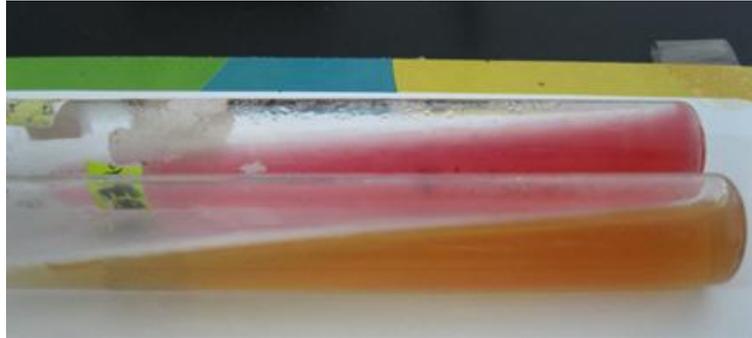
Cette variété, semblable à *T. rubrum*, présente parfois un aspect poudreux des colonies et une pigmentation abondante au recto et au verso. La couleur varie entre le violet et le rouge (Figure 27 A). Au revers, apparait un pigment rouge très foncé (Figure 27 B). Sur Milieu urée de Christensen, cette variété est positive, elle vire la couleur du milieu du jaune au rose fuchsia (Figure 28).



**Figure 27:** *T. rubrum var. raubitschekii* (A : Colonie sur PDA après 10 jours d'incubation, B: revers de la colonie, C et D : Nombreuses macroconidies et microconidies X 400).

➤ *Caractères microscopiques*

La microscopie de cette variété est très riche. Elle permet de distinguer des filaments à ongle droit, avec une forte conidiogénèse, nombreuses microconidies piriformes disposées en acladium et de nombreuses macroconidies, lisses, longues, étroites, à extrémités arrondies (aspect en saucisse) avec plusieurs logettes (Figure 27 C et D).



**Figure 28:** *T.rubrum* var. *raubitschekii* sur milieu solide urée de Christensen après 6 jours d'incubation à 27°C comparé au témoin négatif (tube jaune).

#### 2.1.4. Identification moléculaire

Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude est la région ITS 1 et ITS2 et 5.8S de l'ADN ribosomal. Cette région permet de faire la distinction entre les genres et même entre les espèces de champignons.

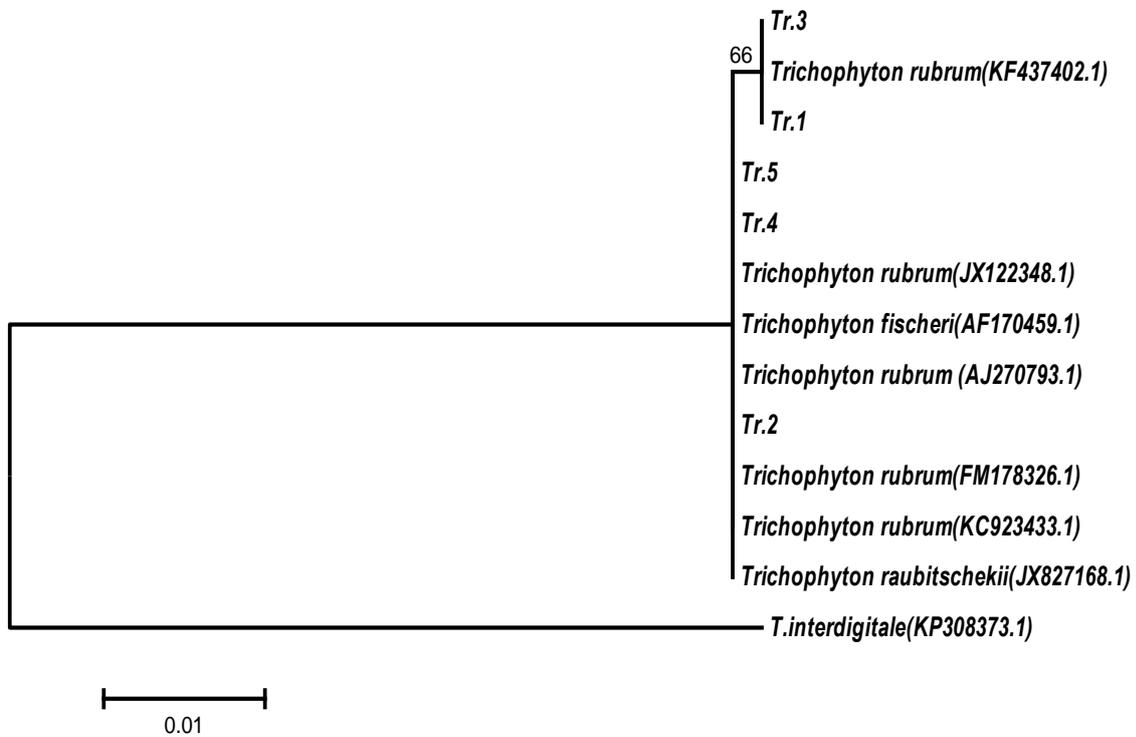
Cinq isolats de *T.rubrum* (Tr.1, Tr.2, Tr.3, Tr.4 et Tr.5) ont été sélectionnés. Leurs régions ITS 1 ; ITS2 et 5.8S des ADN ribosomiaux ont été amplifiées par PCR. Les amplifiats ont été séquencés et les séquences obtenues ont été comparées avec celles des organismes apparentés sur BLASTn. Il en ressort que les ITS des quatre isolats (Tr.1, Tr.2, Tr.3 et Tr.5) étaient homologues à 99% à *T.rubrum* KC923433.1, AJ270802.1, JX122348.1 et AJ270793.1, respectivement. En se basant sur les caractères phénotypiques et moléculaires, ces quatre souches ont été affiliées à l'espèce *T.rubrum* (Tableau 14).

La séquence ITS de la souche Tr.4 était homologue à 99 % avec *T. raubitschekii* JX827168.1 déposé par Liu et Zhang en 2012 (Chine) et *T.rubrum* FM178326.1. En se basant sur les caractères phénotypiques et moléculaires, cette souche Tr.4 a été identifiée comme étant *T.rubrum* var. *raubitschekii* (Tableau 14).

**Tableau 14:** Affiliation phylogénétique des cinq isolats (paires d’amorces universelles)

Souches	Présence de macroconidies	Test d’uréase	PCR			
			Genre	Identité	Espèces apparentées	N° d’accession
Tr.1	Non	-	<i>Trichophyton</i>	99%	<i>T.rubrum</i>	KC923433.1
Tr.2	Non	-	<i>Trichophyton</i>	99%	<i>T.rubrum</i>	AJ270802.1
Tr.3	Non	-	<i>Trichophyton</i>	99%	<i>T.rubrum</i>	JX122348.1
Tr.4	Oui	+	<i>Trichophyton</i>	99%	<i>T.rubrum</i> <i>T.rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i>	FM178326.1 JX827168.1
Tr.5	Non	-	<i>Trichophyton</i>	99%	<i>T.rubrum</i>	AJ270793.1

L’arbre phylogénétique était construit en utilisant *T.interdigitale* (N° d’accession KP308373.1) comme un out-group. L’arbre est composé de deux clades séparés avec *T.rubrum* et *T.interdigitale*. Tous les *T.rubrum* (Tr.1, Tr.2, Tr.3 et Tr.5) et également *T.raubitschekii* (Tr.4), ont été groupés sur la même branche avec leurs espèces apparentées (Espèces de GenBank). *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton raubitschekii* isolées ont montré 100% d’homologie dans la région ITS (Figure 29).



**Figure 29:** Arbre phylogénétique de *T.rubrum*, basé sur l’alignement des séquences ITS de l’ADNr.

## 2.2. Résultats du diagnostic moléculaire des onychomycoses à partir de la poudre d'ongle

### 2.2.1. Résultats des PCR

Les résultats des 70 échantillons obtenus après analyse par les techniques de RT-PCR pan fongique et pandermatophytes, l'examen direct (ED) et la culture, sont reportés dans le tableau 15. Précisons, toutefois, que les cas d'onychomycoses ont été considérés comme « prouvés », quand les résultats de leur ED et/ou de leur culture sont positifs ; ils ont été considérés comme « probables », quand les résultats de leur ED et de leur culture sont négatifs. A ce titre, 51 échantillons ont été considérés comme prouvés et 19 comme probables.

**Tableau 15:** Résultats des examens directs, cultures et des PCR des échantillons d'ongles analysés

Examen Direct	Cultures	Nb	PCR panfongique	Nb	PCR Pandermatophyte	Nb
Positive (41)	<i>T.rubrum</i>	17	<i>T.rubrum</i>	9	<i>Trichophyton</i> spp	16
	<i>T.rubrum</i> + <i>Penicillium</i> spp.	1	<i>T.rubrum</i>	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>Acremonium</i> spp.	2	Négative	2	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>Alternaria</i> spp.	2	<i>T.rubrum</i>	2	<i>Trichophyton</i> spp.	2
	<i>Alternaria</i> sp + <i>Aspergillus</i> spp.	1	<i>A.fumigatus</i>	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>Exophiala</i> spp.	1	<i>T.rubrum</i>	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>Rhodotorulas</i> pp.	1	Négative	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>Mucor</i> spp.	1	Négative	1	Négative	1
	<i>C. non albicans</i>	1	Négative	1	Négative	1
	<i>C. parapsilosis</i>	1	Négative	1	Négative	1
	Négative	13	<i>T.rubrum</i>	1	<i>Trichophyton</i> spp.	8
		<i>T.violaceum</i>	1			
<b>Total (+)</b>		<b>28</b>		<b>16</b>		<b>31</b>
Négative (29)	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	1	Négative	1	Négative	1
	<i>T.rubrum</i>	1	Négative	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>T.rubrum</i> + <i>A.niger</i>	1	Négative	1	Négative	1
	<i>A.niger</i>	1	Négative	1	Négative	1
	<i>Penicillium</i> spp.	2	Négative	2	<i>Trichophyton</i> spp.	1/Neg
	<i>Trichosporons</i> spp.	1	Négative	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>Exophiala</i> spp.	1	Négative	1	<i>Trichophyton</i> spp.	1
	<i>C.parapsilosis</i>	1	Négative	1	Négative	1
	<i>C.albicans</i>	1	Négative	1	Négative	1
	Négative*	19	<i>T. rubrum</i>	3	<i>Trichophyton</i> spp.	7
		<i>T. violaceum</i>	1			
<b>Total (+)</b>		<b>10</b>		<b>4</b>		<b>11</b>

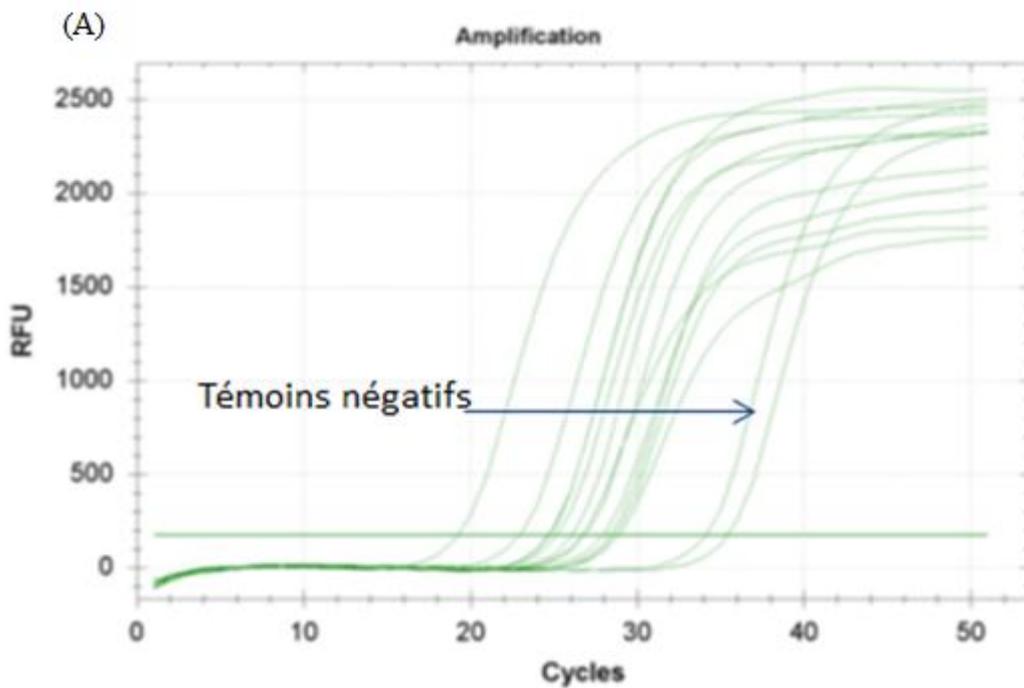
\*Echantillons classés comme probables

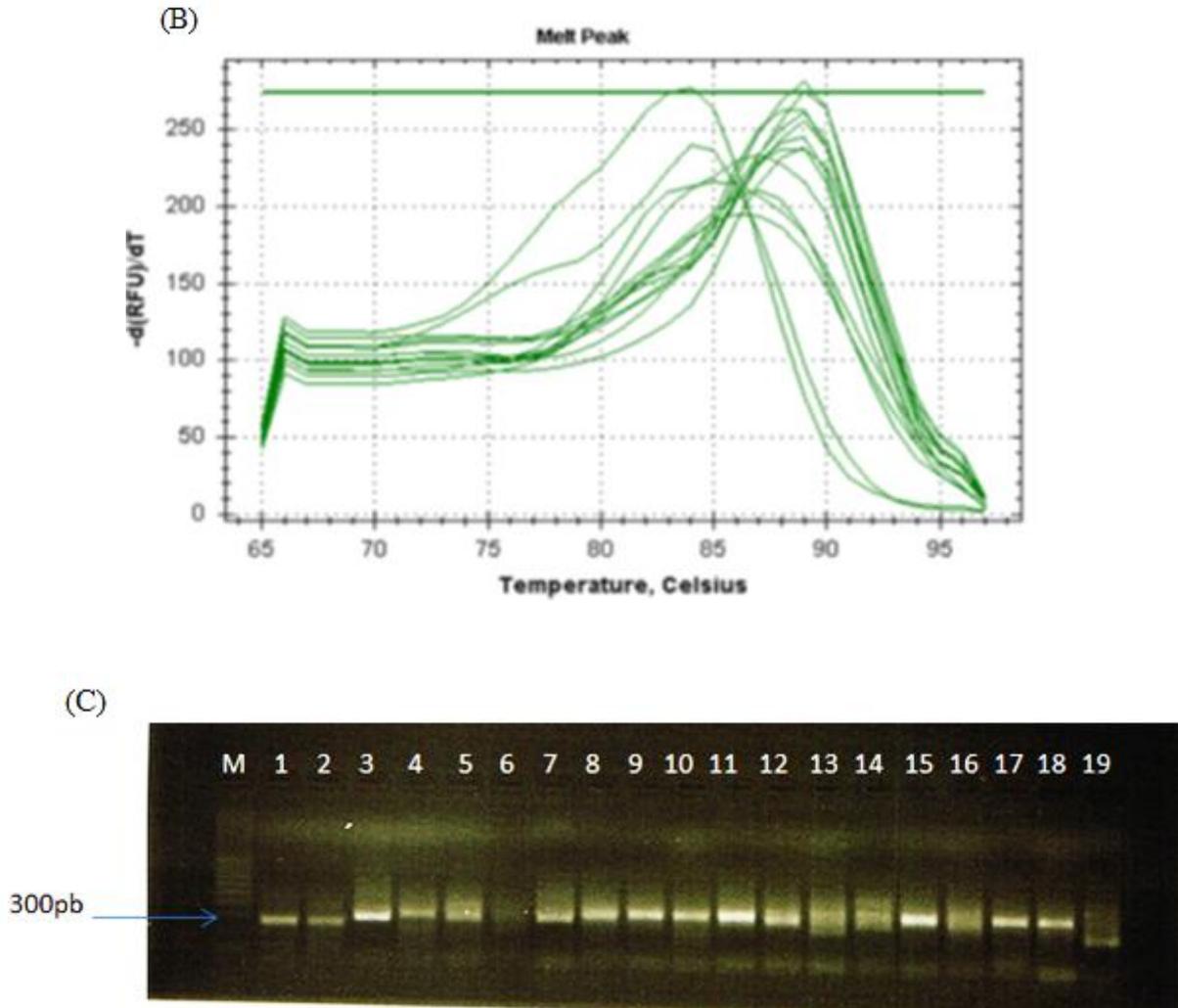
➤ *PCR panfongique*

Après amplification de l'ADN et vérification de la pureté des amplifiats en les faisant migrer sur gel d'agarose, les échantillons révélant une seule bande ont été sélectionnés afin qu'ils soient séquencés (Figure 30C) et ce, pour 40/70 échantillons. Ce qui correspond à 31/51 des cas prouvés et 9/19 des cas probables.

Le séquençage a pu identifier nos espèces dans 20/40 échantillons. Ce qui correspond à 31% (16/51) des cas prouvés et 21% (4/19) des cas probables. *Trichophyton* spp, était le genre retrouvé dans 19 échantillons ; 17 étaient *T.rubrum* et 2 étaient *T.violaceum*.

La RT-PCR panfongique a pu mettre en évidence six espèces dont les cultures étaient négatives et quatre d'entre elles l'étaient aussi à l'examen direct. La sensibilité de cette technique était évaluée par rapport aux cultures, elle était de 47% (18/38). Dans 2 cas, il n'y a pas eu de corrélation entre les deux techniques (Tableau 16).





**Figure 30 :** Exemple de quelques résultats positifs en RT-PCR en présence fongique (A : Courbes d’amplification des PCR pan-fongique ; B : Courbes de fusion des produits de chaque PCR ; C : Contrôle de l’amplification par révélation des amplicons de PCR de quelques échantillons d’ongles en électrophorèse sur gel d’agarose. M : marqueur de taille moléculaire, 1-5, 7-12, 15, 17-19 : produits PCR présentant une seule bande).

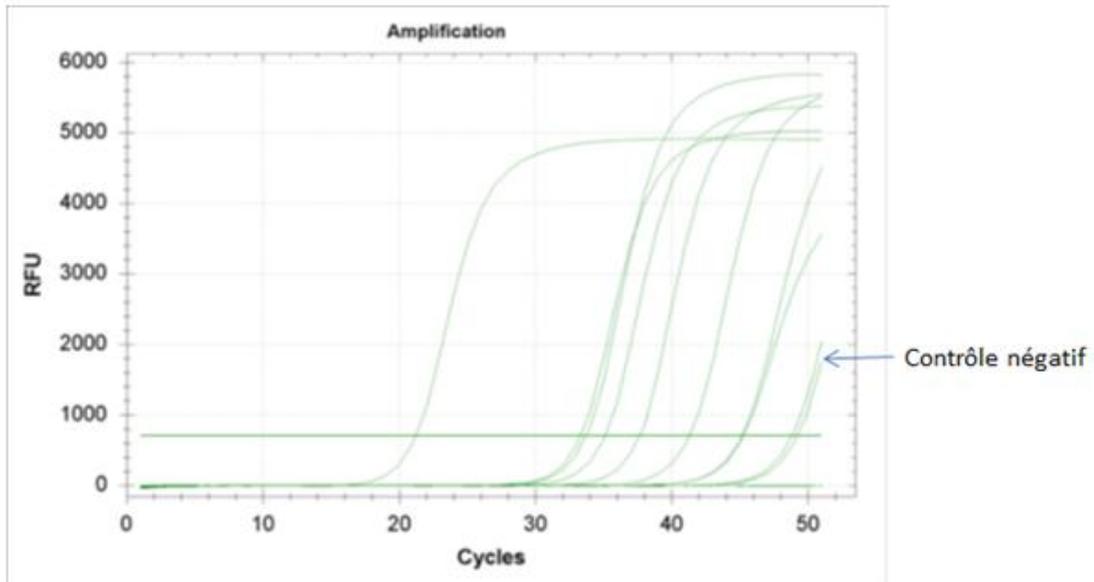
➤ **PCR pandermatophytes**

Cette technique a pu détecter, dans 60% de nos échantillons (42/70), l’ADN des dermatophytes possédant la taille de 432 pb (Figure 31 C et D). Son taux de détection a été de 63% (35/51) pour les cas prouvés et de 37% (7/19) pour les cas probables. Ce qui représente un gain de sensibilité de l’ordre de 90 % (18/20). Pour 9 cas, elle a pu détecter *Trichophyton* spp. et n’a pas été corrélée aux résultats positifs de la culture (Tableau 16). Elle a, cependant,

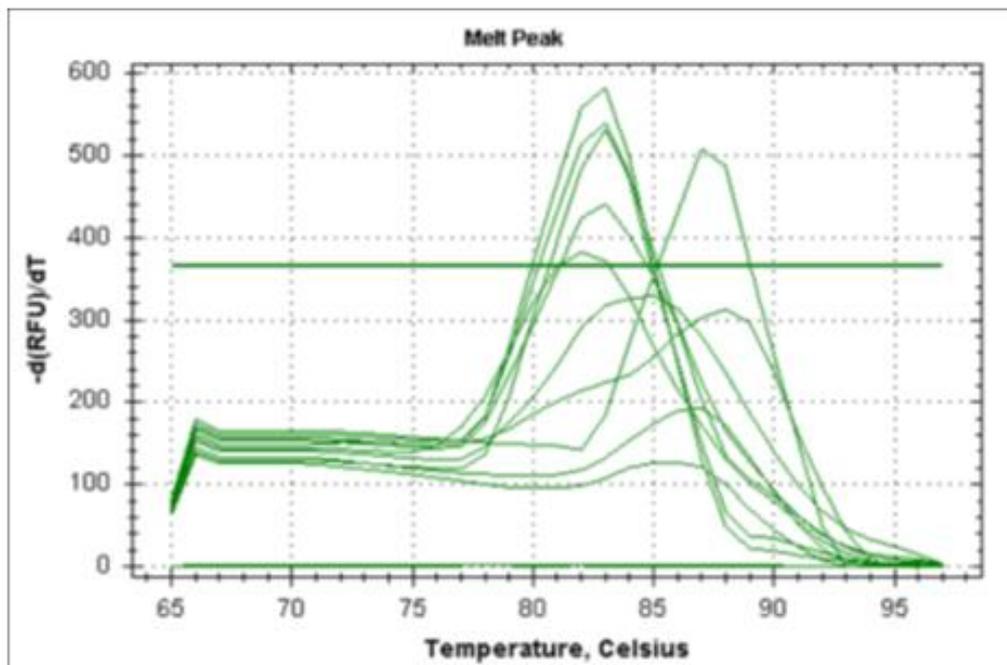
été capable de détecter des espèces de *Trichophyton* spp. dans 15 échantillons négatifs en culture dont sept l'étaient aussi à l'examen direct.

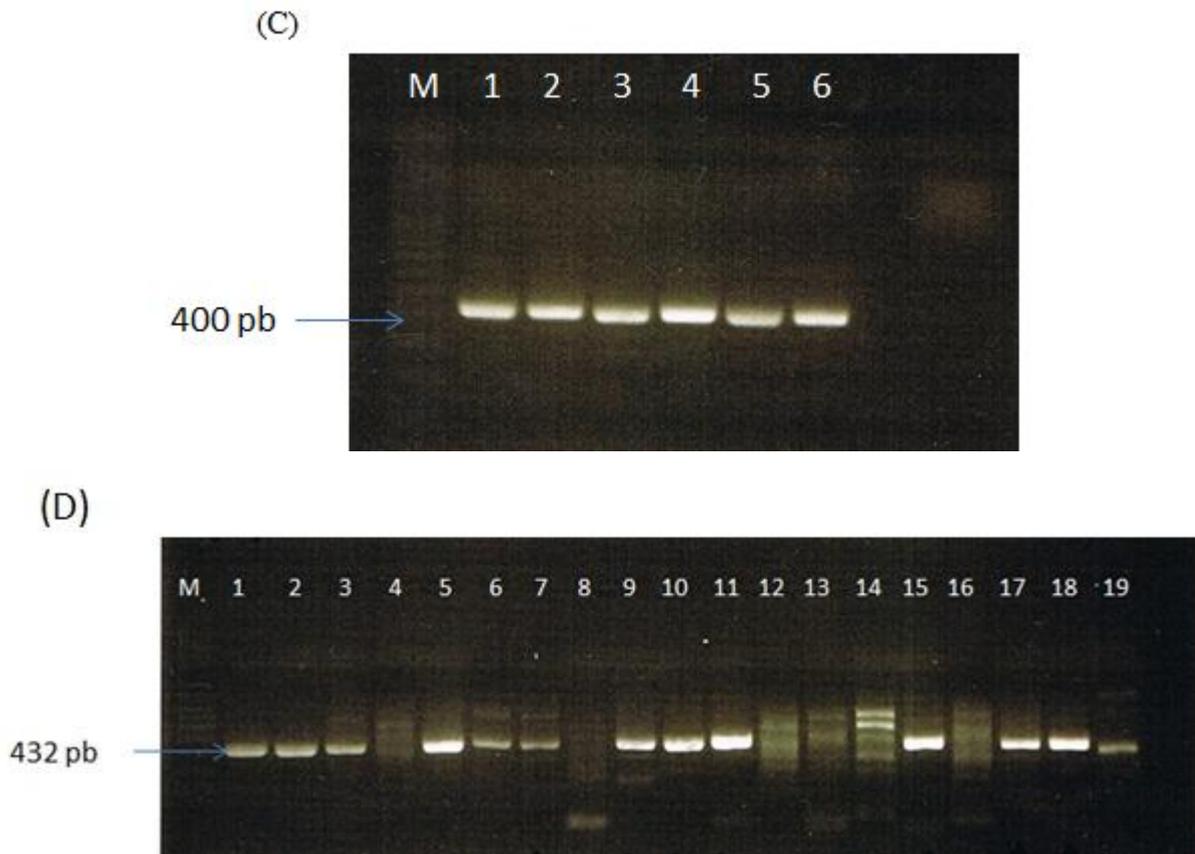
Conjointement, la RT-PCR panfongique et la RT-PCR pandermatophytes n'ont pas pu détecter la présence de champignons dans deux échantillons dont la culture a objectivé *T.rubrum* et l'examen direct la présence de filaments pour l'un des deux.

(A)



(B)





**Figure 31:** Exemple de quelques résultats de RT-PCR en présence de dermatophytes (A : Courbes d'amplification des PCR pandermatophytes ; B : Courbes de fusion des produits PCR pandermatophytes ; C : Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose des amplicons du gène de CHS1 (432 pb) à différentes concentration des ADN extraits de *Trichophyton rubrum* CM7877, *T.interdigitale* CM7803 et *T.violaceum* CM7447 ; (M : marqueur de taille moléculaire, 1 et 2: *T.rubrum* CM7877 à 20pg et 20ng, 3 et 4 *T.interdigitale* CM7803 à 20pg et 20ng, 5 et 6: *T.violaceum* CM7447 à 20pg et 20ng) ; D : Résultats du contrôle de l'amplification par PCR pandermatophytes de quelques échantillons d'ongles, par révélation des amplicons en électrophorèse sur gel d'agarose.

Devant la faible corrélation entre les résultats de la RT-PCR panfongique et ceux de la culture (Tableau 16), la possibilité d'une colonisation par des espèces (*Candida* spp. et *Aspergillus* spp.) ubiquitaires, abondantes dans l'environnement et souvent opportunistes, a été évoquée. Ainsi, 25 échantillons ont été testés par des PCR spécifiques à savoir la PCR-*Candida* spp. et la PCR-*Aspergillus* spp.

**Tableau 16:** Résultats comparatifs entre la culture et la PCR

Echantillons	Culture	PCR panfongique	PCR pandermatophyte
1	<i>Acremonium</i> spp.	Négative	<i>Trichophyton</i> spp.
2/3	<i>Alternaria</i> spp.	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton</i> spp.
4	<i>Alternaria</i> spp + <i>Aspergillus</i> spp.	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.
5	<i>Exophialas</i> pp	<i>T. rubrum</i>	<i>Trichophyton</i> spp.
6	<i>Rhodotorula</i> spp	Négative	<i>Trichophyton</i> spp.
7	<i>Penicillium</i> spp.	Négative	<i>Trichophyton</i> spp.
8	<i>Trichosporon</i> spp.	Négative	<i>Trichophyton</i> spp.
9	<i>Exophiala</i> spp.	Négative	<i>Trichophyton</i> spp.

➤ **PCR spécifique de *Candida* spp. et d'*Aspergillus* spp.**

La PCR spécifique *Candida* spp. a permis de détecter une à plusieurs espèces du genre dans 19/25 échantillons, ce qui a représenté un taux de 76%. De son côté, la PCR spécifique *Aspergillus* spp. a permis de détecter des espèces aspergillaires dans 15/25 cas, ce qui a donné un taux de 60% (Tableau 17).

Dans 10 cas, deux à cinq espèces de *Candida* spp. ont été détectées dans un même échantillon. Ces espèces sont représentées par *C. parapsilosis* (10 cas), *C. krusei* (9 cas) et *C. albicans* (7 cas). Quatre échantillons dont la culture était positive à *Candida* spp., ont été confirmés par la PCR spécifique. *Aspergillus fumigatus* détecté 14 fois a été l'espèce dominante du genre.

Par ailleurs, il est à noter que six cas positifs à *Trichophyton* spp. révélés par la PCR pandermatophyte, ont également été positifs à *A. fumigatus* et à *Candida* spp. par les PCR spécifiques (Tableau 17).

Dans les 15 échantillons d'ongles sains, *Candida* spp. a été révélé 12 fois soit à un taux de 80%. Quant à *Aspergillus* spp., il a été détecté 9 fois soit à un taux de 60% (Tableau 18). Notons que *Candida* spp. et *Aspergillus* spp associés dans 9 cas, ont représentés un taux de 60%.

**Tableau 17:** Détection par PCR spécifique de *Candida* spp. et *Aspergillus* spp. à partir des échantillons négatifs en PCR panfongique.

Cas	PCR Panfongique	PCR <i>Candida</i> spp	PCR <i>Aspergillus</i> spp	PCR Pandermatophyte	Culture
1	Négative	<i>C. albicans</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	Négative
2	Négative	<i>C. albicans</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	Négative
3	Négative	<i>C. tropicalis</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	<i>Exophiala</i> spp.
4	Négative	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	Négative
5	Négative	<i>C.guilliermondii</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	<i>T. rubrum</i>
6	Négative	<i>C.glabrata</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Trichophyton</i> spp.	<i>T. rubrum</i>
7	Négative	<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C.glabrata</i> + <i>C.krusei</i>	Négative	Négative	Négative
8	Négative	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	Négative	Négative	<i>C. parapsilosis</i>
9	Négative	<i>C. parapsilosis</i>	Négative	Négative	<i>Candida</i> spp.
10	Négative	<i>C. parapsilosis</i>	<i>A.flavus</i>	Négative	Négative
11	Négative	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative	Négative
12	Négative	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative	Négative
13	Négative	<i>C. albicans</i> + <i>C. parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i> + <i>A.terreus</i>		Négative
14	Négative	<i>C. albicans</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative	Négative
15	Négative	<i>C. albicans</i>	Négative	Négative	<i>Penicillium</i> spp.
16	Négative	<i>C. parapsilosis</i> + <i>C. tropicalis</i>	Négative	Négative	<i>A.niger</i>
17	Négative	<i>C. tropicalis</i>	Négative	Négative	Négative
18	Négative	<i>C. albicans</i> + <i>C. tropicalis</i> + <i>C.glabrata</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative	<i>C. albicans</i>
19	Négative	<i>C. parapsilosis</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative	<i>C. parapsilosis</i>
20	Négative	Négative	Négative	Négative	<i>T. rubrum</i>
21	Négative	Négative	<i>A.fumigatus</i>	Négative	Négative
22	Négative	Négative	<i>A.fumigatus</i>	Négative	Négative
23	Négative	Négative	Négative	Négative	Négative
24	Négative	Négative	Négative	Négative	<i>P. lilacinus</i>
25	Négative	Négative	Négative	Négative	<i>T. rubrum</i> + <i>A. niger</i>

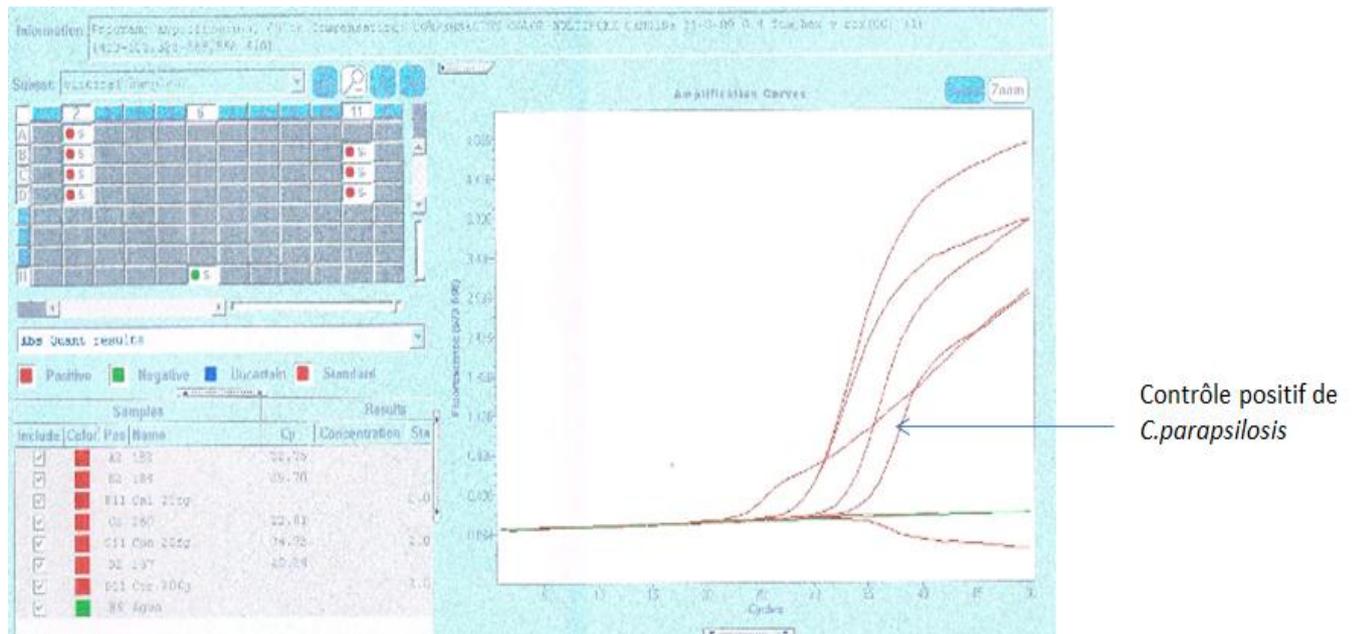


Figure 32 : Exemple de courbes d’amplification des échantillons d’ongles positifs à *C.parapsilosis* à la longueur d’onde 523-568 nm.

Tableau 18: Résultats des 15 prélèvements d’ongles sains testés par les 4 techniques moléculaires

Contrôles (ongles sains)	PCR Panfongique	PCR <i>Candida</i> spp.	PCR <i>Aspergillus</i> spp.	PCR Pandermatophyte
1	Négative	<i>C.parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	Négative	Négative
2	Négative	<i>C.parapsilosis</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
3	Négative	Négative	Négative	Négative
4	Négative	Négative	Négative	Négative
5	Négative	<i>C. albicans</i> + <i>C.parapsilosis</i> + <i>C. tropicalis</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
6	Négative	<i>C.parapsilosis</i>	Négative	Négative
7	Négative	<i>C.parapsilosis</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
8	Négative	<i>C.parapsilosis</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
9	Négative	<i>C.parapsilosis</i>	<i>A.fumigatus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
10	Négative	Négative	Négative	<i>Penicillium chrysogenum</i>
11	Négative	<i>C.parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	Négative	Négative
12	Négative	<i>C.parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
13	Négative	<i>C.parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
14	Négative	<i>C.parapsilosis</i> + <i>C.tropicalis</i>	<i>A.fumigatus</i>	Négative
15	Négative	<i>C.parapsilosis</i> + <i>C.krusei</i> + <i>C.guilliermondii</i>	<i>A.terreus</i>	Négative

### **3. Discussion**

L'onychomycose est une infection unguéale difficile à traiter, car tenace et très souvent récidivante. Sa prévalence dans la population générale est difficile à estimer et nécessite des enquêtes multiples et des études épidémiologiques larges et répétées. Selon certains auteurs, elle représente 18 à 50 % des pathologies unguéales dans le monde (Halim *et al.*, 2013).

Cette infection est principalement causée par des espèces de dermatophytes toutefois, des non dermatophytes, levures ou moisissures, peuvent aussi en être isolés.

Parmi les 298 patients inclus dans notre étude, le sex-ratio était de 0.74, le sexe féminin représentait (57.62 %) ; cette prédominance féminine, rapportée par d'autres auteurs, est mise sur le compte de la gêne fonctionnelle et le souci esthétique plus exprimés par les femmes que par les hommes (Halim *et al.*, 2013).

Cette étude a, en outre, conforté le caractère prédominant des onychomycoses des orteils (68.45 %) noté également par d'autres auteurs. Les principaux facteurs favorisant ces onychomycoses des pieds sont la fréquence de la contamination à partir des sols souillés par les dermatophytes anthropophiles (fréquentation régulière de piscines ou fréquentation régulière de douches collectives), port régulier de chaussures fermées, quelques rites religieux (ablution et mosquées), pratique sportive. Par ailleurs, la vitesse de croissance des ongles des orteils étant plus ralentie que celle des mains, permet au champignon de mieux s'installer (Baran et Piérard, 2004).

L'onychomycose sous-unguéale disto-latérale avec ses deux variétés (onycholyse et hyperkératose) présentant 60% des atteintes, a été la forme clinique la plus fréquente dans notre étude comme souvent mentionné par de nombreux auteurs (Faergemann et Baran, 2003; Farhi *et al.*, 2011). L'onychodystrophie totale ou secondaire (stade final des autres atteintes) a aussi été présente dans 39.6% des cas étudiés. Ce taux peut-être expliqué par le fait que cette maladie peut souvent passer sous silence, dû à l'ignorance ou à la négligence des patients.

L'examen direct et la culture étaient positifs dans 31% des cas. Par ailleurs, des examens directs négatifs avec cultures positives et des examens directs positifs avec cultures négatives ont été notés. Ils représentent respectivement 11.41% et 26.84% de l'ensemble des échantillons (tableau 14). Ces deux techniques se complètent. En effet, l'examen microscopique direct est rapide, peu coûteux et doté d'une bonne sensibilité, cependant, il peut confirmer l'infection fongique (Gupta *et al.*, 2013), sans pour autant identifier le genre ou l'espèce responsable (Chabasse, 2011; Kardjeva *et al.*, 2006; Petinataud *et al.*, 2014).

Quant aux cultures, elles sont lentes et peuvent donner des résultats faussement négatifs dans 40% des cas, alors que l'examen microscopique est positif (Bontems *et al.*, 2009; Monod *et al.*, 2006; Petinataud *et al.*, 2014). La réciprocité est vraie, c'est-à-dire qu'elles peuvent également donner de faux positifs et ce, par contamination par des moisissures saprophytes et environnementales qui poussent plus rapidement que les dermatophytes (Paugam *et al.*, 2013; Petinataud *et al.*, 2014). Nos résultats sont en corrélation avec ceux avancés par certains auteurs (Arca *et al.*, 2004; Dhib *et al.*, 2012; Kardjeva *et al.*, 2006).

Dans cette étude, *T. rubrum* était la seule espèce de dermatophyte isolée. Elle représente l'étiologie la plus fréquente des onychomycoses (environ 49 %). Ce qui est proche des données de la littérature où nous remarquons, par exemple, qu'en France cette espèce représente 50 à 70 % des souches isolées, 91 % en Allemagne et 97 % aux États-Unis (Halim *et al.*, 2013). Notons, également dans ce travail, que l'origine lévurique, a été mise en évidence dans 27 % des prélèvements dont 12% représentés par *C. albicans*, suivie des espèces non *albicans* dans 9 %. Cependant, des enquêtes réalisées à Alger, ont mentionné une fréquence plus importante de *C. parapsilosis* dans les onychomycoses suivie par *C. albicans* et *C. krusei*. Le genre *Trichosporon* étant évoqué en dernière place (Djeridane *et al.*, 2006).

L'implication des moisissures dans la pathologie fongique unguéale est très variable. En effet, les chiffres varient d'un laboratoire à un autre. Monod *et al.* (2006), ont estimé, selon les résultats de leurs recherches, que la fréquence de l'onychomycose à moisissures était environ 30%, sans inclure les infections mixtes. Par ailleurs, des études statistiques menées dans le sud de la Floride (États-Unis) ont montré que les non dermatophytes semblent être plus fréquents que les dermatophytes dans les onychomycoses dans une population gériatrique (Scherer *et al.*, 2001).

Les espèces isolées, dans notre étude, appartiennent à *Aspergillus* spp, *Acremonium* spp, *Paecilomyces* spp, *Alternaria* spp. Ces dernières ont, également, été rapportées dans la littérature (Chabasse et Pihet, 2014; Contet-Audonnet, 2005; Nouripour-Sisakht *et al.*, 2015).

Il est à noter qu'en dehors des dermatophytes et des pseudo-dermatophytes dont le pouvoir pathogène est bien connu, il est difficile d'affirmer la pathogénicité des moisissures isolées (Bontems *et al.*, 2009). Pour cela, il convient de préciser les critères de pathogénicité qui dépendent du champignon isolé, du terrain sous-jacent et des facteurs favorisants afin de distinguer une colonisation d'une réelle implication pathologique (Chabasse et Pihet, 2014).

Concernant l'identification des dermatophytes isolés dans notre étude, nous avons rapporté pour la première fois la mise en évidence de *T. rubrum* var. *raubitschekii*. Ce dernier a été isolé de l'ongle du gros orteil d'une femme hypertendue âgée de 69 ans vivant à Constantine (Algérie). L'examen microscopique des cultures et le test d'uréase positif ont suggéré la présence de *T. rubrum* var. *raubitschekii*. L'analyse moléculaire de l'isolât a révélé une homologie de 99% avec *T. raubitschekii* JX827168.1 et *T. rubrum* FM178326.1. Dans notre étude, cette variante a été isolée dans l'une des cinq cultures positives à *T. rubrum*.

*T. rubrum* var. *raubitschekii* est un dermatophyte anthropophile et pathogène, originaire d'Afrique, d'Asie et d'Amérique du Sud (Brasch, 2007). Il a été récemment mis en évidence en Europe (Hiruma *et al.*, 2012), mais la plupart des patients impliqués étaient des immigrants des régions subtropicales et tropicales. Dans les dernières études, il a été associé à *tinea corporis*, *tinea manuum*, *tinea cruris* et *tinea unguium* (Zhang *et al.*, 2015). Cliniquement, les lésions causées par *T. rubrum* var. *raubitschekii* étaient indiscernables de celles causées par *T. rubrum*. Cela pourrait expliquer le fait qu'aucune étude n'a conduit à la détection et à la description de cette variante auparavant en Algérie. Djeridane *et al.* ont rapporté une prévalence globale de l'onychomycose des ongles égale à 4,6% dans l'hôpital militaire d'Alger. L'onychomycose était causée par *T. rubrum* dans 35% des cas (Djeridane *et al.*, 2006). Cela pourrait être lié à une mauvaise identification de cette variante. Aussi la colonie est phénotypiquement proche à *T. rubrum*, à des souches de *T. mentagrophytes* granulaires et à *T. violaceum* (van Gelderen de Komaid and Borges de Kestelman, 2001; Zhang *et al.*, 2015).

Le test d'uréase n'est pas systématiquement effectué en routine, ce qui pourrait conduire à une identification erronée de *T. rubrum* var. *raubitschekii*.

Initialement, *T. raubitschekii* avait été classé comme une espèce distincte (Adamski *et al.*, 2014), mais les études moléculaires, comme le gène de la chitine synthase 1 (CHS1) et la région de (ITS1-5.8S-ITS2), l'ont reconnu comme une variante de *T. rubrum*. En effet, dans notre étude, nous avons analysé un fragment génomique d'ADN ribosomique, constitué de séquences (ITS) 1 et 2 et d'ADNr 5,8S, en utilisant des amorces universelles ITS1 et ITS4.

Nous avons, effectivement, trouvé que *T. rubrum* var. *raubitschekii* partageait des similitudes avec *T. rubrum* dans la région ITS, ce qui suggère une co-spécificité comme montré sur l'arbre phylogénétique où toutes les espèces sont alignées dans le même clade. Ce résultat peut être expliqué par une homologie génétique de *T. rubrum* et de *T. rubrum* var.

*raubitschekii* dans cette région génomique, comme cela a été démontré précédemment (Gräser *et al.*, 2000).

Il a été rapporté que les méthodes moléculaires semblent être les meilleurs outils pour obtenir un diagnostic rapide et correct directement à partir des échantillons biologiques (Bergman *et al.*, 2013; Dhib *et al.*, 2014; Kupsch *et al.*, 2016; Petinataud *et al.*, 2014). Dans le but de faire une comparaison entre le diagnostic classique et le diagnostic moléculaire nous avons évalué deux méthodes de PCR en temps réel (Pandermatophyte et panfongique) pour la détection des espèces fongiques dans soixante-dix échantillons d'ongles de patients. Les cas ont été classés comme étant prouvés et probables, en se basant sur les résultats négatifs des cultures et de l'examen microscopique. Quinze contrôles sains ont également été inclus dans les essais de RT-PCR.

Dans une première approche, nous avons testé la PCR- panfongique (Buitrago *et al.*, 2013), capable de détecter toute espèce fongique et une PCR pandermatophyte comme décrite précédemment (Dhib *et al.*, 2014). Tous les résultats ont été confirmés par séquençage et ensuite comparés à ceux obtenus par des méthodes classiques (microscopie et cultures). Parmi les 70 échantillons traités, l'examen direct et la culture ont été positifs respectivement dans 58% et 54% des cas et *T.rubrum* représentait 53% (20/38) des cultures positives.

Dans la PCR panfongique, la présence d'un amplicon par PCR a été observée dans 57% des cas, le séquençage a donné un résultat approprié dans seulement 20/40 d'entre eux et la technique a donc donné des résultats positives dans 28% des échantillons. Cependant, elle a pu détecter la présence fongique dans six cas où les cultures étaient négatives (quatre correspondaient à *T.rubrum* et deux à *T.violaceum*). et a été capable de détecter *T. rubrum* dans deux cas donnant des non dermatophytes en culture. Mais n'était pas capable de détecter les espèces appartenant à *Aspergillus* spp, *Alternaria* spp., *Paecilomyces* spp. et *Exophiala* spp. trouvées en culture. Ceci peut être attribué à une faible amplification ou aux résultats de séquençage non interprétables (Monod *et al.*, 2006).

La PCR pandermatophytes a révélé un taux de positivité beaucoup plus élevé que celui de la culture. En effet, elle a pu détecter des espèces de dermatophytes dans 60% (42/70) des échantillons, alors que la culture a donné seulement 20/70 *T.rubrum*. C'est probablement à cause de la faible sensibilité de la culture, en particulier pour les échantillons d'ongles (Dubljanin *et al.*, 2014) . La sensibilité de cette technique était de 90%, dans neuf cas, elle n'a

pas été corrélée aux résultats positifs de la culture, et a pu détecter *Trichophyton* spp. (Tableau 16). Par ailleurs, la technique a permis de détecter les espèces de *Trichophyton* dans quinze échantillons négatifs en cultures, dont sept étaient aussi négatifs en examen direct. Cette technique a une limite, elle ne peut détecter que le genre de dermatophytes sans préciser l'espèce.

Deux échantillons positifs en culture à dermatophytes étaient négatifs dans les deux tests de PCR en temps réel. Ce résultat est quelque peu surprenant car la sensibilité de la PCR (Pandermatophyte) est plus élevée par rapport aux tests mycologiques, cela peut être attribué à une erreur d'échantillonnage, ou à la robustesse de la paroi cellulaire fongique empêchant la libération de l'ADN, ou à la répartition inégale des dermatophytes ou de leur ADN lorsque les échantillons d'ongles sont répartis en portions pour des analyses ultérieures (Bontems *et al.*, 2009; Dhib *et al.*, 2012; Monod *et al.*, 2006).

Vue le faible rendement relatif obtenu par la panfongique (20/70) et la faible corrélation entre les résultats de cette dernière et des cultures, des essais de RT-PCR spécifiques décrits précédemment ont été utilisés pour la détection des espèces commensales telles que *Candida* spp. et les espèces environnementales telles que *Aspergillus* spp. dans les échantillons des patients. Vingt-cinq échantillons négatifs en PCR panfongique ont été sélectionnés pour tester la présence de trois espèces d'*Aspergillus* spp. et / ou six espèces de *Candida* spp. Les échantillons des volontaires sains ont également été inclus dans cette analyse.

Le genre *Candida* a été confirmé chez 76% des échantillons et *Aspergillus* spp. dans 60% (15/25). La présence des deux genres dans un même échantillon était de 52%. Dans dix cas, plusieurs espèces de *Candida* ont été détectées et dans un cas deux espèces d'*Aspergillus* ont été détectées. Ce fait peut expliquer la difficulté d'obtenir des séquences précises quand les produits de la PCR panfongique sont analysés.

Dans notre étude, les espèces les plus fréquemment détectées chez les *Candida* spp. étaient *C. parapsilosis* (10 cas) suivie de *C. krusei* (9 cas) et *C. albicans* (7 cas). Et pour les *Aspergillus* spp. *A. fumigatus* (14 cas) était la plus détectée.

Il est à signaler dans ce travail, que l'utilisation d'autres amorces spécifiques nous aurait permis de détecter d'avantage espèces fongiques, malheureusement cela n'a pas été possible.

L'analyse des ongles sains a donné, des espèces de *Candida* spp dans 80% des échantillons (tableau 17), *A. fumigatus* dans 60% et l'association des deux genres dans 60% des échantillons.

La PCR pandermatophyte a détecté l'ADN de *Penicillium chrysogenum* dans deux échantillons, cela est dû au croisement aléatoire des amorces avec ce champignon. Ce qui nous a poussés à faire recours au séquençage pour confirmer les résultats de la PCR.

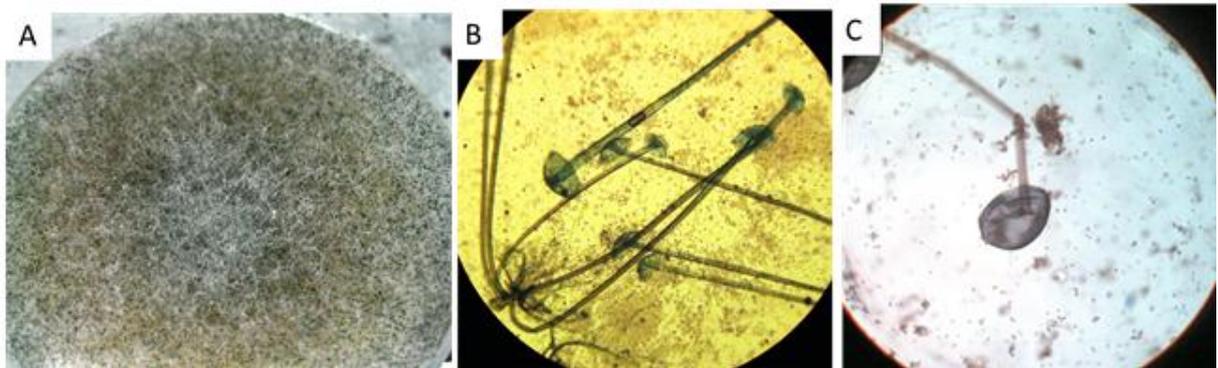
Nous pouvons déduire dans cette étude que, la PCR en temps réel panfongique utilisée seule s'est avérée moins fiable dans la détection des espèces impliquées dans les onychomycoses en raison du grand nombre de ces dernières présentes dans les ongles. Mais malgré ses limites, elle reste un bon outil de diagnostic complémentaire de l'examen microscopique et des cultures chez les patients suspects d'onychomycoses. Cependant, la PCR pandermatophyte semble être plus adaptée dans les infections mixtes ou quand la culture est négative et plus sensible pour la détection des dermatophytes étiologiques sans pour autant identifier l'espèce. Cette limitation n'a aucune incidence sur le traitement à instaurer vu que les dermatophytes ont des sensibilités presque similaires aux médicaments antifongiques. Enfin, il est à noter que les espèces non dermatophytiques isolées à partir des onychomycoses doivent être soigneusement analysées car elles peuvent être responsables de récurrence et d'échec thérapeutique des onychomycoses.

## PARTIE II : LE CHITOSANE PRODUIT PAR *RHIZOPUS ORYZAE*

### 1. Isolement et identification macro/microscopique de *Rhizopus oryzae*

L'isolement de *Rhizopus oryzae* a été effectué à partir des bananes pourries sur milieu PDA. Au bout de 4 jours d'incubation à 30°C, ce champignon est apparu et s'est rapidement développé, en donnant des filaments blancs, devenant rapidement gris puis noirs floconneux (Figure 33).

Cet aspect macroscopique est aussi semblable à celui de *Rhizopus stolonifer*. Le facteur température d'incubation a aussi été pris en considération afin de discriminer entre les deux espèces, en effet, *R.oryzae* peut donner un bon développement des colonies à des températures allant jusqu'à 40°C. Cette souche a été purifiée afin d'obtenir des cultures pures.



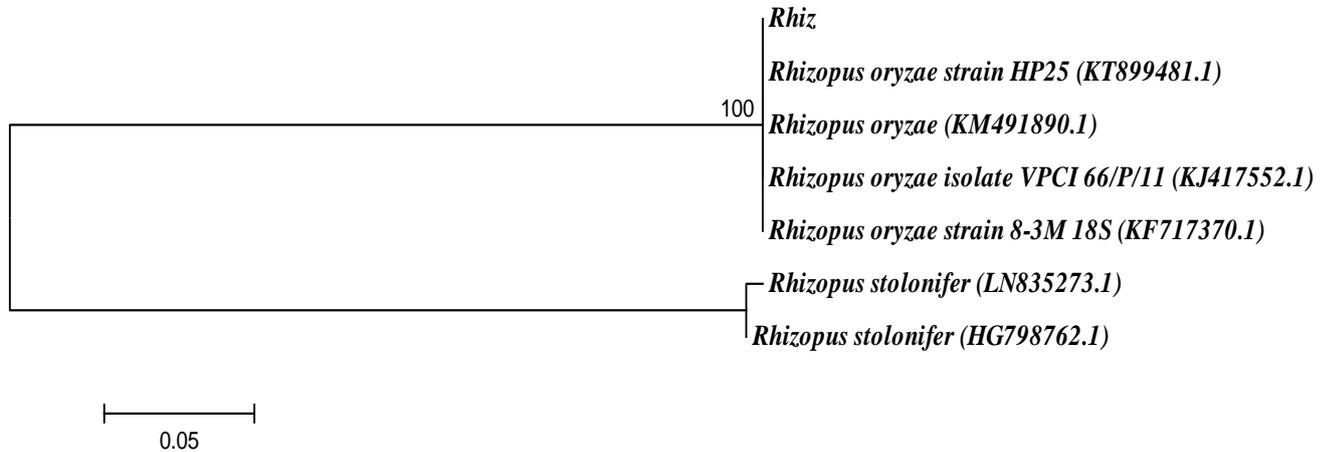
**Figure 33:** *Rhizopus oryzae*. A: Colonie sur PDA après 5 jours d'incubation, B: Sporocystophores en bouquet X 100, C : Sporocyste X 250).

Microscopiquement, cette souche a représenté des sporocystophores simples ou en forme de bouquet, des rhizoïdes bruns ramifiés irrégulièrement ; sporocyste gris à noir, globuleux et des sporocystospores sub-globuleuses à ovoïdes, striées en surface.

### 2. Identification moléculaire de *Rhizopus oryzae*

Les régions ITS 1 et ITS 2 et 5.8S des ADN ribosomiaux ont, également, été choisies comme marqueurs moléculaires. Elles ont été amplifiées par PCR et les amplifiats ont été séquencés. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles des organismes apparentés sur BLASTn. *Rhizopus stolonifer* a été choisi comme un out groupe.

Les ITS de cette souche (*Rhiz*) étaient homologues à 100 % aux autres *Rhizopus oryzae* présents sur NCBI (Figure 34) où ils se sont placés dans le même clade. En se basant sur les caractères phénotypiques et moléculaires, cette souche a donc été affiliée à l'espèce *R. oryzae*.



**Figure 34:** Arbre phylogénétique de *Rhizopus oryzae*, basé sur l'alignement des séquences ITS de l'ADNr

### 3. Fermentation

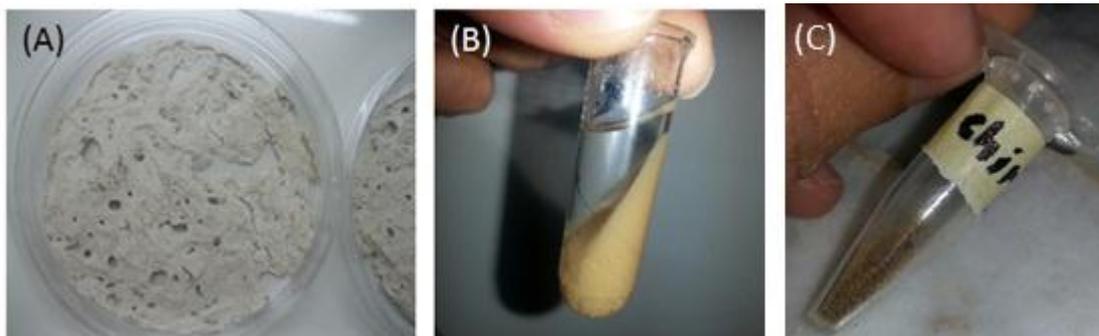
Après inoculation, les Erlenmeyer ont été incubés à 30°C et agités à 180 rpm pendant 72 heures. Cette agitation a permis un développement important du mycélium de l'espèce fongique. Le mycélium se développe dans le milieu de culture en formant des pelotes de filaments. Le développement de *Rhizopus oryzae* après 3 jours de fermentation est illustré par la figure 35.



**Figure 35:** *Rhizopus oryzae* après 3 jours d'incubation à 30°C à 180 rpm.

## 4. Extraction

*Rhizopus oryzae* a été choisie pour son importante production et sa qualité de chitosane. Après fermentation et récupération de la biomasse, le chitosane a été extrait selon le protocole d'extraction indiqué précédemment. La figure 36 (A) montre l'AIM après lyophilisation, (B), montre le chitosane de couleur beige, précipité après lavage à l'acétone et l'image (C) le chitosane en poudre après séchage.

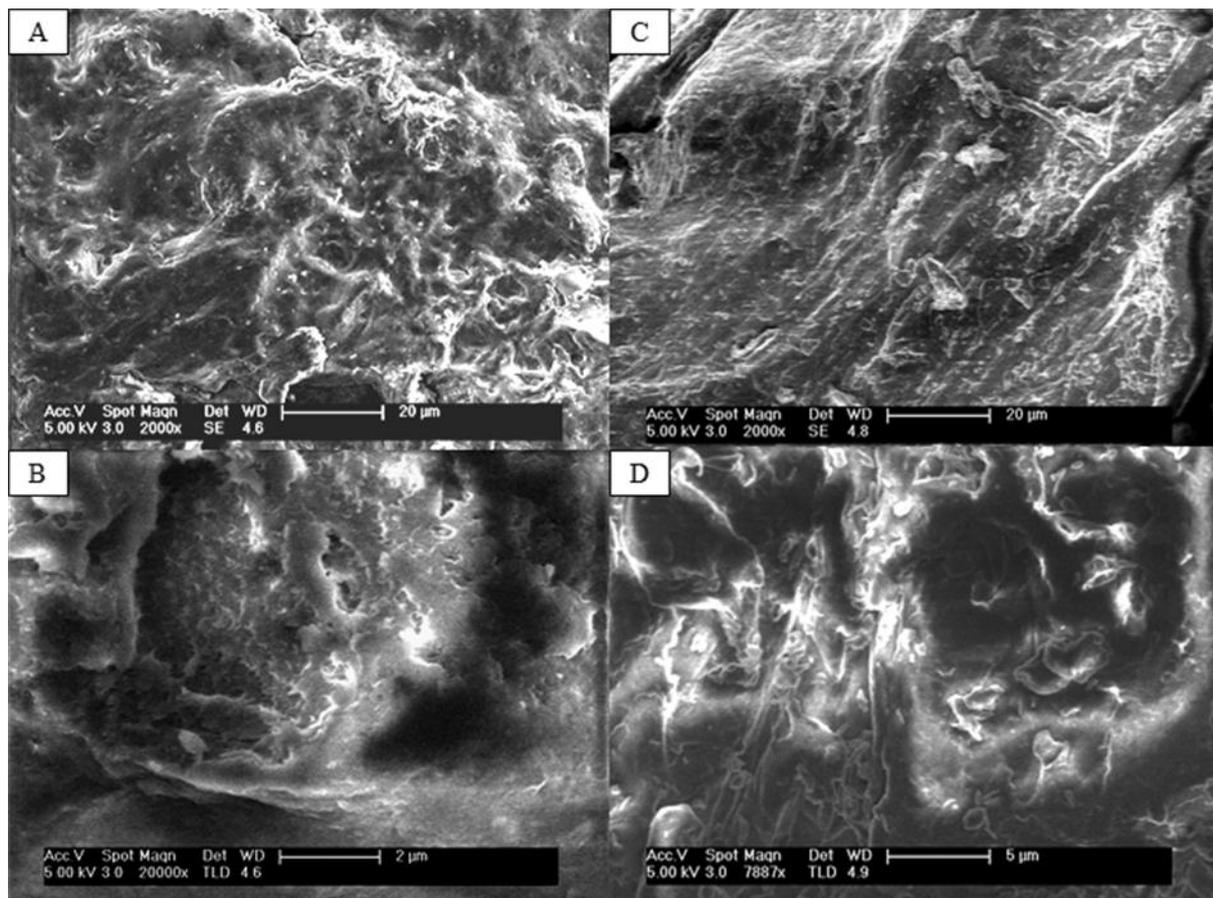


**Figure 36:** Extraction du chitosane, (A) : AIM lavée et lyophilisée, (B) : Le chitosane après lavage à l'eau distillée, éthanol et acétone, (C) : la poudre de chitosane après séchage.

## 5. Identification et caractérisation du chitosane

### 5.1. Analyse par microscopie électronique à balayage MEB

Les figures 37 A et B montrent les images MEB obtenues du chitosane commercial et synthétique respectivement, avec différents agrandissements. Les images révèlent une structure composée de fibres reliées entre elles, intégrées dans une matrice amorphe. Cette structure fibreuse leur permet d'avoir des forces de liaisons qui facilitent, ou non, leur solubilité (Crini *et al.*, 2009)



**Figure 37:** Image de la Microscopie Electronique à Balayage (MEB) des deux Chitosanes: A-B : Grossissement élevé et faible du Chitosane synthétisé (extrait), C-D : Grossissement élevé et faible du Chitosane commercial.

## 5.2. Analyse par spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie IR constitue une méthode de choix pour le suivi de la synthèse d'une molécule ou de son identification. En effet, elle peut mettre en évidence l'apparition ou la disparition de certaines bandes de façon significative au cours des étapes de synthèse.

La figure 38 représente les spectres FTIR du chitosane commercial (A) et celui du chitosane de synthèse (B). La position et l'intensité des pics observés dans la figure 38 B, indiquent que le chitosane synthétique possède les mêmes fonctions que celles du chitosane commercial (Figure 38 A). Chaque pic et chaque bande sont attribués à une fonction particulière.

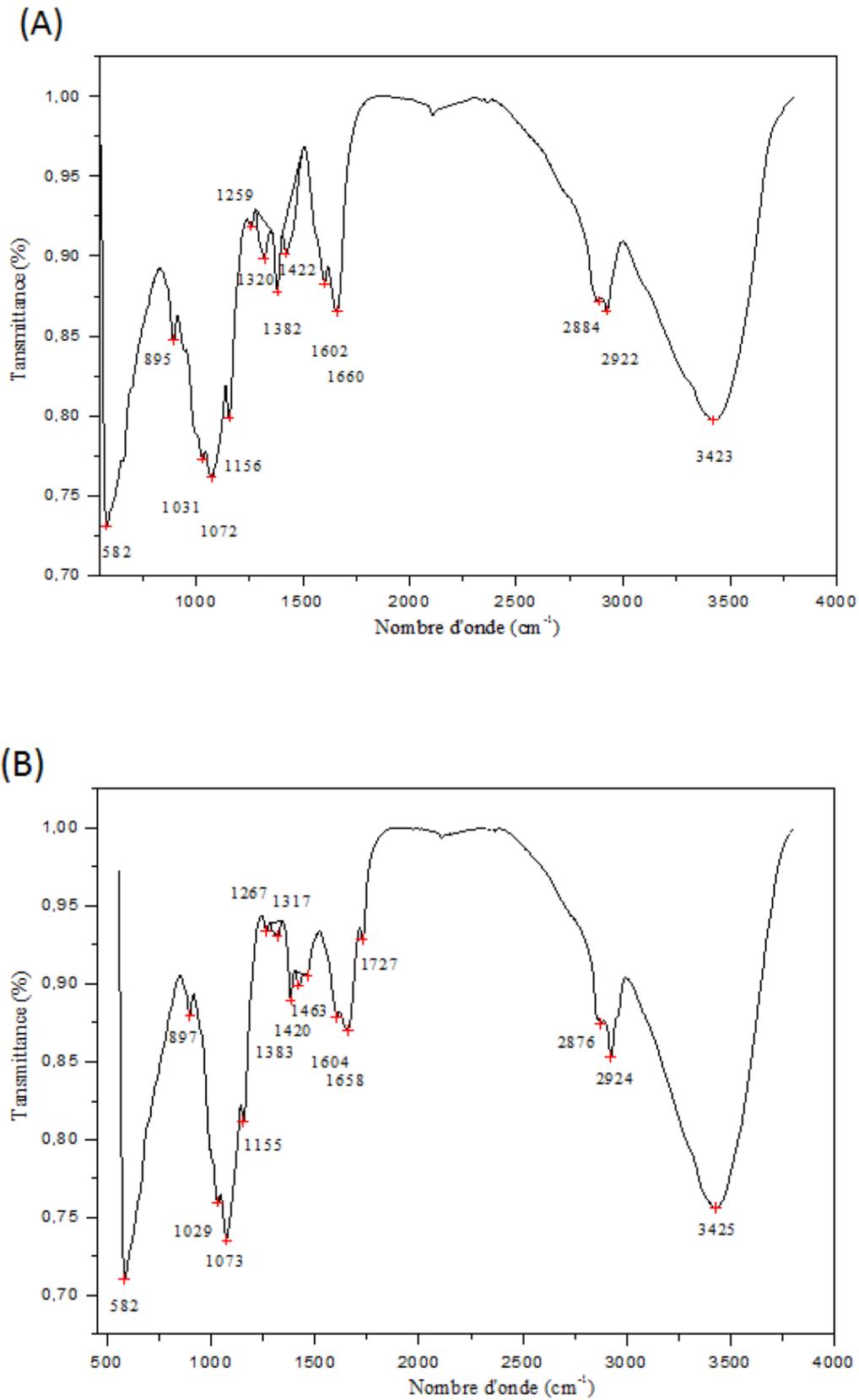


Figure 38: Spectre IR des chitosane. (A) Commercial et (B) Synthétisé.

Le Degré de désacétylation est calculé à partir de l'équation du degré d'acétylation qui est le ratio entre  $A_{1320}/A_{1420}$ , selon (Brugnerotto *et al.*, 2001) :

$$\text{DA}\% = 31.92 A_{1320}/A_{1420} - 12.20$$

Selon cette analyse, le chitosane commercial a donc un pourcentage de DA de 24,28%. Soit, un pourcentage DD égal à 75,72%. Le chitosane synthétisé a un DA de 23,71%, soit, un DD égal à 76,29%.

### 5.3. Calcul du degré de désacétylation DD par titration

La solution du chitosane solubilisé dans du HCl a été neutralisée avec du NaOH à 1M, la courbe obtenue est représentée sur la figure 39.

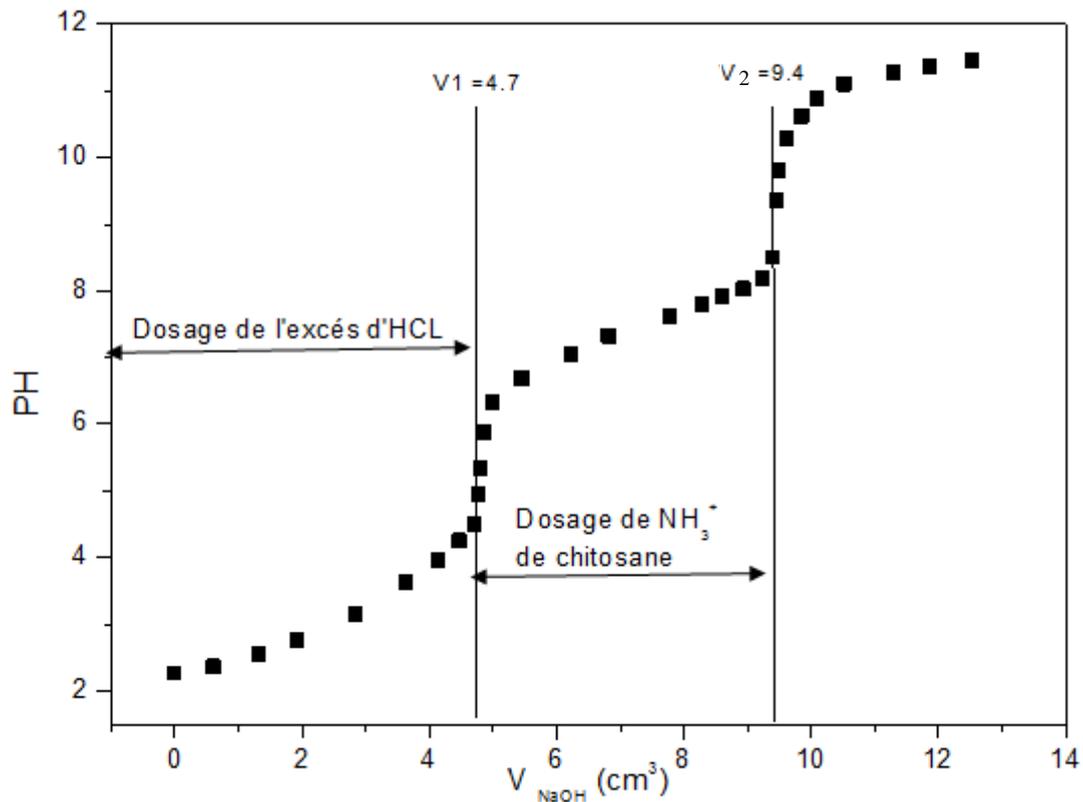
Deux zones distinctes sur la courbe sont observées. La première correspond à l'excès de HCl, la seconde (entre  $V_1$  et  $V_2$ ) correspond au dosage des fonctions amines ( $\text{NH}_3^+$ ). Le degré d'acétylation du chitosane synthétisé est calculé selon la formule ci-dessous :

$$\% \text{ DA} = (1 - 162 \times Q) / (1 + 43 \times Q)$$

$$Q = (V_{\text{NaOH}} \times 0,1) / (1000 \times M_{\text{cs}})$$

Sachant que  $M_{\text{cs}}$  : est la masse sèche de chitosane dans la prise d'essai (g) et  $V_{\text{NaOH}} = V_2 - V_1$  = volume versé en mL de NaOH 0,1M entre pH 4,5 et pH 8,5 (Figure 39).

$\% \text{ DA} = 19.8 \Rightarrow \% \text{ DD} \approx 80\%$ .



**Figure 39 :** Détermination du degré d'acétylation (DA) par titration du chitosane dissout dans une solution à 0.1M d'acide hydrochlorique (HCL) par 0.1M d'hydroxyde de sodium (NaOH).

## 6. Discussion

Le chitosane est un biopolymère, approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour son utilisation comme supplément alimentaire, dans les domaines biomédicaux, pharmaceutiques, agricoles et nutritionnels. Il a également été rapporté que la dégradation des produits de chitosane pur sont non toxiques, non immunogène et non cancérigène (Tayel *et al.*, 2010b).

Alternativement à sa source traditionnelle à partir des résidus des carapaces des crustacées, les champignons ont de plus grands avantages du point de vue écologique, simplicité du processus d'extraction, coût et temps d'extraction plus réduit, et absence de contamination par les protéines qui pourraient provoquer des réactions allergiques chez quelques individus (Crini *et al.*, 2009; Tayel *et al.*, 2010a).

Le chitosane n'a été trouvé jusqu'ici que chez les champignons, et particulièrement dans la paroi cellulaire des Zygomycètes, *Mucor*, *Absidia* et *Rhizopus* (Synowiecki et Al-Khateeb, 1997; Tan *et al.*, 1996).

Le taux et la qualité du chitosane peuvent varier selon l'espèce utilisée, les conditions de fermentation (Submerged shaken culture, batch culture, solid state culture) et les paramètres de fermentation (pH, température, temps d'incubation...) (Roberts, 1992).

Selon la littérature, *R. oryzae* s'est avérée parmi les espèces les plus productrices de chitosane aussi bien en SmF qu'en SSF. Cette dernière produit un chitosane ayant un degré de désacétylation élevé compris, entre 73 et 90%. Ce qui lui confère une plus grande activité antibactérienne vis-à-vis de différentes bactéries pathogènes, telles que *B.cereus*, *P.aeruginosa*, *Salmenella* sp. et *E.coli* comparativement au chitosane extrait à partir des crustacées (Dhillon *et al.*, 2013).

Le taux de production de chitosane a été comparé dans une étude menée par Pochanavanich and Suntornsuk, 2002, sur plusieurs espèces de champignons appartenant à *Lentinus edodes*, *Aspergillus niger*, *Pleuratus sajo-caju* et deux autres levures *Candida albicans* et *zygosaccharomyces rouxii* et *Rhizopus oryzae*, cette dernière espèce s'est montrée plus productrice avec un taux de 138 mg/g de substrat soit 14% de chitosane. Ce rendement fongique du chitosane atteint son maximum pendant la phase de croissance exponentielle (Hang, 1990).

Plusieurs milieux ont été décrits pour la production du chitosane par *Rhizopus oryzae*. L'effet de certaines sources de carbone et d'azote sur la production du chitosane a été étudié.

Il a été constaté que l'urée serait la meilleure source d'azote en SSF (Wang *et al.*, 2008) et la peptone influencerait de façon significative le poids moléculaire de ce biopolymère en SmF (Dhillon *et al.*, 2013). Cependant, la biosynthèse du chitosane est modulée par plusieurs facteurs, tels que la source de carbone, la source d'azote et le pH. Ce dernier influe de façon significative sur la taille du polymère obtenu. Un pH égale à 3 donne un chitosane de petit poids moléculaire, alors qu'un pH de 6 donne un chitosane de plus grande chaîne en SmF (Dhillon *et al.*, 2013). Un chitosane à faible PM serait plus efficace dans les tests antimicrobiens (Tayel *et al.*, 2010a).

Les procédés d'extractions sont aussi des facteurs pouvant affecter le DD et le taux du chitosane. En effet, le degré de désacétylation augmente avec l'augmentation de la concentration de la base, la durée du traitement et la température. Cependant, Zamani *et al.*,

2010 ont trouvé que le meilleur degré de désacétylation était après traitement au NaOH à la concentration 0.1M pendant 20 min à 121°C.

Dans le but d'identifier et de caractériser ce composé, plusieurs techniques sont généralement utilisées ; la spectroscopie à infra- rouge (FTIR), la résonance magnétique nucléaire (RMN) et spectroscopie UV, chromatographie par perméation de gel (GPC), l'hydrolyse acide, la méthode d'absorption de colorant et diverses méthodes de titration (Kasaai, 2008).

La spectroscopie FTIR et la titration sont considérées comme les techniques les plus adaptées car elle sont rapides, simples et économiques (Duarte *et al.*, 2002). C'est aussi des techniques utiles pour la détermination du DA du chitosane.

Au cours de notre étude, la texture et la structure du chitosane extrait ont été confirmées par MEB et FTIR, respectivement et comparées à celles du chitosane commercial isolé à partir des crustacés. La texture des deux chitosanes est constituée de fibres denses plus ou moins régulières, pour le chitosane commercial (carapaces des crevettes). Pour le chitosane extrait à partir de *R. oryzae*, une surface avec des fibres réparties aléatoirement a été observée.

Cette forme fibreuse est strictement liée à la solubilité de ce biopolymère. Des résultats similaires ont été observés par (Marei *et al.*, 2016) dans une étude comparative de la morphologie de surface des échantillons de chitosane obtenus à partir des crustacées et de certains champignons.

Les spectres FTIR des chitosanes synthétisé et commercial mettent en évidence la position et l'intensité des pics observés. Ce qui indique que le chitosane synthétisé possède les mêmes fonctions que celles du chitosane commercial. La bande observée à 3425  $\text{cm}^{-1}$  est attribuée à l'étirement symétrique des groupements -OH et  $-\text{NH}_2$  (Marei *et al.*, 2016), les deux pics observés à 2876 et 2924  $\text{cm}^{-1}$  sont due à l'étirement symétrique et antisymétrique des groupements -CH présents dans le cycle, des radicaux  $-\text{CH}_2\text{OH}$  et des groupement  $-\text{CH}_3$  (Pearson *et al.*, 1960). Le doublet des pics à 1604 et 1658  $\text{cm}^{-1}$  sont caractéristiques de l'étirement des groupements carbonyle C=O de l'amide I. Les deux pics à 1383 et 1420  $\text{cm}^{-1}$  sont due à la déformation symétrique des  $-\text{CH}$ . Le pic à 1463  $\text{cm}^{-1}$  est attribué à la déformation asymétrique des  $-\text{CH}_3$ . Les pics à 1317 et 1267  $\text{cm}^{-1}$  sont deux pics caractéristiques du chitosane, ils sont attribués aux bandes C-N de l'amine I et II. Trois pics sont observés à 1155, 1073 et 1029  $\text{cm}^{-1}$ , ils sont dus à l'étirement des -CO présents dans le cycle. Le pic à 897  $\text{cm}^{-1}$  correspond au liaison C-O-C caractéristique de la structure des saccharides (Mansur *et al.*, 2013).

La méthode de titration a confirmé les valeurs du DD trouvé en FTIR. En effet les résultats des deux techniques ont donné un degré de désacétylation de  $\approx 80\%$  et de  $76\%$  respectivement pour le chitosane synthétisé.

## PARTIE III : EVALUATION *IN VITRO* DE L'ACTIVITE DU CHITOSANE FONGIQUE SUR LES ESPECES DE DERMATOPHYTES ISOLEES

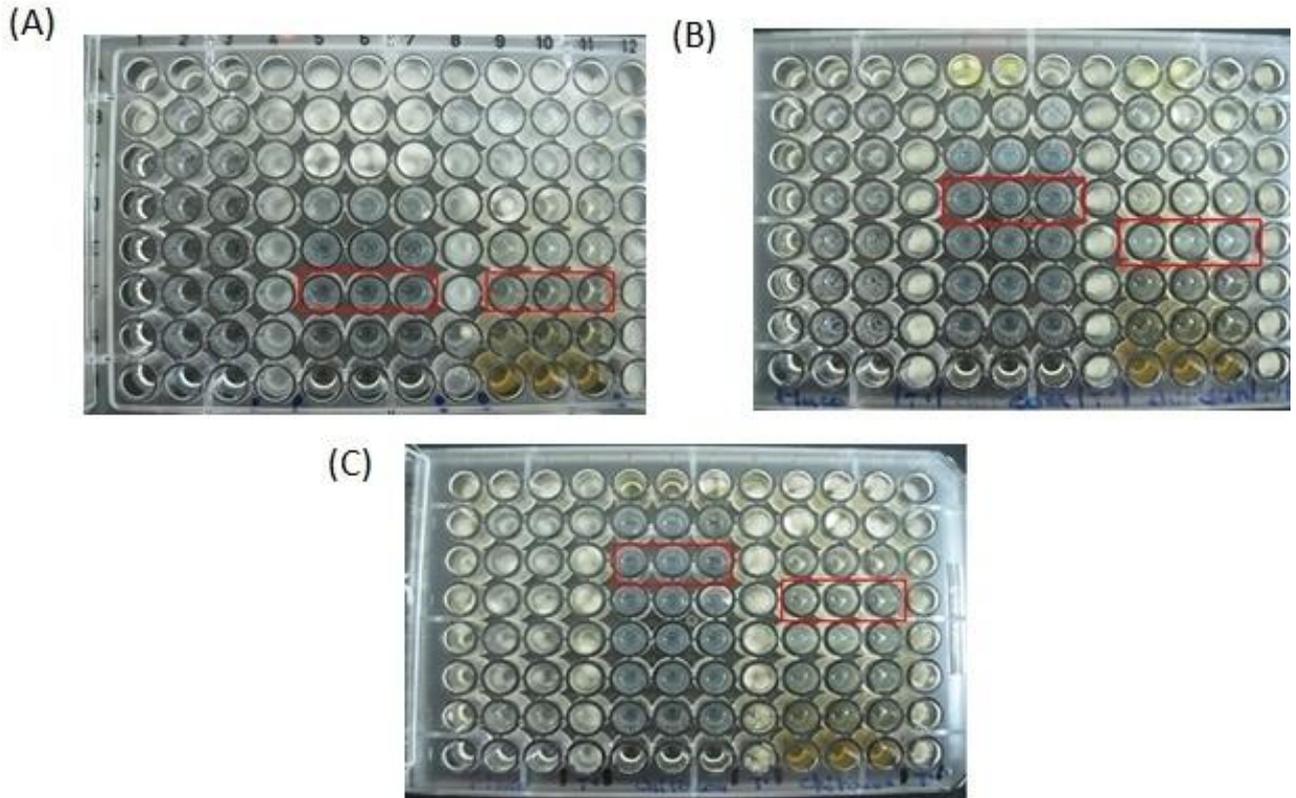
Pour évaluer l'activité *in vitro* du chitosane vis-à-vis de *T. rubrum*, *T. rubrum* var. *raubitschekii* et *T. interdigitale*, nous avons employé les deux méthodes précédemment décrites dans la section matériel et méthodes. La méthode de microdilution est sensible, fiable, peu consommatrice en réactifs, permet la répétition des essais, le traitement d'un grand nombre d'échantillons et la détermination de leur CMI. La méthode de diffusion sur gélose, simple et peu onéreuse, permet d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

### 1. Méthode de microdilution

Les résultats des concentrations minimales inhibitrices des trois molécules testées, à savoir le Fluconazole, le chitosane commercial (CC) et le chitosane extrait (synthétisé) (CE), vis-à-vis des trois dermatophytes choisis sont reportés dans le tableau 19 et illustrés par la figure 40.

**Tableau 19:** CMI obtenues vis-à-vis de *T. rubrum*, *T. rubrum* var. *raubitschekii* et *T. interdigitale*.

Molécules testées	CMI		
	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i> var. <i>raubitschekii</i>	<i>T. interdigitale</i>
Fluconazole (µg/mL)	32	64	64
Chitosane commercial (mg/mL)	2.5	0.62	0.31
Chitosane extrait (mg/mL)	2.5	1.25	0.62



**Figure 40:** CMI obtenues par microdilution (CLSI) vis-à-vis de : (A) *Trichophyton rubrum*, (B) *T. rubrum* var. *raubitschekii* et (C) *T. interdigitale*.

Au cours de nos manipulations, le fluconazole utilisé comme témoin positif a donné une CMI égale à 32  $\mu\text{g/mL}$  pour *T. rubrum* et égale à 64  $\mu\text{g/mL}$  pour *T. rubrum* var. *raubitschekii* et *T. interdigitale* (Tableau 19).

Les deux chitosanes (commercial et extrait) ont révélé des CMI variables de 0.31 à 2.5 mg/mL. Ils ont manifesté une activité importante vis-à-vis de *T. interdigitale* et faible vis-à-vis des deux autres espèces. En effet, *T. interdigitale* a pu être inhibé avec des concentrations de 0,62 pour le chitosane extrait et de 0,31 pour le chitosane commercial dont l'activité antifongique s'est révélée légèrement supérieure à celle du chitosane extrait. Cependant, les deux chitosanes ont présenté des CMI identiques (2.5 mg/mL) vis-à-vis de *T. rubrum*. Pour la variété *raubitschekii*, les CMI ont été de 1,25 mg/mL pour le chitosane extrait et de 0.62 mg/mL pour le chitosane commercial.

## 2. Méthode de diffusion sur gélose

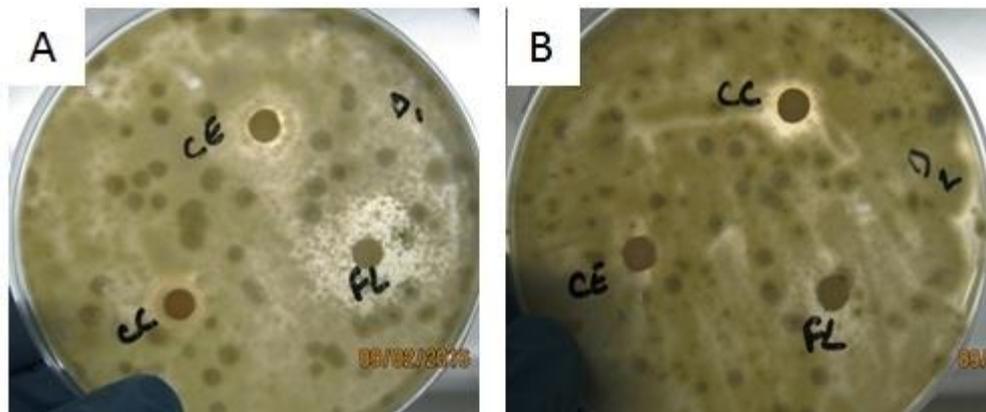
L'activité antifongique des deux chitosanes vis-à-vis des trois souches de dermatophytes (*T.rubrum*, *T.rubrum* var. *raubitschekii* et *T.interdigitale*) est illustrée par les figures 41, 43 et 45.

Nous remarquons l'existence d'une bonne corrélation entre les résultats des deux techniques employées, à savoir : la microdilution en plaque et la diffusion sur gélose.

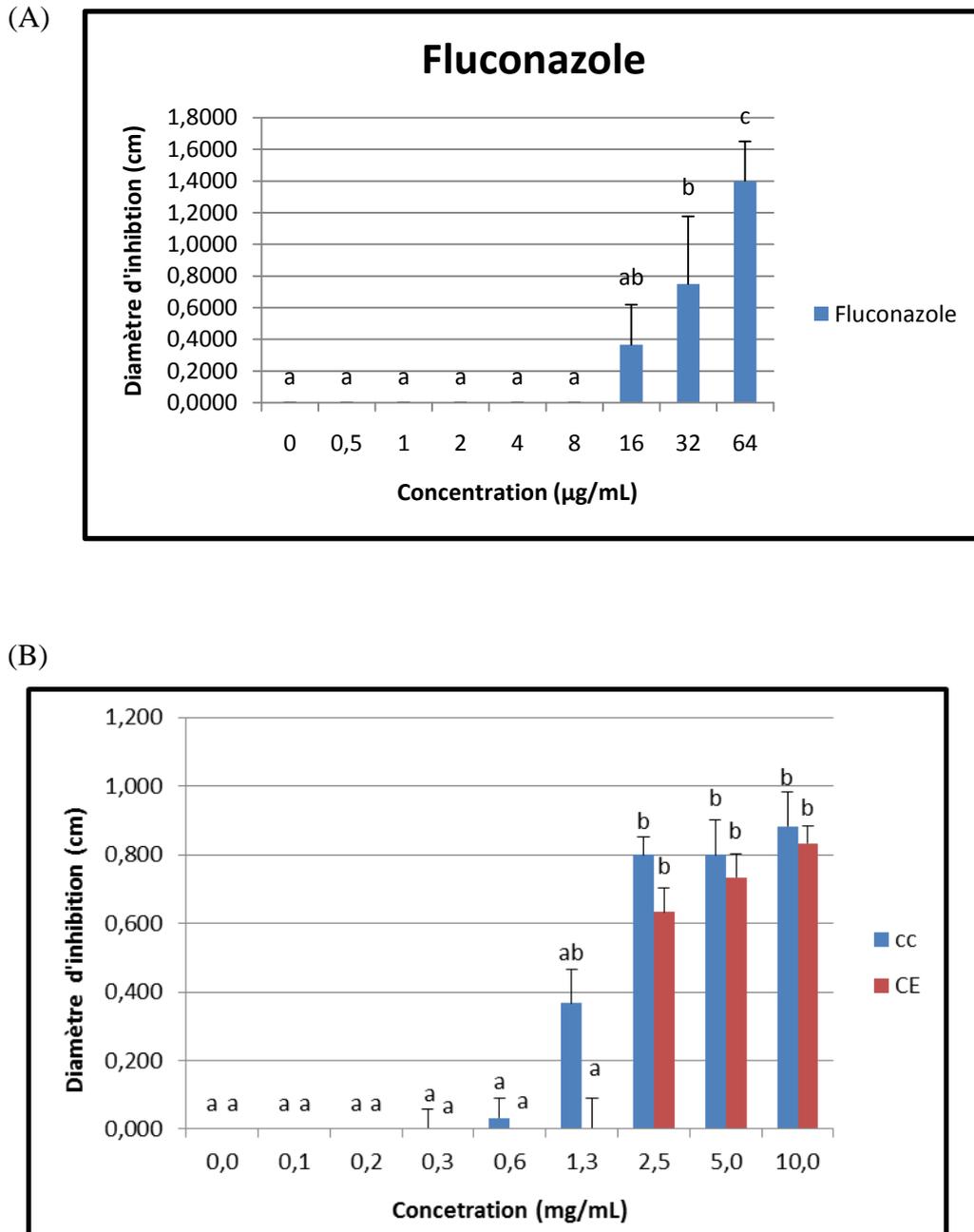
### ➤ Impact sur *T.rubrum*

La figure 42 montre les résultats obtenus avec les différentes concentrations d'antifongiques (fluconazole, chitosanes commercial et extrait) vis-à-vis de *T.rubrum*.

Le fluconazole a donné des diamètres d'inhibition significativement élevés (1.4 cm) vis-à-vis de *T.rubrum* (Figure 42 A). En l'occurrence, l'augmentation de concentration des deux chitosanes a influencé, mais de façon très peu significative, l'augmentation du diamètre d'inhibition surtout aux concentrations de 10, 5 et 2.5 mg/mL. De même, à une concentration inférieure à 1.3 mg/mL, l'effet des chitosanes s'est montré négligeable (figure 42 B).



**Figure 41:** Action du fluconazole (FL), du chitosane commercial (CC) et du chitosane extrait (CE) sur *T.rubrum* ; (A) : dilution D1, (B) : dilution D2.



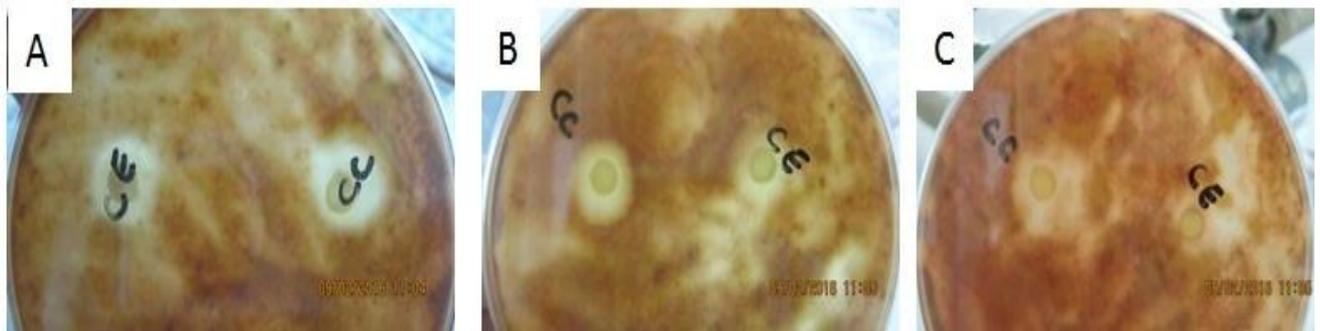
**Figure 42:** Diamètres des zones d'inhibitions de *T.rubrum* en fonction des différentes concentrations (A) du Fluconazole, (B) des chitosanes commercial et extrait.

Les valeurs représentent la moyenne des diamètres d'inhibition  $\pm$  SEM. Les lettres (a, b, c et d) représentent les différences statistiques de l'effet des différentes concentrations (En utilisant ANOVA suivi par le test Tukey,  $p < 0.05$ ).

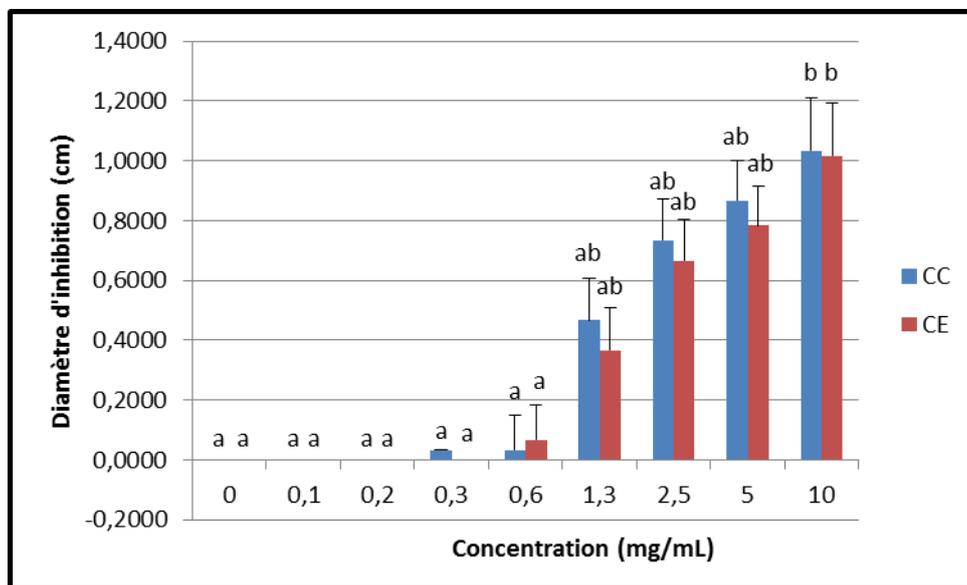
➤ *Impact sur T.rubrum var. raubitschekii*

La figure 44 montre les résultats obtenus vis-à-vis de *T.rubrum var. raubitschekii* ; les deux chitosanes ont manifesté leur activité antifongique aux concentrations allant de 1.3 à 10 mg/mL. Le diamètre d'inhibition qu'ils ont engendré (Figure 43) a augmenté avec leur degré de concentration, mais cette augmentation est peu significative.

Les concentrations inférieures à 1.3 mg/mL n'ont révélé aucune activité significative sur la souche considérée.



**Figure 43:** Effet du chitosane commercial et du Chitosane extrait sur *T.rubrum var. raubitschekii*. (A) : dilution D1, (B) : dilution D2 et (C) : dilution D3.



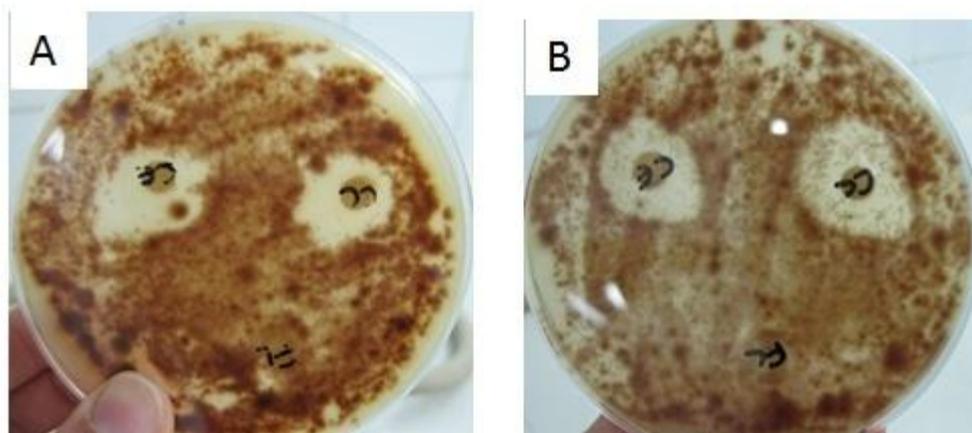
**Figure 44:** Diamètres de zones d'inhibitions de *T.rubrum var. raubitschekii* en fonction des différentes concentrations de chitosanes commercial et extrait.

➤ *Impact sur T.interdigitale*

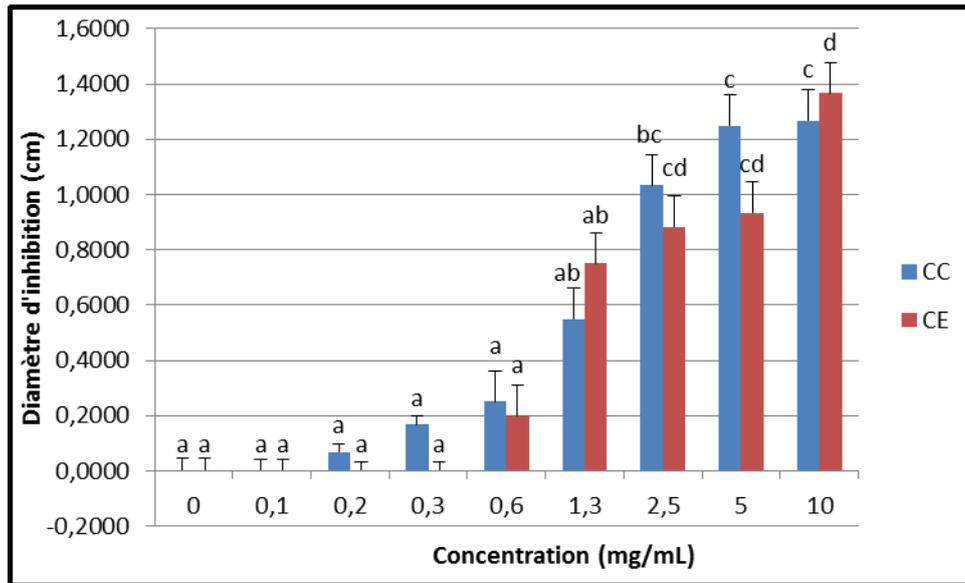
Les photos de la figure 45 représentent les diamètres d'inhibition obtenus avec le chitosane commercial et le chitosane extrait sur les cultures de *T. interdigitale* ; ces diamètres sont nettement plus importants que ceux obtenus avec les deux autres espèces.

L'histogramme de la figure 46 montre que les zones d'inhibition obtenues sont proportionnelles à la concentration des deux chitosanes. Elles ont pu atteindre une valeur de 1.38 cm à la concentration 10 mg/mL. Le diamètre d'inhibition a varié de façon significative pour les concentrations allant de 1.3 à 10 mg/mL et a été négligeable aux autres concentrations (activité faible).

Comme représenté sur les figures 43 et 45, le fluconazole n'a exprimé aucune zone d'inhibition ni vis-à-vis de *T.rubrum* var. *raubitschekii* ni vis-à-vis de *T.interdigitale*.



**Figure 45:** Effet du chitosane commercial et du Chitosane extrait sur *T.interdigitale*.  
(A): dilution D1 ; (B): dilution D2.



**Figure 46:** Diamètre des zones d’inhibition de *T.interdigitale* en fonction des différentes concentrations des chitosanes commercial et extrait.

### 3. Discussion

Les dermatophytes sont les agents étiologiques les plus fréquents des onychomycoses. Actuellement, plusieurs médicaments destinés au traitement de ces affections existent ; mais leur utilisation fréquente, anarchique, précocement interrompue ou au contraire trop prolongée, provoque une résistance de ces champignons. Ce qui n’est pas sans risque sur la santé humaine et sur l’environnement (Sajomsang *et al.*, 2012).

Le chitosane, composé naturel, connu pour son activité antifongique contre de nombreuses espèces de levures, moisissures et bactéries, n’a jamais posé de tels problèmes quoique les études se rapportant à son action sur les dermatophytes sont rares (Goy *et al.*, 2009). Aussi, nous avons jugé important d’évaluer, *in vitro*, l’activité antifongique du chitosane extrait à partir de zygomycètes, sur les principaux dermatophytes responsables des onychomycoses à Constantine, à savoir : *T.rubrum*, *T.rubrum* var. *raubitschekii* (identifié pour la première fois en Algérie, au cours de cette étude) et *T.interdigitale*.

Les CMI des chitosanes commercial et extrait ont pu être déterminées sur les espèces retenues dans cette l’étude. La figure 40 montre des puits où il n’y a pas eu de croissance fongique visible ; du chitosane a été rajouté au niveau de ces puits et a inhibé la croissance des champignons comparativement aux témoins positifs de croissance (colonnes 8 et 12 de gauche à droite) qui n’ont pas été additionnés de chitosane. En somme le chitosane que nous

avons extrait a montré une activité antifongique proche à celle du chitosane commercial. L'analyse de ces résultats montre que l'inhibition de la croissance fongique est due à la seule action du chitosane, car aucune inhibition n'a été observée dans la solution d'acide acétique utilisée comme témoin.

Dans ce cadre, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer le mécanisme d'action du chitosane. Selon certains auteurs, le caractère polycationique du chitosane constitue le facteur le plus important de son activité antifongique ; son interaction avec les groupes amino-cationiques peut interagir avec des composants anioniques de la paroi cellulaire (sphingolipides) perturbant ainsi les échanges entre la cellule microbienne et le milieu extérieur (Cuero, 1999; Roller and Covill, 1999; Zakrzewska *et al.*, 2005). il peut également former des liaisons avec l'ADN des microorganismes, en inhibant la synthèse de l'ARNm (Devlieghere *et al.*, 2004).

Comme on peut le voir sur le tableau 19, les valeurs des CMI ont différé selon l'espèce considérée. *T.interdigitale* a été l'espèce la plus sensible à l'action des deux chitosanes avec des CMI à 0.31 mg/mL pour le chitosane commercial et 0.62 mg/mL pour le chitosane extrait. Cependant, *T.rubrum*, espèce la plus sensible au fluconazole, a manifesté la réponse la plus faible vis-à-vis des deux chitosanes avec des CMI égales à 2.5 mg/mL.

Les valeurs de CMI obtenues avec le fluconazole sur *T.rubrum* (32 mg/mL) et *T.interdigitale* (64 mg/mL) sont en corrélation avec celles obtenues par Adimi *et al.*, 2013; Sabatelli *et al.*, 2006; da Silva Barros *et al.*, 2007).

Nos résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'activité antifongique dépend du champignon en cause. Celui-ci peut interférer avec l'activité antifongique d'une molécule par son adaptation et son mécanismes de défense contre le stress ; deux facteurs qui peuvent affecter l'intégrité structurale de la paroi en induisant la synthèse de composés de défense (Sajomsang *et al.*, 2012).

Certains travaux indiquent que l'action inhibitrice du chitosane est directement proportionnelle à sa concentration, car à des concentrations élevées de chitosane, les champignons produisent une plus grande quantité de chitinase, ce qui conduit à la dégradation de la chitine et du chitosane cellulaires (Li *et al.*, 2008). Ce phénomène a pu être constaté et mis en évidence au cours de cette étude. En effet, l'analyse des microplaques (figure 40) montre qu'à des concentrations élevées de chitosane, la croissance fongique cesse et qu'au

contraire, au fur et à mesure qu'on en diminue la concentration, le champignon reprend son développement.

En plus de son effet inhibiteur direct sur la croissance des champignons, le chitosane peut agir, indirectement, en formant des complexes avec les métaux, tels que le calcium et le fer, nécessaires pour la croissance du champignon ce qui retarde la germination des spores (Cuero, 1999; Roller et Covill, 1999).

Dans ce travail, l'activité antifongique du chitosane contre *T. rubrum*, *T. rubrum* var. *raubitschekii* et *T. interdigitale* a été prouvée comparativement aux travaux de certains auteurs qui ont également étudié l'activité antifongique du chitosane sur des dermatophytes ; ainsi, Mei *et al.* (2015), ont obtenu une valeur de CMI comprise entre 2.5 et 5 mg/mL avec un chitosane de DD % égale à 91% utilisé contre *T. rubrum*. Les résultats de cette étude, comparable à la nôtre, concordent parfaitement avec nos résultats. De même Goy *et al.* (2009) ainsi que Ramisz *et al.* (2005) ont pu déterminer la CMI du chitosane pour *T. mentagrophytes* et *T. canis*. Les résultats obtenus étaient de 2.2 et 1.1 mg/mL, respectivement.

Par ailleurs, concernant l'évaluation de l'activité du chitosane, certaines études ont indiqué que la méthode de diffusion, utilisée pour évaluer la sensibilité *in vitro* des dermatophytes, donne des résultats comparables à ceux de la méthode de dilution (Karaca et Koç, 2004). En effet, au cours de notre travail, nous avons pu démontrer, *in vitro*, l'activité antifongique du chitosane en utilisant cette méthode. Les résultats obtenus sont, effectivement, en corrélation avec ceux de la méthode de microdilution sur plaque. L'espèce *T. interdigitale* a été la plus sensible à l'action du chitosane avec un diamètre d'inhibition de 1.38 cm à la plus forte concentration et l'espèce *T. rubrum* a été la plus résistante avec un diamètre d'inhibition très réduit pour la plus grande CMI. Ce qui laisse supposer un développement de certains mécanismes de résistance vis-à-vis de ce composé.

Enfin, compte tenu des résultats obtenus et de ceux des nombreux auteurs, nous pouvons déduire que l'activité antifongique du chitosane contre les dermatophytes est à la fois tributaire de la concentration du chitosane utilisé et du champignon à tester. Des essais sur des espèces plus nombreuses et plus variées doivent être poursuivis.

# Conclusion

Les onychomycoses, de par leur fréquence, leur chronicité et leur caractère récidivant, posent un véritable problème de prise en charge. De ce fait, une confirmation de l'étiologie fongique de l'onychopathie et la détermination précise de l'espèce sont des éléments clés pour le choix d'un traitement approprié.

Toutefois, un examen mycologique direct positif ne permet pas l'identification précise de l'agent fongique observé quand la culture est négative. Ce qui oblige souvent à refaire de nouveaux prélèvements.

Les outils moléculaires, alliant rapidité, sensibilité et spécificité ont été développés en microbiologie et adaptés, récemment, au diagnostic des onychomycoses pour en optimiser la performance. Cependant ces méthodes ne permettent pas toutes d'aller jusqu'à l'identification des espèces, et seules certaines, plus spécifiques, peuvent, aidée par des tests biochimiques classiques, détecter des mutations épidémiologiques au sein d'une même espèce de dermatophyte.

Au terme des travaux qui ont articulé la présente thèse, nous retiendrons, à travers les résultats de la première partie, que :

- ✓ les onychomycoses prédominent aux orteils et chez le sujet âgé avec une prédominance féminine.
- ✓ L'onychomycose sous unguéale disto-latérale profonde représente l'aspect clinique le plus retrouvé.
- ✓ *Trichophyton rubrum* est isolé dans près de la moitié des prélèvements et *T.rubrum* var.*raubitschekii* a été mis en évidence, pour la première fois, en Algérie.
- ✓ Le taux de prévalence des onychomycoses est plus élevé à Constantine, voire en Algérie.
- ✓ La PCR-pandermatophytes s'est révélée être une technique sensible et adaptée pour la détection des dermatophytes dans les infections fongiques mixtes et quand les cultures sont négatives.

Concernant la deuxième partie, nous pouvons conclure que le chitosane que nous avons extrait à partir de *Rhizopus oryzae*, constitue un bon exemple d'utilisation de la biotechnologie verte car sa préparation simple, rapide, peu onéreuse et non polluante pour l'environnement, a permis d'obtenir un chitosane comparable au chitosane commercialisé avec des caractéristiques similaires et un degré de désacétylation très proche (76 et 75% respectivement).

Quant à la dernière partie, elle nous a permis de vérifier l'activité antifongique du chitosane extrait vis-à-vis des espèces de dermatophytes les plus incriminées, à savoir *T. rubrum*, *T. rubrum* var. *raubitschekii* et *T. interdigitale* ; cette activité appréciable, s'est manifestée avec des CMI allant de 0.62 à 2.5 mg/ml, ce qui permet d'envisager de plus amples essais, *in vitro*, puis, *in vivo*, non seulement sur les dermatophytes, mais aussi sur d'autres agents fongiques. Cette molécule naturelle, représentera sans doute un défi thérapeutique vis-à-vis des molécules plus anciennes, toxiques et mal tolérées car souvent prescrites au long cours, à des sujets âgés, tarés et non compliants.

Ces biopolymères fongiques sont intéressants car de nouveaux marchés très prometteurs sont apparus. En effet, les applications dans les domaines du biomédical ou de la cosmétologie nécessitent d'utiliser des biopolymères ultra purs. Ces polymères peuvent être facilement obtenus à partir d'organismes sélectionnés, et ceci, dans des conditions reproductibles. Ils possèdent des caractéristiques physico-chimiques (MM, DD...) identiques à celles que l'on obtient en utilisant des ressources d'origine animale.

Comme perspectives, nous nous proposons de tester l'efficacité du chitosane fongique directement sur deux lots de patients : le premier concernera des personnes atteintes d'onychomycoses sur lesquelles nous testerons l'effet de ce polymère *in vivo*. Le deuxième lot, concernera des patients guéris, après avoir suivi un traitement antifongique. Le test portera sur la récurrence ou pas, après application du chitosane fongique (par comparaison à des patients témoins).

L'autre perspective, portera sur l'effet du chitosane sur d'autres souches microbiennes responsables d'autres infections cutanées.

Enfin pour conclure, les résultats obtenus dans ce travail ont fait l'objet de deux publications dans des revues de renommée (la 2<sup>ème</sup> *in press*) dotées d'un IF et de plusieurs communications dans des congrès nationaux et internationaux (Annexe 3).

# Références bibliographiques

Adamski, Z., Kowalczyk, M.J., Adamska, K., Kubisiak-Rzepczyk, H., Bowszyc-Dmochowska, M., Banaszak, A., Bartkiewicz, P., and Zaba, R. (2014). The first non-African case of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* or a urease-positive *Trichophyton rubrum* in Central Europe? *Mycopathologia* 178, 91–96.

Adimi, P., Hashemi, S.J., Mahmoudi, M., Mirhendi, H., Shidfar, M.R., Emmami, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Gramishoar, M., and Kordbacheh, P. (2013). In-vitro Activity of 10 Antifungal Agents against 320 Dermatophyte Strains Using Microdilution Method in Tehran. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* 12, 537–545.

Amal Hassan El-Kamel, L.Y.A. (2007). Micromatrical Metronidazole Benzoate Film as a Local Mucoadhesive Delivery System for Treatment of Periodontal Diseases. *AAPS PharmSciTech* 8, E75.

Anane, S., Aoun, K., Zallagua, N., and Bouratbine, A. (2001). Onychomycoses dans la région de Tunis: Données épidémiologiques et mycologiques. *Ann. Dermatol. Vénérologie* 128, 733–736.

Aranaz, I., Mengfbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., and Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr Chem Biol* 203–230.

Arca, E., Saracli, M.A., Akar, A., Yildiran, S.T., Kurumlu, Z., and Gur, A.R. (2004). Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. *Eur. J. Dermatol. EJD* 14, 52–55.

Baran, R., and Chosidow, O. (2008). *Des champignons et des ongles: comment guérir les onychomycoses ?* (United Kingdom: John Libbey Eurotext), 28p. ISBN 978-2-7420-0612-0.

Baran, R., and Hay, R.-J. (2014). Nouvelle classification clinique des onychomycoses. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 24, 247–260.

Baran, R., and Piérard, G.E. (2004). *Onychomycoses* (Paris: Masson), 179 p. ISBN 2-294-01775-7.

Baran, R., Tosti, A., Hartmane, I., Altmeyer, P., Hercogova, J., Koudelkova, V., Ruzicka, T., Combemale, P., and Mikazans, I. (2009). An innovative water-soluble biopolymer improves

efficacy of ciclopirox nail lacquer in the management of onychomycosis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 23, 773–781.

Bartnicki-Garcia, S., and Lippman, E. (1969). Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* 165, 302–304.

Beaulieu, C. (2007). Les effets multiples du chitosane. *Phytothérapie* 5, 38.

Belloeuf, L., Boisseau-Garsaud, A.-M., Saint-Cyr, I., Desbois, N., Hélénon, R., Quénéhervé, C., Calès-Quist, D., and Garsaud, P. (2004). [Nail disease due to *Scytalidium* in Martinique (French West Indies)]. *Ann. Dermatol. Vénérologie* 131, 245–249.

Benmezdad, A. (2011). Les mycoses superficielles: Etude épidémiologique et mycologique. Thèse pour l'obtention du diplôme en Sciences Médicales. Université de Constantine: faculté de médecine, département de pharmacie.

Bergman, A., Heimer, D., Kondori, N., and Enroth, H. (2013). Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, E205-211.

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

Brasch, J. (2007). *Var. raubitschekii* of *Trichophyton rubrum* as a cause of tinea in Germany. *Mycoses* 50 Suppl 2, 2–5.

Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., and Rinaudo, M. (2001). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer* 42, 3569–3580.

Buitrago, M.J., Aguado, J.M., Ballen, A., Bernal-Martinez, L., Prieto, M., Garcia-Reyne, A., Garcia-Rodriguez, J., Rodriguez-Tudela, J.L., and Cuenca-Estrella, M. (2013). Efficacy of DNA amplification in tissue biopsy samples to improve the detection of invasive fungal disease. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, E271-277.

Buitrago, M.J., Bernal-Martinez, L., Castelli, M.V., Rodriguez-Tudela, J.L., and Cuenca-Estrella, M. (2014). Performance of panfungal--and specific-PCR-based procedures for etiological diagnosis of invasive fungal diseases on tissue biopsy specimens with proven infection: a 7-year retrospective analysis from a reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1737–1740.

C. Gerente, V.K.C.L. (2007). Application of Chitosan for the Removal of Metals From Wastewaters by Adsorption—Mechanisms and Models Review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 37, 41–127.

Chabasse, D. (2004). Epidémiologie et étiologie des onychomycoses. In *Onychomycoses*, (Paris: Masson), pp. 1–35.

Chabasse, D. (2007). Onychomycoses, recommandations pour les modalités de diagnostic et de prise en charge. *J. Mycol. Médicale* 17, 241–241.

Chabasse, D et Contet- Audonneau (2007). Dermatophytes et moisissures d'intérêt médical.

Chabasse, D. (2008). Les dermatophytes : d'où viennent-ils ? Comment sont-ils devenus des parasites ? 18, 27–35.

Chabasse, D. (2011). Place du laboratoire dans le diagnostic mycologique d'une onychomycose. *Rev. Francoph. Lab.* 2011, 43–50.

Chabasse, D., and Pihet, M. (2008). Les dermatophytes : les difficultés du diagnostic mycologique. *Rev. Francoph. Lab.* 2008, 29–38.

Chabasse, D., and Pihet, M. (2014). Les onychomycoses à moisissures. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 24, 261–268.

Chabasse, D., Baran, R., and Feuilhade De Chauvin, M. (2000). Les onychomycoses. I : Epidémiologie-étiologie. *J. Mycol. Médicale* 10, 177–190.

Chabasse, D., Bouchara, J.P., De Gentile, L., Cimon, B., and Penn, P. (2004). Cahier 31 bioforma pdf - PDF CAHIER 31 BIOFORMA.

Chabasse, D., Pihet, M., and Bouchara, J.-P. (2009). Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale. *Rev. Francoph. Lab.* 2009, 71–86.

- Chatelet, C., Damour, O., and Domard, A. (2001). Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials* 22, 261–268.
- Chauvin, M.F. (2011). Traitement des onychomycoses. *Rev. Francoph. Lab.* 2011, 71–75.
- Contet-Audonneau, N. (2005). Les Onyxis À Moisissures. *Rev. Francoph. Lab.* 2005, 35–44.
- Crini, G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresour. Technol.* 97, 1061–1085.
- Crini, G., Badot, P.-M., and Guibal, É. (2009). *Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application* (Presses Univ. Franche-Comté), 303 p. ISBN 978-2-84867-249-6.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., and Groenewald, J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud. Mycol.* 55, 235–253.
- Cuero, R.G. (1999). Antimicrobial action of exogenous chitosan. *EXS* 87, 315–333.
- Czechowska-Biskup, R., Jarosinska, D., Rokita, B., and Ulanski, P. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Progchemapplchitin Its Deriv* 5–20.
- Daniel, C.R., Gupta, A.K., Daniel, M.P., and Sullivan, S. (1998). Candida infection of the nail: role of Candida as a primary or secondary pathogen. *Int. J. Dermatol.* 37, 904–907.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R.M., and Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* 36, 981–1014.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., and Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol.* 21, 703–714.
- Dhib, I., Fathallah, A., Charfeddine, I.B., Meksi, S.G., Said, M.B., Slama, F., and Zemni, R. (2012). Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 22, 249–255.

- Dhib, I., Fathallah, A., Yaacoub, A., Hadj Slama, F., Said, M.B., and Zemni, R. (2014). Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. *Mycoses* 57, 19–26.
- Dhillon, G.S., Kaur, S., Brar, S.K., and Verma, M. (2013). Green synthesis approach: extraction of chitosan from fungus mycelia. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33, 379–403.
- Djeridane, A., Djeridane, Y., and Ammar-Khodja, A. (2006). Epidemiological and aetiological study on tinea pedis and onychomycosis in Algeria. *Mycoses* 49, 190–196.
- Duarte, M.L., Ferreira, M.C., Marvão, M.R., and Rocha, J. (2002). An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.* 31, 1–8.
- Dubljanin, E., Colovic Calovski, I., Vujcic, I., Dzamic, A., Arendrup, M.C., Petersen, R.F., and Jensen, R.H. (2014). Clinical evaluation of a *T. rubrum*-specific polymerase chain reaction and pandermatophyte polymerase chain reaction in the diagnosis of suspected onychomycosis in 183 Serbian patients. *Br. J. Dermatol.* 171, 1593–1595.
- Eloff, J.N. (1998). A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64, 711–713.
- Farhi, D., Savary, J., Pansart, S., and Hesse, S. (2011). Étude prospective des onychomycoses des pieds en France : prévalence, aspect clinique, impact et prise en charge en médecine générale. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 21, 266–272.
- Ferreira, J.A., Lennartsson, P.R., Edebo, L., and Taherzadeh, M.J. (2013). Zygomycetes-based biorefinery: present status and future prospects. *Bioresour. Technol.* 135, 523–532.
- Feuilhade de Chauvin, M. (2014). Traitement des onychomycoses. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 24, 296–302.
- Fortún, J., Meije, Y., Buitrago, M.J., Gago, S., Bernal-Martinez, L., Pemán, J., Pérez, M., Gómez-G Pedrosa, E., Madrid, N., Pintado, V., et al. (2014). Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 3134–3141.

- Foster, K.W., Ghannoum, M.A., and Elewski, B.E. (2004). Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J. Am. Acad. Dermatol.* 50, 748–752.
- García-Sánchez, S., Aubert, S., Iraqui, I., Janbon, G., Ghigo, J.-M., and d'Enfert, C. (2004). *Candida albicans* biofilms: a developmental state associated with specific and stable gene expression patterns. *Eukaryot. Cell* 3, 536–545.
- van Gelderen de Komaid, A., and Borges de Kestelman, I. (2001). Urease-positive *Trichophyton rubrum* strains (previously described as *T. raubitschekii*): first isolations in Argentina. *Eur. J. Epidemiol.* 17, 929–933.
- Goy, R.C., Britto, D. de, and Assis, O.B.G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros* 19, 241–247.
- Gräser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schönian, G., Presber, W., Mitchell, T.G., and Vilgalys, R. (1996). Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12473–12477.
- Gupta, A.K., Paquet, M., and Simpson, F.C. (2013). Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clin. Dermatol.* 31, 544–554.
- Hajoui, F.-Z.M., Zeroual, Z., Ghfir, B., Moustachi, A., Lyagoubi, M., and Aoufi, S. (2012). Les onychomycoses à moisissure au Maroc : à propos de 150 cas isolés en 20 ans. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 22, 221–224.
- Halim, I., El Kadioui, F., and Soussi Abdallaoui, M. (2013). Les onychomycoses à Casablanca (Maroc). *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 23, 9–14.
- Hang, Y.D. (1990). Chitosan production from *Rhizopus oryzae* mycelia. *Biotechnol. Lett.* 12, 911–912.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M.G., Méndez-Montealvo, M.G., Sánchez-Rivera, M.M., and Bello-Pérez, L.A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydr. Polym.* 73, 541–547.

- Hiruma, M., Kano, R., Sugita, T., Mochizuki, T., Hasegawa, A., and Hiruma, M. (2012). Epidemiological aspects of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* in Japan. *J. Dermatol.* 39, 1000–1001.
- Hwang, S.M., Suh, M.K., and Ha, G.Y. (2012). Onychomycosis Due to Nondermatophytic Molds. *Ann. Dermatol.* 24, 175–180.
- Indira, G. (2014). *In vitro* Antifungal Susceptibility Testing of 5 Antifungal Agents against Dermatophytic Species by CLSI (M38-A) Micro Dilution Method. *Clin. Microbiol. Open Access* 3, 145.
- Karaca, N., and Koç, A.N. (2004). *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 259–264.
- Kardjeva, V., Summerbell, R., Kantardjiev, T., Devliotou-Panagiotidou, D., Sotiriou, E., and Gräser, Y. (2006). Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1419–1427.
- Kasaai, M.R. (2008). Kasaai, M.: A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* 71, 497–508. *Carbohydr. Polym.* 71, 497–508.
- Kaur, S., and Dhillon, G.S. (2014). The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 155–175.
- Kisser, M., Kubicek, C.P., and Röhr, M. (1980). Influence of manganese on morphology and cell wall composition of *Aspergillus niger* during citric acid fermentation. *Arch. Microbiol.* 128, 26–33.
- Klis, F.M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast Chichester Engl.* 10, 851–869.
- Knorr, D., and Klein, J. (1986). Production and conversion of chitosan with cultures of *Mucor rouxii* or *Phycomyces blakesleeanus*. *Biotechnol. Lett.* 8, 691–694.
- Koenig, H. (1995). *Guide de mycologie médicale* (Paris: Ellipses), 284 p. ISBN 2-7298-4512-7.

- Krajewska, B. (2005). Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Sep. Purif. Technol.* 41, 305–312.
- Kumar, M.N.V.R., Muzzarelli, R. a. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., and Domb, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.* 104, 6017–6084.
- Kumari, S., and Rath, P.K. (2014). Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from (*Labeo rohita*) Fish Scales. *Procedia Mater. Sci.* 6, 482–489.
- Kupsch, C., Ohst, T., Pankewitz, F., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Winter, I., and Gräser, Y. (2016). The agony of choice in dermatophyte diagnostics-performance of different molecular tests and culture in the detection of *Trichophyton rubrum* and *Trichomphyton interdigitale*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 735.e11-17.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar. Biotechnol. N. Y.* N 8, 203–226.
- Kwon, J.-H., Ryu, J.-S., Chi, T.T.P., Shen, S.-S., and Choi, O. (2012). Soft Rot of *Rhizopus oryzae* as a Postharvest Pathogen of Banana Fruit in Korea. *Mycobiology* 40, 214–216.
- Lacroix, C., Kac, G., Dubertret, L., Morel, P., Derouin, F., and de Chauvin, M.F. (2003). Scytalidiosis in Paris, France. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48, 852–856.
- Li, X.-F., Feng, X.-Q., Yang, S., Wang, T.-P., and Su, Z.-X. (2008). Effects of Molecular Weight and Concentration of Chitosan on Antifungal Activity Against *Aspergillus Niger*. *Iran. Polym. J.* 17, 843–852.
- Lopandic, K., Zelger, S., Bánszky, L.K., Eliskases-Lechner, F., and Prillinger, H. (2006). Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23, 341–350.
- Lubeck, D.P. (1998). Measuring health-related quality of life in onychomycosis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 38, S64–S68.
- Luk, N.M., Hui, M., Cheng, T.S., Tang, L.S., and Ho, K.M. (2012). Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 37, 230–234.

- Mansur, H.S., Mansur, A.A.P., Curti, E., and Almeida, M.V.D. (2013). Functionalized-chitosan/quantum dot nano-hybrids for nanomedicine applications: towards biolabeling and biosorbing phosphate metabolites. *J. Mater. Chem. B* 1, 1696–1711.
- Marei, N.H., El-Samie, E.A., Salah, T., Saad, G.R., and Elwahy, A.H.M. (2016). Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt. *Int. J. Biol. Macromol.* 82, 871–877.
- Marikani Kannan, M.N. (2010). Production and Characterization of Mushroom Chitosan under Solid-State Fermentation Conditions. *Adv. Biol. Res.* 4, 10.
- Mavor, A.L., Thewes, S., and Hube, B. (2005). Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. *Curr. Drug Targets* 6, 863–874.
- Mei, Y., Dai, X., Yang, W., Xu, X., and Liang, Y. (2015). Antifungal activity of chitooligosaccharides against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Int. J. Biol. Macromol.* 77, 330–335.
- Mhurchu, C.N., Dunshea-Mooij, C., Bennett, D., and Rodgers, A. (2005). Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* 6, 35–42.
- Minke, R., and Blackwell, J. (1978). The structure of alpha-chitin. *J. Mol. Biol.* 120, 167–181.
- Monod, M., Bontems, O., Zaugg, C., Léchenne, B., Fratti, M., and Panizzon, R. (2006). Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. Med. Microbiol.* 55, 1211–1216.
- Monod, M., Lurati, M., and Baudraz-Rosselet, F. (2013). Diagnostic des onychomycoses à moisissures et importance pour le traitement - revmed. *Rev. Médicale Suisse* 9, 730–733.
- Moreno, G., and Arenas, R. (2010). Other fungi causing onychomycosis. *Clin. Dermatol.* 28, 160–163.
- Naghdi, M., Zamani, A., and Karimi, K. (2014). A sulfuric-lactic acid process for efficient purification of fungal chitosan with intact molecular weight. *Int. J. Biol. Macromol.* 63, 158–162.

- Ngaba, G.P., Essomba, N.E., Koum, D.K., Meledie, A.N., Nida, M., Wo'o, P.N., Adiogo, D., and Coppieters, Y. (2015). Aspects des Onychomycoses chez des patients camerounais de 2011 à 2014. *Rev. Médecine Pharm.* 5, 499–506.
- Nolting, S., Brautigam, M., and Weidinger, G. (1994). Terbinafine in onychomycosis with involvement by non-dermatophytic fungi. *Br. J. Dermatol.* 130 Suppl 43, 16–21.
- Nouripour-Sisakht, S., Mirhendi, H., Shidfar, M.R., Ahmadi, B., Rezaei-Matehkolaei, A., Geramishoar, M., Zarei, F., and Jalalizand, N. (2015). Aspergillus species as emerging causative agents of onychomycosis. *J. Mycol. Médicale* 25, 101–107.
- Nwe, N., Furuike, T., and Tamura, H. (2011). Production, Properties and Applications of Fungal Cell Wall Polysaccharides: Chitosan and Glucan. 244, 187–208.
- Nzenze Afène, S., Ngoungou, E.B., Mabika Mamfoumbi, M., Bouyou Akotet, M.K., Avome Mba, I.M., and Kombila, M. (2011). Les onychomycoses au Gabon : aspects cliniques et mycologiques. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 21, 248–255.
- Paugam, A., L'Ollivier, C., Viguié, C., Anaya, L., Mary, C., de Ponfilly, G., and Ranque, S. (2013). Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *J. Microbiol. Methods* 95, 218–222.
- Pearson, F.G., Marchessault, R.H., and Liang, C.Y. (1960). Infrared spectra of crystalline polysaccharides. V. Chitin. *J. Polym. Sci.* 43, 101–116.
- Petinataud, D., Berger, S., Contet-Audonneau, N., and Machouart, M. (2014). Molecular diagnosis of onychomycosis. *J. Mycol. Médicale* 24, 287–295.
- Pochanavanich, P., and Suntornsuk, W. (2002). Fungal chitosan production and its characterization. *Lett. Appl. Microbiol.* 35, 17–21.
- Richardson, M. (2009). The ecology of the Zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, Supplement 5, 2–9.
- Roberts, G.A.. (1992). Chitin chemistry (London: Macmillan), 368 p. ISBN 978-0-333-52417-6.

Roller, S., and Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 67–77.

Sabatelli, F., Patel, R., Mann, P.A., Mendrick, C.A., Norris, C.C., Hare, R., Loebenberg, D., Black, T.A., and McNicholas, P.M. (2006). *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2009–2015.

Sajomsang, W., Gonil, P., Saesoo, S., and Ovatlarnporn, C. (2012). Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* 50, 263–269.

Santos, D.A., and Hamdan, J.S. (2005). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1917–1920.

Santos, D.A., Barros, M.E.S., and Hamdan, J.S. (2006). Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichomphyton mentagrophytes*. *J. Clin. Microbiol.* 44, 98–101.

Scherer, W.P., McCreary, J.P., and Hayes, W.W. (2001). The diagnosis of onychomycosis in a geriatric population: a study of 450 cases in South Florida. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc.* 91, 456–464.

Shahidi, F., and Abuzaytoun, R. (2005). Chitin, chitosan, and co-products: chemistry, production, applications, and health effects. *Adv. Food Nutr. Res.* 49, 93–135.

Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., and Jeon, Y.-J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 37–51.

Sigler, L., and Congly, H. (1990). Toenail infection caused by *Onychocola canadensis* gen. et sp. nov. *J. Med. Vet. Mycol. Bi-Mon. Publ. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol.* 28, 405–417.

da Silva Barros, M.E., de Assis Santos, D., and Hamdan, J.S. (2007). Evaluation of susceptibility of *Trichomphyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J. Med. Microbiol.* 56, 514–518.

Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N.A. (2003). Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 145–171.

- Synowiecki, J., and Al-Khateeb, N.A.A.Q. (1997). Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem.* 4, 605–610.
- Tabara, K., Szewczyk, A.E., Bienias, W., Wojciechowska, A., Pastuszka, M., Oszukowska, M., and Kaszuba, A. (2015). Amorolfine vs. ciclopirox – lacquers for the treatment of onychomycosis. *Adv. Dermatol. Allergol. Dermatol. Alergol.* 32, 40–45.
- Tan, S.C., Tan, T.K., Wong, S.M., and Khor, E. (1996). The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydr. Polym.* 30, 239–242.
- Tanrıverdi, S.T., and Özer, Ö. (2013). Novel topical formulations of Terbinafine-HCl for treatment of onychomycosis. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 628–636.
- Tayel, A.A., Moussa, S., el-Tras, W.F., Knittel, D., Opwis, K., and Schollmeyer, E. (2010a). Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 454–457.
- Tayel, A.A., Moussa, S., Opwis, K., Knittel, D., Schollmeyer, E., and Nickisch-Hartfiel, A. (2010b). Inhibition of microbial pathogens by fungal chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* 47, 10–14.
- Teng, W.L., Khor, E., Tan, T.K., Lim, L.Y., and Tan, S.C. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydr. Res.* 332, 305–316.
- Tharanathan, R.N., and Kittur, F.S. (2003). Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43, 61–87.
- Wang, W., Du, Y., Qiu, Y., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., Cai, J., and Kennedy, J.F. (2008a). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydr. Polym.* 74, 127–132.
- Wang, W.-P., Du, Y.-M., and Wang, X.-Y. (2008b). Physical properties of fungal chitosan. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2717–2720.
- Zakrzewska, A., Boorsma, A., Brul, S., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M. (2005). Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to the plasma membrane-perturbing compound chitosan. *Eukaryot. Cell* 4, 703–715.

Zamani, A., Edebo, L., Niklasson, C., and Taherzadeh, M.J. (2010). Temperature Shifts for Extraction and Purification of Zygomycetes Chitosan with Dilute Sulfuric Acid. *Int. J. Mol. Sci.* 11, 2976–2987.

Zhang, H., Xiong, X., Liu, T., and Ran, Y. (2015). Generalized superficial mycosis caused by *Trichophyton raubitschekii* in China: case report and review of the literature. *Mycopathologia* 179, 279–284.

Zukervar, P., Dabin, G., Secchi, T., Petiot-Roland, A., Mathon, N., Maccari, M., Pincemaille, B., Colcombet-Navarranne, A., Rigot-Muller, G., Batut, V., et al. (2011). Étude des onychomycoses en médecine de ville dans la région lyonnaise. *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.* 21, 118–122.

**Site internet**

<http://www.sfdermato.org/media/pdf/recommandation/onychomycoses/ea897f8482d176d93ec53661d8ea2561.pdf>

# Annexes

# *Annexe 1*

## Les milieux de cultures

### 1. Milieux d'isolement

➤ **Milieu Sabouraud Agar**

Glucose.....	20g
Peptone.....	10g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6

### 2. Milieux d'identification

➤ **PDA (Potato dextrose agar)**

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	15g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000ml

pH= 6

➤ **Milieu Borelli (Lacrimel)**

Farine de blé.....	14g
Lait en poudre.....	14g
Miel.....	07g
Agar.....	14g
Eau distillée.....	1000ml

pH=6.5

➤ **Milieu Urée de Christensen**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,8g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.2g
Peptone.....	01g
Glucose.....	01g
NaCl.....	01g
Rouge de phénol.....	0,012g
Agar.....	15g

Eau distillée.....1000ml

pH= 6.8

- Stériliser à 115°C à l'autoclave pendant 20 minutes. Refroidir à 50°C et ajouter stérilement 5 ml de solution d'urée à 40 % stérile pour un volume de 95 mL de milieu. Bien mélanger, répartir par volumes de 10 ml et laisser se solidifier en pente.

### 3. Milieux de fermentation

#### ➤ Milieu YPD (Yeast Peptone Dextrose)

Glucose.....20g

Peptone.....10g

Extrait de levure.....5g

Eau distillée.....1000ml

pH= 4.5

## *Annexe 2*

### **Fabrication des gels d'agarose**

- Préparer la plaque de gels avec les peignes.
- Utiliser l'agarose haute résolution.
- Pour une plaque de gel :
  - Peser 2 g d'agarose dans un erlenmeyer de 250 mL.
  - Ajouter 100mL de tampon TAE (Tris Acetate 0.04 M EDTA 1mM).
  - Chauffer dans le four micro-ondes pendant 2min.
  - Porter des gants anti-chaueur.
  - Remuer lentement la solution.
  - Remettre à chauffer jusqu'à disparition des résidus d'agarose dans la solution en ébullition.
  - Remuer à nouveau lentement la solution.
  - Refroidir sous l'eau froide du robinet
  - Remuer doucement la solution et couler dans la plaque.
  - Laisser polymériser les gels environ 40 min à température ambiante.
  - Mélanger 2 $\mu$ L de MaesterSafe et 2  $\mu$ L de tamponde charge et enfin 10  $\mu$ L d'ADN avant d'introduire le mix dans chaque puits

## *Annexe 3*

### *Productions scientifiques*

#### **Publications**

- **A. Z. Hafirassou , N. Gassem , A. L. Bienvenu , G. Bonnot , S. Picot et I. Mihoubi.** First identification of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* in Constantine (ALGERIA). *Int. J. Adv. Res.* (2016), 4 (9) : 1747-1753.

- **Hafirassou A. Z, Valero. C, Gassem. N, Mihoubi. I, Buitrago M. J.** Usefulness of techniques based on Real Time PCR for the identification of onychomycosis causing species. *Mycoses (in press).*

#### **Communications internationales**

- **HAFIRASSOU Anissa Zohra, GASSEM Nadia, MIHOUBI Ilhem, FENDRI Hichem**  
« Mise en évidence des champignons responsables des onychomycoses à Constantine ». II<sup>ème</sup> Congrès international de Biotechnologies et Valorisation des Bio-ressources (BVBR), 18- 20 Mars 2014, Tabarka, Tunisie.

- **HAFIRASSOU Anissa Zohra, GASSEM Nadia, PICOT Stéphane, MIHOUBI Ilhem**  
”Molecular diagnosis of dermatophytes agent of onychomycosis in Constantine, Algeria”  
Congrès des sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale, 20-22 Mai 2015, Bordeaux, France.

- **HAFIRASSOU Anissa Zohra, AYACHI Ahmed Abdelhakim, BENSERRADJ Ouafa, MIHOUBI Ilhem.** « Extraction et caractérisation du chitosane obtenu à partir de *Rhizopus oryzae* ». Séminaire international des biotechnologies, Constantine du 19-21 Octobre 2015, Constantine, Algérie.

**Thème :****Evaluation, *in vitro*, du potentiel du chitosane pour la lutte contre les champignons responsables des Onychomycoses à Constantine****Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> Cycle****Option : Bioprocédés et Biotechnologie, Applications Mycologiques**

Les onychomycoses sont des infections fongiques des ongles, fréquentes, contagieuses, bénignes et chroniques. Les dermatophytes sont considérés comme les agents pathogènes les plus incriminés, cependant les moisissures et les levures peuvent aussi être des agents colonisateurs ou contaminants. Les onychomycoses sont souvent observées à un âge avancé et à un stade évolué, rendant leur traitement long et difficile, en raison de l'absence de molécules peu ou pas toxiques aux doses thérapeutiques administrées. Dans ce contexte, l'objectif principal de l'étude, était de produire, à partir de la souche *Rhizopus oryzae*, un biopolymère approuvé par la FDA : le chitosane. Ensuite, tester son activité antifongique sur les espèces responsables des onychomycoses à Constantine. 298 échantillons d'ongles infectés, ont été prélevés, au CHUC, et analysés par des méthodes de diagnostic conventionnel (Examen direct et culture) et moléculaire (RT-PCR, PCR panfongique, PCR pandermatophyte). Les résultats obtenus ont révélé que *T.rubrum* était l'espèce prédominante. Cependant, une variante de cette espèce a été identifiée pour la première fois en Algérie, il s'agit de *T.rubrum* var. *raubitschekii*. Quant au chitosane synthétisé, sa caractérisation par FTIR et titration a révélé de bonnes qualités avec un degré de désacétylation légèrement supérieur à celui du chitosane commercial. Par ailleurs, la mise en évidence de l'activité antifongique sur les espèces les plus incriminées dans les onychomycoses, a révélé un effet significatif avec des CMI respectives de 2.5, 1,25 et 0.62mg/ml sur *T. rubrum*, *T.rubrum* var. *raubitschekii* et *T.interdigitale*. Ces résultats pourraient ouvrir la voie vers de nouvelles perspectives thérapeutiques, non seulement contre les dermatophytes, mais sans doute, contre d'autres agents fongiques.

**Mots clés : Onychomycoses - Chitosane - PCR – Dermatophytes – Activité antifongique****Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne**

<b>Président :</b>	<b>Mr. DEHIMAT L.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. des Frères Mentouri - Constantine</b>
<b>Directrice :</b>	<b>Mme. MIHOUBI I.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. des Frères Mentouri - Constantine</b>
<b>Co-directeur :</b>	<b>Mr. PICOT S.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. Claude Bernard-Lyon</b>
<b>Examineurs :</b>	<b>Mr. GUECHI A.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. Farhat Abbas – Sétif</b>
	<b>Mr. HAMIDECHI A.</b>	<b>Professeur</b>	<b>Univ. des Frères Mentouri - Constantine</b>