



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE LORRAINE

2014

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE

du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le jeudi 30 janvier 2014 à 14h

Par Dimitri PETINATAUD

né le 10 Mai 1985 à Lyon08

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

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT

de DOCTEUR en PHARMACIE

**Optimisation de la stratégie diagnostique
des onychomycoses : du prélèvement à
l'identification fongique.**

Evaluation d'un kit diagnostique de PCR en temps réel.

Membres du Jury

Président : Monsieur le Professeur C. GANTZER
Juges : Monsieur le Professeur JL. SCHMUTZ
Madame le Docteur N. CONTET-AUDONNEAU
Madame le Docteur V. LETSCHER-BRU
Directeur : Madame le Professeur M. MACHOUART

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2013-2014

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du Collège d'Enseignement
Pharmaceutique Hospitalier :**

Jean-Michel SIMON

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

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

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

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

Faculté de Pharmacie

Présentation

ENSEIGNANTS

*Section
CNU**

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Viologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI ☒	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND ☒	87	<i>Environnement et Santé</i>
Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique

Faculté de Pharmacie

Présentation

<i>ENSEIGNANTS (suite)</i>	<i>Section CNU*</i>	<i>Discipline d'enseignement</i>
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Caroline GAUCHER	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

Anne MAHEUT-BOSSER

86 Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD

11 Anglais

✉ En attente de nomination

Au président de thèse,

Monsieur le Professeur C. GANTZER,
Professeur de Microbiologie,
Faculté de Pharmacie, Nancy

Vous me faites l'honneur d'accepter d'être le président de Jury.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mes remerciements les plus sincères.

Au juge,

Monsieur le Professeur JL. SCHMUTZ,
PU-PH du service de Dermatologie
CHU Brabois, Faculté de médecine, Nancy

Je suis honoré que vous fassiez parti de ce jury.
J'apprécie votre enthousiasme à vouloir juger ce travail.
Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mes remerciements les plus sincères.

Au juge,

Madame le Docteur N. CONTET-AUDONNEAU,
MCU-PH en Mycologie médicale
Laboratoire de Mycologie - service de Dermatologie,
CHU Brabois, Faculté de Médecine, Nancy

Je suis reconnaissant de vous avoir dans ce jury et vous remercie de me faire partager votre regard sur mon travail.
Je vous remercie également pour votre disponibilité à faire partager la mycologie et à transmettre les connaissances au sein du laboratoire.

Au juge,

Madame le Docteur V. LETSCHER-BRU
MCU-PH, laboratoire de Parasitologie-Mycologie
CHU et Faculté de médecine de Strasbourg

Je suis honoré de votre présence et vous remercie de votre disponibilité et de la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail.
Soyez assurée de ma profonde gratitude et de ma sincère reconnaissance.

A ma directrice de thèse,

Madame le Professeur M. MACHOUART,
PU-PH, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
CHU Brabois, Faculté de médecine, Nancy

Pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse et m'avoir suivi et accompagné tout au long de mon travail, malgré la distance et les contraintes horaires,
Pour votre investissement, votre intérêt envers ce travail, et votre patience dans sa relecture et sa correction,
Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

A C. Ferdinus,
Biostatisticien au CHU Félix Guyon, Réunion
Pour votre aide indispensable pour extraire et traiter les données recueillies dans cette étude.

Au Docteur E. Georges,
Pour votre aide dans mes travaux et pour la lecture des cultures.

A Céline et Anais,
Merci à vous deux pour votre aide précieuse dans certaines manipulations techniques, en particulier pour la mise en culture et certaines étapes de biologie moléculaire.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie-Mycologie,
Pour votre accueil chaleureux et votre soutien.

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

SERMENT DES APOTHICAIRES



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

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

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

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

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

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



Sommaire

Liste des figures.....	11
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations	14
I. INTRODUCTION.....	16
II. LES ONYCHOMYCOSES.....	17
1. Epidémiologie	17
1.1. Facteurs favorisants	18
1.2. Espèces fongiques incriminées	19
2. Les dermatophytes	20
2.1. Classification actuelle des dermatophytes	22
2.2. Origine des dermatophytes	23
2.3. Répartition géographique	27
3. Physiopathologie	29
3.1. Généralités	29
3.2. Rappel anatomique et sémiologique.....	30
3.3. Mode de végétation au niveau de l'ongle.....	31
4. Traitements.....	34
4.1. Avulsion unguéale	35
4.2. Traitements locaux	36
4.3. Traitements systémiques.....	39
5. Diagnostic mycologique et limites.....	42
5.1. Anamnèse	43
5.2. Prélèvement	43
5.3. Examen direct.....	45
5.4. Culture	49
6. Diagnostic moléculaire.....	53
6.1. Présentation des techniques les plus utilisées.....	54
6.2. Les gènes cibles	57
II. OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	64

III. APPROCHE EXPERIMENTALE	65
1. Prélèvements	65
2. Examens directs	65
3. Culture conventionnelle	66
4. Diagnostic moléculaire	67
4.1. Description du coffret.....	67
4.2. Contenu du coffret.....	67
4.3. Principe de la détection.....	68
4.4. Procédures	68
4.5. Validation de l'expérimentation	71
4.6. Analyse des données et interprétation	71
4.7. PCR panfongique et séquençage	72
IV. RESULTATS	73
1. Echantillons	73
2. Examens directs	74
3. Cultures	79
4. Résultats de la PCR	83
5. Comparaison inter techniques	86
5.1. Cultures <i>versus</i> PCR.....	86
5.2. Examens directs <i>versus</i> cultures ou PCR	87
5.3. Examens directs à filaments <i>versus</i> cultures ou PCR.....	90
5.4. Sensibilité et spécificité de l'examen direct/culture/PCR	92
5.5. Sensibilité et spécificité de l'examen direct à filaments/culture/PCR.....	99
V. DISCUSSION	106
VI. CONCLUSION	115
VII. ANNEXES	117
VIII. BIBLIOGRAPHIE	122

Liste des figures

Figure 1 : Coupe anatomique de l'appareil unguéal	30
Figure 2 : Onychomycose sous-unguéale distale.....	31
Figure 3 : Onychomycose unguéale sous-proximale.....	32
Figure 4 : Leuconychie.....	33
Figure 5 : Onychomycose endonychia.....	33
Figure 6 : Aspects microscopiques des cultures : fructifications et formations annexes	51
Figure 7 : Les différents systèmes de PCR en temps réel	56
Figure 8 : Schéma de l'unité transcriptionnelle de l'ADN ribosomique des champignons.	57
Figure 9 : Protocole réalisé pour utiliser le kit PCR temps réel dermatophytes.....	70
Figure 10 : Exemple d'un résultat obtenu en PCR en présence de dermatophyte.....	83

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux facteurs favorisant les onychomycoses des pieds et des mains.....	19
Tableau 2 : Origine des principaux dermatophytes	24
Tableau 3 : Caractéristiques des dermatophytes.	26
Tableau 4 : Localisation géographique des principaux dermatophytes.....	28
Tableau 5 : Recueil des différentes études de la littérature où sont comparés les taux de positivité de la microscopie, culture, PCR.	61
Tableau 6 : Protocole d'extraction de l'ADN fongique.....	69
Tableau 7 : Programme de la PCR en temps réel utilisant le kit BioEvolution.	70
Tableau 8 : Analyse des données et interprétation.	72
Tableau 9 : Types de lésions rencontrés.....	73
Tableau 10 : Différentes associations rencontrées.	74
Tableau 11 : Fréquences obtenues en fonction des techniques d'examens directs et du prélèvement.	75
Tableau 12 : Fréquences obtenues en fonction des techniques d'examens directs et du prélèvement, en ne considérant que les ED positifs à filaments.....	76
Tableau 13 : Signification des index kappa selon leurs valeurs.....	77
Tableau 14 : Comparaison des techniques de l'examen direct dans la visualisation des filaments pour les mauvais prélèvements.....	77
Tableau 15 : Comparaison des techniques de l'examen direct dans la visualisation des filaments pour les bons prélèvements.....	78
Tableau 16 : Résultats des cultures suivant les deux types de prélèvements.....	79
Tableau 17 : Genres et espèces de levures obtenues dans les prélèvements.....	80
Tableau 18 : Genres et espèces de moisissures isolés dans les prélèvements.....	81
Tableau 19 : Genres et espèces de dermatophytes isolés dans prélèvements.....	82
Tableau 20 : Résultats PCR obtenus dans les bons et mauvais prélèvements.....	84
Tableau 21 : Taux de positivité des examens directs, cultures et PCR dans les prélèvements.....	87
Tableau 22 : Taux de positivité des cultures, PCR et des ED à filaments	90
Tableau 23 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des examens directs (tout élément fongique confondu) et de la PCR.....	93
Tableau 24 : Sensibilité et spécificité des « mauvais » prélèvements calculé à partir du LCA, pour l'examen direct (tout élément fongique confondu), la culture, et la PCR.....	93
Tableau 25 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture, de l'examen direct (tout élément fongique confondu) et de la PCR (1 : positif, 0 : négatif).....	94
Tableau 26 : Répartition des « bons » prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des examens directs (tout élément fongique confondu) et de la PCR.....	96
Tableau 27 : Sensibilité et spécificité des « bons » prélèvements calculé à partir du LCA, pour les examens directs, la culture, et la PCR.....	96
Tableau 28 : Répartition des « bons » prélèvements en fonction de la culture, des examens directs et de la PCR (1 : positif ; 0 : négatif).....	97
Tableau 29 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des examens directs positifs à filaments et de la PCR.....	99

Tableau 30 : Sensibilité et spécificité des « mauvais » prélèvements calculé à partir du LCA, pour l'examen direct positif à filaments, la culture, et la PCR.....	99
Tableau 31 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture, de la PCR et de la technique utilisée pour l'examen direct : noir chlorazole ou fluorescence.....	101
Tableau 32 : Répartition des bons prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des ED positifs à filaments et de la PCR.	102
Tableau 33 : Sensibilité et spécificité des bons prélèvements calculé à partir du LCA, pour l'examen direct ciblé sur la recherche de filaments, la culture, et la PCR.	103
Tableau 34 : Répartition des bons prélèvements en fonction de la culture, de la PCR et de la technique utilisée pour l'examen direct : noir chlorazole ou fluorescence.	104
Tableau 35 : Revue de la littérature des auteurs utilisant des techniques PCR.....	119

Liste des abréviations

ACT : Actine

ADN : Acide -Désoxyribo-Nucléique

ADNr : Acide -Désoxyribo-Nucléique ribosomique

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ARNr : Acide Ribo-Nucléique ribosomique

BCP : Bromocrésol pourpre

BHQ : Black hole quencher

CE : Contrôle d'extraction

CHS : Chitine synthase

CiA : Contrôle interne d'amplification

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CMF : Concentration minimale fongicide

C neg : Contrôle négatif

C pos : Contrôle positif

Ct : Nombre de cycles

DMSO : Diméthyl-sulfoxyde

ED : Examen direct

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique

E. : *Epidermophyton*

FRET : Fluorescence resonance energy transfert

IO : inter-orteils

ITS : Internal Transcribed Spacer

KOH : Hydroxyde de potassium

LCA : Latent class analysis

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MI : Membres inférieurs

M. : *Microsporum*

NDF : Filamenteux non dermatophyte

NTS : Espaceur non transcrit

OO : ongle d'orteil

PAS : Periodic Acid Schiff

pb : Paire de bases

PCR : Polymerase Chain reaction

PF : Point final

RAT : Rice Agar Tween

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

T. : *Trichophyton*

TR : Temps réel

VPP : Valeur prédictive positive

VPN : Valeur prédictive négative

I. INTRODUCTION

Les dermatophytes sont des pathogènes kératinophiles qui infectent la peau, les ongles et les cheveux. Ces organismes sont répartis en trois genres : *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*, dont les espèces déterminent chez l'homme et l'animal des lésions superficielles ou dermatophyties. Les infections des ongles sont principalement causées par *T. rubrum* et par *T. mentagrophytes*, alors que les atteintes des cheveux et de la peau peuvent aussi être causées par d'autres espèces de dermatophytes. La prévalence de l'onychomycose dans les pays européens varie de 3 à 22 %. Parallèlement aux dermatophytes, des moisissures et des levures peuvent également être isolées à partir des ongles cliniquement affectés. Alors que l'isolement d'un dermatophyte anthropophile doit toujours être considéré comme pathogène, les *Candida* spp. et les moisissures peuvent être des contaminants ou des agents colonisateurs, liés à une infection secondaire ou à des facteurs locaux.

Certaines onychopathies, comme le psoriasis par exemple, peuvent mimer l'aspect d'une onychomycose. Or, l'onychomycose nécessite un traitement antifongique, parfois systémique et à long terme. De ce fait, l'identification correcte des champignons en cause est indispensable. Le diagnostic actuel est basé sur la détection d'éléments fongiques par microscopie directe des échantillons cliniques, suivie par la culture *in vitro* permettant l'identification morphologique du champignon. L'examen direct de squames et d'ongles est souvent suffisant pour mettre en évidence une infection fongique, mais il ne fournit pas l'identification du genre ou de l'espèce en cause et donc ne fait pas de distinction entre la présence de dermatophytes et de moisissures. En outre, bien que rapide et économique, l'examen direct donne des résultats faussement négatifs dans 5 à 15 % des cas. La culture, quant à elle, peut rester négative dans 40 % des cas pour lesquels l'examen direct microscopique est positif. Cette étape de culture prend aussi beaucoup de temps en raison de la croissance lente des champignons et de leur faible sporulation. Dans certains cas, des tests physiologiques supplémentaires sont nécessaires. Par conséquent, le temps requis pour l'identification des espèces peut varier de 10 à 15 jours jusqu'à 3 à 4 semaines.

Dans ce contexte, le développement des techniques de biologie moléculaire représente un apport intéressant pour la détection et l'identification des dermatophytes directement à partir des prélèvements biologiques.

Dans ce travail, nous présentons tout d'abord les connaissances actuelles concernant les onychomycoses et le diagnostic conventionnel des pathogènes qui y sont associés, puis nous exposons les principales techniques moléculaires décrites dans la littérature et utilisées pour l'identification des dermatophytes. Enfin, après avoir présenté les quelques kits commerciaux disponibles sur le marché, nous décrivons l'évaluation de l'un d'entre eux dans le laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Nancy. Pour finir, nous discutons de la stratégie diagnostique des onychomycoses, en y incluant les avantages et les inconvénients de ce kit, et sa possible intégration au panel des outils diagnostiques de cette pathologie.

II. LES ONYCHOMYCOSES

1. Epidémiologie

L'onychomycose désigne une atteinte de l'ongle due à un champignon. Il peut s'agir d'un dermatophyte, d'une moisissure ou d'une levure. La prévalence des onychomycoses dans la population générale varie de 2 à 27 % en moyenne selon les zones géographiques et les études concernées [1][2][3]. Elles représentent jusqu'à 50 % des onychopathies, et apparaissent ainsi parmi les causes les plus fréquentes de pathologies unguéales [4][5][6]. Elles sont également la cause de 1,5 à 15 % des consultations en dermatologie clinique selon Klein cité par Baran [4]. Peu fréquentes chez l'enfant [7], et augmentant avec l'âge, elles atteignent un pic chez les personnes âgées [8][9].

Dans les régions d'Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis, on note la prédominance des atteintes des ongles des pieds par rapport à celles des ongles des mains puisque 80 % des cas des onychomycoses touchent en effet les pieds [10][11]. Les hommes sont généralement plus fréquemment atteints que les femmes [12][5]. En revanche, au Moyen Orient et dans le sud de l'Europe, les périonyxis avec atteintes des mains touchent plus souvent les femmes.

1.1. Facteurs favorisants

Les onychomycoses peuvent être dues à de nombreux facteurs individuels (âge, sexe, etc...), mais les facteurs génétiques, les pathologies sous-jacentes, et les prédispositions héréditaires jouent également un rôle non négligeable dans le développement de ces pathologies.

Le mode de vie, *via* la profession et les pratiques sportives en particulier, peut également créer des facteurs environnementaux propices aux onyxis [4].

L'âge fait ainsi partie des facteurs individuels les plus fréquemment cités, et de nombreuses études rapportent des fréquences d'onychomycoses variables selon les tranches d'âges. Comme le montre l'étude pan-européenne Achille la prévalence chez l'enfant varie de 0 à 2,6 % contre 10 à 20 % chez les adultes et de 15 à 40 % chez les sujets âgés [13][14][15]. Plusieurs raisons, telles que la différence de structure de la tablette unguéale, l'exposition moindre aux traumatismes et la repousse plus rapide de l'ongle chez les sujets jeunes, peuvent expliquer ces fréquences moins importantes. Cependant, certaines études récentes rapportent une augmentation des onychomycoses chez les enfants [9][16][17][18]. La pratique du sport et la transmission intra familiale peuvent expliquer en partie ce phénomène.

Chez l'adulte âgé, la prévalence des onychomycoses est plus élevée. A partir de 40-60 ans, la prévalence atteint des taux de 15 à 20 %, et chez les sujets de plus de 60 ans ces taux s'élèvent jusqu'à 30 %. Ceci peut s'expliquer par un ralentissement de la pousse de l'ongle, par la diminution de l'aptitude à assurer une hygiène correcte des pieds chez les personnes les plus âgées, et par des facteurs locaux tels que l'insuffisance circulatoire, les troubles trophiques et généraux, comme le déficit ou la diminution de la fonction phagocytaire, ou de la réponse à médiation cellulaire.

Le tableau présenté ci-dessous présente synthétiquement les facteurs favorisant les onychomycoses des pieds ou des mains.

1.2. Espèces fongiques incriminées

Principaux facteurs favorisants	
Onychomycoses des pieds	Onychomycoses des mains
<ul style="list-style-type: none"> • Age • Dermatophytie interdigito-plantaire préexistante • Troubles trophiques des membres inférieurs : <ul style="list-style-type: none"> - Insuffisance circulatoire - Altération de la microcirculation • Microtraumatismes répétés de l'ongle ou des pieds associés à l'excès de transpiration dû aux chaussures fermées • Sports à risque : natation, arts martiaux, course à pieds • Pathologies sous-jacentes : <ul style="list-style-type: none"> - Diabète - Psoriasis - Immunodépression • Anomalie héréditaire ou constitutionnelle de l'ongle • Malposition des orteils • Hyperkératose palmo-plantaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Sexe féminin • Port prolongé de gants • Microtraumatismes répétés des ongles • Utilisation manuelle excessive de détergents • Manipulation de produits sucrés • Professions exposées : coiffeurs, manucures, podologues • Pathologies sous-jacentes : <ul style="list-style-type: none"> - Candidoses vulvo-vaginales, - Candidoses cutanéomuqueuses - Autres localisations de : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Dermatophytes ▪ Psoriasis ▪ Hyperkératose palmaire

Tableau 1 : Principaux facteurs favorisant les onychomycoses des pieds et des mains.

Parmi la centaine d'espèces fongiques incriminées aujourd'hui dans les onychomycoses, il faut distinguer trois grands groupes de champignons.

- Les principaux responsables de ces atteintes sont les dermatophytes. Parmi eux, les espèces les plus fréquentes sont *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* ;
- Viennent ensuite les levures, essentiellement *Candida albicans* retrouvé surtout sur les mains ;
- Les champignons filamenteux non dermatophytiques, ou moisissures sont également responsables de certaines atteintes à une fréquence faible inférieure à 10 %, comme *Scopulariopsis brevicaulis*, ainsi que différentes espèces d'*Aspergillus* spp. ou de *Fusarium* spp. 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*.

2. Les dermatophytes

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux kératinophiles. Ils sont caractérisés par leur capacité à se développer aux dépens de substrats kératiniques issus du sol, de l'animal et de l'homme. Ils dégradent la kératine humaine ou animale de l'ongle grâce à des enzymes kératinolytiques : les kératinases.

Chez l'homme, les dermatophytes sont à l'origine d'atteintes appelées dermatophytoses, qui représentent les mycoses cutanées les plus fréquentes [16]. Elles touchent la peau (épiderme), les phanères (cheveux, poils, ongles) et très exceptionnellement les muqueuses, les tissus sous-cutanés (granulomes, mycétomes) ou les viscères (maladie dermatophytique). Les dermatophytoses évoluent chez l'homme selon un mode chronique et volontiers récidivant, elles prennent des aspects cliniques très variés, d'où l'importance du diagnostic reposant sur le prélèvement mycologique. C'est pourquoi, depuis 2007, la Société Française de Dermatologie recommande que celui-ci soit systématique avant la mise en œuvre du traitement spécifique [19].

L'appareil végétatif de ces champignons appelé thalle ou mycélium est constitué par un réseau dense de filaments mycéliens ou hyphes, plus ou moins ramifiés et souvent cloisonnés. Ils se reproduisent par l'intermédiaire de spores, produites selon deux modalités : la reproduction asexuée qui est la plus fréquente et la reproduction sexuée, que l'on observe rarement. La formation de ces spores ou conidies correspond à la conidiogénèse et est à la base de la classification actuelle. Les dermatophytes, dans leur forme sexuée, produisent des ascospores et sont ainsi classés au sein du phylum des Ascomycètes, de l'ordre des Onygenales, de la classe des Arthrodermataceae, et du genre *Arthroderma* [20]. Ces formes sexuées étant difficiles à obtenir en culture, la classification des dermatophytes repose classiquement sur la reproduction asexuée : ils sont alors répertoriés dans le phylum des Deutéromycètes ou *fungi imperfecti* et dans la classe des Hypomycètes.

Lors de la reproduction asexuée des champignons, on distingue deux modes de conidiogénèse : le mode thallique et le mode blastique, eux-mêmes divisés en plusieurs types. Les spores produites selon le mode thallique sont formées à partir d'éléments préexistants du thalle. Ce mode de reproduction est lui-même subdivisé en deux types : le type holothallique qui conduit à la formation de spores appelées aleuries et le type arthrique qui conduit à la formation d'arthrospores.

Les dermatophytes produisent selon ce mode de reproduction des aleuries, qui, lorsque ces spores sont unicellulaires, sont appelées microconidies, alors que si elles sont pluricellulaires (à base tronquée et cloisonnées transversalement) ce sont des macroconidies [20][21]. Ces deux types de spores, par leur morphologie et leur abondance, permettent la distinction de trois genres : *Microsporum* (Gubry, 1843), *Trichophyton* (Mamsten, 1845) et *Epidermophyton* (Sabouraud, 1907).

Cette classification actuelle des dermatophytes qui repose sur les modalités de la conidiogénèse, reste malgré tout assez figée, en n'intégrant pas le concept évolutif qui domine en biologie [22]. Aussi, d'autres classifications considérant cette notion sont en cours.

2.1. Classification actuelle des dermatophytes

Le genre *Microsporum* (Gruby, 1843)

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

Au niveau microscopique, ce genre est caractérisé par la présence de macroconidies fusiformes à paroi verruqueuse ou échinulée, et de microconidies le plus souvent piriformes, mais parfois rondes [20].

Le genre *Trichophyton* (Mamsten, 1845)

Plus d'une vingtaine d'espèces de dermatophytes sont répertoriés dans ce genre, parmi lesquelles seule une dizaine peut parasiter la peau et les phanères de l'homme. Parmi elles, on retrouve les deux espèces les plus incriminées dans les onychomycoses : *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* qui représentent à elles seules plus de 90 % des dermatophytes isolés de l'ongle et plus de 70 % des souches isolées dans les laboratoires français [17].

Alors que *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* n'attaquent pas les cheveux, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* et *T. soudanense* peuvent être retrouvés au niveau d'une teigne du cuir chevelu, en association avec une atteinte des ongles. Il s'agit dans ce cas d'une auto-contamination. Des onyxis des pieds dus à ces espèces ont été uniquement décrits dans les pays d'endémie de ces champignons.

L'aspect microscopique des espèces appartenant à ce genre présente des macroconidies à paroi lisse et à cloisons peu nombreuses, ainsi que des microconidies rondes ou piriformes selon les espèces.

Le genre *Epidermophyton* (Sabouraud, 1907)

Ce genre ne comprend qu'une seule espèce, *Epidermophyton floccosum*, caractérisée par l'absence de microconidies et la présence de macroconidies à paroi mince en forme de massue (ou régime de bananes). Cette espèce n'attaque jamais ni les cheveux ni les poils et rarement les ongles des orteils [20].

2.2. Origine des dermatophytes

Les dermatophytes isolés en pathologie peuvent avoir trois origines différentes :

2.2.1. Les dermatophytes anthropophiles

La transmission de ces dermatophytes se fait toujours d'homme à homme selon un mode direct ou indirect. La transmission indirecte transite *via* des objets contaminés par des spores tels que des brosses à cheveux, des tapis de bain, des foulards, des chaussures qui seraient échangées, des peignes, des rasoirs....

Ces champignons sont difficilement transmissibles aux animaux (zoonoses inversées rares).

Parmi cette catégorie de dermatophytes, on retrouve principalement :

- *Trichophyton rubrum*,
- *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale*,
- *Trichophyton violaceum*, *T. tonsurans*, *T. soudanense*, *T. schoenleinii*
- *Microsporum audouinii*,
- *Epidermophyton floccosum*

2.2.2. Les dermatophytes zoophiles

Ils correspondent à une catégorie de dermatophytes adaptés spécifiquement aux animaux.

Parmi ceux-ci citons :

- *Microsporum canis*, transmis le plus souvent par le chat, mais aussi par le chien, le lapin,...
- *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, transmis par le cheval, la souris, le hérisson, le hamster,...
- *Trichophyton mentagrophytes* var. *porcellae*, transmis par le cochon d'Inde [23].
- *Microsporum persicolor*, qui parasite spécifiquement les rongeurs tels que la souris.
- *Trichophyton gallinae* retrouvé chez les Gallinacés (poule, dindon, faisan, ...).

2.2.3. Les dermatophytes géophiles

Ils ont une vie saprobiotique dans le sol et peuvent parfois contaminer l'homme ou les animaux, il s'agit de :

- *Microsporum gypseum*,
- *Trichophyton ajelloi*,
- *Trichophyton terrestre*

Le dermatophyte le plus fréquemment rencontré parmi ces espèces est *Microsporum gypseum*.

Le tableau ci-dessous résume la répartition des principaux dermatophytes suivant leurs origines :

Espèces anthropophiles	
-Genre <i>Epidermophyton</i>	<i>E. floccosum</i>
-Genre <i>Microsporum</i>	<i>M. audouinii</i> var. <i>langeronii</i> <i>M. ferrugineum</i>
-Genre <i>Trichophyton</i>	<i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. soudanense</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. schoenleinii</i>
Espèces zoophiles	
-Genre <i>Microsporum</i>	<i>M. canis</i> (chat, chien) <i>M. persicolor</i> (souris) <i>M. praecox</i> (cheval) <i>M. equinum</i> (cheval) <i>M. nanum</i> (porc)
-Genre <i>Trichophyton</i>	<i>T. mentagrophytes</i> (chat, lapin, cheval) <i>T. erinacei</i> (hérisson) <i>T. verrucosum</i> (bovin) <i>T. equinum</i> (cheval) <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>porcellae</i> (cochon d'inde)
Espèces telluriques	
-Genre <i>Microsporum</i>	<i>M. gypseum</i> <i>M. fulvum</i>

Tableau 2 : Origine des principaux dermatophytes.

Parmi ces différentes espèces *T. mentagrophytes* est le dermatophyte qui a le plus large habitat. Il est à la fois zoophile, anthropophile, mais il peut également avoir une vie saprobiotique dans le sol [24] [20][21].

Ces notions d'épidémiologie permettent de dépister la source de contamination, de la traiter et de prendre les mesures prophylactiques nécessaires pour éviter une nouvelle contamination.

Selon l'origine de ces dermatophytes, certains auteurs suggèrent une nouvelle « classification » plus évolutive en distinguant deux principales catégories de dermatophytes, et une troisième « intermédiaire » ou provisoire [22] :

- Les dermatophytes géophiles ou zoophiles encore liés au sol et gardant une reproduction sexuée :

- *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. persicolor*, *T. erinaei*

- Les dermatophytes associés aux parasitismes stricts, zoophiles ou anthropophiles. Ils se propagent à partir de lésions dermatophytiques de la peau ou des phanères *via* les arthrospores.

- *T. verrucosum*, *T. equinum*, *T. erinacei* (zoophiles)

- *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. soudanense*, *M. audouinii*, *T. schoenleinii* (anthropophiles)

- Les dermatophytes intermédiaires ou provisoires : ils associent des comportements telluriques et parasites.

- *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, espèce anthropophile stricte, rencontrée uniquement à l'état parasitaire mais qui présente encore des caractères telluriques tels que la présence d'organes perforateurs et la capacité de positiver un test à l'uréase.

Le tableau ci-dessous résume les caractéristiques des dermatophytes associés au sol ou au parasitisme strict.

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

Tableau 3 : Caractéristiques des dermatophytes.

2.2.4. Adaptation au parasitisme

D'après les études phylogénétiques les plus récentes, les espèces pathogènes chez l'homme sont issues de celles associées au sol. Le passage du sol à l'animal, puis de l'animal à l'homme semble être l'évolution phylogénique naturelle de ces champignons [22].

Il faut souligner que les espèces anthropophiles diffusent bien dans la population humaine, tandis que les espèces zoophiles souvent adaptées à une ou plusieurs espèces animales passent de façon accidentelle chez l'homme. Enfin, les espèces telluriques (ou géophiles) sont transmises à l'homme ou à l'animal par le biais, le plus souvent, d'un traumatisme ou d'une souillure tellurique.

2.3. Répartition géographique

La majorité des dermatophytes sont cosmopolites tels que *E. floccosum*, *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum*..... Cependant certaines espèces restent localisées à des zones géographiques spécifiques :

- *Trichophyton violaceum* : Afrique du Nord
- *T. soudanense* : Afrique subsaharienne
- *M. audouinii* var. *langeronii* : Afrique de l'Ouest et Centrale
- *M. ferrugineum* : Asie, Afrique
- *T. concentricum* : Asie, Indonésie

La diminution de fréquence d'isolement de certaines espèces comme *M. ferrugineum*, ou *T. schoenleinii* peut s'expliquer par leur limitation à certaines zones géographiques étroites.

D'autres espèces, à l'inverse, en s'adaptant à la population autochtone sont en augmentation (*M. audouinii* var. *langeronii*, *T. soudanense*, *T. tonsurans*) et sont retrouvées lors d'épidémies, par exemple en milieu scolaire dans les grandes villes cosmopolites [20].

Ainsi, 70 % des patients touchés par *M. audouinii* var. *langeronii* ou *T. soudanense* sont originaires d'Afrique Subsaharienne où ces dermatophytes sont endémiques [25].

Les flux migratoires et les pratiques professionnelles modifient la répartition des espèces, comme c'est le cas pour *T. tonsurans*, agent de teigne et habituellement isolé chez des patients provenant du continent Américain ou des Caraïbes (notamment Haïti). Ce dermatophyte a provoqué en France en 2000 des épidémies localisées de *tinea corporis gladiatorum*, associant des lésions cutanées et du cuir chevelu chez les judokas [26]. Cette épidémie s'est étendue entre 2002 et 2003 au Japon, puis à travers le monde, via les compétitions et tournois internationaux, ainsi qu'à d'autres sports tels que la lutte, le karaté et d'autres arts martiaux [27][28][29].

Le tableau ci-dessous présente les localisations géographiques de différents dermatophytes.

Espèces	Agents	Localisation géographique
Anthropophile	<i>E. floccosum</i>	cosmopolite
	<i>M. audouinii</i>	cosmopolite
	<i>M. audouinii</i> var. <i>langeroni</i>	Afrique noire
	<i>M. audouinii</i> var. <i>rivalieri</i>	Afrique noire
	<i>T. soudanense</i>	Afrique noire
	<i>T. tonsurans</i>	Amérique, Caraïbes, cosmopolite
	<i>T. violaceum</i>	Asie, MoyenOrient, Bassin méditerranéen
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>	cosmopolite
	<i>T. rubrum</i>	cosmopolite
	<i>T. concentricum</i>	Pacifique, Sud Est asiatique, Amérique latine
	<i>T. yaoundei</i>	Afrique centrale
<i>T. schoenleinii</i>	Afrique du nord	
Zoophile	<i>M. canis</i>	cosmopolite
	<i>M. gallinae</i>	cosmopolite
	<i>M. equinum</i>	cosmopolite
	<i>M. persicolor</i>	Amérique, Europe
	<i>M. nanum</i>	cosmopolite
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	cosmopolite
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>erinacei</i>	Europe, Nouvelle-Zélande
	<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>quinckeanum</i>	cosmopolite
	<i>T. verrucosum</i>	cosmopolite
	<i>T. simii</i>	Inde
Géophile	<i>M. gypseum</i>	cosmopolite
	<i>M. praecox</i>	États-Unis, Europe de l'Ouest

Tableau 4 : Localisation géographique des principaux dermatophytes.

3. Physiopathologie

3.1. Généralités

Les dermatophytes bien que retrouvés la plupart du temps en tant que pathogènes et associés à des lésions cliniques typiques, peuvent, dans de rares cas, être aussi isolés comme saprophytes chez l'homme [30][31].

La première étape dans la genèse d'une dermatophytose implique l'adhérence d'une arthrospore au cornéocyte, celle-ci étant issue de la fragmentation d'un filament mycélien et constituant l'élément infectant.

Pendant l'étape d'adhérence, les éléments fongiques doivent résister à différents facteurs tels que :

- la compétition avec la flore locale,
- les propriétés locales physico-chimiques de l'épiderme,
- les acides gras insaturés à longues chaînes,
- les variations de températures et d'humidité,
- les ultraviolets.

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

Le principal mécanisme d'adhérence des champignons repose sur la reconnaissance spécifique entre des adhésines fongiques et des récepteurs de l'hôte. Les adhésines identifiées chez les dermatophytes sont principalement des protéines et des mannoprotéines, classées en fonction des ligands auxquels elles se lient [30]. Les adhésines de type lectine sont présentes à la surface des microconidies chez *T. mentagrophytes* et *T. rubrum*. Elles leur permettent d'adhérer à des cellules épithéliales en se liant à des résidus de mannose et de galactose.

Les adhésines fibrillaires présentes à la surface des microconidies et des arthrospores de *T. mentagrophytes* sont des chaînes de fibrilles de grandes tailles pendant la phase d'adhérence, mais elles deviennent petites et fines quand elles pénètrent dans le cornéocyte. Elles permettent la connexion des kératinocytes avec les arthrospores et des arthrospores entre elles. Les

protéases jouent un rôle majeur dans la physiopathologie [32]. Plusieurs protéases ont déjà été purifiées chez les dermatophytes et interviendraient dans l'adhérence du champignon aux kératinocytes et dans les premiers stades de l'invasion du *stratum corneum*, par exemple en modifiant de façon adéquate la surface des kératinocytes ou la paroi fongique elle-même [33].

3.2. Rappel anatomique et sémiologique

La vitesse de croissance de l'ongle est d'environ 3 mm par mois pour les mains et elle est environ 30 à 50 % plus lente pour les pieds [34].

La tablette unguéale d'un doigt se renouvelle en 4 à 6 mois, celle d'un orteil en 9 à 18 mois sachant que la vitesse de renouvellement est plus rapide chez l'enfant et plus lente chez le sujet âgé. D'autre part, la tablette unguéale n'est pas adhérente à l'hyponychium, structure épidermique qui fait suite au lit de l'ongle (la tablette apparaît alors blanche).

La matrice unguéale, dont on aperçoit la région distale qui correspond à la lunule, fabrique la tablette qui s'allonge sur le lit unguéal, structure rosée que l'on aperçoit à travers la tablette.

Une atteinte matricielle a pour conséquence une dystrophie de la tablette alors qu'une atteinte du lit de l'ongle engendre un décollement et/ou un épaissement de l'ongle.

Les ongles peuvent donc être affectés à différents niveaux de ces structures (Fig.1) et selon trois grandes causes déterminant les onychopathies : traumatiques, infectieuses, inflammatoires, les tumeurs restant plus rares [35].

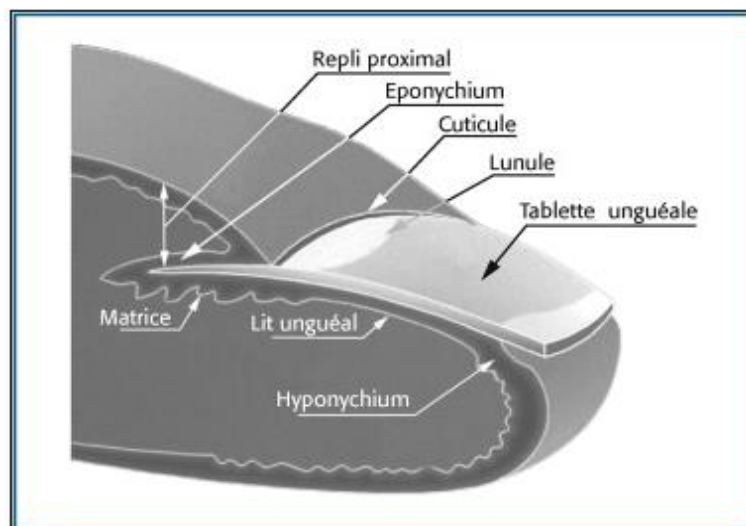


Figure 1 : Coupe anatomique de l'appareil unguéal [35].

3.3. Mode de végétation au niveau de l'ongle

Suite à un traumatisme ou à une lésion cutanée, le champignon envahit l'ongle suivant différents processus déterminant 5 tableaux cliniques principaux : l'onychomycose sous-unguéale distale ou latéro-distale, l'onychomycose unguéale sous-proximale, la leuconychie, l'onychomycose endonychiaie et l'onychomycose avec dystrophie totale.

3.3.1. Onychomycose sous-unguéale distale ou latéro-distale

C'est la forme la plus fréquente (85 % des cas) : elle débute par l'envahissement de l'hyponychium, puis du lit de l'ongle et de la face ventrale de la tablette, entraînant une hyperkératose sous-unguéale (Fig.2). Cette hyperkératose sous-unguéale, située au niveau du bord libre de la tablette unguéale, peut être associée de manière inconstante à une strie de couleur blanche ou jaune près du rebord latéral. Cette hyperkératose peut entraîner une onycholyse secondaire [36] et parfois une paronychie. L'accumulation de kératine sous la tablette peut aussi provoquer directement une onycholyse sans que celle-ci soit secondaire à l'hyperkératose [37].

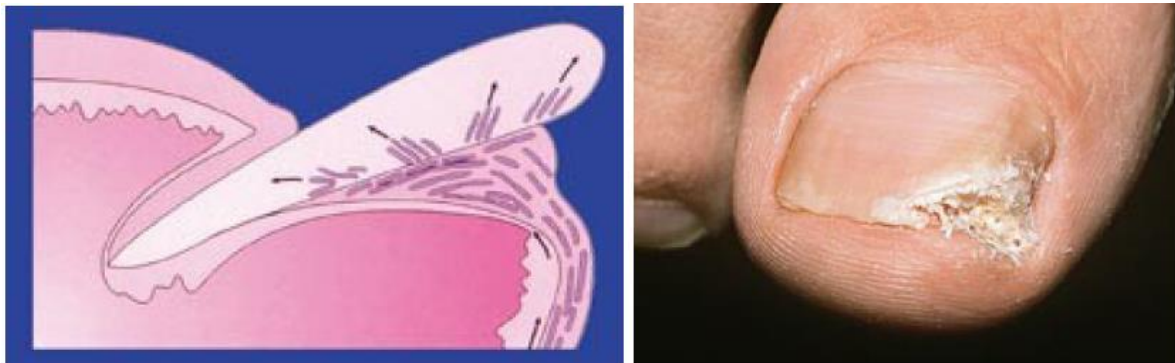


Figure 2 : Onychomycose sous-unguéale distale. Extrait de “A Text Atlas of Nail Disorders” [38].

3.3.2. *Onychomycose unguéale sous-proximale*

Ce type d'atteinte plus rare se manifeste surtout au niveau des ongles des pieds et exceptionnellement aux mains (Fig.3). Cet aspect est celui que l'on voit occasionnellement chez les sidéens atteints d'onychomycose.

Elle résulte le plus souvent d'une infestation par *T. rubrum*, mais peut aussi être due, dans un nombre significatif de cas, à des moisissures. Elle se manifeste par une modification de la couleur de l'ongle qui se produit à proximité du repli unguéal proximal, en regard de la lunule. La tablette y devient blanche ou jaune. La zone atteinte s'étend progressivement au fur et à mesure que l'ongle pousse vers la partie distale. La surface de la tablette unguéale est, en revanche, le plus souvent intacte. A l'atteinte matricielle peut s'associer, lorsqu'il s'agit de moisissures, un périonyxis, inflammatoire et purulent [36][37].

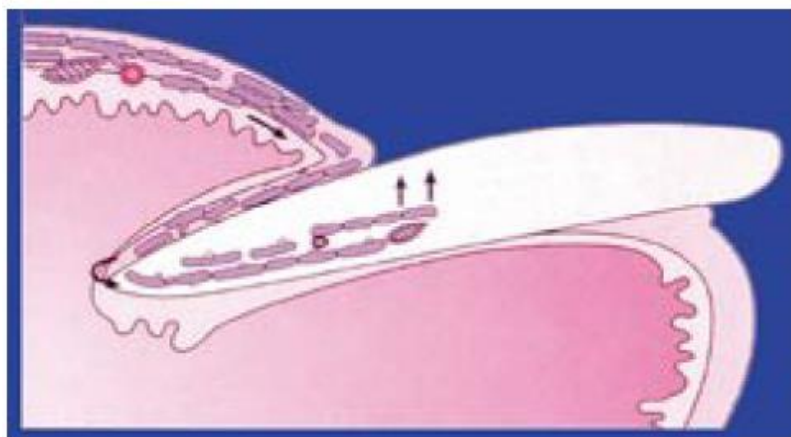


Figure 3 : Onychomycose unguéale sous-proximale. Extrait de "A Text Atlas of Nail Disorders"[38].

3.3.3. *Onychomycose superficielle blanche ou leuconychie*

Elle est relativement rare et touche principalement les orteils. Elle est surtout le fait d'une infestation par *T. mentagrophytes*, plus rarement par *T. rubrum*. Elle se manifeste sous la forme d'une atteinte superficielle de l'ongle, avec un aspect de poudre blanche, qui peut être facilement détachée à la curette (Fig.4). Lorsque plusieurs zones atteintes confluent, l'ensemble de la tablette peut être touché [37].

Il en existe une forme exceptionnelle noire, provoquée par *T. rubrum* var *melanoides*. L'onychomycose superficielle blanche s'associe très souvent à un intertrigo interdigito-plantaire mycosique [36].

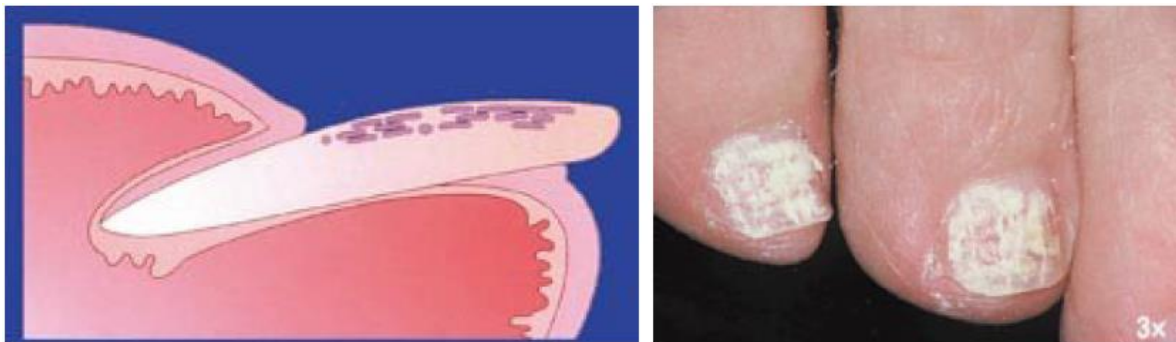


Figure 4 : Leuconychie. Extrait de « A Text Atlas of Nail Disorders » [38].

3.3.4. *Onychomycose endonychiaie*

Dans ce type d'atteintes également rares, les agents pathogènes pénètrent dans la tablette unguéale par voie pulpaire, comme c'est le cas pour l'onychomycose disto-latérale, mais n'envahissent pas le lit unguéal. Ceci rend l'ongle diffusément blanc et opaque, sans onycholyse, ni hyperkératose sous-unguéal (Fig. 5) [39][36][37].

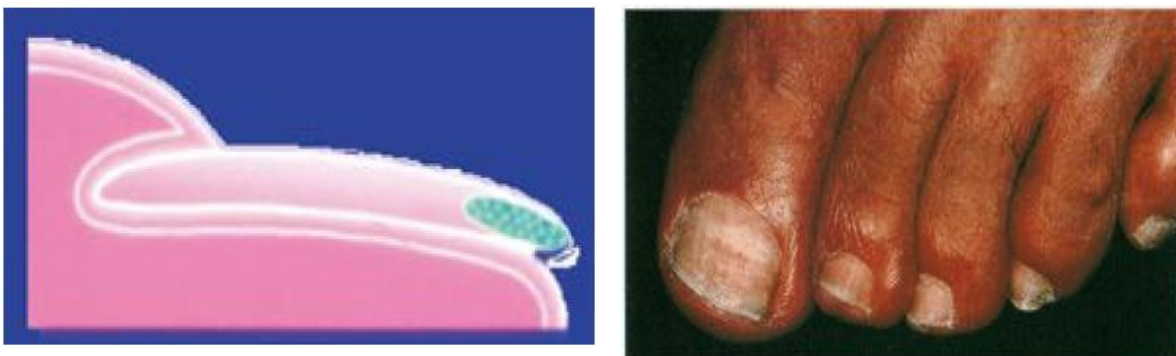


Figure 5 : Onychomycose endonychiaie. Extrait de "A Text Atlas of Nail Disorders"[38].

3.3.5. Onychomycose avec dystrophie totale

Cette forme est le plus souvent secondaire et constitue le mode évolutif d'une onychomycose, localisée, disto-latérale, non traitée. Elle correspond au stade ultime de cette dernière. L'ongle devient ainsi progressivement épaissi et déformé avec, parfois, un empâtement des tissus péri-unguéaux.

Beaucoup plus rarement, l'atteinte de toute la tablette unguéale est primitive ; ces onychodystrophies totales primitives sont le plus souvent candidosiques [36][37].

4. Traitements

Dans le cas d'une onychomycose, la mise en place d'un traitement est justifié, car ces infections ont un retentissement sur la qualité de vie [40][41] tant sur le plan esthétique que fonctionnel (douleur à la marche, diminution de la dextérité, gêne fonctionnelle) [42], mais aussi parce que les onychomycoses ne régressent jamais spontanément [19].

Le traitement a également pour but de réduire la contagiosité personnelle et communautaire.

Les différentes options thérapeutiques peuvent être utilisées seules ou en association, en fonction de plusieurs facteurs[43][42][44][45][46][47][19] [48] :

- Le(s) pathogène(s) responsable(s) ;
- La localisation aux doigts de la main et/ou aux orteils ;
- Le tableau clinique avec atteinte lunulaire ou non ;
- L'ancienneté des lésions ;
- Le nombre d'ongles atteints ;
- Le terrain du patient et les thérapeutiques associées.

4.1. Avulsion unguéale

4.1.1. Chimique

Après avoir nettoyé et désinfecté la région unguéale et péri-unguéale avec un antiseptique (Bétadine®), et protégé la peau péri-unguéale par une moleskine adhésive (Scholl®), on applique sur l'ongle une couche épaisse de préparation à base d'urée à 40 %. Un pansement occlusif (Blenderm® 5 cm) est ensuite appliqué et laissé en place une semaine, ou ôté tous les soirs pour la toilette et refait.

Après une semaine, l'ongle pathologique ramolli se détache facilement aux ciseaux ou à la pince à ongles ; l'opération doit parfois être renouvelée, surtout en cas de pachyonychie importante [34].

4.1.2. Chirurgicale

L'avulsion chirurgicale nécessite une anesthésie locale et doit se limiter à la partie pathologique de la lame afin d'éviter des complications lors de la repousse (incarnation latérale ou antérieure). Des pansements ne sont nécessaires que quelques jours. Dans certaines onychomycoses avec atteinte récidivante au niveau des parties latérales extrêmes de la lame unguéale, et qui semblent d'accès difficile aux différentes thérapeutiques, même systémiques, l'avulsion unguéale partielle et chirurgicale est une alternative intéressante[34].

Elle est également utile dans les onychomycoses à moisissures particulièrement résistantes aux antifongiques.

4.1.3. Meulages répétés

Ce traitement semble moins efficace que le traitement chirurgical mais étant simple et réalisable à domicile il est fréquemment conseillé aux patients[19].

4.1.4. Association d'une avulsion chimique à un antifongique

L'association urée 40 % et bifonazole 1 % (Amycor onychoset®) avec renouvellement quotidien pendant une à trois semaines, puis l'application seule du bifonazole (Amycor crème®) jusqu'à la repousse complète de l'ongle, donne de bons résultats (environ 40 à 50 % de guérison mycologique après 6 mois à 1 an de traitement) [49][50]. Les atteintes matricielles demandent des cures successives.

4.2. Traitements locaux

Ils sont réservés aux mycoses débutantes sans atteinte de la matrice ou en complément d'un traitement par voie orale. On peut également les utiliser chez l'enfant et chez la femme enceinte. Ils ont pour but d'inhiber la croissance du champignon impliqué grâce à une action anti-métabolique. Les topiques antifongiques, peuvent se présenter sous différentes formes galéniques : crèmes, lotions, solutions, poudres.

4.2.1. Les formes galéniques standards

Dans les formes galéniques standards, les molécules utilisées sont les azolés, la ciclopiroxolamine, les allylamines, le tolnaftate. Les solutions filmogènes principalement utilisées sont l'amorolfine et le ciclopirox. L'activité des imidazolés et de la ciclopiroxolamine topique n'est appréciable qu'après avulsion unguéale préalable, compte tenu de l'absence de diffusion dans la kératine unguéale[34].

✓ Les dérivés azolés

La cible principale des azolés est l'ergostérol membranaire, composant essentiel de la paroi fongique. Les azolés présentent surtout une activité fongistatique. Parmi eux on trouve[25] :

- bifonazole (Amycor[®], crème 1 %, Amycor onychoset[®], avec pommade à l'urée 1 %) ;
- éconazole (Pévaryl[®] lait dermique 1 %, crème dermique 1 %, poudre, spray 1 %) ;
- isoconazole (Fazol[®], crème, poudre et lotion à 2 %) ;
- fenticonazole (Lomexin[®], crème à 2 %) ;
- kétoconazole (Ketoderm[®], crème à 1 %) ;
- miconazole (Daktarin[®], gel dermique, lotion et poudre à 2 %) ;
- omoconazole (Fongamil[®], crème, poudre, et solution à 1 %) ;
- oxiconazole (Fonx[®], crème, poudre, solution à 1 %) ;
- sertaconazole (Monazol[®], crème à 2 %) ;
- sulconazole (Myk[®], 1 %, crème, solution, poudre) ;
- tioconazole (Trosyd[®], crème à 1 %).

✓ **Le tolnaftate**

Il existe sous forme de crème et de lotion à 1 % (Sporiline®).

✓ **Les allylamines**

Elles agissent aussi sur la paroi en la rendant perméable et de ce fait assurent la mort du champignon : terbinafine (Lamisil® crème, solution à 1 %, Lamisil dermagel®, gel à 1 %, Lamisilate®, crème 1 %, Terbinafine Biogaran®, crème 1 %).

✓ **L'hydroxypyridone**

Ce composé cible principalement le métabolisme cellulaire du dermatophyte : ciclopiroxolamine (Mycoster® crème, solution, poudre solution à 1 %).

4.2.2. Solutions filmogènes

La mise au point des solutions filmogènes, amorolfine (Loceryl® 5 %) et ciclopirox (Mycoster® 8 %), permet la diffusion de leur principe actif à travers la tablette unguéale jusqu'aux couches profondes, et une persistance pendant au moins 1 semaine après leur application.

Les deux molécules fongistatiques et fongicides sont actives sur les dermatophytes et les levures, tout en possédant une activité *in vitro* sur certaines moisissures avec des CMI plus élevées.

✓ **La morpholine**

Cette molécule est active aussi sur la paroi du champignon : amorolfine (Loceryl® solution filmogène à 5 %). Elle bloque la synthèse de l'ergostérol en agissant sur la 14 alpha- réductase et sur la delta 7-8 isomérase. Cette molécule d'action fongicide sur les dermatophytes et les *Candida*, a une activité sur *Scopulariopsis brevicaulis*, *Alternaria* spp., *Neoscytalidium dimidiatum*. Elle diffuse rapidement à travers la kératine de la tablette et sa rémanence y est suffisante pour qu'elle conserve son action fongicide sept jours après la dernière application.

✓ L'hydroxypyridone

Connu sous le nom de ciclopirox (Mycoster® solution filmogène à 8 %) ou Onytec® (ciclopirox 80 mg/g), son mode d'action se fait par l'inhibition des enzymes fongiques responsables de la dégradation des peroxydes toxiques des champignons. À forte concentration, le ciclopirox inhibe l'activité respiratoire des champignons et altère la perméabilité cellulaire. Contrairement aux autres antifongiques, il n'affecte pas le cycle de l'ergostérol. Le ciclopirox a un spectre d'action relativement large. Il est fongicide sur les dermatophytes. *In vitro*, le spectre d'action s'étend aux levures et à certaines moisissures comme *Scopulariopsis brevicaulis*, *Hendersonula toruloidea*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Scytalidium hyalinum*.

Des études ont montré l'efficacité de ces solutions filmogènes en monothérapie, tout particulièrement en l'absence d'atteinte lunulaire [51].

Leur efficacité dans les onychomycoses dermatophytiques des orteils peut être estimée à environ 50 % des cas, en l'absence d'atteinte lunulaire. L'efficacité clinique et mycologique de l'amorolfine après six mois de traitement est d'environ 38 % en monothérapie [52] et l'efficacité est inchangée que le produit soit appliqué une ou deux fois par semaine [53] (L'amorolfine s'applique 1 à 2 fois par semaine, le ciclopirox 1 fois par jour).

Le ciclopirox en monothérapie aboutit à une guérison mycologique dans 30 à 60 % des cas, et à une guérison clinique et mycologique dans 10 à 30 % des cas [19].

En cas d'atteinte lunulaire, l'association terbinafine et amorolfine a permis de réduire la durée du traitement systémique, et d'augmenter le pourcentage de guérison. 72 % des patients recevant de la terbinafine pendant 3 mois et appliquant du Locéryl® pendant 15 mois ont une guérison clinique et mycologique à 18 mois [54].

Les effets indésirables sont rares, puisque seuls 2 à 3 % des sujets traités ont ressenti des picotements, une brûlure ou une douleur lors de l'application et 4 à 10 % ont eu un érythème péri-unguéal. D'après la littérature, des solutions filmogènes pourraient constituer une thérapeutique prophylactique des récurrences chez les patients génétiquement prédisposés.

4.3. Traitements systémiques

Utilisés en cas d'atteinte matricielle ou de lésions multiples, anciennes et/ou récidivantes, ils peuvent toutefois avoir des effets indésirables et parfois graves, d'où la nécessité de documenter l'origine mycosique de la lésion unguéale avant leur prescription.

Les molécules principalement connues dans le traitement des onychomycoses sont la griséofulvine, les imidazolés, l'allylamine, et les triazolés. L'itraconazole et la terbinafine présentent des propriétés nettement supérieures aux antifongiques plus anciens tels que la griséofulvine et le kétoconazole.

L'itraconazole et la terbinafine ont comme propriétés communes :

- Leur fongicidie ;
- Leur diffusion rapide en quelques semaines dans la kératine unguéale à partir de la matrice et surtout du lit de l'ongle, à des taux nettement supérieurs à la concentration minimale inhibitrice (CMI) et à la concentration minimale fongicide (CMF) ;
- Leur efficacité thérapeutique est très supérieure aux autres molécules ;
- Ils ont une meilleure tolérance avec des effets secondaires plus rares et un risque hépatique réduit par rapport aux autres traitements systémiques ;
- Leur persistance dans la kératine unguéale à des taux thérapeutiques plus de 6 mois après l'arrêt du traitement, limite les récives [34].

Pour le traitement antifongique systémique, trois antifongiques sont disponibles en France dans cette indication : la terbinafine, le kétoconazole et la griséofulvine.

Les faibles taux de guérison obtenus avec la griséofulvine ont très longtemps fait considérer l'onychomycose comme incurable [55]. Pourtant, les études randomisées montrent des taux de guérison mycologique qui sont compris entre 40 et 80 % mais ils ne sont obtenus qu'après des traitements longs, allant de 24 à 52 semaines [56][57].

De plus, les différentes analyses comparatives montrent sans exception une supériorité de l'itraconazole [58][55] et de la terbinafine par rapport à la griséofulvine. C'est pourquoi malgré son autorisation de mise sur le marché (AMM) pour cette indication cette molécule n'est actuellement plus prescrite en France pour traiter les onychomycoses.

Une étude en double aveugle n'a pas montré la supériorité du kétoconazole par rapport à la griséofulvine [59]. Ce produit possède des effets indésirables graves, d'où un mauvais rapport bénéfice/risque. En plus des effets indésirables « classiques », comme les céphalées, les troubles gastro-intestinaux, les réactions cutanées (urticaires, exanthèmes, prurit) et neurologiques (céphalées, vertiges), l'effet secondaire le plus redouté est une hépato-toxicité. L'incidence de cet effet indésirable est de 1/10000 à 1/15000 [60]. Il s'agit d'une réaction immuno-allergique qui ne semble liée ni à la dose journalière ni à la quantité cumulée absorbée et qui peut conduire à une hépatite fulminante.

En pratique dermatologique, tout comme la griséofulvine, le kétoconazole n'est plus prescrit pour traiter les onychomycoses. La terbinafine est à ce jour l'antifongique systémique le plus efficace sur les dermatophytes responsables d'onychomycose et celui dont la durée de prescription est la plus courte. Il s'agit du médicament de première intention.

✓ La terbinafine

La terbinafine est un médicament fongicide, membre de la famille des allylamines. Elle agit sur la chaîne des stérols, en bloquant la squalène oxydase. Il en résulte un déficit en ergostérol, composant membranaire essentiel des champignons, et une accumulation de squalènes qui fragilisent la membrane en formant des vésicules lipidiques.

Le spectre *in vitro* inclut toutes les variétés de dermatophytes ainsi que quelques levures (*Candida*, cryptocoques, *Malassezia*) et quelques champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Blastomyces*, *Fusarium*, *Histoplasma*, *Sporothrix*). La concentration fongistatique minimale et la concentration fongicide minimale sont basses pour toutes les variétés de dermatophytes [61]. *T. rubrum* est le dermatophyte pour lequel les concentrations minimales inhibitrices sont les plus basses. En revanche, la terbinafine n'est que fongistatique vis-à-vis des levures, à l'exception de *Candida parapsilosis* [62].

La terbinafine n'interfère pas avec le cytochrome P450 mais elle est un inhibiteur enzymatique du CYP2D6, ce qui implique peu d'interactions médicamenteuses. Pour les médicaments principalement métabolisés par cette isoenzyme et ayant une marge thérapeutique étroite, à savoir la propafénone, le flécaïnide et le métoprolol, leur taux sérique tend à être augmenté et une adaptation posologique peut être nécessaire.

Certaines associations sont néanmoins à prendre en compte : la théophylline, la cimétidine, l'absorption massive de café augmentent de manière non significative les taux plasmatiques de terbinafine, tandis que la ciclosporine et la rifampicine les diminuent. La clairance de la ciclosporine est augmentée de 15 % [45].

Ce produit est d'une assez bonne tolérance malgré quelques effets indésirables tels que des troubles digestifs et cutanés qui touchent 10 % des patients [63]. Ils sont bénins et surviennent dans les premières semaines du traitement et sont généralement réversibles à l'arrêt du traitement. On rapporte aussi des effets indésirables sensoriels (dysgueusie, agueusie, parosmie ou anosmie) et neurologiques (céphalées, vertiges, paresthésies). Des cas d'hépatotoxicité ont également été rapportés [64].

Cependant les atteintes hépatiques, cholestatiques ou mixtes sont rares, de même que les atteintes des lignées sanguines (neutropénie, thrombopénie, lymphopénie, anémie). Rarement, il peut y avoir une élévation des taux de cholestérol et des triglycérides. Ces troubles biologiques surviennent le plus fréquemment à la sixième semaine du traitement. Aucune surveillance biologique ne figure dans les recommandations du Vidal®. L'absorption augmente si la prise est effectuée au cours du repas mais il y a un passage dans le lait et la barrière hémato-encéphalique, c'est pourquoi ce médicament est déconseillé pendant la grossesse. La métabolisation hépatique produit des dérivés inactifs qui seront éliminés par les urines. Ce médicament possède une forte diffusion unguéale et cutanée.

Différentes études ont permis de prouver l'efficacité de la terbinafine dans le traitement des onychomycoses à dermatophytes, avec des taux de réussite à court terme qui sont de l'ordre de 80 % en ce qui concerne la guérison mycologique et de l'ordre de 50 % en ce qui concerne la guérison simultanée mycologique et clinique [65]. La dose la plus adaptée est de 250 mg/j, pendant 6 semaines pour les ongles des mains et 16 semaines pour les ongles des pieds [66]. L'administration durant 24 semaines en continu ou l'adjonction de 12 semaines supplémentaires chez les seuls non-répondeurs ne permet pas d'augmenter de manière significative les taux de réussite.

D'autres triazolés tels que l'itraconazole et le fluconazole ont montré une activité intéressante dans le traitement des onychomycoses à dermatophytes, mais ils ne possèdent pas en France d'AMM dans cette indication. Les taux de guérison obtenus avec ces médicaments sont cependant inférieurs à ceux de la terbinafine [19].

L'efficacité de la terbinafine à 250 mg/j est en effet supérieure à l'itraconazole 200 mg/j pendant 12 semaines en continu et à l'itraconazole 400 mg/j une semaine par mois durant trois cycles. Cependant, une grande série de Degreff et al [67], montre une équivalence de la terbinafine à 250 mg/j et de l'itraconazole à 200 mg/j pour une durée de 12 semaines également. L'étude LION a par ailleurs permis d'objectiver des taux de guérison clinique et mycologique à long terme significativement supérieurs pour la terbinafine en continu par rapport à l'itraconazole selon le schéma séquentiel [66].

L'efficacité de la terbinafine en continu durant 16 à 24 semaines est supérieure à celle de la griséofulvine pendant 48 à 52 semaines [45].

Enfin, les taux de guérison mycologique et clinique obtenus avec la terbinafine pendant 12 semaines sont supérieurs à ceux obtenus avec le fluconazole administré selon le schéma séquentiel de 150 mg/j une semaine par mois [45].

5. Le diagnostic mycologique et ses difficultés

Le diagnostic biologique des onychomycoses nécessite du personnel qualifié connaissant bien la mycologie. Le prélèvement doit être fait à distance de tout traitement antifongique : les délais recommandés pour éviter les faux négatifs ou les résultats discordants (examen direct positif et culture négative) sont les suivants : 15 jours pour une crème antifongique et les traitements à l'urée, et 3 mois pour les solutions filmogènes ou les traitements locaux par terbinafine. Il est également nécessaire d'éviter tout soin de pédicurie au préalable, d'enlever un éventuel vernis cosmétique 48 heures avant.

L'examen mycologique comprend plusieurs étapes :

- L'interrogatoire et l'examen clinique du patient : ils facilitent la confrontation clinico-mycologique, permettant ainsi une bonne interprétation des résultats ;
- Le prélèvement mycologique proprement dit dont la technique est adaptée au type de lésion ;
- L'examen direct et la culture confiés à un laboratoire compétent en mycologie ;
- L'interprétation des résultats, englobant les résultats mycologiques, l'aspect clinique des lésions ainsi que les données épidémiologiques (contact avec des animaux, mode de vie, ...).

5.1. Anamnèse

L'interrogatoire du patient est nécessaire pour préciser :

- le mode de vie ;
- la présence d'animaux ;
- l'ancienneté des lésions ;
- l'existence de traitements antérieurs, leur durée et leur efficacité ;
- le mode d'évolution des lésions dans le temps (rapide pour une candidose, lent pour un dermatophyte) et dans la forme (début par le bord libre ou par la région matricielle) ;
- la notion de facteurs favorisants, qu'ils soient professionnels (femme de ménage ou pâtissier pour les onyxis des mains, port de chaussures de sécurité pour les onyxis des pieds, ...) ou liés à la pratique d'un sport ou à la fréquentation d'environnements particuliers (piscine, tatamis...) ;
- les antécédents dermatologiques (psoriasis, eczéma...) ;
- le portage dans la famille ;
- l'existence de lésions cutanées associées, anciennes ou préalablement traitées, qui peuvent nécessiter un prélèvement si elles sont de nature à modifier le traitement (exemple d'une onycholyse dermatophytique non matricielle associée à une atteinte plantaire en mocassin) ;
- l'examen du pied dans son ensemble, à la recherche d'anomalies podologiques pouvant expliquer une onycholyse ou une hyperkératose.

5.2. Prélèvement

Le prélèvement de l'échantillon destiné à l'analyse mycologique est l'étape critique pour assurer la qualité de l'examen. Depuis 2007, il est recommandé par la Société Française de Dermatologie d'adresser le patient dans un laboratoire expérimenté pour cette analyse [19][68][69]. De la qualité du geste de prélèvement et de la quantité d'échantillon biologique prélevé dépend en effet le succès de toutes les techniques mises en œuvre par la suite.

Le prélèvement doit être réalisé sur des ongles propres, par exemple désinfectés à l'alcool afin d'éliminer au mieux les moisissures de l'environnement. Il doit également être réalisé de façon à obtenir le champignon vivant pour favoriser la culture c'est-à-dire en recueillant des fragments d'ongle au plus près de la jonction ongle lésé - ongle sain. Un meulage ou grattage

de l'ongle malade permet aussi d'obtenir une poudre exploitable pour le diagnostic mycologique et notamment pour l'examen direct.

Ce geste peut être coûteux en temps mais il est en général indolore et nécessaire pour un diagnostic contributif.

Pour réaliser le prélèvement, le matériel utilisé est simple : des pinces à ongles de taille adaptée, des curettes ou vaccinostyles, des écouvillons stériles, et des boîtes de Pétri. D'autres équipes utilisent des micro-fraisages pour recueillir les squames [70][71] car cette technique augmenterait la sensibilité de la culture.

Conduite à tenir devant une lésion suspecte de candidose [19][25]

L'atteinte des replis latéraux et une onycholyse disto-latérale nécessitent une découpe totale de la lésion afin de gratter le lit unguéal mis à nu pour en recueillir les squames. Un périonyxis associé peut laisser sourdre un pus blanchâtre simplement recueilli à l'écouvillon. En l'absence de suintement (ce qui est souvent le cas), il faut gratter sous le repli sus-unguéal proximal à l'aide d'un vaccinostyle, geste non douloureux, mais nécessitant un minimum de doigté. En cas de coloration verdâtre de l'ongle on peut suspecter une surinfection bactérienne à germe pyocyanique. Un prélèvement bactériologique peut alors être réalisé pour confirmation.

Devant une lésion suspecte de dermatophytose [45][19]

- Dans le cas d'une onycholyse latéro-distale avec ou sans hyperkératose (la plus fréquente), la kératine parasitée est obtenue en grattant les débris kératosiques friables recouvrant le lit unguéal. La découpe peut se faire jusqu'à la lunule en cas d'atteinte matricielle, ce qui peut être mal vécu par le patient sur le plan esthétique. Mais cela permet d'éliminer les contaminants accumulés sous l'ongle (levures, moisissures, germes) qui peuvent profiter du terrain pour se développer. En cas de fusée longitudinale, la découpe est évidemment plus difficile, mais tout de même nécessaire jusqu'à sa partie la plus proximale.

- Dans le cas d'hyperkératose totale de l'ongle sans onycholyse évidente, les couches unguéales supérieures doivent être éliminées progressivement et le prélèvement peut prendre plus de temps.

- Dans le cas d'une leuconychie superficielle, le prélèvement est assez simple puisqu'un simple grattage à la curette de la tablette externe suffit pour rapporter la kératine parasitée. L'ongle récupère alors un aspect faussement sain.

- Lors de leuconychies profondes et d'onychomycose proximale, la découpe préalable des couches superficielles saines est nécessaire jusqu'à visualisation de la zone friable de la tablette inférieure parasitée où est recueilli l'échantillon. L'utilisation d'une meule pour accéder à la zone parasitée n'est pas conseillée, car le meulage risque de favoriser la greffe de moisissures de l'environnement.

- Pour une paronychie (péronyxis) : s'il y a une atteinte des sillons latéraux, comme dans le cas des lésions candidosiques, il faut gratter sous le bourrelet et écouillonner la sérosité, puis un curetage est réalisé sous le repli sus-unguéal, puis dans les zones latérales après découpage de la tablette.

5.3. L'examen direct

L'examen direct désigne l'ensemble des techniques de recherche d'un (ou plusieurs) champignon(s) dans les tissus du patient. Cet examen doit être réalisé rapidement afin d'apporter une réponse rapide au clinicien et d'orienter le prescripteur.

Alors que l'éventuel développement en culture et l'identification du champignon, notamment d'un dermatophyte, peuvent prendre plusieurs semaines, l'examen direct, en affirmant la présence d'un champignon à l'état parasitaire au sein de la lésion, peut justifier ainsi la mise en route d'un traitement dans l'attente des résultats de la culture.

L'examen direct est particulièrement important pour le diagnostic des onyxis dermatophytiques car la culture peut rester négative dans 15 à 20 % des prélèvements, ce taux atteint même 40 % dans certaines études [72][73].

Il s'effectue à partir des fragments d'ongles ou de poudre issue du grattage des squames cutanées en regard et des sérosités des replis unguéaux.

La présence de filaments mycéliens septés oriente vers le diagnostic d'une mycose, elle signe la présence d'un champignon à l'état parasitaire. Quand ces filaments sont réguliers, le plus souvent, il s'agit d'un dermatophyte. Lorsqu'ils sont en revanche irréguliers, vésiculeux, ils évoquent plutôt une moisissure ou un pseudo-dermatophyte.

Des aspects de pseudomycélium avec des blastospores (levures bourgeonnantes) orientent vers une infection candidosique. Enfin la notion d'abondance des éléments fongiques doit être signalée [19][68][74][75].

5.3.1. Examen direct après éclaircissement

Plusieurs techniques sont décrites pour réaliser l'examen direct.

Examen direct après éclaircissement par le lactophénol ou le chloral-lactophénol :

Ces solvants sont très efficaces pour l'examen du matériel sec qui est alors réhydraté. Ils sont principalement décrits pour être utilisés lors de l'examen direct des cheveux, poils et duvets.

Les examens directs réalisés avec ces colorants sur des fragments d'ongles ou de matières sous-unguéales éclaircissent insuffisamment les préparations et ne colorent pas assez les éléments fongiques. Ainsi l'observation ne semble pas assez précise par cette méthode et la mise en évidence d'un pauci-parasitisme dans un échantillon n'apparaît pas de manière fiable [74].

Examen direct par les alcalis caustiques :

L'exposition des fragments d'ongles aussi fins que possibles, idéalement sous forme de poudre, aux alcalis caustiques, hydroxydes de potassium (potasse ou KOH) et de sodium (soude ou NaOH), provoque la dissociation des kératinocytes, par une véritable « digestion » de la kératine. Pour beaucoup de biologistes, cette potasse caustique à une concentration de 10 à 30 % constitue ainsi le réactif de choix pour la recherche des dermatophytes. Certains auteurs, notamment confrontés à des lésions unguéales hyperkératosiques, augmentent même cette concentration jusqu'à 40 % [74]. D'après la littérature, l'addition de 36 à 40 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) à la solution aqueuse de potasse potentialise l'effet du KOH [76].

Après chauffage léger, la préparation est examinée entre lame et lamelle au microscope. La potasse à 20 % dans un véhicule contenant 60 % d'eau et 40 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) évite de chauffer la préparation et s'avère comme une méthode diagnostique plus rapide [74].

Cependant, en pratique quotidienne, du fait d'un contraste fugace et de la dissociation des structures rendant la lecture peu aisée, les techniques utilisant les alcalis caustiques comme éclaircissants des fragments d'ongles et de matières sous-unguéales manquent aussi de

sensibilité, en particulier lorsque les éléments fongiques sont peu abondants, avec un taux de faux négatifs estimé à environ 30 % [37][77].

5.3.2. Examen direct après éclaircissement et coloration

Examen direct après éclaircissement par l'hydroxyde de potassium et coloration

À l'origine préconisée pour le diagnostic microscopique du pityriasis versicolor, la coloration par ajout d'encre stylographique bleue ou noire à la solution éclaircissante bien que non spécifique de la chitine, permet une bonne mise en évidence des spores et filaments.

Le noir chlorazole a été initialement utilisé en botanique, puis repris dans les techniques rapides de coloration pour le diagnostic des affections fongiques. C'est un colorant vital acide qui pénètre très bien dans les cellules, et colore le noyau et les chromosomes en noir, le cytoplasme en gris, le glycogène en rose ou rouge. Il est doté par ailleurs d'une affinité sélective pour la chitine de la paroi fongique qu'il colore spécifiquement en bleu vert en milieu potassique, en laissant apparaître grises les cellules kératinisées et en éliminant au maximum les artefacts. Le noir chlorazole peut ainsi s'avérer particulièrement utile pour repérer les éléments fongiques, surtout quand leur densité dans l'échantillon est faible, ou en cas de doute avec des fibres de cotons ou des fibres élastiques qu'il ne colore pas.

Examen direct après éclaircissement et révélation par un fluorochrome :

Lorsque l'on dispose d'un microscope équipé d'une lampe fluorescente avec des jeux de filtres adéquats (filtre bleu 400-440 nm), on peut utiliser des agents clarifiants tels que le blanc de calcofluor (Sigma) ou le Blankophor[®] (Bayer) à 0,1 %. Ils permettent des lectures rapides de l'examen direct.

Utilisés à la base comme agents de blanchiment dans les industries textile et papetière, certains fluorochromes de la famille des diamino-stilbènes ont une très grande affinité pour les β 1-3 et β 1-4 polysaccharides des champignons. Leur fixation sur les glycanes et la chitine des parois fongiques rend celles-ci fluorescentes vert brillant, vert-bleu ou vert-pomme sous rayonnement ultra-violet. Cette fluorescence est optimale au niveau de l'extrémité des hyphes, des bourgeonnements cellulaires et des tubes germinatifs, lieux de haute concentration de chitine lors de la croissance fongique.

Ces diamino-stilbènes, notamment le blanc de calcofluor, peuvent être utilisés seuls ou associés à un éclaircissant, le plus souvent l'hydroxyde de potassium [78]. Se fixant de manière non spécifique aux β -D-glucanes de la paroi, le rouge Congo en solution à 0,1 % en eau distillée, permet sous rayonnement ultra-violet, une intense fluorescence rouge des éléments fongiques.

Cette fluorescence est facilement repérable par des observateurs non expérimentés [78][72] mais elle a un coût élevé et nécessite la mise à disposition d'un microscope à fluorescence avec lampes et filtres appropriés [19][77].

5.3.3. Examen direct histo-pathologique

L'examen histologique peut être utile en cas d'onychomycose. Après coloration par l'acide période de Schiff (PAS), les filaments apparaissent en effet colorés en rouge dans les tissus. Cependant, cette technique, par ailleurs relativement invasive, ne permet pas d'identifier l'agent pathogène, même si elle présente la meilleure valeur prédictive négative pour l'ensemble des différentes techniques d'examen direct [79][80].

Un certain nombre de contraintes limite cependant fortement la mise en œuvre systématique de cet examen, notamment dans les laboratoires polyvalents de biologie médicale. Le prélèvement, relativement invasif, est effectué selon une procédure chirurgicale définie, sous anesthésie locale [80]. Les techniques d'inclusion et de coupes fines, nécessitant un certain délai et étant relativement coûteuses, ne peuvent être effectuées que dans une structure spécialisée. De plus, la lecture et l'interprétation sont du seul ressort d'un médecin histo-pathologiste.

Différentes simplifications des étapes successives de prélèvement, de traitement de l'échantillon et de coloration des coupes histologiques ont toutefois été éprouvées. Ainsi, l'inclusion, les coupes et la coloration de « rognures » (fragments d'ongles et d'hyperkératoses sous-unguéales) provenant de la zone distale de l'ongle affecté ont été proposées comme bonne alternative à celles de l'échantillon biopsique prélevé par incision, donnant d'aussi bons résultats tout en étant moins douloureuses et plus économiques [81].

Néanmoins, ces techniques de simplification, moins longues qu'une technique d'histo-pathologie classique, sont réalisées sur les mêmes prélèvements que ceux examinés directement, de façon classique et plus rapidement, par exemple avec le noir chlorazole. L'intérêt en reste donc limité puisqu'il n'est alors pas possible d'observer la structure de l'ongle dans l'épaisseur, ce qui est un avantage majeur de l'histo-pathologie, et permet l'apport de renseignements physiopathologiques.

D'autres examens, comme l'immunochimie et la cytométrie en flux, ont été évalués récemment comme des techniques valables. Malheureusement, comme avec l'histopathologie, le principal inconvénient de ces techniques innovantes est qu'elles sont réservées aux laboratoires spécialisés [82][83][84].

Malgré certains avantages comme la rapidité, le faible coût, la bonne sensibilité, l'examen direct est limité par des difficultés d'interprétation, la nécessité pour l'opérateur d'avoir une bonne expérience, la qualité ainsi que la quantité du prélèvement, l'impossibilité de donner l'identification du genre et de l'espèce de champignon en présence.

5.4. Culture

Pour cultiver les champignons, deux milieux différents sont utilisés [69]:

- le milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol (0,05 %) et de gentamicine qui permet la croissance des dermatophytes, des non-dermatophytes et des levures ;
- un milieu identique, comprenant en plus du cycloheximide (0,4 %) (Actidione[®]) et inhibant ainsi la croissance des moisissures contaminantes sauf *Scopulariopsis brevicaulis* [79].

L'ensemencement se fait à l'aide d'une oëse stérile ou d'une spatule. Le produit pathologique est déposé en appuyant légèrement, en plusieurs endroits distincts de la surface de la gélose. Si l'ensemencement est réalisé en tubes, les dermatophytes étant aérobies, il est indispensable de ne pas visser complètement les bouchons.

Les tubes sont ensuite placés à 27 °C en atmosphère humide pour stimuler le développement des champignons pendant une période maximale de 28 jours. Ils seront examinés une à deux fois par semaine. 24 à 48 heures sont nécessaires pour la croissance et l'identification des levures, 48 à 72 heures pour les moisissures, 7 à 21 jours en moyenne pour les dermatophytes. Selon les espèces de dermatophytes, les colonies seront caractéristiques après un délai variable : 8 jours pour *E. floccosum*, jusqu'à 3 à 4 semaines pour certaines espèces à croissance lente comme *T. verrucosum* ou le pseudodermatophyte *Onychocola canadensis*.

L'identification des champignons est donc dépendante du délai de développement des cultures, mais également de leur aspect macroscopique au recto et au verso, et de la microscopie des colonies, d'où la nécessité d'un laboratoire compétent. Les observations macroscopiques et microscopiques sont indissociables l'une de l'autre : l'aspect macroscopique note la vitesse de pousse, la couleur, la forme et la consistance du champignon, ce qui oriente vers son genre (exemple : *Trichophyton* sp., *Aspergillus* sp. ...), tandis que l'aspect microscopique complète cette orientation en précisant l'espèce en cause (exemple : *Trichophyton rubrum* ou *mentagrophytes* variété *interdigitale*).

5.4.1. Aspect macroscopique

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

5.4.2. Aspect microscopique

L'examen microscopique se fait à partir d'un fragment de culture dissocié au bleu lactique ou lactophénol, et examiné entre lame et lamelle. On peut aussi s'aider d'un morceau de ruban adhésif appliqué à la surface de la colonie (drapeau de Roth), puis déposé entre lame et lamelle, dans le bleu lactique ou lactophénol. Le montage est ensuite observé au microscope optique aux objectifs 20 puis 40.

On observe l'aspect des filaments, la présence de chlamydospores, l'abondance et la morphologie des microconidies, la présence et la morphologie des macroconidies, et la présence d'autres éléments appelés ornements (excroissances triangulaires chez *T. rubrum*, organes pectinés, vrilles, organes perforateurs...) (Fig.6).

La figure ci-dessous présente un récapitulatif des différentes caractéristiques microscopiques les plus fréquemment observées pour les dermatophytes.

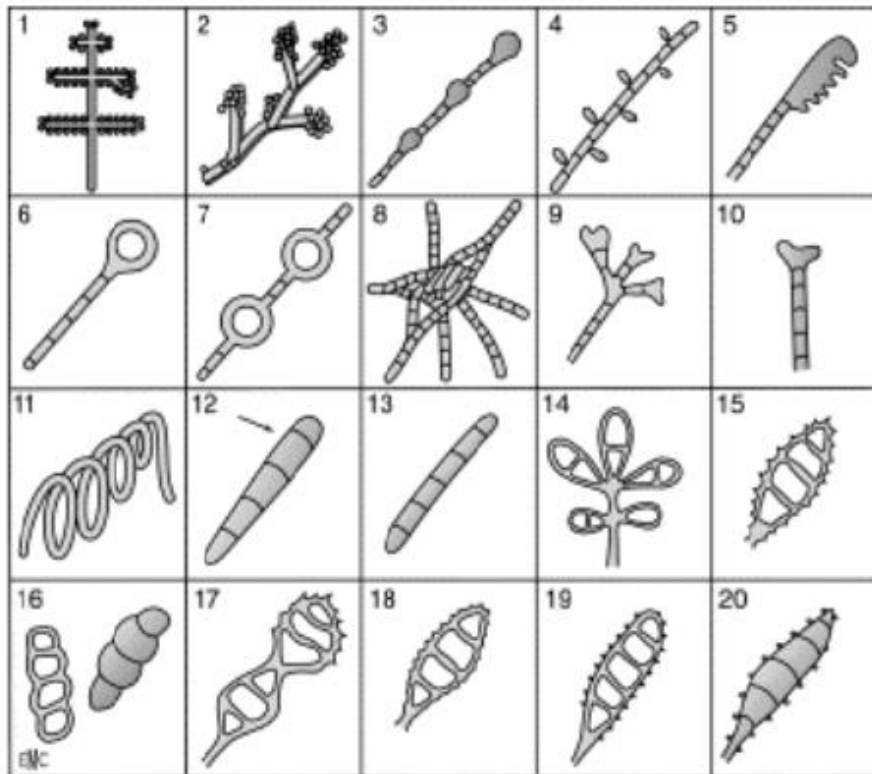


Figure 6 : Aspects microscopiques des cultures : fructifications et formations annexes [85].

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

On considère la culture comme négative en l'absence de croissance après 3 à 6 semaines. D'une façon générale, on ne doit jamais éliminer de tubes avant 3 semaines, au cas où la croissance d'une moisissure ou d'une levure dissimulerait celle d'un dermatophyte. En d'autres termes, un contaminant peut être révélé par le milieu de culture et envahir les boîtes en empêchant toute interprétation correcte alors qu'un autre champignon se trouve être, en fait, le véritable pathogène.

Dans certains cas, des difficultés d'identification sont dues à des variations phénotypiques propres à chaque espèce. Des repiquages peuvent alors être nécessaires sur différents milieux de culture afin de permettre par exemple la fructification du champignon, qui est parfois pauvre ou même absente lors de la primo-culture, ce qui rend difficile le diagnostic d'espèce. Ceci a pour conséquence de retarder d'autant le rendu du résultat au patient et au clinicien.

5.4.3. Avantages et inconvénients de la culture

Malgré certains avantages comme le fait de permettre l'identification du genre et de l'espèce en présence, la culture présente aussi certains inconvénients [86] : sa faible sensibilité, le temps de pousse long, la subjectivité de l'identification microscopique, les faux négatifs par prélèvement de matériel non parasité ou d'agents fongiques non viables, les faux positifs lors de la pousse de champignons filamenteux saprophytes accrochés à la surface de la tablette unguéale.

En raison de ces problèmes, certains cliniciens choisissent de traiter leurs patients sans confirmation diagnostique, et ceci au risque d'engager ces derniers dans un traitement long et parfois non nécessaire, et de les exposer à des effets indésirables [87]. Une étude récente de l'observatoire européen des onychomycoses a montré que, lors d'une suspicion d'onychomycose, seulement 3,4 % des médecins généralistes et 39,6 % des dermatologues ont demandé un prélèvement et un examen mycologique, probablement en raison des difficultés de diagnostic mycologique et du temps requis pour la culture [88].

C'est dans ce contexte que plusieurs méthodes moléculaires ont été développées pour pallier au manque de sensibilité et de spécificité des techniques d'identification classiques des dermatophytes basées sur les critères phénotypiques. Certains laboratoires s'équipent à cet effet de ces techniques rapides et hautement spécifiques.

6. Diagnostic moléculaire

Les méthodes moléculaires sont de plus en plus utilisées en microbiologie. Ainsi, la littérature a vu apparaître ces dernières années différentes techniques centrées autour de la PCR pour aider au diagnostic des dermatophytes.

En 1985, Kary Müllis a mis au point la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Cette technique d'amplification des acides nucléiques a révolutionné le domaine de la biologie. Elle permet d'amplifier rapidement une quantité importante d'ADN à l'origine peu abondante. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une enzyme thermorésistante, l'ADN polymérase (la plus connue étant la *Taq* polymérase), qui recopie en de nombreux exemplaires l'ADN cible à l'aide de deux amorces (oligonucléotides synthétiques de 15 à 30 bases) complémentaires (respectivement des brins sens et antisens).

Le processus d'amplification est exponentiel. Chaque cycle aboutit à la formation de deux copies par brin. Cette avancée technologique s'est peu à peu imposée dans certains laboratoires et en étant déclinée de différentes manières a permis l'essor de nouvelles méthodes, appliquées aux différents domaines de la biologie. Parmi les différentes techniques dérivées de la PCR sont répertoriées :

- La PCR-RFLP [89]
- La PCR-Elisa [90]
- La PCR-Nichée [91]
- La PCR multiplex [92]
- La PCR en temps réel (multiplex ou non) [93]
- La PCR suivie d'un séquençage [94]

6.1. Présentation des techniques les plus utilisées

6.1.1. La PCR-RFLP

Il s'agit de l'étude du polymorphisme de longueur des fragments de restriction enzymatique (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) de l'acide désoxyribonucléique (ADN) préalablement amplifié par PCR.

Cette technique consiste en l'amplification d'un gène cible par PCR classique, suivie d'une digestion enzymatique des produits d'amplification par des enzymes de restriction, et d'une séparation des fragments obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose ou de polyacrylamide. Les différences de profils de digestion obtenus entre souches sont dues à des altérations moléculaires au niveau des sites de restriction des enzymes utilisées : création ou élimination de sites par mutations ponctuelles, par insertion ou délétion de nucléotides. Cette technique est assez fréquemment utilisée en mycologie [95][96][97][98] (cf tableau 33 Annexes). Cependant, elle présente l'inconvénient d'être longue et parfois coûteuse du fait de l'utilisation des enzymes de restriction. Même si elle reste facile à mettre en œuvre, avec le développement de techniques plus modernes, comme la PCR en temps réel, elle est de moins en moins utilisée et n'a pas de place réelle dans le diagnostic des onychomycoses dans un laboratoire de routine.

6.1.2. La PCR Elisa

Dans cette méthode, le produit amplifié est marqué lors de la PCR grâce à une des deux amorces liée par exemple à un résidu de digoxigénine ou un autre marqueur. Après fixation en microplaque à l'aide d'une sonde de capture, la révélation est effectuée à l'aide d'un anticorps spécifique (par exemple antidigoxigénine). Savin [90] et Winter [99] ont utilisé cette technique et ont obtenu des résultats intéressants à partir d'échantillons cliniques. Cependant, la PCR-Elisa nécessite un temps de manipulation conséquent du fait des deux étapes, PCR puis Elisa, et même si cet outil reste technologiquement élégant, les équipes l'ayant développé l'ont fait évoluer pour l'adapter aux méthodes plus modernes comme la PCR en temps réel.

6.1.3. La PCR nichée

Il s'agit d'une PCR avec deux couples d'amorces : un couple externe utilisé lors d'une première PCR, suivie d'une seconde amplification réalisée à l'aide d'un couple d'amorces internes

s'hybridant à l'intérieur du premier fragment. Souvent, le premier couple d'amorces est conçu pour pouvoir accrocher les parties stables du génome, le deuxième pour identifier le sous-type.

Deux PCR successives sont donc réalisées. Cette PCR « nichée » (*nested PCR*) permet d'augmenter la sensibilité du système d'après la littérature mais augmente également considérablement le risque de contamination. Garg et al, Uchida et al [100], Ebihara et al [101] ont utilisé cette technique. Les résultats annoncés dans les publications font état d'une sensibilité remarquable, qui doit toutefois être objectivée du fait du risque important de contamination de cette méthode. D'ailleurs, il est aujourd'hui déconseillé d'utiliser la PCR nichée en diagnostic, et de réserver son application à d'autres utilisations (recherche, suivant les thématiques).

6.1.4. PCR multiplex

Lors de la PCR multiplex, plusieurs couples d'amorces sont ajoutés dans un même tube et la PCR s'effectue simultanément pour chaque couple d'amorces. La PCR multiplex permet donc d'amplifier plusieurs cibles dans un seul tube [92]. Cette méthode prometteuse est déclinée dans la littérature, en PCR classique multiplex [92][102] et PCR en temps réel multiplex [103]. Des kits ont même été développés à partir de cette technique, pour le diagnostic des dermatophytes [93][104].

6.1.5. PCR en temps réel

Des méthodes utilisant la PCR en temps réel (TR) ont aussi été développées. Elles sont fondées sur l'emploi de sondes fluorescentes qui s'hybrident au fragment amplifié ou d'un marqueur fluorescent s'incorporant au produit amplifié à chaque cycle de l'amplification. Le produit amplifié est mis en évidence grâce à l'émission de fluorescence, directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Il en résulte l'apparition d'un signal généré et mesuré « en temps réel », c'est-à-dire au cours du processus d'amplification, et non pas a posteriori, en mesure finale, comme dans les autres systèmes.

Parmi les systèmes de PCR en temps réel les plus connus, on trouve : les sondes FRET (*fluorescence resonance energy transfert*, sondes d'hybridation), le SYBR[®] Green (agent intercalant fluorescent), les sondes TaqMan[®] (appelées aussi sondes double marquage), les balises moléculaires (*molecular beacons*), les sondes Scorpion[™], les sondes LightUp[™]. La PCR en temps réel permet également de réaliser l'amplification multiplex, uniquement lorsqu'on

utilise la détection à l'aide de sondes. Par ailleurs, elle utilise un système fermé : après addition du mélange réactionnel et de l'acide nucléique recherché, le tube reste fermé jusqu'à la fin de la réaction, détection comprise. Outre le fait d'apporter un gain de temps notable, le risque de contamination est donc diminué, avantage important par rapport aux autres techniques dérivées de la PCR classique.

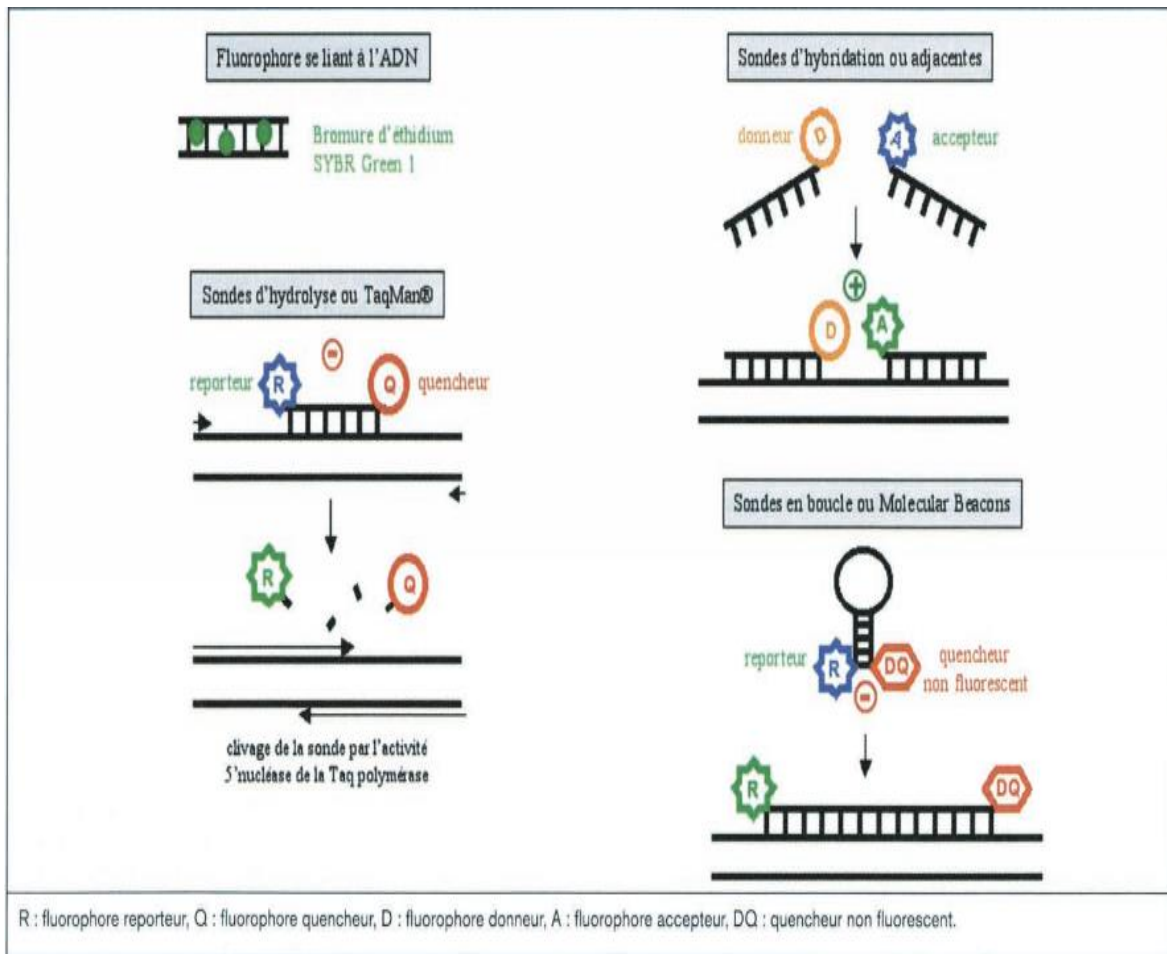


Figure 7 : Les différents systèmes de PCR en temps réel [105].

6.1.6. La PCR suivie de séquençage

Le séquençage consiste à décrypter l'information génomique d'un organisme à partir d'un produit issu de l'amplification d'un ou plusieurs gènes par PCR. La plus courante des techniques de séquençage repose sur la méthode de Sanger. Pour les champignons, les cibles les plus fréquemment utilisées sont les régions ribosomiques comme les ITS ou la grande sous-

unité de l'ARNr [94]. Lors de l'étape d'analyse des séquences, des banques de données sont consultées afin de comparer l'information obtenue à celles collectées dans la base. Cependant il faut être prudent du fait d'un nombre important d'erreurs contenues dans ces banques comme c'est le cas pour GenBank, la plus connue d'entre elles.

6.2. Les gènes cibles utilisés

Parmi les cibles les plus fréquemment utilisées dans la littérature, citons les gènes ribosomiques ITS1, ITS2 [93], 18S [89] et 28S [106] ainsi que des gènes codant des fonctions essentielles à la vie cellulaire tels que l'actine [107], la chitine synthase [91] ou l'ADN topoisomérase [108][109].

6.2.1. Gène codant l'ADN ribosomique

Des équipes se sont orientées vers l'utilisation de l'ADN ribosomique (ADNr) pour mettre en place des techniques moléculaires dans le but de détecter et identifier les dermatophytes, parfois même directement au sein des prélèvements mycologiques.

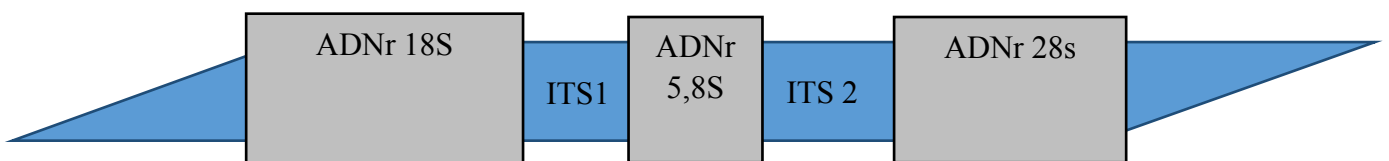


Figure 8 : Schéma de l'unité transcriptionnelle de l'ADN ribosomique des champignons.

Les gènes codant les ARN ribosomiques (ARNr) 18S, 28S et 5,8S sont ceux utilisés généralement pour développer des techniques d'amplification universelle. Ces gènes sont séparés les uns des autres par les régions ITS 1 et ITS 2 (*Internal Transcribed Spacer 1 et 2*) qui ne sont pas transcrites en ARNr. Chez les champignons, les séquences des gènes codant

pour l'ARNr sont relativement conservées parmi les espèces et sont donc moins discriminantes que les séquences des régions ITS qui ont un degré de polymorphisme plus grand. Ces séquences ITS sont utiles pour les études phylogénétiques car elles sont de petites tailles (entre 140 et 600 nts) et sont entourées par des séquences bien conservées (18S, 5,8S et 28S), ce qui permet de trouver facilement des amorces permettant de les amplifier [110].

Le nombre élevé de copies des gènes codant pour l'ARNr dans le génome des champignons a de plus l'avantage de conférer une grande sensibilité aux techniques d'amplification génique ciblées sur cette région [111].

6.2.2. Gène codant l'ADN topoisomérase

L'ADN topoisomérase joue un rôle essentiel lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire (réplication, transcription, séparation des chromosomes, etc...). De ce fait, cibler un gène codant une enzyme présentant une fonction stable dans les cellules est intéressant pour étudier une famille de champignons telle que les dermatophytes. Ceci permet d'étudier l'hétérogénéité des espèces, comme c'est le cas également avec des séquences d'éléments répétés dans les régions non transcrites (NTS) de l'ADN ribosomique de *T. rubrum* [112].

Selon Kambe et al. les PCR ciblant l'ADN topoisomérase sont beaucoup moins sensibles que celles ciblant l'ADN ribosomique [109]. Ceci peut notamment s'expliquer par le nombre de copies présentes par génome : seules deux copies pour l'ADN topoisomérase en comparaison de plus d'une centaine de copies codant pour l'ARNr par génome fongique [113].

6.2.3. Gène codant la chitine synthétase

La paroi cellulaire fongique contient quatre classes de macromolécules appelées protéines de la paroi : mannoprotéines, chitine, alpha et bêta glucane. Ces molécules, spécifiques du champignon et absentes des cellules humaines, constituent une cible intéressante pour le

développement de méthodes moléculaires. Plusieurs auteurs ont ainsi utilisé pour cible l'enzyme impliquée dans la synthèse de la chitine, la chitine synthétase [114] [115].

Cette cible semble beaucoup plus fine et plus appropriée pour identifier les espèces, voire les souches au sein d'une même espèce.

Elle est donc aussi utilisée dans les études de phylogénie.

6.2.4. Gène codant l'actine

L'actine est une protéine du cytosquelette qui participe à de nombreuses fonctions cellulaires vitales. Elle intervient dans les fonctions cellulaires telles que la cytokinèse, l'exo ou l'endocytose, la ségrégation des chromosomes, le transport des organites, et le changement de forme de la cellule, qui constituent tous des indicateurs utiles de la croissance cellulaire [116].

De ce fait, la détection de l'activité de transcription du gène de codage (*ACT* mRNA) est un indicateur potentiel de la fonction cellulaire et de la viabilité moléculaire fongique en pleine croissance.

Cette information pourrait donc également servir à évaluer l'efficacité d'un traitement particulier. Okeke et ses collaborateurs utilisent cette cible [107].

De nombreuses techniques parmi celles décrites dans la littérature n'ont été appliquées qu'à des cultures de dermatophytes, ou d'autres champignons responsables d'onychomycoses, et non pas directement à partir des échantillons biologiques [117][108].

Certains auteurs comme Brillowska [93], Walberg [94], Kardjeva [97], Ebihara [101] ont par contre adapté leurs méthodes d'identification à la détection de l'agent responsable directement dans l'échantillon clinique.

Le tableau suivant résume les différentes études où les auteurs ont évalué parallèlement la microscopie, la culture, et une technique de PCR.

Références	N	Technique de l'examen direct	Examen direct % positifs	Culture % positifs	PCR % positifs	Technique de PCR et cible
Luk [118]	120	KOH 35 %	29 %	10 %	40 %	PCR classique TopoisoméraseII

Références	N	Technique de l'examen direct	Examen direct % positifs	Culture % positifs	PCR % positifs	Technique de PCR et cible
Bontems[98]	4363	Fluorescence	53 %	13 %	Pas même effectif	PCR RFLP 28S
Walberg[94]	346	Pas d'examen direct		18,5 %	33,8 %	PCR Séquençage 18S
Brillowska[119]	109	Non indiquée	29,3 %	20,2 %	33,9 %	PCR multiplex ITS CHS
Kardjeva[97]	195	KOH 30 %	93 %	22 %	84 %	PCR multiplex ITS (GTn)
Litz[120]	550	KOH 10%	40 %	22 %	37 %	PCR nichée CHS1
Gupta[86]	62	KOH 20%	77,4 %	22,6 %	69,4 %	PCR nichée ITS
Arca[121]	52	KOH 20%	77 %	23 %	38 %	PCR classique ITS
Winter[99]	218	Fluorescence	51,6 %	23,9 %	29,9 %	PCR ELISA TopoisoméraseII
Garg[114]	155	KOH 20%	63,4 %	25,8 %	79,6 %	PCR nichée CHS1
Uchida[100]	80	Pas indiquée	100 %	26 %	99 %	PCR nichée ITS1
Berk[122]	90	Noir chlorazole	80 %	22 %	74,4 %	PCR TR
Wissenlink[123]	1437	Pas d'examen direct		27 %	49 %	PCR TR ITS
Li [102]	104	KOH 15%	50,9 %	27,8 %	40,4 %	PCR classique CHS1
Mehlig[104]	253	Noir chlorazole	34,4 %	31,6 %	50,2 %	PCR classique
Arabatzis[117]	92	KOH	43 %	33 %	51 %	PCR TR ITS

Références	N	Technique de l'examen direct	Examen direct % positifs	Culture % positifs	PCR % positifs	Technique de PCR et cible
Kondori[124]	177	Fluorescence	46 %	34 %	44 %	PCR multiplex ITS CHS1
Chandran[73]	107	KOH	100 %	35,5 %	72 %	PCR multiplex ITS CHS1
Bergman[125]	202	Pas d'examen direct		39 %	51 %	PCR TR multiplex ITS-CHS1
Alexander[126]	862	Non indiquée	56,7 %	51,7 %	61 %	PCR TR ITS
Beifuss[127]	204	Noir chlorazole	100 %	59,8 %	79,9 %	PCR ELISA topoisomérase II
Ebihara[101]	50	Non indiquée	100 %	/	78 %	PCR nichée 28S
Dhib[92]	201	KOH 30%	71,1 %	65,6 %	97 %	PCR classique CHS1

Tableau 5 : Positivité des techniques de microscopie, culture, PCR Revue de la littérature.

*TR : temps réel

Ce tableau met en évidence que quelle que soit la technique de PCR utilisée les taux de résultats positifs avec les méthodes moléculaires sont toujours supérieurs à ceux de la culture et souvent équivalents ou supérieurs à ce qui est obtenu à l'examen direct. Dans certaines études seulement les taux sont inférieurs à ceux de l'examen direct. Ceci peut être dépendant de la spécificité de la PCR ou de ce qui est considéré comme positif à l'examen direct (filaments uniquement ou levures et filaments)

6.2.5. Kits commerciaux

Plusieurs kits commerciaux ont été développés ces dernières années pour détecter directement les dermatophytes à partir du prélèvement biologique. Pour des raisons de confidentialité, les cibles utilisées dans ces kits ne sont malheureusement pas toujours indiquées.

Le kit Onychodiag a été l'un des premiers développés par la société Bioadvance. Savin et al ont rapporté les résultats prometteurs obtenus lors du test de cette PCR Elisa en 2007 sur des échantillons cliniques [90]. Cet outil ne permet de détecter que la présence générale de dermatophytes sans aller jusqu'à l'identification de l'espèce. Ainsi tout laboratoire équipé d'un système d'amplification par PCR et d'un spectrophotomètre pour microplaques ELISA peut traiter les échantillons d'ongles avec le kit Onychodiag et fournir les résultats dans les 48h.

Une société Danoise : Statens Serum Institut commercialise également un kit : c'est une PCR duplex en point final qui combine une PCR pan-dermatophytes avec une PCR spécifique de *T. rubrum*. Les cibles de ce kit sont la chitine synthase (CHS1) pour la PCR pan-dermatophyte et les régions ITS pour *T. rubrum*. Ce Kit PCR ne nécessite qu'une journée pour le diagnostic de laboratoire d'après Kondori [124]. D'après l'auteur la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et négative (VPP, VPN) de ce test seraient de 93 %, 87 %, 94 % et 85 %.

D'autres auteurs comme Chandran [73] ou Brillowska [119] ont aussi évalué ce kit, en rapportant des résultats similaires à ceux de Kondori.

Dernièrement, Melhing et al ont publié leur évaluation du kit Mycoderm commercialisé par la société Mentype [104]. Le kit se compose de tous les réactifs pour effectuer deux PCR multiplex distinctes qui permettent de mettre en évidence 21 espèces au total. Le mélange d'amorces 1 contient des amorces spécifiques de *E. floccosum*, *M. canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichosporon cutaneum*, *S. brevicaulis*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. Le Mix 2 contient les amorces spécifiques pour l'amplification de *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *Trichophyton* spp. Les auteurs rapportent une sensibilité, une spécificité, une valeur prédictive positive et négative (VPP, VPN) respectivement de 87,3 %, 94,3 %, 87,3 % et de 94,3 %.

Un autre kit est actuellement commercialisé par la société FTD Dermatophytes : Fast Track Diagnostics. C'est une PCR multiplex en temps réel permettant la détection simultanée du complexe *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, du complexe *T. rubrum*, de *Microsporum canis*, *Microsporum audouinii* et *Microsporum ferrugineum*. Malheureusement aucune étude n'a encore été publiée sur ce kit.

Enfin, le kit BioEvolution est utilisé pour détecter l'ensemble des dermatophytes, directement à partir du prélèvement, sans distinction des espèces. Ce kit constitue l'adaptation en temps réel du kit Onychodiag, la société Bioadvance étant renommée BioEvolution. Aucune étude n'est encore publiée sur le test de ce kit.

Dans le travail expérimental de cette thèse, nous avons évalué ce kit sur 180 prélèvements biologiques issus de 90 patients suspects d'onychomycose.

II. Objectifs du travail

L'objectif premier de cette étude est l'évaluation d'une méthode simple de biologie moléculaire pour optimiser le diagnostic des dermatophytoses et en particulier celui des onychomycoses.

L'objectif secondaire de ce travail est d'amorcer une réflexion sur la possible intégration de cet outil au diagnostic de routine réalisé dans le secteur de dermatomycologie de la structure de Parasitologie Mycologie du CHU de Nancy.

En effet, ceci permettrait de :

- **Raccourcir le délai du diagnostic :**

Le délai de rendu des résultats varie de 15 jours à 1 mois en utilisant les méthodes de culture conventionnelles. L'utilisation d'un kit de PCR a l'avantage d'être beaucoup plus rapide et de permettre d'obtenir des résultats en 24h, le protocole d'extraction étant de moins de deux heures et le coffret permettant une analyse en 80 min.

- **Augmenter la sensibilité diagnostique :**

L'amélioration de la sensibilité du diagnostic des onychomycoses est essentielle. En effet, un traitement antifongique systématique est actuellement très souvent instauré sans documentation microbiologique malgré les recommandations de la Société Française de Dermatologie [19]. Pourtant le rapport bénéfice/risque de la prise au long cours d'un traitement potentiellement toxique pour une pathologie bénigne, ne présentant pas de risque vital et dont le diagnostic n'est pas certain, nous paraît extrêmement défavorable. L'augmentation de la sensibilité diagnostique permettra également d'éviter les éventuels effets secondaires et le coût pour la collectivité de traitements empiriques ou prescrits de manière inadaptée et répétitive pour une « mycose qui n'existe pas » chez des malades déjà parfois poly-médicamentés [4].

- **S'affranchir de la qualité du prélèvement :**

La sensibilité de la culture conventionnelle dépend de la qualité du prélèvement, c'est-à-dire de la présence de spores ou d'hyphes de dermatophytes viables dans le prélèvement.

Le diagnostic moléculaire par PCR possède une meilleure sensibilité que la culture conventionnelle car cette technique est indépendante de la viabilité du micro-organisme : même si le champignon n'est pas viable, c'est-à-dire dans un prélèvement non optimal, son ADN sera quand même détectable.

La sensibilité de la culture est également influencée par la présence de spores de champignons contaminants, ou de bactéries ayant une vitesse de pousse plus rapide que les dermatophytes et inhibant ainsi leur développement en culture, même si ces derniers sont bien présents. En utilisant une PCR spécifique des dermatophytes, les résultats de celle-ci ne seront pas dépendants de la présence d'ADN d'autres organismes dans le prélèvement.

III. Approche expérimentale

1. Prélèvements

De novembre 2012 à mai 2013, de manière prospective, nous avons recueilli 180 échantillons unguéaux provenant de 90 patients atteints d'onychopathie, dont l'origine dermatophytique était suspectée. Le recrutement s'est effectué principalement au cours des consultations externes de dermatologie, et diabétologie ainsi que pendant les hospitalisations dans les services de dermatologie, de diabétologie, gastro-entérologie et de gériatrie du CHU de Nancy.

Chaque patient a subi deux prélèvements : l'un considéré comme « mauvais » dans la zone la plus éloignée de la jonction ongle sain / ongle malade et l'autre dit « bon » à la jonction ongle sain / ongle malade, dans le but de noter l'impact de ce facteur sur la sensibilité de chaque étape du diagnostic.

2. Examens directs

L'examen direct a pour objet l'observation de squames ou de fragments d'ongles, dans le but de mettre en évidence, ou non, des éléments fongiques contenus dans ces échantillons biologiques.

Dans notre étude, nous avons utilisé le noir chlorazole ainsi que le Blankophor afin de déterminer laquelle de ces deux techniques est la plus sensible pour détecter les filaments, spores ou levures présents dans le prélèvement.

Pour chaque échantillon, de la poudre d'ongle a été recueillie, placée directement entre lame et lamelle avec soit une goutte de noir chlorazole soit du Blankophor, puis chauffée doucement, et enfin analysée au microscope pour rechercher la présence d'éléments fongiques. La lame avec le noir chlorazole a été regardée au microscope optique.

Quant au prélèvement avec le Blankophor, les préparations ont été examinées en utilisant un microscope à fluorescence (Leica type 020-519-500 LB30T) avec un filtre d'excitation à 350-460 nm et un filtre d'arrêt à une longueur d'onde de 420 nm. Les lames ont été lues aux objectifs 20 et 40 en intégralité avant d'être rendue soit négative soit positive avec plus ou moins d'éléments fongiques retrouvés.

3. Culture conventionnelle

Le gold standard actuel pour le diagnostic des onychomycoses est la culture conventionnelle [25]. Dans notre étude, elle est utilisée comme référence pour comparer les résultats de la PCR. Les échantillons d'ongles prélevés, comme précédemment décrit, ont étéensemencés sur deux types de milieux gélosés en tube, un milieu Sabouraud avec du chloramphenicol (0,5g) et de la gentamicine et un milieu comprenant en plus de l'actidione qui inhibe en partie certains contaminants (moisissures et levures). Les milieux ont été placés à 27°C pendant quatre semaines ; les cultures ont été examinées une à deux fois par semaine pour contrôler la pousse du champignon. Quand celle-ci a été estimée optimale, les cultures ont été examinées macroscopiquement et microscopiquement.

Lorsque les fructifications n'étaient pas assez abondantes et/ou ne permettaient pas une identification microscopique, les colonies ont été repiquées sur des milieux spécifiques type BCP, eau gélosée à 2 %, milieu à l'urée...

Les moisissures et les champignons non dermatophytiques ont été repiqués sur milieu de malt à 2 % ou de Czapek.

Les levures ont été identifiées en utilisant les caractères morphologiques après subculture à 27°C sur milieu RAT (Rice Agar Tween - fabrication maison), sur milieu CanD (biomérieux) après réalisation de tests de filamentation sur sérum, et ensemencement de géloses avec et sans actidione. Des galerie Api ID32C (biomérieux) ont été utilisées si besoin

4. Diagnostic moléculaire

Les performances du kit « Dermatophytes - PCR en temps réel » commercialisé par Bioevolution ont été évaluées sur les 180 échantillons cliniques provenant de patients suspects d'onychomycose.

4.1. Description du coffret

Le coffret de PCR en temps réel comporte un système prêt à l'emploi spécifique de la détection des dermatophytes. Il contient les réactifs et les enzymes nécessaires à l'amplification de l'ADN de ces champignons. La fluorescence est émise et mesurée de façon individuelle par un système optique au cours de la PCR.

La détection des fragments amplifiés d'ADN de dermatophytes est réalisée par un fluorimètre en utilisant le canal FAM. En parallèle, ce coffret contient un système pour déterminer la qualité de l'extraction de l'ADN en mesurant la fluorescence d'un contrôle cellulaire sur le canal VIC.

4.2. Contenu du coffret

Le coffret contient les réactifs nécessaires à la réalisation de 25 réactions de PCR : un tube de mix (500 µl) contenant le tampon de la Taq polymérase, le chlorure de magnésium, les nucléotides tri-phosphates, la Taq polymérase thermoactivable, les différentes amorces et sondes, ainsi que le rox (utilisé comme référence passive) ; un tube d'eau (500 µl) et un tube de contrôle positif (30 µl).

4.3. Principe de la détection

Ce coffret repose sur une réaction d'amplification des acides nucléiques spécifiques et une analyse en temps réel de l'activité 5' nucléase de l'ADN polymérase par un système optique de réaction de la fluorescence. Des réactions d'amplification spécifiques d'un fragment du gène codant l'ARN ribosomique 5,8S des dermatophytes et d'une région de la bêta-actine humaine (contrôle cellulaire) sont réalisées à partir de l'ADN extrait de l'échantillon. La sonde spécifique des dermatophytes est marquée par le fluorochrome FAM et émet une fluorescence spécifique suite à son hydrolyse au cours de l'élongation du produit d'amplification des dermatophytes. La sonde spécifique du contrôle cellulaire est marquée par le fluorochrome HEX et émet une fluorescence spécifique suite à son hydrolyse au cours de l'élongation du produit d'amplification du contrôle cellulaire.

La mesure des intensités de fluorescence en temps réel relate l'accumulation des produits d'amplification spécifiques sans nécessiter de manipulation des amplicons après amplification. L'amplification du contrôle cellulaire d'extraction permet à l'utilisateur de s'assurer de la qualité de l'extraction d'ADN. Ceci permet de détecter la présence d'inhibiteurs de la Taq DNA polymérase ou de conditions de réactions sub-optimales.

4.4. Procédures

4.4.1. Extraction de l'ADN à partir des ongles

L'ADN de chaque échantillon a été extrait en utilisant le kit d'extraction QIamp DNA mini kit® (QIAGEN) ; nous avons augmenté le temps d'incubation de l'échantillon en présence de la protéinase K en passant de 45 min à 1h 30.

Le tableau présenté ci-dessous résume les différentes étapes nécessaires à l'extraction de l'ADN en utilisant ce kit.

Etape 1	Echantillon + 180µL tampon ATL + 20 µL de proteinase K	Vortexer	
	Incuber 1H30 à 56°C		
Etape 2	+ 200 µL de tampon AL	Vortexer	Incuber 10 min à 70°C
	Centrifuger brièvement à 3000 t. min ⁻¹ (pour faire tomber les gouttes du bouchon)		
	+ 200 µL d'éthanol absolu	Vortexer	
	Centrifuger à 8000 t. min ⁻¹ pendant 1 min puis placer dans un nouveau tube		
	+ 500 µL de tampon AW1	Centrifuger 1 min à 8000 t. min ⁻¹	Jeter le tube collecteur
	+ 500 µL de tampon AW2	Centrifuger 3 min à 14000 t. min ⁻¹	Jeter le tube collecteur
		Centrifuger 1 min à 14000 t. min ⁻¹	Jeter le tube collecteur
	Mettre la colonne filtre sur un tube type eppendorf et ajouter 100 µL de tampon AE	Incuber 5 min et centrifuger 1 min à 8000 t. min ⁻¹	Jeter la colonne et garder le tube contenant l'ADN

Tableau 6 : Protocole d'extraction de l'ADN fongique.

4.4.2. Protocole PCR

A partir des réactifs contenus dans le kit, le mélange réactionnel a été réalisé comme suit :

- 1) Homogénéisation du mix et centrifugation brève, puis distribution de 20µL de mix dans chaque puits d'une plaque de réaction pour PCR en temps réel.
- 2) Séparément, ajout de 5 µL de chaque échantillon d'ADN, de contrôles positifs ou négatifs dans les différents puits de réaction correspondants.

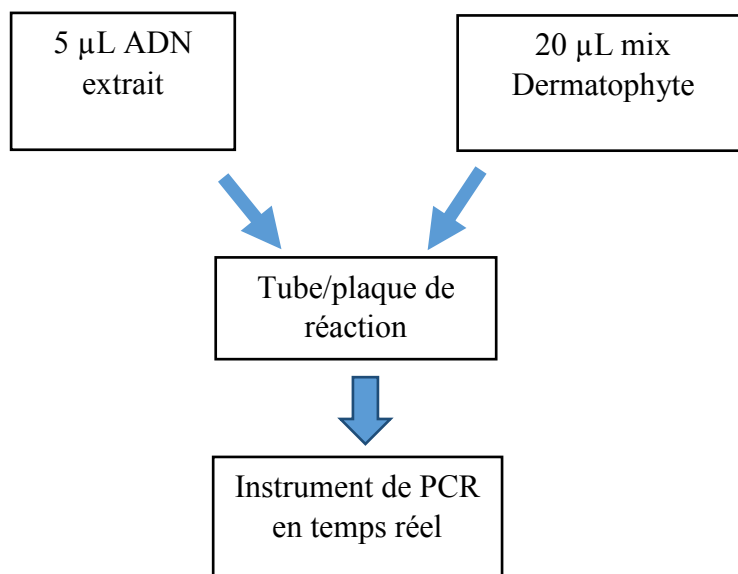


Figure 9 : Protocole réalisé pour utiliser le kit PCR temps réel dermatophytes.

- 3) Réalisation du programme suivant sur l'instrument de PCR *StepOne™* (Applied Biosystems) :

Programme	Température	Durée (secondes)	Cycle(s)	Acquisition de fluorescence
Activation de la Taq polymérase	95°C	30	1	Non
Amplification	95°C	5	40	non
	60°C	40		Canaux FAM et VIC
Refroidissement	37°C	1	1	non

Tableau 7 : Programme de la PCR en temps réel utilisant le kit BioEvolution.

4.5. Validation de l'expérimentation

Dans chacun des canaux (FAM et VIC), le seuil doit être positionné au-dessus du maximum de signal généré par le contrôle négatif. Les valeurs de Ct pour les contrôles détectés dans le canal **FAM** doivent être les suivantes :

- Contrôle négatif (eau) : Ct non déterminé (en dessous du seuil de positivité fixé)
- Contrôle positif : Ct inférieur ou égal à 32

Les valeurs de Ct pour les contrôles détectés dans le canal **VIC** doivent être les suivantes :

- Contrôle positif : Ct inférieur ou égal à 38
- Un signal pour le contrôle cellulaire doit être détecté dans ce canal pour chaque échantillon. Toutefois, pour des raisons de compétition, le signal peut ne pas être détecté en présence de quantités importantes d'ADN de dermatophytes.

	Canal FAM	Canal VIC
Contrôle négatif	Indéterminé	indéterminé
Contrôle positif	$Ct \leq 32$	$Ct \leq 38$
Echantillon	Ct	Ct échantillon

4.6. Analyse des données et interprétation

Différents résultats peuvent être obtenus :

- Un signal est détecté sur le canal FAM et la valeur du Ct est inférieure ou égale à 38.

Le résultat est positif : l'échantillon contient de l'ADN de dermatophytes.

- Un signal est détecté sur le canal FAM mais la valeur de Ct est comprise entre 38 et 40.
Il est nécessaire de relancer une analyse. Si le résultat montre une valeur de Ct de nouveau comprise entre 38 et 40, alors le résultat peut être considéré comme négatif : l'échantillon ne contient pas d'ADN de dermatophytes.

- Aucun signal n'est détecté sur le canal FAM. Simultanément, un signal positif du contrôle cellulaire apparaît sur le canal VIC. **L'échantillon ne contient pas d'ADN de dermatophytes, il peut être considéré comme négatif.**
- Aucun signal n'est détecté, ni sur le canal FAM ni sur le canal VIC. **Aucun diagnostic ne peut être réalisé.** La réaction de PCR a été inhibée. Il est recommandé de diluer l'échantillon d'un facteur 5 et de l'analyser à nouveau.

	Canal FAM	Canal VIC	Interprétation
Contrôle négatif	Indéterminé	Indéterminé	
Contrôle positif	$Ct \leq 32$	$Ct \leq 38$	
Echantillon	$Ct \leq 38$	*	Positif pour les dermatophytes
	$Ct \geq 38$	$Ct \leq 40$	Négatif pour les dermatophytes
	$Ct \geq 38$	Indéterminé	Réanalyser

Tableau 8 : Analyse des données et interprétation.

*Quelle que soit la valeur de Ct détectée sur le canal VIC pour le contrôle cellulaire d'inhibition

4.7. PCR panfongique et séquençage

En cas de résultats discordants entre les différentes techniques nous avons fait une PCR classique pan-fongique de l'ADN extrait grâce au couple d'amorces ITS1-ITS4. Les produits de cette réaction ont été déposés sur gel d'agarose à 2 % (annexe 3). En fonction des résultats de l'électrophorèse, quand le produit amplifié ne présentait qu'une seule bande, celui-ci a été envoyé à la société Genoscreen (Lille) pour être séquencé afin d'identifier le champignon.

La présence de plusieurs organismes fongiques a été mise en évidence par plusieurs bandes sur le gel d'électrophorèse. Dans ce cas, les échantillons n'ont pas pu être séquencés.

Les tests statistiques réalisés pour analyser les résultats de notre étude ont été faits par voie informatique par A. C. Ferdinand, Biostatisticien au CHU Félix Guyon, à la Réunion

IV. RESULTATS

1. Echantillons

Nous avons recueilli 180 échantillons unguéaux provenant de 90 patients atteints d'onychopathie, dont l'origine dermatophytique était suspectée. Parmi ces patients, les prélèvements étaient issus de 43 femmes, soit 47,8 % des échantillons, et 47 hommes, soit 52,2 % des échantillons. La moyenne d'âge de ces 90 patients était de 70,3 ans avec une médiane à 69,5 ans et un écart type de 16,6 années.

Quatre types de lésions ont été rencontrés :

Type de lésions		
	Fréquence	Pourcentage
Distale avec onycholyse	28	31.11
Distale avec hyperkératose	22	24.44
Atteinte totale	38	42.22
Leuconychie	2	2.22
Total	90	100

Tableau 9 : Types de lésions rencontrés.

Au cours de notre étude nous n'avons pas rencontré d'atteinte proximale de l'ongle.

Lors de la réalisation du prélèvement nous avons noté si ces lésions étaient associées à d'autres localisations comme la plante, l'inter-orteil (IO), d'autres ongles d'orteils (OO), ou aux mains.

Chacun des deux prélèvements réalisés pour un même patient a été divisé en quatre parties réparties entre l'examen direct avec le noir chlorazole, l'examen direct avec le fluorochrome, la culture mycologique, et l'analyse de biologie moléculaire.

Atteinte de l'ongle		
Association	Fréquence	Pourcentage
Non	44	48.89
IO	8	8.89
Plante	5	5.56
IO + plante	26	28.89
Autres ongles	3	3.33
OO + plante	2	2.22
Mains	2	2.22

Tableau 10 : Différentes associations de lésions rencontrées.

2. Examens directs

Nous avons comparé l'impact de la qualité du prélèvement et de la méthode utilisée pour l'examen direct pour chaque patient. Nous avons utilisé un test d'analyse des mesures répétées, et étudié deux facteurs : le type de prélèvement et la technique de l'examen direct. Deux prélèvements (notés 1 ou 2) ayant été réalisés pour chaque patient : le prélèvement 1 correspond à celui de moins bonne qualité, tandis que l'échantillon 2 est celui réalisé au plus proche de la jonction ongle sain – ongle malade.

Chacun de ces deux prélèvements a été analysé par les 2 méthodes d'examens directs (noir chlorazole et fluorochrome). Les prélèvements ont été dits négatifs si aucun élément fongique n'était observé sur la totalité de la lame à l'objectif 40. L'examen direct était positif dès lors qu'un élément fongique (filament, levure ou spore) était observé, quelle qu'en soit la quantité.

Dans le tableau ci-dessous les fréquences et pourcentages obtenus en analysant les résultats des examens directs, tout élément fongique confondu, suivant les techniques utilisées et les prélèvements « bons » ou « mauvais ».

Prélèvement 1		Prélèvement 2		Fréquence	Pourcentage
noir	fluorescence	noir	fluorescence		
-	-	-	-	30	33.33
-	-	-	+	1	1.11
-	-	+	-	1	1.11
-	-	+	+	4	4.44
-	+	-	+	1	1.11
-	+	+	+	3	3.33
+	-	+	+	3	3.33
+	+	+	+	47	52.22

Tableau 11 : Fréquences obtenues en fonction des techniques d'examens directs et du prélèvement.

D'après le logiciel de bio-statistiques utilisés et par le test des mesures répétées, **le fait de changer de technique n'est significativement pas différent au risque $\alpha=0,05$ ($p=0,0563$)** lorsque l'on inclut dans les ED positifs les spores et/ou levures et /ou filaments.

En revanche, **la qualité du prélèvement a ici un impact significatif sur ces résultats ($p=0,0005$).**

En d'autres termes, le bon prélèvement donne une probabilité significativement plus élevée d'une réponse positive de l'examen direct que le mauvais prélèvement.

Si l'on fait les mêmes analyses mais cette fois en n'incluant dans les examens directs positifs que ceux montrant des filaments, on obtient :

Prélèvement 1		Prélèvement 2		Fréquence	Pourcentage
noir	fluorescence	noir	fluorescence		
-	-	-	-	41	45.56
-	-	-	+	3	3.33
-	-	+	+	2	2.22
-	+	-	+	2	2.22
-	+	+	+	5	5.56
+	-	-	+	1	1.11
+	-	+	+	2	2.22
+	+	+	+	34	37.78

Tableau 12 : Fréquences obtenues en fonction des techniques d'examens directs et du prélèvement, en ne considérant que les ED positifs à filaments.

Avec le test bio-statistiques des mesures répétées, **la qualité du prélèvement a toujours un impact significatif sur les résultats ($p=0,0004$).**

Mais ici, **le choix de la technique a également un impact significatif ($p=0,0150$).**

Par les mêmes méthodes d'analyse, **la fluorescence donne une probabilité significativement plus élevée d'une réponse positive que le noir chlorazole.**

Le test précédent montrant que le choix de la technique pour détecter les filaments a un impact significativement différent, nous avons comparé la concordance de ces techniques par le test statistique du Kappa.

L'index Kappa permet de quantifier le niveau de concordance des méthodes diagnostiques par des index. Plus la valeur de l'index Kappa se rapproche de 1, plus la concordance des résultats est importante. Celle-ci est qualifiée par différents adjectifs en fonction de la valeur de l'index Kappa.

Accord	Index Kappa
Excellent	$\geq 0,80$
Bon	$0,60 \leq \kappa < 0,80$
Moyen	$0,40 \leq \kappa < 0,60$
Médiocre	$0,20 \leq \kappa < 0,40$
Mauvais	$0 \leq \kappa < 0,20$
Exécrable	< 0

Tableau 13 : Signification des index kappa selon leurs valeurs.

Ainsi, en considérant les résultats obtenus pour chaque technique et pour chacun des types de prélèvements on obtient :

➤ « Mauvais » prélèvements / examens directs positifs à filaments :

Noir	Fluorescence		Total
	Négatif	Positif	
Négatif	46	7	53
Positif	3	34	37
Total	49	41	90

Tableau 14 : Comparaison des techniques de l'examen direct dans la visualisation des filaments pour les mauvais prélèvements.

Sur les mauvais prélèvements en changeant uniquement de technique on a une différence globale de 4 échantillons entre le noir et la fluorescence (3 échantillons détectés positifs au noir contre 7 détectés positifs à la fluorescence).

L'index calculé Kappa est tel que $k=0,774$, on a donc une **bonne concordance** car $0,6 \leq k \leq 0,8$ même si on a des discordances entre les deux techniques.

➤ « Bons » prélèvements / examens directs positifs à filaments :

	Fluorescence		Total
	Négatif	Positif	
Noir			
Négatif	41	6	47
Positif	0	43	43
Total	41	49	90

Tableau 15 : Comparaison des techniques de l'examen direct dans la visualisation des filaments pour les bons prélèvements.

Sur les bons prélèvements : on observe 6 prélèvements positifs supplémentaires en changeant uniquement de technique.

L'index calculé est tel que $k=0,8672$, les deux techniques ont donc une **excellente concordance** entre elles.

Les deux techniques ont une concordance qui s'améliore avec la qualité du prélèvement. Celle-ci est très élevée mais les discordances restantes sont significatives, comme l'a montré le premier test.

En résumé, une meilleure qualité du prélèvement impacte significativement le résultat de l'examen direct. L'utilisation de la fluorescence sur les bons prélèvements permet d'améliorer significativement ces résultats par rapport à l'utilisation du noir chlorazole.

3. Cultures

Dans un premier temps, nous avons comparé les « bons » et les « mauvais » prélèvements pour l'obtention de cultures positives présentant soit un dermatophyte ou une moisissure ou une levure ou une bactérie sur au moins un des deux tubesensemencés.

Pour les mauvais prélèvements, 50 (55,6 %) cultures ont été positives sur 90, alors que pour les bons prélèvements, 53 (58,9 %) cultures se sont avérées positives sur 90.

Le tableau ci-dessous présente ces résultats détaillés pour chaque catégorie :

	Microorganismes isolés en culture					
Fréquence	négatifs	bactéries	moisissures	levures	dermatophytes	total
Mauvais prélèvements	40 (44.44%)	5 (5.56%)	21 (23.33%)	9 (10.00%)	15 (16.67%)	90 (50%)
Bons prélèvements	37 (41.11%)	9 (10.00%)	19 (21.11%)	4 (4.44%)	21 (23.33%)	90 (50%)
Total	77 (42.78%)	14 (7.78%)	40 (22.22%)	13 (7.22%)	36 (20.00%)	180 100.00

Tableau 16 : Résultats des cultures suivant les deux types de prélèvements.

Ces résultats montrent au total trois microorganismes isolés en plus dans les bons prélèvements par rapport aux mauvais.

Par contre, le fait d'avoir un prélèvement de meilleure qualité augmente la sensibilité d'avoir un dermatophyte dans la culture, puisque **6 cultures de dermatophytes supplémentaires** sont détectées dans les « bons » prélèvements.

Parmi les « bons » prélèvements, 5 échantillons positifs à levures en moins sont retrouvés par rapport aux « mauvais » prélèvements.

Dans les « mauvais » prélèvements, deux cultures positives à moisissures en plus sont retrouvées.

Les séries étant appariées, nous avons utilisé un test bio-statistique d'homogénéité marginale pour étudier ces données.

Ce test est une analyse de mesures répétées dans laquelle il existe plus de deux niveaux de réponse (ici 5).

D'après le test, **les deux séries ne sont pas homogènes au risque $\alpha=0,05$ ($p=0,0277$).**

Ceci montre que **la façon de réaliser le prélèvement influe sur le résultat de la culture** (il n'y a donc pas d'homogénéité marginale entre les bons et les mauvais prélèvements).

En d'autres termes, l'obtention des différents microorganismes diffère de manière significative entre les bons et les mauvais prélèvements.

Si l'on détaille cette fois les genres et espèces retrouvées dans chaque catégorie on obtient :

Pour les levures :

Levures	Prélèvements		Total (n=180)
	Mauvais (n=90)	Bons (n=90)	
<i>Rhodotorula spp</i>	2 (2.22%)	1 (1.11%)	3 (1.67%)
<i>C. albicans</i>	1 (1.11%)	0	1 (0.56%)
<i>C. famata</i>	1 (1.11%)	1 (1.11%)	2 (1.11%)
<i>C. parapsilosis</i>	4 (4.44%)	2 (2.22%)	6 (3.33%)
<i>Cryptococcus spp</i>	1 (1.11%)	0	1 (0.56%)
Total	9 (10.00%)	4 (4.44%)	13 (7.22%)

Tableau 17 : Genres et espèces de levures obtenues dans les bons et mauvais prélèvements.

Pour les moisissures :

Moisissures	Prélèvements		Total sur (n=180)
	Mauvais (n=90)	Bons (n=90)	
<i>A. versicolor</i>	3 (3,33%)	1 (1,11%)	4 (2,23%)
<i>A. candidus</i>	1 (1,11%)	0	1 (0,56%)
<i>A. fumigatus</i>	0	1 (1,11%)	1 (0,56%)
<i>A. sydowi</i>	4 (4,44%)	5 (5,56%)	9 (5%)
<i>Acremonium</i>	1 (1,11%)	2 (2,22%)	3 (1,67%)
<i>Fusarium oxysporum</i>	1 (1,11%)	1(1,11%)	2 ((1,11%)
<i>Fusarium subglutinans</i>	2 (2,22%)	0	1(1,11%)
<i>P. lilacinus</i>	1 (1,11%)	0	1 (0,56%)
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	6 (6,67%)	7 (7,78%)	13 (7,22%)
moisissures non identifiées	3 (3,33%)	2 (2,22%)	5 (2,78%)
TOTAL	21 (23,33%)	19 (21,11%)	40 (22,22%)

Tableau 18 : Genres et espèces de moisissures isolés dans les bons et mauvais prélèvements.

Le tableau global permet d'observer que **2 moisissures** en plus sont isolées dans les « mauvais » prélèvements par rapport aux « bons ». Il faut cependant être prudent car l'analyse détaillée des genres et espèces montrent qu'un *Scopulariopsis brevicaulis* est isolé en plus dans les « bons » échantillons, tout comme un *Acremonium*, un *A. sydowii* et un *A. fumigatus*. Ceci donne **4 moisissures** supplémentaires dans ces catégories.

Par contre, dans les « mauvais » prélèvements, une moisissure non identifiée, un *P. lilacinus*, deux *Fusarium subglutinans*, deux *A. versicolor* et un *A. candidus* ont été isolés en plus par rapport aux « bons » prélèvements, soit **6 moisissures** supplémentaires dans ces catégories. D'où la différence globale de 2 moisissures.

Pour les dermatophytes :

Dermatophytes	Prélèvements		Total n=180
	Mauvais (n=90)	Bons (n=90)	
<i>T. rubrum</i>	10 (11,11%)	16 (17,78%)	26 (14,44%)
<i>T. mentagrophytes</i>	3 (3,33%)	3 (3,33%)	6 (3,33%)
<i>T. terrestre</i>	1 (1,11%)	1 (1,11%)	2 (1,11%)
<i>E. floccosum</i>	1 (1,11%)	1 (1,11%)	2 (1,11%)
TOTAL	15 (16,66%)	21 (23,33%)	36 (20%)

Tableau 19 : Genres et espèces de dermatophytes isolés dans les bons et mauvais prélèvements.

15 et 21 échantillons ont été retrouvés positifs en culture pour un dermatophyte soit 16,6 % et 23,3 % des échantillons étudiés, respectivement pour les « mauvais » et les « bons » prélèvements. *T. rubrum* est présent pour 66,6 % (10/15) ou 76 % (16/21) des dermatophytes et *T. mentagrophytes* représente 20 % (3/15) ou 14 % (3 /21) des cultures des dermatophytes retrouvés.

Dans la population étudiée, nous avons observé un patient positif à *E. floccosum* et un autre positif à *T. terrestre*. Pour ces deux patients la culture a été positive pour chacun des deux prélèvements.

La différence de six prélèvements entre les mauvais et les bons prélèvements est due à la croissance supplémentaire de 6 *T. rubrum* dans les cultures des bons prélèvements.

4. Résultats de la PCR

Voici un aperçu des résultats pour un échantillon positif à dermatophyte obtenu par le kit Bio-Evolution sur l'instrument de PCR *StepOne*TM (Applied Biosystems) :

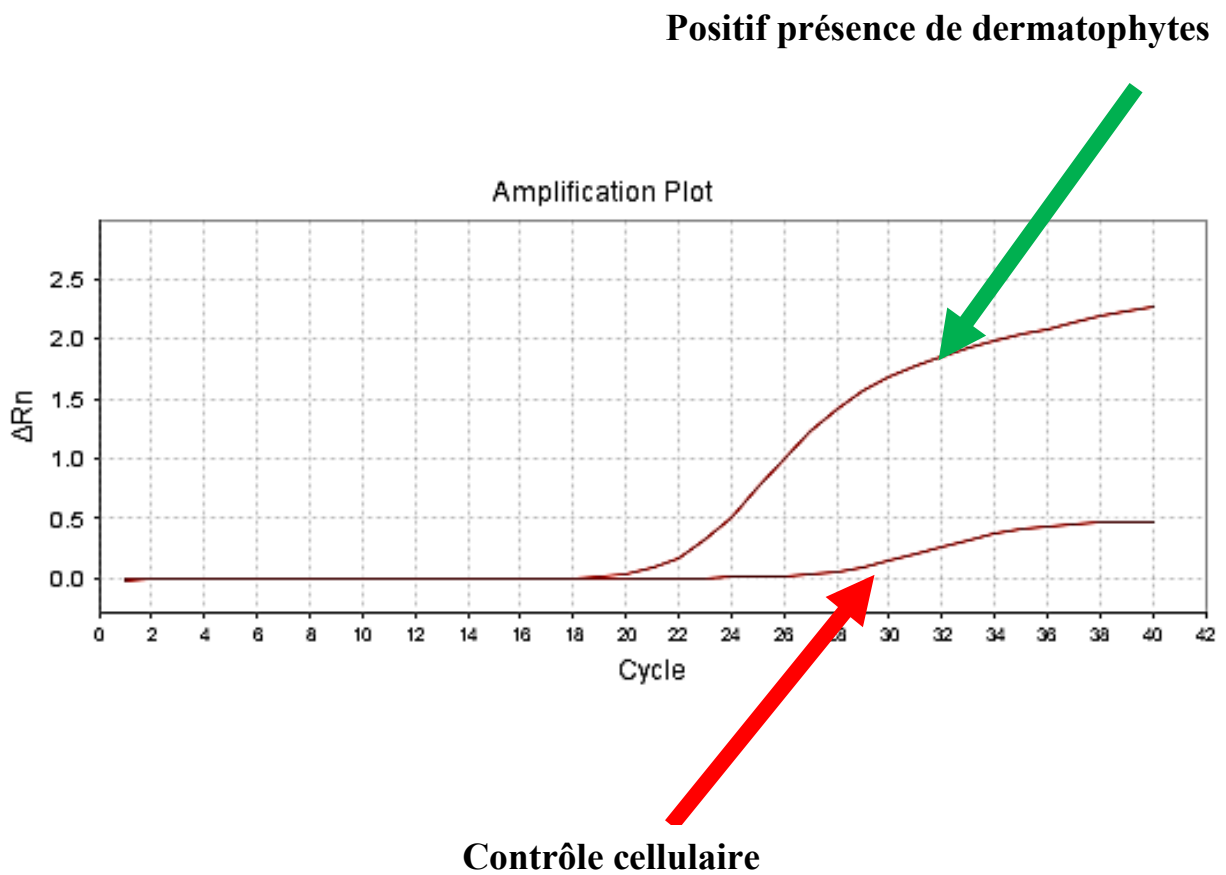


Figure 10 : Exemple d'un résultat obtenu en PCR en présence de dermatophyte.

En comparant les résultats obtenus en utilisant le kit sur les « mauvais » et les « bons » prélèvements, voici ce que l'on obtient :

Prélèvements	Résultats PCR		
	Négatifs	Positifs	Total
Mauvais	59 (65.56%)	31 (34.44%)	90 (50.00%)
Bons	59 (65.56%)	31 (34.44%)	90 (50.00%)
Total	118 (65.56%)	62 (34.44%)	180 (100.00%)

Tableau 20 : Résultats PCR obtenus dans les bons et mauvais prélèvements.

On note que **la PCR est aussi sensible dans les bons et les mauvais prélèvements.**

De plus, l'analyse détaillée de ces données nous a montré que chaque patient retrouvé positif dans les mauvais prélèvements l'est également dans les bons prélèvements.

Les « bons » prélèvements n'ont pas permis d'améliorer la détection des dermatophytes par PCR par rapport aux « mauvais » prélèvements.

Ainsi, dans notre étude, la sensibilité de la PCR est indépendante de la qualité des échantillons testés, contrairement aux techniques de mycologie conventionnelle.

Globalement plus d'un tiers (34,4 %) des patients a été retrouvé porteur d'onychomycoses à dermatophytes.

Pour chaque prélèvement positif, nous avons comparé les Ct c'est-à-dire le premier cycle auquel l'amplification positive est détectée.

Pour les 31 mauvais prélèvements, une moyenne de 21,67 cycles est obtenue avec une médiane à 21,74 et un écart type à 2,85 cycles.

Pour les bons prélèvements, une moyenne de 20,34 cycles est obtenue avec une médiane à 20,1 et un écart type à 2,62 cycles.

Bergman et al. [125] ont comparé dans leur étude deux techniques de PCR sur les mêmes échantillons (l'une duplex avec deux sondes qui ciblaient pour l'une *T. rubrum* et l'autre *T. mentagrophytes*, l'autre PCR avait une sonde pan-dermatophyte). Ils ont observé environ 2 cycles de différence entre les deux techniques. Ces auteurs ont conclu que la PCR duplex est plus sensible que la PCR pan-dermatophyte.

En se rapportant à cette étude et en considérant nos résultats, nous avons également observé 2 cycles de différence entre les résultats positifs obtenus avec les « mauvais » prélèvements et ceux obtenus avec les « bons » échantillons. **La PCR apparaît donc plus sensible sur les « bons » prélèvements que sur les « mauvais »,** même si ceci n'a globalement pas d'impact sur le diagnostic de l'onychomycose.

5. Comparaisons inter techniques

5.1. Cultures *versus* PCR

En comparant le « gold standard » actuel, qui est la culture, *versus* la biologie moléculaire, voici les résultats obtenus pour les « mauvais » prélèvements :

Les 15 prélèvements pour lesquels des dermatophytes ont été isolés en culture ont toujours été positifs en PCR.

Dans 16 cas, la biologie moléculaire a permis de positiver des échantillons négatifs en culture.

Avec le test du kappa, on obtient $k=0.5514$ soit une **concordance moyenne** entre la culture et la biologie moléculaire.

Sur les « bons » prélèvements : les 21 prélèvements pour lesquels des dermatophytes ont été isolés en culture ont toujours été positifs en PCR.

Dans 10 cas, la biologie moléculaire a permis de positiver des échantillons négatifs en culture.

Avec le test du kappa, on obtient $k=0.7336$ soit une **bonne concordance** entre la culture et la biologie moléculaire sur ce type de prélèvements.

5.2. Examens directs *versus* cultures ou PCR

Dans le tableau présenté ci-dessous, les examens directs positifs comprennent ceux présentant des filaments et/ou des spores et/ou des levures. Ils sont comparés avec les résultats de la culture et de la biologie moléculaire.

	Mauvais prélèvements n=90		Bons prélèvements n=90	
	Examens directs		Examens directs	
Cultures dermatophytes	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs
Négatifs	38 (42,22%)	37 (41,11%)	32 (35,56%)	37 (41,11%)
Positifs	0	15 (16,67%)	0	21 (23,33%)
PCR	Négatifs	Positifs	Négatifs	Positifs
Négatifs	38 (42,22%)	21 (23,33%)	32 (35,56%)	27 (30%)
Positifs	0	31 (34,44%)	0	31 (34,44%)

Tableau 21 : Taux de positivité des examens directs, cultures et PCR dans les bons et mauvais prélèvements.

Pour la culture :

- Pour les « mauvais » prélèvements :

Tous les échantillons présentant des cultures positives à dermatophyte étaient positifs à l'examen direct. Le fait d'avoir un examen direct négatif n'a jamais été associé à la mise en évidence d'un dermatophyte en culture.

Le nombre d'examens directs positifs est de 52 (37+15) (soit 57,78 %) pour 90 patients suspects d'onychomycose, tous types d'éléments fongiques confondus. Le nombre d'examens directs positifs associés à une culture positive à dermatophyte est beaucoup plus faible : 15 sur 52 (28,85 %) examens directs positifs totaux.

Avec le test du kappa, en comparant les cultures positives à dermatophyte aux examens directs positifs, on obtient $k=0.2550$ soit **une concordance médiocre** entre les deux techniques.

- Pour les « bons » prélèvements :

Les 21 échantillons positifs à dermatophyte en culture étaient positifs en examen direct.

Dans les bons prélèvements, le fait d'avoir un examen direct négatif n'a jamais été associé à la mise en évidence d'un dermatophyte en culture.

Le nombre d'examens directs positifs est de 58 (37+21) (soit 64,4 %) chez 90 patients suspects d'onychomycoses, tous types d'éléments fongiques confondus.

Le nombre de cultures positives à dermatophyte associées à un examen direct positif est de 21 sur 58 (36,21 %) examens directs positifs totaux.

Avec le test du kappa, en comparant les cultures positives à dermatophyte aux examens directs positifs, on obtient $k=0.2875$. **Cette concordance entre l'examen direct et la culture est améliorée par le prélèvement de meilleure qualité mais elle reste toujours médiocre.**

Pour la PCR :

- Pour les « mauvais » prélèvements :

31 échantillons sur 52 (59,6 %) présentant des examens directs positifs, sont également positifs en biologie moléculaire.

Dans les mauvais prélèvements, le fait d'avoir un examen direct négatif n'a jamais été associé à la mise en évidence d'un dermatophyte en PCR.

Avec le test du kappa, on obtient un index $k=0.5549$ soit **une concordance moyenne entre la PCR et l'examen direct.**

- Pour les « bons » prélèvements :

31 échantillons sur 58 (53,45 %) présentant un examen direct positif sont également positifs en biologie moléculaire.

Comme dans les mauvais prélèvements, le fait d'avoir un examen direct négatif n'a jamais été associé à la mise en évidence d'un dermatophyte en PCR.

Avec le test du kappa, un index $k=0.4495$ est obtenu soit **une concordance moyenne également entre l'examen direct et la biologie moléculaire** pour ce qui concerne les bons prélèvements.

5.3. Examens directs à filaments *versus* cultures ou PCR

Dans cette analyse, seuls les examens directs positifs à filaments ont été considérés.

	Mauvais prélèvements		Bons prélèvements	
	Examen direct à filaments		Examen direct à filaments	
Culture dermatophyte	Négatif	Positif	Négatif	Positif
Négatif	46 (51,11%)	29 (32,2%)	41 (45,6%)	28 (31,1%)
Positif	0	15 (16,67%)	0	21 (23,3%)
PCR	Négatif	Positif	Négatif	Positif
Négatif	44 (48,89%)	15 (16,67%)	40 (44,44%)	19 (21,11%)
Positif	2 (2,22%)	29 (32,22%)	1 (1,11%)	30 (33,33%)

Tableau 22 : Taux de positivité des cultures, PCR et des ED à filaments dans les bons et mauvais prélèvements.

Pour la culture :

- En considérant les mauvais prélèvements, moins d'examens directs positifs ont été obtenus en ne ciblant que les filaments: 44 (29+15) au lieu de 52 (diminution de 8 échantillons soit 8 % des échantillons). Parmi les 44 examens directs positifs à filaments, le nombre de cultures positives à dermatophytes est de 15 soit 34 % des examens directs positifs.

Avec le test du kappa, en comparant les cultures positives à dermatophytes aux examens directs positifs à filaments, un index $k=0.3459$ est obtenu soit une **concordance encore médiocre** entre ces deux techniques.

- En ce qui concerne les bons prélèvements, 9 examens directs positifs en moins ont été obtenus si on ne considère que les filaments : 49 (28+21) au lieu de 58 (soit 10 % des échantillons).

Parmi les 49 examens directs positifs à filaments, le nombre de cultures positives à dermatophytes est plus élevé : 21 sur 49 (42,8 %).

Avec le test du kappa, en comparant les cultures positives à dermatophytes aux examens directs positifs à filaments, on obtient $k=0.406$ soit une **concordance médiocre** à nouveau entre ces deux techniques.

Pour la PCR :

- Dans les mauvais prélèvements, les 44 cas examens directs positifs à filaments, 29 sont positifs en PCR soit 65,9 %.

Néanmoins 2 de ces prélèvements positifs en PCR (2,2 %) sont négatifs à filaments à l'examen direct.

Le fait de cibler uniquement les prélèvements positifs à filaments permet de détecter 93,5% des échantillons positifs à dermatophytes.

Avec le test du kappa entre la PCR et l'examen direct, un index $k=0.6196$ est obtenu soit une **bonne concordance**.

- Pour les bons prélèvements, parmi les 49 échantillons positifs à l'examen direct pour la recherche de filaments, 30 sont positifs en PCR soit 61,2 %.

Là encore, un prélèvement s'est révélé être négatif à filaments (1,1 % des échantillons). **Cependant, le fait de cibler seulement les prélèvements positifs à filaments permet de détecter 96,7 % des échantillons positifs à dermatophytes.**

Le fait de ne considérer que les examens directs à filaments permet de diminuer fortement (de 10 %) la sélection des échantillons à tester en PCR, sans modifier le taux de positivité de la PCR. Seul un patient n'est pas diagnostiqué en utilisant cette stratégie. En d'autres termes, il pourrait être intéressant d'utiliser la PCR uniquement sur les échantillons positifs à filaments à l'examen direct.

Avec le test du kappa entre la PCR et les examens directs, on obtient $k=0.5675$ soit une **concordance médiocre**. Ce résultat du kappa plus faible que le précédent peut s'expliquer par le nombre plus élevé d'examens directs à filaments dans les bons prélèvements en comparaison avec les mauvais prélèvements.

Comme le soulignent Savin et al [90] ainsi que Gräser et al [128], en l'absence de technique de référence pour le diagnostic de l'onychomycose, il est difficile d'estimer la sensibilité et la spécificité du kit bioEvolution sur les échantillons. Les études évaluant la PCR ont été évaluées en comparant les résultats moléculaires avec ceux de la culture et de l'examen direct. Cependant, du fait de faux négatifs obtenus aussi en culture et dans l'examen direct, le statut de l'infection réelle n'est pas connu.

Utiliser l'examen mycologique comme « norme de référence » comporte ainsi un biais : l'évaluation classique des valeurs des tests dans une table classique est donc difficile.

5.4. Sensibilité et spécificité ED/culture/PCR

Le Latent Class Analysis (LCA) a été utilisé pour estimer la prévalence, la sensibilité et la spécificité des tests diagnostiques [129]. Un programme d'évaluation de la précision du test a été utilisé pour effectuer l'analyse, il est disponible sur le site :

<http://www.epi.ucdavis.edu/diagnostictests/QUERY.HTM> [130].

Le modèle de LCA retenu nécessite au moins trois tests (examen direct, culture, et PCR), quand il n'y a qu'une seule population (les 90 échantillons cliniques) et qu'une classe latente (la prévalence des dermatophytes).

Nous avons utilisé le modèle du LCA qui permet de calculer ces valeurs lorsque le gold standard est remis en cause [131].

Dans un premier temps, nous avons inclus dans les examens directs positifs la présence de spores et /ou levures et/ou filaments. Dans un deuxième temps, nous n'avons inclus que les examens directs positifs à filaments. Nous avons comparé à chaque fois les « bons » et les « mauvais » prélèvements. Ces résultats sont détaillés ci-dessous.

5.4.1. Mauvais prélèvements

Les résultats obtenus sur les mauvais prélèvements sont répertoriés dans ce tableau :

Mauvais prélèvements				
Cultures positives à dermatophytes	PCR	Examens directs	Fréquence	Pourcentage
-	-	-	38	42.22
-	-	+	21	23.33
-	+	+	16	17.78
+	+	+	15	16.67

Tableau 23 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des examens directs (tout élément fongique confondu) et de la PCR.

A partir de ces données, les résultats obtenus par le logiciel de calcul bio-statistique montrent une prévalence des dermatophytes de 34,4 % pour les mauvais prélèvements.

Mauvais prélèvements		
Examens directs positifs à spores et/ou levures et/ou filaments		
Tests	Sensibilité	spécificité
ED	100%	64,4%
culture	48,4%	100%
PCR	100%	100%

Tableau 24 : Sensibilité et spécificité des « mauvais » prélèvements calculé à partir du LCA, pour l'examen direct (tout élément fongique confondu), la culture, et la PCR.

En considérant les résultats du tableau 24, pour les « mauvais » prélèvements, la PCR présente la meilleure sensibilité et spécificité avec le test du LCA. La culture présente la sensibilité la plus faible, mais une spécificité aussi bonne que la PCR. L'examen direct a une sensibilité aussi bonne que la PCR dans notre étude, par le test du LCA, et une spécificité plus faible que la culture et la PCR.

Dans le tableau ci-dessous, les fréquences et pourcentages correspondant aux différentes combinaisons des tests en apportant le détail des types de cultures obtenues.

Mauvais prélèvements				
ED	PCR	Type de culture	Fréquence	Pourcentage
0	0	0	27	30.00
0	0	Moisissures	6	6.67
0	0	Levures	3	3.33
1	0	0	7	7,78
1	0	Bactéries	3	3.33
1	0	Moisissures	10	11,1
1	0	Levures	3	3.33
1	1	0	6	6,67
1	1	Bactéries	2	2,22
1	1	Moisissures	5	5.56
1	1	Levures	3	3.33
1	1	Dermatophytes	15	16.67

Tableau 25 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture, de l'examen direct (tout élément fongique confondu) et de la PCR (1 : positif, 0 : négatif).

Il apparait que 13 échantillons présentent un examen direct positif, une culture négative ou contaminée par une bactérie ou une levure, et une PCR négative.

Parmi ces 13 échantillons :

- Pour 5 prélèvements, les résultats du séquençage ont abouti à un cas de *Scopulariopsis brevicaulis*, trois cas d'*Aspergillus sydowii*, et un cas de *Cladosporium* spp.
- Parmi les 8 autres échantillons, 5 étaient positifs à l'examen direct pour la recherche de levures ou de spores, et n'ont pas été séquencés ; et pour les 3 restant, la séquence n'était pas interprétable ;

Si l'on s'intéresse aux 10 prélèvements avec des examens directs positifs, une PCR négative et avec une culture positive à moisissures :

- 3 échantillons comprenaient un *Scopulariopsis brevicaulis*, un correspondait à un *Fusarium oxysporum* et le dernier à un *Fusarium subglutinans*.
- 3 autres ont permis de mettre en évidence un *Aspergillus sydowii*, un échantillon correspondait à *A. versicolor* et un dernier à *A. candidus*.

Par ailleurs, le kit a permis d'identifier 16 prélèvements qui auraient été considérés négatifs pour la recherche de dermatophytes, si l'on avait seulement considéré l'examen mycologique conventionnel :

- 6 prélèvements présentaient des résultats mycologiques négatifs ;
- 3 étaient contaminés par des levures ;
- 2 étaient contaminés par des bactéries ;
- 5 prélèvements étaient souillés ou contaminés par des moisissures.

L'ensemble de ces résultats illustrent la bonne spécificité et sensibilité du kit, sur les « mauvais » prélèvements.

5.4.2. Bons prélèvements

Les résultats obtenus sur les bons prélèvements sont répertoriés dans ce tableau :

Bons prélèvements				
Culture positive à dermatophytes	PCR	Examens directs	Fréquence	Pourcentage
-	-	-	32	35.56
-	-	+	27	30.00
-	+	+	10	11.11
+	+	+	21	23.33

Tableau 26 : Répartition des « bons » prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des examens directs (tout élément fongique confondu) et de la PCR.

Pour les « bons » prélèvements, en utilisant le logiciel de biosatistique on obtient également à partir des données du tableau 26 une prévalence des dermatophytes de 34,4 %.

Bons prélèvements		
Examens directs positifs à spores et/ou levures et/ou filaments		
Tests	Sensibilité	spécificité
ED	100%	54,2%
culture	67,7%	100%
PCR	100%	100%

Tableau 27 : Sensibilité et spécificité des « bons » prélèvements calculé à partir du LCA, pour les examens directs, la culture, et la PCR.

En considérant les résultats du tableau 27, et comme pour les « mauvais » prélèvements, pour les « bons » prélèvements, la PCR présente aussi ici la meilleure sensibilité et spécificité avec le test du LCA. La culture présente la sensibilité la plus faible, mais une spécificité aussi bonne que la PCR. L'examen direct a une sensibilité aussi bonne que la PCR dans notre étude, par le test du LCA, et une spécificité plus faible que la culture et la PCR.

En détaillant les résultats des examens directs, de la PCR et le type de culture on obtient :

Bons prélèvements				
ED	PCR	Type culture	Fréquence	Pourcentage
0	0	0	24	26.67
0	0	bactéries	1	1.11
0	0	moisissures	3	3.33
0	0	levures	2	2.22
1	0	0	11	12,22
1	0	bactéries	4	4.44
1	0	moisissures	12	13.33
1	0	levures	2	2.22
1	1	0	2	2.22
1	1	bactéries	4	4.44
1	1	moisissures	4	4.44
1	1	dermatophytes	21	23.33

Tableau 28 : Répartition des « bons » prélèvements en fonction de la culture, des examens directs et de la PCR (1 : positif ; 0 : négatif).

Les 17 échantillons qui avaient un examen direct positif, une culture négative ou contaminée par une bactérie ou une levure, et une PCR négative, ont été analysés :

- 7 d'entre eux étaient positifs à l'examen direct pour la recherche de levures ou de spores, et n'ont pas été séquencés ;
- Pour 4 d'entre eux la séquence n'était pas interprétable ;
- Pour les 6 autres prélèvements les résultats du séquençage ont retrouvé une fois un *Fusarium subglutinans*, quatre fois de *Aspergillus sydowii*, et une fois du *Cladosporium* spp.

Si l'on s'intéresse aux 12 prélèvements avec des examens directs positifs, une PCR négative et avec une culture positive à moisissures :

- 5 échantillons sont retrouvés positifs à *Scopulariopsis brevicaulis*, et un à *Fusarium oxysporum* ;
- 4 autres l'étaient à *A. sydowi*, un à *A. versicolor* et un dernier à *A. fumigatus*.

Le kit a permis d'identifier 10 prélèvements qui auraient été considérés négatifs si l'on avait seulement utilisé la culture :

- 2 prélèvements étaient négatifs en mycologie ;
- 4 étaient contaminés par des bactéries ;
- 4 prélèvements étaient souillés ou contaminés par des moisissures.

Là aussi, ces résultats illustrent la bonne sensibilité et spécificité du kit évalué.

5.5. Sensibilité et spécificité de l'examen direct à filaments/cultures/PCR

5.5.1. Mauvais prélèvements

Le tableau présenté ci-dessous résume les résultats analysés par la suite :

Culture à dermatophytes	PCR	ED + à filaments	Fréquence	Pourcentage
0	0	0	44	48.89
0	0	1	15	16.67
0	1	0	2	2.22
0	1	1	14	15.56
1	1	1	15	16.67

Tableau 29 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des examens directs positifs à filaments et de la PCR.

La prévalence des dermatophytes est ici de 31,46 % (calcul effectué par le logiciel bio-statistique).

Mauvais prélèvements		
Examens directs positifs à filaments		
Test	Sensibilité	Spécificité
ED	100%	74,6%
culture	53%	100%
PCR	100%	95,6%

Tableau 30 : Sensibilité et spécificité des « mauvais » prélèvements calculé à partir du LCA, pour l'examen direct positif à filaments, la culture, et la PCR.

En considérant les résultats du tableau 30, pour les « mauvais » prélèvements, la PCR et l'examen direct ciblant la recherche de filaments, présentent ici la meilleure sensibilité avec le test du LCA. La culture présente la meilleure spécificité. La PCR a une spécificité supérieure à celle de l'examen direct mais inférieure à la culture. La culture présente ici la moins bonne sensibilité.

En détaillant la technique utilisée pour l'examen direct, c'est-à-dire en considérant soit l'utilisation du noir chlorazole ou de la fluorescence, et en détaillant également le type de cultures, voici ce qui est obtenu :

ED noir	ED fluorescence	PCR	culture	Fréquence	Pourcentage
0	0	0	0	31	34,44
0	0	0	moisissures	8	8,89
0	0	0	levures	4	4,44
0	0	0	bactéries	1	1,11
0	0	1	bactéries	1	1,11
0	0	1	levures	1	1,11
0	1	0	moisissures	2	2,22
0	1	1	dermatophytes	2	2,22
0	1	0	0	1	1,11
0	1	0	levures	1	1,11
0	1	1	0	1	1,11
1	0	1	0	1	1,11
1	0	0	moisissures	1	1,11
1	0	1	bactéries	1	1,11
1	1	0	0	2	2,22
1	1	0	bactéries	2	2,22
1	1	0	moisissures	2	2,22
1	1	1	0	4	4,44
1	1	1	moisissures	4	4,44
1	1	1	levures	2	2,22
1	1	1	dermatophytes	13	14,44
1	1	0	levures	1	1,11
1	1	0	moisissures	3	3,33
1	1	1	moisissures	1	1,11

Tableau 31 : Répartition des « mauvais » prélèvements en fonction de la culture, de la PCR et de la technique utilisée pour l'examen direct : noir chlorazole ou fluorescence.

En différenciant les techniques d'examens directs, on observe que les 7 cas où l'examen direct est positif à filaments en fluorescence et négatif au noir chlorazole sont associés :

- pour 3 cas à une PCR positive (pour deux cas, la culture est aussi positive à dermatophyte),
- pour 2 cas à une PCR négative avec des moisissures en cultures
- pour 2 autres cas également à une PCR négative, mais aussi à une culture soit négative ou positive à levures.

Dans les 3 cas positifs au noir chlorazole mais négatif en fluorescence, 1 cas est positif uniquement en PCR. Les deux autres sont négatifs en PCR et soit souillés en culture par une bactérie ou négatif.

5.5.2. Bons prélèvements

Le tableau présenté ci-dessous résume les résultats qui sont ensuite analysés :

Culture à dermatophyte	PCR	ED+ à filaments	Fréquence	Pourcentage
0	0	0	40	44.44
0	0	1	19	21.11
0	1	0	1	1.11
0	1	1	9	10.00
1	1	1	21	23.33

Tableau 32 : Répartition des bons prélèvements en fonction de la culture ciblée sur la recherche de dermatophytes, des ED positifs à filaments et de la PCR.

La prévalence des dermatophytes est ici de 32,8 % (calcul effectué par le logiciel bio-statistique).

Bons prélèvements		
Examens directs positifs à filaments		
Test	Sensibilité	Spécificité
ED	100%	67,8%
culture	71,1%	100%
PCR	100%	97,8%

Tableau 33 : Sensibilité et spécificité des bons prélèvements calculé à partir du LCA, pour l'examen direct ciblé sur la recherche de filaments, la culture, et la PCR.

En considérant les résultats du tableau 33, comme pour les « mauvais » prélèvements, pour les « bons » prélèvements, la PCR et l'examen direct ciblant la recherche de filaments, présentent ici aussi la meilleure sensibilité avec le test du LCA. La culture présente la meilleure spécificité. La PCR a une spécificité supérieure à celle de l'examen direct mais inférieure à la culture. La culture présente ici la moins bonne sensibilité même si elle est supérieure à celle obtenue dans le cas des « mauvais » prélèvements (tableau 31).

En détaillant ici aussi la technique utilisée pour l'examen direct, c'est-à-dire en considérant soit l'utilisation du noir chlorazole ou de la fluorescence, et en détaillant également le type de cultures, voici ce qui est obtenu :

ED noir	ED fluorescence	PCR	Type de culture	Fréquence	Pourcentage
0	0	0	0	32	37,78
0	0	0	bactérie	2	2,22
0	0	0	moisissures	3	3.33
0	0	0	moisissures	3	3,33
0	0	1	bactérie	1	1.11
0	1	0	moisissures	3	3.33
0	1	0	levures	1	1.11
0	1	1	0	1	1.11
0	1	1	dermatophytes	1	1.11
1	1	0	bactéries	1	1.11
1	1	0	0	3	3,33
1	1	0	bactéries	2	2.22
1	1	0	moisissures	3	3.33
1	1	1	0	1	1.11
1	1	1	bactéries	9	9,99
1	1	1	moisissures	4	4.44
1	1	1	dermatophytes	20	22,22

Tableau 34: Répartition des bons prélèvements en fonction de la culture, de la PCR et de la technique utilisée pour l'examen direct : noir chlorazole ou fluorescence.

En différenciant les techniques utilisées pour l'examen direct :

- dans 6 cas où l'examen direct est positif à filaments en fluorescence et négatif au noir chlorazole, on retrouve 2 échantillons positifs à dermatophyte en PCR dont un l'est également en culture.
- 4 autres échantillons sont négatifs en PCR mais parmi eux 3 retrouvent des moisissures en culture et un une levure.

D'après le calcul de la sensibilité et de la spécificité du LCA :

En considérant les examens directs positifs quel que soit l'élément fongique retrouvé, la sensibilité et la spécificité de la PCR dans ces conditions est très bonne.

Si la PCR n'avait été réalisée que dans les cas où les examens directs sont positifs, alors tous les dermatophytes de l'étude auraient été détectés.

Cette option permettrait de ne faire cette PCR que dans 2 /3 des échantillons (60/90) et donc de diminuer le coût.

Par contre, en ne ciblant que les examens directs positifs à filaments pour réaliser ensuite les PCR, le nombre d'échantillons à tester en biologie moléculaire diminue encore de presque 20% (11/60).

Dans notre étude, ceci aurait permis de n'effectuer la PCR que dans 54,4 % (49/90) des cas. La perte de spécificité et le risque de ne pas détecter un dermatophyte par cette stratégie est à relativiser lorsqu'on compare ces taux à ceux des échantillons présentant un examen direct positif associé à une culture négative soit 15 à 50 % des cas d'après la littérature [132].

V. Discussion

Cette nouvelle méthode de PCR en temps réel, spécifique des dermatophytes, permet un diagnostic sensible, rapide et spécifique des onychomycoses à dermatophytes. En effet cette technique donne de meilleurs résultats que la culture : seulement 15,67 % des mauvais échantillons et 23,3 % de bons échantillons sont positifs en culture alors que la PCR en détecte 34,4 % dans les deux types de prélèvements. La PCR permet donc de s'affranchir de la qualité du prélèvement qui est actuellement l'un des éléments clefs d'un bon diagnostic mycologique. Elle est spécifique et utilisable même si d'autres champignons non dermatophytes sont présents dans le prélèvement : sur 50 cultures pour les mauvais prélèvements et 53 obtenus pour les bons échantillons, seules respectivement 15 et 21 cultures se révèlent être des dermatophytes, alors que la PCR spécifique des dermatophytes permet d'en découvrir 31 dans les deux cas. Par ailleurs, le délai des résultats est réduit par rapport à la culture qui nécessite 3 à 4 semaines : les résultats de la PCR peuvent être rendus en 3h en comptant l'extraction, soit en 24 à 48 heures en l'intégrant dans des séries.

L'examen direct microscopique de l'échantillon oriente le diagnostic en cas de suspicion d'onychomycose s'il est positif, que la culture soit positive ou non. Cependant sa sensibilité dépend de la technique utilisée et de l'expérience du personnel qui l'effectue. Malheureusement, cet examen n'est pas toujours pratiqué, notamment lors d'une quantité insuffisante de matériel. Cet examen possède une faible spécificité avec d'assez nombreux faux positifs. Kardjeva et al. [97], Fletcher et al. [132] et Gupta et al. [86] estiment que 15 à 50 % des échantillons positifs en microscopie restent négatifs en culture. Quant à Liu et al. [84], ils considèrent qu'il existe 30 % de faux positifs par microscopie. Panasiti et al. [77] estiment ce chiffre entre 5 et 15 % avec le KOH. Dans notre étude, nous avons comparé les résultats microscopiques sur les prélèvements de bonne et de mauvaise qualité. Les prélèvements de bonne qualité ont permis d'observer un nombre plus important d'examen directs positifs par rapport aux prélèvements de moins bonne qualité. Que ce soit en utilisant le noir chlorazol ou la fluorescence, le nombre d'examen directs positifs est resté identique pour un même type de prélèvement ; par contre nous avons constaté que l'utilisation de la fluorescence permettait d'augmenter significativement la détection de filaments par rapport au noir chlorazole.

Panasiti et al. [77] ont comparé l'observation directe des échantillons avec différentes techniques (KOH, noir chlorazole et acridine orange). Ils ont conclu que ces deux dernières techniques étaient meilleures que le KOH pour observer les éléments fongiques.

Abdelrahman et al., quant à eux, ont comparé le KOH à 30 % et le calcofluor dans des prélèvements d'ongles et de peau. Ils ont également conclu à l'augmentation de la sensibilité (de 22 %) et de la spécificité (de 6 %) de la fluorescence, qui permettait par ailleurs d'observer une quantité plus importante d'éléments fongiques avec une plus grande facilité et rapidité par rapport à la méthode classique au KOH [77]. D'autres auteurs comme Hamer et al. [133] et Haldane et al. [134] ont également trouvé des résultats similaires, montrant la supériorité de la fluorescence sur le KOH. Lawry et al. [135]. ont comparé plusieurs tests de diagnostic disponibles pour l'onychomycose, comme l'examen histopathologique de routine utilisant le PAS, la centrifugation après dissolution de l'ongle dans du KOH suivie d'une coloration au PAS décrite par Liu et al. [84], ou utilisant un colorant fluorescent, ou du noir chlorazole. Dans cette étude, aucune différence n'est mise en évidence entre le noir chlorazole et la fluorescence, et l'examen histopathologique utilisant le PAS est décrit comme le plus sensible. Cependant, le recueil des échantillons de cette étude a été critiqué par certains auteurs comme Arca et al. [121]. et Elewski [136].

Ainsi, les taux de positivité de l'examen direct varient dans la littérature selon les techniques utilisées. Le PAS apparaît comme celui qui possède la meilleure sensibilité, mais cette méthode étant longue, complexe et fastidieuse, elle est difficile à mettre en place en routine. Beaucoup de mycologues lui préfèrent l'utilisation du KOH qui a pourtant montré ses limites car environ 15 % à 30 % des échantillons présentent des faux négatifs selon les auteurs [137] [84]. À l'heure actuelle, l'examen microscopique direct en utilisant des techniques de fluorescence est décrit comme le plus sensible pour la détection de spores et d'hyphes dans les échantillons dermatologiques [138]. Pour Alexander et al. [126] et Litz et al. [120], la détection microscopique par fluorescence ou par le PAS permet de maximiser le potentiel de détection des organismes fongiques et de compléter ceux qui ne seraient pas détectés par la culture ou les PCR.

En terme de spécificité diagnostique, la culture reste la référence à laquelle sont comparées les autres techniques. Dans notre étude, les différents modèles du LCA lui donnent une spécificité de 100 % à chaque fois. Cependant, du fait de la faible vitesse de croissance et de sporulation des dermatophytes, elle demande beaucoup de temps ([92], [127], [119], [73], [124]). Ainsi, les délais des cultures peuvent aller jusqu'à 6 semaines en fonction des tests physiologiques supplémentaires. Par contre, la culture manque de sensibilité et il est possible d'isoler parfois des faux positifs, représentés par des champignons contaminant l'ongle et qui ne jouent pas un rôle pathogène dans la situation concernée. Les faux négatifs représentent également au moins 20 % des cas [121]. Dans certains essais, les cultures restent stériles dans environ 15 à 50 % des cas, même si les examens directs microscopiques sont positifs [101] [97] [96] [138]. Les cultures négatives peuvent être la conséquence d'un traitement antifongique déjà mis en place ou peuvent être dues au fait que les champignons contenus dans la partie distale de l'ongle sont parfois déjà morts. Le pourcentage de dermatophytes obtenus en culture varie, comme nous l'avons montré, selon la qualité du prélèvement. Nous avons obtenu un taux de 16,6 % pour les mauvais prélèvements et de 23,3 % pour les bons. Dans la littérature, peu d'études évaluent l'impact du prélèvement sur la qualité des cultures. Parmi celles-ci, les études de Menotti et al. et Savin et al. ont évalué ce paramètre. De même, English et al. [139] ont montré qu'un prélèvement effectué dans la zone proximale de l'ongle réduit le taux d'échec de la culture de 14 % par rapport à un prélèvement réalisé dans la région la plus distale de l'ongle. Cependant, dans leurs études, le « bon » prélèvement est choisi comme référence et analysé parallèlement en mycologie classique (examen direct et culture), alors que le « mauvais » prélèvement est uniquement traité en PCR.

D'après la littérature, les taux de positivité des cultures ne correspondent pas toujours à ceux des examens directs (Cf tableau 5). Dans notre étude, les examens directs positifs ont représenté 57,7 % et 64,4 % des échantillons observés suivant le type de prélèvements soit une moyenne de 60 %. Ce phénomène est très dépendant des techniques utilisées pour réaliser l'examen direct (noir chlorazole, fluorescence,...) mais aussi du recrutement de patients sélectionnés pour les études. Ainsi, dans notre travail, beaucoup de patients inclus étaient en séjour gériatrique, ceci expliquant d'ailleurs la moyenne d'âge élevée (70,2 ans) de la population étudiée ; or ces patients présentent en particulier le facteur de risque « âge » pour le développement de mycoses, dues aux dermatophytes ou aux moisissures. Ceci pourrait expliquer le taux important de positifs à l'examen direct (60 % en moyenne), relativement au pourcentage plus faible de cultures positives à dermatophytes (20 % en moyenne).

A l'inverse, si on considère dans les examens directs positifs ceux correspondant à des moisissures en culture, soit 10 cas dans les mauvais prélèvements et 12 cas dans les bons, le taux d'examens directs positifs associés à des cultures négatives pour la recherche de dermatophytes s'élève à 52 % (27/52) et 43 % (25/58) respectivement. Ces résultats sont conformes avec ceux de la littérature, ramenant des taux de faux négatifs pouvant aller jusque 50 % [97] [138] [138].

L'extraction de l'ADN fongique à partir des échantillons cliniques est une étape clef du diagnostic moléculaire. La préparation des extraits est souvent l'étape la plus laborieuse et la plus longue de toute la procédure [140]. Le choix du protocole parmi le panel existant est crucial car cette étape peut en effet limiter la sensibilité de la PCR. Kardjeva et ses collaborateurs ont présenté une méthode de diagnostic de 48 h pour les onychomycoses impliquant un prétraitement de l'ongle en 14 étapes par l'utilisation de colonnes d'extraction de l'ADN avec des étapes d'incubation et de centrifugation successives [97]. Une telle méthodologie, demandant beaucoup de manipulations, est associée à un risque accru de contamination, et difficile à mettre en œuvre en routine dans un laboratoire susceptible de recevoir un grand nombre de spécimens d'ongles. Au contraire, Brillowska et al. [119] proposent une procédure de 15 minutes pour l'extraction de l'ADN directement à partir des échantillons d'ongles (incubation de l'ongles à 95 °C dans un tampon de lyse pendant 15min). Des kits PCR commerciaux comme celui de BioEvolution ou d'autres, comme celui décrit par Beifuss [127], recommandent l'utilisation d'un kit d'extraction comme outil facile, rapide et bien normalisé pour procéder à l'extraction de l'ADN génomique, ceci remplaçant avantageusement les extractions à l'alcool et au phénol-chloroforme. Cependant, il faut également faire attention aux différents kits d'extraction, Pankewitz et al [141] montrent une diminution de sensibilité d'un tiers de leur PCR-ELISA sur une population de 300 échantillons en utilisant deux kits d'extraction d'ADN différents (Passage de QIAamp DNA Minikit à Spin Mini Illustra GenomicPrep). Dans notre travail, ainsi que dans la majorité des articles publiés sur l'utilisation des techniques moléculaires, des méthodes d'extraction manuelle sont utilisées. Ces méthodes restent difficiles à utiliser lors du traitement d'un grand nombre d'échantillons en routine. Certains auteurs comme Alexander et al. [126] démontrent que l'utilisation d'un système automatisé d'extraction en une seule étape est possible. Outre le gain de temps, ce système permet de limiter les contaminations.

Deux appareils sont évalués dans cet article : le Biorobot EZ1 (Qiagen) et le QIASymphony (Qiagen) avec lesquels on peut traiter jusqu'à 96 échantillons. Ceci en fait un système très efficace permettant de faciliter le traitement de plus de 12 000 échantillons par an. Bergman et al[125] ont également employé un système automatisé d'extraction avec le MagNAPure (Roche Diagnostics).

Peu d'études ont comparé l'impact du prélèvement sur les résultats. Dans leurs travaux sur respectivement 88 et 75 patients, Menotti et Savin ont effectué deux types de prélèvements, l'un considéré comme « mauvais » et l'autre comme « bon » [142][90]. Les bons prélèvements ont été analysés en microscopie et en culture. Seuls les mauvais ont été traités en PCR, dans les deux études. Dans l'étude de Menotti, sur les 88 prélèvements effectués en double, 69 étaient positifs en culture pour la recherche de dermatophytes et 67 l'étaient en PCR. La différence de 2 échantillons est expliquée par l'absence de détection en PCR de 5 dermatophytes isolés en culture et par la détection de 3 échantillons positifs en PCR alors que les cultures étaient négatives. Dans l'étude de Savin, les 53 échantillons positifs en culture dans les prélèvements de référence, ont été retrouvés positifs en PCR. Le kit Onychodiag a permis d'une part de s'affranchir de la qualité du prélèvement et d'autre part d'améliorer la sensibilité par rapport au diagnostic standard.

Dans nos travaux, la PCR a été réalisée sur les deux types de prélèvements. Ainsi, les 31 dermatophytes identifiés dans les bons prélèvements l'étaient également dans les mauvais. Par contre, la culture, elle, a été impactée significativement par la qualité du prélèvement, alors que, comme Savin et al., nous avons constaté qu'aucun échantillon négatif en microscopie à l'examen direct ne s'est révélé positif en PCR avec le kit BioEvolution. Nos résultats sont donc assez proches de ces deux études. Ainsi, la PCR peut fournir un diagnostic fiable, même lorsque la qualité de l'échantillonnage n'est pas établie, par exemple quand il n'a pas été effectué par un dermatologue ou un mycologue formé. Un avantage de la PCR est également la faible quantité d'ADN nécessaire autorisant donc le traitement d'échantillons en quantité non optimale pour le diagnostic mycologique classique.

En comparant nos résultats à ceux d'autres équipes (Cf tableau 5), les taux de résultats positifs obtenus par PCR par rapport à ceux obtenus en culture sont proches. Nous obtenons 34,44 % d'échantillons positifs en PCR et 16,6 % ou 23,3 % en culture selon le mode de prélèvement. En l'absence d'un étalon de référence, le test statistique du LCA a été choisi pour évaluer l'exactitude de ces résultats. Le LCA calcule les résultats des tests sur un modèle informatique, en prenant en compte la PCR, la culture, et la microscopie, et calcule la prévalence des dermatophytes sur une population. Le LCA a montré une spécificité et une sensibilité élevée pour la méthode PCR, ceci se rapportant au fait qu'il n'y a pas d'échantillons positifs avec les deux autres méthodes et négatifs en PCR. A part Bergman, peu d'auteurs utilisent la technique du LCA [125]. Il est donc difficile de comparer la sensibilité et la spécificité de la PCR dans chaque étude car les auteurs calculent souvent celle-ci en fonction des examens directs ou de la culture. Cependant, certaines études font référence à des faux négatifs en PCR [99], ceci peut être fortement lié à un problème d'extraction de l'ADN tel que la présence d'un inhibiteur[119], ou d'une quantité variable de l'échantillon. Ainsi, pour pallier au problème des inhibiteurs de PCR, l'utilisation d'un témoin interne d'amplification est aujourd'hui fréquente[126], et permet de mettre en évidence, dans certaines études, des taux d'échantillons faussement négatifs avoisinant les 5 % [119]. Le kit commercialisé par BioEvolution comprend également un témoin interne. Lors de l'extinction de ce signal, il est alors nécessaire de diluer l'échantillon d'ADN ou de ré-extraire le prélèvement initial avant ré-amplification. Les différences obtenues dans la littérature pour certaines études entre le taux de positifs de la PCR et de la culture s'expliquent d'une part par la plus grande sensibilité de l'outil moléculaire mais également aussi par le fait qu'un même prélèvement est divisé en plusieurs aliquots pour réaliser les analyses et que certains aliquots pourraient être pauvres ou dépourvus d'éléments fongiques (Arca et al. [121]). De plus, la PCR détecte les cellules non viables et est donc plus sensible que la culture nécessitant un élément fongique vivant qui pourra donc se développer en culture.

Les différences observées dans la prévalence des dermatophytes dans les onychomycoses, selon l'outil diagnostique utilisé : PCR ou outils classiques peuvent trouver une explication dans le choix du recrutement des patients : certains présentent une documentation antérieure d'onychomycose, alors que d'autres sont issus de populations comprenant de nombreux patients à risque tels que les services de gériatrie ou de diabétologie.

Enfin dans d'autres études, le recrutement porte uniquement sur les patients consultant des dermatologues, d'une manière générale.

A cette bonne sensibilité de la PCR s'ajoute sa spécificité, liée au dessin des amorces et des sondes. Cette technique permet en effet de reconnaître spécifiquement les dermatophytes et de les différencier des autres champignons contaminants ou non que l'on peut retrouver dans une culture mycologique et qui dans certains cas peuvent aussi gêner la croissance du dermatophyte.

En pratique clinique, la possibilité de résultats de laboratoire faussement négatifs (jusqu'à 40 %) avec les techniques classiques de mycologie soulève, pour les médecins, la préoccupation de l'absence de traitement adéquat et d'un diagnostic erroné de pathologie des ongles, non-infectieuse tels un psoriasis ou un lichen plan. C'est pourquoi, certains auteurs, comme Amichai [87], proposent un traitement systématique des suspicions d'onychomycose, car dans leur étude, un patient suspect d'onychomycose peut voir des prélèvements successifs se positiver même si le premier était négatif. Il précise également que ceci doit être réservé à des dermatologues confirmés et que ces pratiques vont à l'encontre des recommandations officielles. Ainsi, le fait de s'appuyer aujourd'hui uniquement sur les cultures fongiques dans la prise de décision pour traiter l'onychomycose conduit à une perte de chance pour les patients, de recevoir le traitement approprié à la pathologie développée.

La sensibilité accrue de la PCR pourrait en théorie éviter la nécessité d'un nouvel examen causé par des cultures faussement négatives et ainsi éviter ces dérives. Utiliser à bon escient, elle permettrait de réduire les coûts inhérents aux visites supplémentaires chez le médecin et à la réalisation et au traitement de plusieurs prélèvements. De par son délai d'exécution rapide, l'outil moléculaire peut permettre un diagnostic rapide de l'onychomycose et de ce fait l'initiation précoce du traitement adéquat, tout en réduisant l'impact de la maladie pour les patients.

Quand une moisissure est isolée en culture, il est difficile de prouver sa responsabilité dans la pathogénie de l'onychopathie. De plus, la présence d'un contaminant, comme des moisissures levures ou bactéries, peut masquer celle d'un dermatophyte dont la croissance est nettement plus lente. La spécificité de la PCR permet de détecter un dermatophyte présent dans l'échantillon dont la croissance serait masquée par la présence d'un simple contaminant. Dans notre étude, en comparant les résultats de PCR et de culture nous avons mis en évidence plusieurs fois la présence concomitante d'une moisissure et d'un dermatophyte. En effet, dans

5 cas pour les mauvais prélèvements et dans 4 cas pour les prélèvements de référence, une moisissure était présente dans la culture et la PCR était positive également. Avec le kit évalué, la PCR détecte globalement tous les dermatophytes, et ne permet pas de mettre en évidence une association de plusieurs genres ou espèces de dermatophytes dans un même échantillon clinique. Dans sa grande série de 1437 patients, Wisselink et al. détecte 19 cas où la PCR en temps réel détecte *T. rubrum* et *T. interdigitale*. Les cultures n'ont révélé ce phénomène que dans deux de ces cas. Pour Vander, Straten et al. [143], les dermatophytes représentent environ 90 % des cas d'onychomycoses et 50 % des infections de l'ongle [144]. Historiquement, les moisissures sont fréquemment considérées comme de simples contaminants, surtout quand un dermatophyte est présent en même temps (Elewski [76]). Toutefois, ces moisissures peuvent également être des agents étiologiques d'onychomycoses, même si leur prévalence reste incertaine [145]. Des critères permettant de démontrer l'infection par une moisissure ont été proposés par certains auteurs comme la nécessité d'isoler le champignon en culture pure à plusieurs reprises pour le même patient, mais ceci fait toujours l'objet de débats [76] [145] [146]. Dans une étude réalisée par Summerbell et al. [147], les moisissures ont été impliqués comme agents étiologiques des ongles infectés dans 3,3 % des cas. D'autres auteurs estiment que *Scytalidim* spp., *Scopulariopsis* spp., *Fusarium* spp. seraient responsables de 3 % des infections des ongles des pieds [148] [149]. Dans une étude colombienne, les moisissures retrouvées représentaient 4,5 % des infections des ongles dans un laboratoire et 9,5 % dans un autre. *Neoscytalidium dimidiatum* est en cause dans 20 % des infections des ongles des pieds au Gabon [143]. Enfin, au Nigeria, Gugnani a démontré que jusqu'à 40 % des onychomycoses chez les mineurs de charbon étaient dues à *Hendersonula toruloidea* [150]. Ces agents d'onychomycose sont donc moins fréquemment retrouvés sous nos latitudes, mais il est néanmoins possible d'y être confronté chez des patients originaires de ces zones endémiques. Lors de la dernière décennie, une prévalence croissante de *Fusarium* spp. et *Acremonium* spp. dans les onychomycoses a été observée. Pour Verrier et al [138] la fréquence des isolats de *Fusarium* dans les ongles représente 15 % des dermatophytes dans leur laboratoire entre 2005 et 2010 .

Fusarium spp ainsi que d'autres moisissures comme *Scytalidium* sp. semblent être insensibles aux traitements systémiques classiques proposés, un diagnostic fiable du pathogène responsable de l'atteinte pourrait donc permettre au praticien d'adapter le traitement si nécessaire. Ainsi, en couplant la PCR spécifique dermatophytes avec la microscopie et la culture, cela permettrait, en présence de filaments, d'une culture positive à moisissure et d'une PCR dermatophyte négative, de s'orienter vers une onychomycose à moisissure.

Le diagnostic conventionnel nécessite un minimum de 3 à 4 semaines pour permettre un rendu définitif des résultats. La PCR en temps réel permet de rendre un diagnostic en moins de 24-48h, même en tenant compte de la phase d'extraction de l'ADN qui est la plus longue. Dans notre cas, l'étape d'extraction a nécessité 1h30, alors que dans beaucoup d'études, le temps d'extraction se fait pendant la nuit. La PCR en temps réel permet de s'affranchir de la phase de révélation des amplicons, et offre ainsi un gain de temps par rapport à la PCR en point final, tout en réduisant considérablement les risques de contamination.

La région et la sélection des amorces/sondes cibles ont également une grande influence sur les performances de la PCR [141]. En présence de souches rares, ou présentant des mutations dans les régions des amorces ou des sondes, il y a un risque de ne pas détecter les pathogènes par PCR. Toutefois, au regard du taux élevé de faux négatifs de la culture (jusqu'à 40 %), un taux modeste d'échantillons faux négatifs peut être acceptable avec les outils moléculaires. L'augmentation de prix engendrée par une analyse moléculaire doit être rapportée au coût élevé du traitement des onychomycoses. Le coût plus élevé de la PCR comparativement aux méthodes de mycologie classique est actuellement un facteur limitant, mais cela pourrait aussi changer en fonction de la baisse des prix du marché des réactifs et par les économies entraînées par le remplacement ou la diminution des autres tests de diagnostic classiques.

Comme le suggère Arabatis, la PCR de par sa grande sensibilité pourrait également contribuer à détecter des infections à dermatophytes subcliniques qui peuvent être impliquées dans certains eczémas, psoriasis et lésions de peau hyperkératosiques. Comme l'ADN peut être détecté même lorsque le champignon n'est plus en vie, nous estimons que cette technique pourrait également être utilisée pour le diagnostic rétrospectif de l'onychomycose chez les patients qui ont déjà reçu un traitement antifongique qui pourrait inhiber la culture des

champignons. En outre, ce test plus sensible pourrait, au cours des schémas thérapeutiques, être utile pour détecter précocément les rechutes rapides chez les patients dont l'ongle apparaît cliniquement guéri. En effet, une onychomycose clinique traitée présente des taux de rechute appréciables, ce qui suggère que dans certains cas de «guérison» il resterait une présence de dermatophytes résiduels non détectés par des méthodes de microscopie et de culture standard. La PCR pourrait permettre un suivi plus précis de l'infection, conduisant à un traitement mieux adapté. Certains auteurs suggèrent d'analyser tous les échantillons positifs en microscopie en PCR. Les résultats positifs pourraient ainsi être rendus en 24h et les échantillons rendus négatifs seraient mis en culture pour permettre de détecter des onychopathies à d'autres agents pathogènes (moisissures ou levures). Enfin, le kit BioEvolution pourrait être utilisé pour tester d'autres échantillons cliniques que les ongles. Par exemple, les cheveux chez l'homme pour détecter des teignes, des squames prélevés sur des lésions de la peau glabre, ou encore des poils pour mettre en évidence des sycosis à dermatophytes. Chez l'animal, le test de poils ou de squames pourrait permettre d'identifier la source des cas humains de dermatophyties etc....

VI. Conclusion

Les résultats obtenus montrent que la PCR que nous avons testée a une sensibilité bien supérieure à la culture et permet ainsi de diagnostiquer un nombre supérieur d'onychomycoses par rapport à la culture seule. Cette PCR est de protocole assez simple en comparaison à d'autres PCR multiplex décrites dans la littérature, qui certes donnent une identification de l'espèce, mais sont plus coûteuses et complexes à mettre en œuvre dans un laboratoire de diagnostic de routine. Le délai de rendu des résultats est lui aussi raccourci : il nécessite 1h30 pour obtenir un extrait d'ADN à partir d'un prélèvement et 80 min pour obtenir les résultats, soit un diagnostic en moins de 24h.

Cette PCR ne permet pas en revanche d'identifier l'espèce du dermatophyte responsable de l'atteinte, mais cette limitation, si elle est importante pour l'épidémiologie, n'a aucune incidence sur le traitement à instaurer d'autant plus que les dermatophytes ont des sensibilités presque similaires aux médicaments antifongiques [88].

A l'heure actuelle, la pratique médicale courante s'appuie largement sur l'aspect clinique et sur les résultats des cultures fongiques quand cet examen est réalisé pour prendre la décision de traiter une onychomycose, or cela n'est pas toujours profitable aux patients.

Malgré ses limites, cette PCR est un outil de diagnostic prometteur et complémentaire de l'examen microscopique et des cultures fongiques chez les patients suspects d'onychomycose. Elle pourrait permettre d'accorder enfin une plus grande confiance dans le diagnostic des dermatophytoses et dans le traitement des patients concernés.

VII. Annexes

Annexe 1 :

Préparation du noir chlorazole :

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

Parallèlement, dissoudre 100 mg de noir chlorazole E (Sigma) dans 10 mL de

Diméthylsulfoxyde. Verser la solution de noir chlorazole dans la solution d'hydroxyde de Potassium.

Annexe 2 :

Blankophor :

Blankophor (Valeant Pharmaceuticals, Costa Mesa , CA, USA) a été préparée directement (0,001 % v / v) dans KOH à 15 % ou 20 % p / v .

Annexe 3 :

Fabrication des gels d'agarose :

Préparer la plaque de gels avec les peignes.

Utiliser l'agarose haute résolution (RESOPHOR EURO BIO).

Pour une plaque de gels :

Peser 4 grammes d'agarose dans un erlenmeyer de 500mL.

Ajouter 200mL de tampon TBE1X.

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

Porter une paire de lunettes de protection en plastique.

Ajouter 20 μL de GelRed 10 000X (dans l'aluminium au réfrigérateur) dans la solution d'agarose refroidie.

Remuer doucement la solution et couler dans la plaque.

Laisser polymériser les gels environ 40 min à température ambiante.

Conserver les gels à +4 °C (1 semaine maximum).

Mélanger au préalable 5 μL de bleu et 12 μL d'ADN avant d'introduire le mix dans chaque puits.

Pour le marqueur de taille mélanger 5 μL de bleu et 5 μL de marqueur.

Annexe 4 : Tableau 35 : Revue de la littérature des auteurs utilisant des techniques PCR

Référence	Gene cible	Echantillon	Contrôle	Type de PCR	Espèces ciblées	Méthode d'extraction	Sensibilité analytique	Type d'examen direct
Bontems 2009 [98]	28 S	n=410	-	PF RFLP	<i>Trichophyton</i> spp et 5 NFD	E.Z.N.A.® Fungal DNA mini kit	-	Tous ED+ par Blankophor
Bagyalakshmi 2008[151]	18 S	N=68	-	PF RFLP	<i>Pan dermatophyte</i> spp	Lyse (prot K) Biogene Kit	10pg 1fg	Pas d'ED
	ITS				<i>Pan fongique</i>			
Monod 2006[96]	28S	N=111	CiA	PF RFLP Sequençage	Pan fongique	E.Z.N.A.® Fungal DNA mini kit	-	Blankophor
Kardjeva 2006[97]	Microsatellite markerT1 (GTn)	N=261	-	PF	<i>T.rubrum</i> et sous type	Lyse (prot K) Amersham Pharmacia Biotech Inc		30% KOH
	ITS			PF RFLP sequençage	<i>Pan dermatophyte</i> spp			
Verrier 2012[138]	28S	N=679	-	TRFLP	<i>Pan fongique</i>	DNeasy Plant Minikit Qiagen AG	7.5 ng	Tous ED + fluorochrome
Yang 2007[95]	ITS	N=65	-	PF RFLP	<i>Pan dermatophyte</i> spp	Sun et al		Tous ED+
Arca 2004[121]	ITS1 ITS4	N=52	Cneg Cpos	PF	<i>Pan dermatophyte</i> spp <i>Et autres champignons</i>	Turin <i>et al</i> Lyse (prot K)	-	20% KOH
Elavarashi 2013[152]	ITS	N=138	Cneg Cpos	PF	<i>Pan fongique</i>	<i>Omni Prep™*</i> Lyse (prot K)		10% KOH
	18S				<i>Pan dermatophyte</i> spp			
Machouart 2001[89]	18S	N=75	Cneg Cpos CE	PF RFLP	<i>Pan dermatophyte</i> spp et <i>Scytalidium</i> spp	-standard phenol-chloroform extraction -Chelex (Bio-Rad) -High-Pure-PCR-Template	-	Noir chlorazole
Garg 2007[114]	CHS1	N=152	-	PF nichée	<i>Pan dermatophyte</i> spp	Lysis (Prot K), phenol/chloroform	-	20% KOH avec 40% DMSO

Référence	Gene cible	Echantillon	Contrôle	Type de PCR	Espèces ciblées	Méthode d'extraction	Sensibilité analytique	Type d'examen direct
Bergmans 2008[153]	ITS	N=818	CE CiA	PF	9 dermatophyte spp	Lysis (Prot K) QuiAmp®	0.1–1 pg	30% KOH
Bergmans 2010[154]	ITS	N=145	CE CiA	TR	<i>11 dermatophytes</i>	Lysis (Prot K), MagNA Pur®	1 pg	-
Litz 2010[120]	CHS1	N=550	CE CIA Cneg	PF nichée	<i>Pan dermatophyte</i>	freeze-thaw alk. lysis	1-5 cells	PAS 10% KOH
Gupta 2007[86]	ITS	N=62	Cneg Cpos	PF nichée	<i>T. rubrum</i>	Lysis (Prot K) Amicon Centricon- 100®	10pg	20% KOH
	Actine						1pg	
Uchida 2009[100]	ITS1	N=206	Cneg Cpos	PF nichée	<i>T. r u b r u m</i> <i>T. interdigitale</i>	Mechan. lysis, phenol/chloroform	-	Tous ED+
Okeke 2001[107]	Actine	N=84	-	PF nichée	<i>12 dermatophytes spp</i>	Isogen	50fg	Pas d'ED
Ebihara 2009[101]	28S	N=50	-	PF multiplex nichée	<i>Pan dermatophyte et</i> <i>Pan fongique</i>	Mechan. lysis phenol/chloroform	100-1000 copies	Tous ED+
Chandran 2013[73]	CHS1 ITS	N=107	CE Cneg Cpos	PF	<i>Pan dermatophyte</i> <i>T. rubrum</i>	Cf brillowska dabrowska	-	Tous ED+30%KOH
Savin 2007[90]	CHS1	N=438		PF, Elisa	Pan dermatophyte	High pure template prep kit	1 fg	Noir chlorazol
Turin 2000[155]	ITS 18s	N=40	Cneg Cplus	PF double	Pan dermatophyte	Lysis (Prot K)	10pg	KOH
Luk 2012[118]	Topoisomerase II	N=120	Cneg Cpos	PF	<i>Pan dermatophyte</i>	<i>Cf Brillowska-</i> <i>Dabrowska</i>		10% KOH
Winter 2013[99]	TopoisoméraseII	N=218	Cneg Cpos	PF Elisa	<i>Trubrum Tinterdigitalae</i>	Lysis (Prot K) QIAamp®		Blankophor
Dhib 2012[156]	CHS1	N=201	-	EP	<i>Pan dermatophyte</i>	Lysis (Prot K) QIAamp®	50pg	30% KOH
Bergman 2013[125]	CHS1	N=202	-	TR	<i>Pan dermatophyte</i>	Lysis (Prot K) MagnaPure Compact	-	Pas d'ED
	ITS			TR	<i>T. rubrum et T. interdigitale</i>			
Alexander 2011[126]	ITS	N=862 N=4110	CiA Cneg Cpos	TR	<i>T. rubrum</i>	Lysis (Prot K) QIAamp®	-	ED
Brillowska 2010[93]	CHS1 ITS	N=109	Ci	PF	Pan dermatophyte <i>T rubrum</i>	Alk. lysis bcarbonate BSA (antiinh)		ED

Référence	Gene cible	Echantillon	Contrôle	Type de PCR	Espèces ciblées	Méthode d'extraction	Sensibilité analytique	Type d'examen direct
Wisselink 2011[123]	ITS1	N=1437	CiA	TR	10 dermatophytes	Lysis (Prot K) easyMAG Cf Van den Brule et al	50fg	-
Pankewitz 2013[141]	Microsatellite	N=434	CiA Cneg	PF ELISA	<i>T.rubrum/ T. violaceum</i>	Lysis (Prot K) GenomicPrep®	35pg	Calcofluor
	Topoisomerase II CF BEIFUSS		Cpos Cneg			Lysis (Prot K) QIAamp®		
Miyajima 2013[157]	ITS	N=42	CiA	TR multiplex	<i>Pan fongique</i> <i>T.rubrum/T.menta</i>	NO2 liquide et phenol-chloroform. Cf Elsewhere	50 copies	15% KOH et 40% DMSO
Brasch 2011[158]	GT-microsatellite	N=230	Cneg Cpos	PF	<i>T. rubrum/T violaceum</i>	Lysis (Prot K) QiAmp®	-	20% KOH
Kondori 2010[124]	CHS1	N=177	CiA Cneg Cpos	PF duplex	<i>Pan dermatophyte</i>	Cf brillowska dabrowska	-	30% KOH blankophore
	ITS				<i>T.rubrum</i>			
Walberg 2006[94]	18S	N=346	-	Séquençage	<i>Pan fongique</i>	phenol/chloroforme Cf Arca	100 copies	Pas d'ED
Beifuss 2009[127]	Topoisomerase II	N=520	CiA Cneg Cpos	PF elisa	5 dermatophytes	Lysis (Prot K) QIAamp®	1pg	Noir chlorazole

VIII. BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. K. Gupta, H. C. Jain, C. W. Lynde, G. N. Wateeel, et R. C. Summerbell, « Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists' offices in Ontario, Canada--a multicenter survey of 2001 patients », *Int. J. Dermatol.*, vol. 36, n° 10, p. 783-787, oct. 1997.
- [2] D. T. Roberts, « Onychomycosis: current treatment and future challenges », *Br. J. Dermatol.*, vol. 141 Suppl 56, p. 1-4, nov. 1999.
- [3] C. M. Elewski BE, « Prevalence of onychomycosis in patients attending a dermatology clinic in northeastern ohio for other conditions », *Arch. Dermatol.*, vol. 133, n° 9, p. 1172-1173, sept. 1997.
- [4] D. Chabasse, R. Baran, et M. F. de Chauvin, « Les onychomycoses I - Épidémiologie-Étiologie », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 10, n° 4, p. 177, déc. 2000.
- [5] D. Chabasse, « Peut-on chiffrer la fréquence des onychomycoses ? », *Ann. Dermatol. Vénéréologie*, vol. 130, n° 2, p. 1222-1230, févr. 2003.
- [6] F. Makni, F. Cheikhrouhou, H. Amri, A. Sellami, H. Sellami, S. Néji, S. Marrekchi, H. Turki, et A. Ayadi, « Les onychomycoses chez les enfants à Sfax (Tunisie) », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 18, n° 3, p. 158-161, sept. 2008.
- [7] A. K. Gupta, P. Chang, J. Q. Del Rosso, P. Adam, et S. L. Hofstader, « Onychomycosis in children: prevalence and management », *Pediatr. Dermatol.*, vol. 15, n° 6, p. 464-471, déc. 1998.
- [8] D. Gill et R. Marks, « A review of the epidemiology of tinea unguium in the community », *Australas. J. Dermatol.*, vol. 40, n° 1, p. 6-13, 1999.
- [9] S. Neji, F. Makni, F. Cheikhrouhou, A. Sellami, H. Sellami, S. Marreckchi, H. Turki, et A. Ayadi, « Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia », *Mycoses*, vol. 52, n° 6, p. 534-538, 2009.
- [10] G. Sais, A. Jucglà, et J. Peyrí, « Prevalence of dermatophyte onychomycosis in Spain: a cross-sectional study », *Br. J. Dermatol.*, vol. 132, n° 5, p. 758-761, mai 1995.
- [11] D. Dompmartin, A. Dompmartin, A. M. Deluol, E. Grosshans, et J. P. Coulaud, « Onychomycosis and AIDS. Clinical and laboratory findings in 62 patients », *Int. J. Dermatol.*, vol. 29, n° 5, p. 337-339, juin 1990.
- [12] J. C. Gentles et E. G. V. Evans, « Foot Infections in Swimming Baths », *Br. Med. J.*, vol. 3, n° 5874, p. 260-262, août 1973.
- [13] B. J. Guentz, « Common pediatric foot dermatoses », *J. Pediatr. Health Care*, vol. 13, n° 2, p. 68-71, mars 1999.
- [14] G. Piérard, « Onychomycosis and Other Superficial Fungal Infections of the Foot in the Elderly: A Pan-European Survey », *Dermatology*, vol. 202, n° 3, p. 220-224, 2001.
- [15] A. K. Gupta et J. Q. De Rosso, « Management of onychomycosis in children », *Postgrad. Med.*, vol. Spec No, p. 31-37, juill. 1999.
- [16] N. Lateur, A. Mortaki, et J. André, « Two Hundred Ninety-Six Cases of Onychomycosis in Children and Teenagers: A 10-Year Laboratory Survey », *Pediatr. Dermatol.*, vol. 20, n° 5, p. 385-388, 2003.
- [17] M. Lange, J. Roszkiewicz, A. Szczerkowska-Dobosz, E. Jasiel-Walikowska, et B. Bykowska, « Onychomycosis is no longer a rare finding in children », *Mycoses*, vol. 49, n° 1, p. 55-59, 2006.
- [18] C. Romano, M. Papini, A. Ghilardi, et C. Gianni, « Onychomycosis in children: a survey of 46 cases », *Mycoses*, vol. 48, n° 6, p. 430-437, 2005.
- [19] « Onychomycoses : modalités de diagnostic et prise en charge », *J. Mycol. Médicale J.*

- Med. Mycol.*, vol. 17, n° 4, p. 284-293, déc. 2007.
- [20] Bioforma, *Les dermatophytes*, vol. 31. 2004.
- [21] D. Chabasse, C. Guiguen, et N. Contet-Audonnet, *Mycologie médicale*, Masson. 1999.
- [22] D. Chabasse, « Les dermatophytes : d'où viennent-ils ? Comment sont-ils devenus des parasites ? », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 18, n° 1, p. 27-35, mars 2008.
- [23] N. Contet-Audonnet et C. Leyer, « Émergence d'un dermatophyte transmis par le cochon d'Inde et proche de *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* : *T. mentagrophytes* var. *porcellae* », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 20, n° 4, p. 321-325, déc. 2010.
- [24] D. Chabasse, N. Contet-Audonnet, J. Bouchara, et A. Basile, *Moisissures-Dermatophytes-Levures/ Du prélèvement au diagnostic*, Biomérieux. .
- [25] D. Chabasse et N. Contet-Audonnet, « Dermatophytes et dermatophytoses », *EMC - Mal. Infect.*, vol. 8, n° 2, p. 1-15, janv. 2011.
- [26] D. Chabasse, M. Pihet, et J.-P. Bouchara, « Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale », *Rev. Francoph. Lab.*, vol. 2009, n° 416, p. 71-86, nov. 2009.
- [27] D. M. Poisson, N. Jourdan Da Silva, D. Rousseau, et E. Estève, « *Tinea corporis gladiatorum*: Specificity and epidemiology », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 17, n° 3, p. 177-182, sept. 2007.
- [28] E. Estève, D. Rousseau, D. Defo, et D.-M. Poisson, « Épidémie de trichophyties cutanées chez les judokas du pôle France d'Orléans : septembre 2004-juin 2005 », *Ann. Dermatol. Vénérologie*, vol. 133, n° 6-7, p. 525-529, juin 2006.
- [29] Y. Shiraki, M. Hiruma, N. Hirose, et S. Ikeda, « Commonly affected body sites in 92 Japanese combat sports participants with *Trichophyton tonsurans* infection », *Mycoses*, vol. 52, n° 4, p. 339-342, 2009.
- [30] A. Baldo, A. Mathy, S. Vermout, J. Tabart, B. Losson, et B. Mignon, « Les mécanismes d'adhérence des champignons responsables de mycoses superficielles. », *Ann. Méd. Vét.*, n° 151, p. 192-199, 2007.
- [31] A. Baldo, M. Monod, A. Mathy, L. Cambier, E. T. Bagut, V. Defaweux, F. Symoens, N. Antoine, et B. Mignon, « Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes », *Mycoses*, vol. 55, n° 3, p. 218-223, mai 2012.
- [32] M. Monod, « Secreted proteases from dermatophytes », *Mycopathologia*, vol. 166, n° 5-6, p. 285-294, déc. 2008.
- [33] A. Baldo, A. Mathy, J. Tabart, P. Camponova, S. Vermout, L. Massart, F. Maréchal, M. Galleni, et B. Mignon, « Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis », *Br. J. Dermatol.*, vol. 162, n° 5, p. 990-997, mai 2010.
- [34] S. Goettmann, « Pathologie unguéale », *EMC - Dermatol.*, vol. 2, n° 3, p. 1-40, 2003.
- [35] J.-M. Bonnetblanc, « Item 288 – Troubles des phanères : onyxis », *Ann. Dermatol. Vénérologie*, vol. 139, n° 11, p. A209-A212, oct. 2012.
- [36] J.-N. (Yannis) Scrivener, « Onychomycoses : épidémiologie et clinique », *RFL - Rev. Francoph. Lab.*, vol. 41, n° 432, p. 35-41, mai 2011.
- [37] M. F. de Chauvin, R. Baran, et D. Chabasse, « Les onychomycoses », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 11, n° 4, p. 205-215, déc. 2001.
- [38] R. Baran, *A text atlas of nail disorders: diagnosis and treatment*. London: M. Dunitz, 1996.
- [39] A. Tosti, R. Baran, B. M. Piraccini, et P. A. Fanti, « "Endonyx" onychomycosis: a new modality of nail invasion by dermatophytes », *Acta Derm. Venereol.*, vol. 79, n° 1, p. 52-53, janv. 1999.
- [40] J. C. Szepietowski, A. Reich, P. Pacan, E. Garlowska, et E. Baran, « Evaluation of quality of life in patients with toenail onychomycosis by Polish version of an

- international onychomycosis-specific questionnaire », *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV*, vol. 21, n° 4, p. 491-496, avr. 2007.
- [41] L. A. Drake, D. L. Patrick, P. Fleckman, J. Andr, R. Baran, E. Haneke, C. Sapède, et A. Tosti, « The impact of onychomycosis on quality of life: development of an international onychomycosis-specific questionnaire to measure patient quality of life », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 41, n° 2 Pt 1, p. 189-196, août 1999.
- [42] E. Duhard, P. Coudière, J.-J. Voisard, et F.-A. Allaert, « Prise en charge des onychopathies présumées d'origine mycosique en dermatologie libérale », *Ann. Dermatol. Vénérologie*, vol. 133, n° 1, p. 11-15, janv. 2006.
- [43] A. K. Gupta, P. Adam, N. Dlova, C. W. Lynde, S. Hofstader, N. Morar, J. Aboobaker, et R. C. Summerbell, « Therapeutic Options for the Treatment of Tinea Capitis Caused by Trichophyton Species: Griseofulvin Versus the New Oral Antifungal Agents, Terbinafine, Itraconazole, and Fluconazole », *Pediatr. Dermatol.*, vol. 18, n° 5, p. 433-438, 2001.
- [44] A. K. Gupta et L. Q. Tu, « Dermatophytes: Diagnosis and treatment », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 54, n° 6, p. 1050-1055, juin 2006.
- [45] Y. Scrivener, « Analyse systématique des essais thérapeutiques », *Ann. Dermatol. Vénérologie*, vol. 134, n° 5, p. 17-45, 05/07.
- [46] M. F. de Chauvin, « Traitement des onychomycoses », *RFL - Rev. Francoph. Lab.*, vol. 41, n° 432, p. 71-75, mai 2011.
- [47] C. Lacroix et M. Feuilhade de Chauvin, « Traitements antifongiques », *EMC - Dermatol.*, vol. 3, n° 4, p. 1-9, janv. 2008.
- [48] E. Haneke, « Fungal infections of the nail », *Semin. Dermatol.*, vol. 10, n° 1, p. 41-53, mars 1991.
- [49] R. Tsuboi, K. Unno, H. Komatsuzaki, H. Ogawa, T. Kasai, K. Oka, I. Takiuchi, K. Kitamura, N. Higashi, Y. Nakashima, et K. Nishimoto, « Topical treatment of onychomycosis by occlusive dressing using bifonazole cream containing 40% urea », *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi Jpn. J. Med. Mycol.*, vol. 39, n° 1, p. 11-16, 1998.
- [50] R. Friedman-Birnbaum, A. Cohen, A. Shemer, O. Bitterman, R. Bergman, et S. Stettendorf, « Treatment of onychomycosis: a randomized, double-blind comparison study with topical bifonazole-urea ointment alone and in combination with short-duration oral griseofulvin », *Int. J. Dermatol.*, vol. 36, n° 1, p. 67-69, janv. 1997.
- [51] M. Zaug et M. Bergstraesser, « Amorolfine in the treatment of onychomycoses and dermatomycoses (an overview) », *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 17, p. 61-70, 1992.
- [52] J. Lauharanta, « Comparative efficacy and safety of amorolfine nail lacquer 2% versus 5% once weekly », *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 17 Suppl 1, p. 41-43, sept. 1992.
- [53] D. Reinel et C. Clarke, « Comparative efficacy and safety of amorolfine nail lacquer 5% in onychomycosis, once-weekly versus twice-weekly », *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 17 Suppl 1, p. 44-49, sept. 1992.
- [54] R. Baran, « Topical amorolfine for 15 months combined with 12 weeks of oral terbinafine, a cost-effective treatment for onychomycosis », *Br. J. Dermatol.*, vol. 145 Suppl 60, p. 15-19, oct. 2001.
- [55] H. C. Korting et M. Schäfer-Korting, « Is tinea unguium still widely incurable? A review three decades after the introduction of griseofulvin », *Arch. Dermatol.*, vol. 128, n° 2, p. 243-248, févr. 1992.
- [56] H. Hofmann, M. Bräutigam, G. Weidinger, et H. Zaun, « Treatment of toenail onychomycosis. A randomized, double-blind study with terbinafine and griseofulvin. LAGOS II Study Group », *Arch. Dermatol.*, vol. 131, n° 8, p. 919-922, août 1995.
- [57] J. Faergemann, C. Anderson, K. Hersle, E. Hradil, P. Nordin, T. Kaaman, L. Molin, et A. Pettersson, « Double-blind, parallel-group comparison of terbinafine and griseofulvin in the treatment of toenail onychomycosis », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 32, n° 5 Pt 1, p. 750-753, mai 1995.

- [58] A. K. Gupta et T. Gregurek-Novak, « Efficacy of itraconazole, terbinafine, fluconazole, griseofulvin and ketoconazole in the treatment of *Scopulariopsis brevicaulis* causing onychomycosis of the toes », *Dermatol. Basel Switz.*, vol. 202, n° 3, p. 235-238, 2001.
- [59] E. Svejgaard, « Oral ketoconazole as an alternative to griseofulvin in recalcitrant dermatophyte infections and onychomycosis », *Acta Derm. Venereol.*, vol. 65, n° 2, p. 143-149, 1985.
- [60] J. H. Lewis, H. J. Zimmerman, G. D. Benson, et K. G. Ishak, « Hepatic injury associated with ketoconazole therapy. Analysis of 33 cases », *Gastroenterology*, vol. 86, n° 3, p. 503-513, mars 1984.
- [61] Y. M. Clayton, « Relevance of broad-spectrum and fungicidal activity of antifungals in the treatment of dermatomycoses », *Br. J. Dermatol.*, vol. 130 Suppl 43, p. 7-8, avr. 1994.
- [62] G. Petranyi, J. G. Meingassner, et H. Mieth, « Antifungal activity of the allylamine derivative terbinafine in vitro », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 31, n° 9, p. 1365-1368, sept. 1987.
- [63] M. Hall, C. Monka, P. Krupp, et D. O'Sullivan, « Safety of oral terbinafine: results of a postmarketing surveillance study in 25,884 patients », *Arch. Dermatol.*, vol. 133, n° 10, p. 1213-1219, oct. 1997.
- [64] A. J. Zapata Garrido, A. C. Romo, et F. B. Padilla, « Terbinafine hepatotoxicity. A case report and review of literature », *Ann. Hepatol.*, vol. 2, n° 1, p. 47-51, mars 2003.
- [65] M. Haugh, S. Helou, J. P. Boissel, et B. J. Cribier, « Terbinafine in fungal infections of the nails: a meta-analysis of randomized clinical trials », *Br. J. Dermatol.*, vol. 147, n° 1, p. 118-121, juill. 2002.
- [66] E. G. Evans et B. Sigurgeirsson, « Double blind, randomised study of continuous terbinafine compared with intermittent itraconazole in treatment of toenail onychomycosis. The LION Study Group », *BMJ*, vol. 318, n° 7190, p. 1031-1035, avr. 1999.
- [67] H. Degreef, A. del Palacio, S. Mygind, G. Ginter, A. Pinto Soares, et A. Zuluaga de Cadena, « Randomized double-blind comparison of short-term itraconazole and terbinafine therapy for toenail onychomycosis », *Acta Derm. Venereol.*, vol. 79, n° 3, p. 221-223, mai 1999.
- [68] D. Chabasse, « Place du laboratoire dans le diagnostic mycologique d'une onychomycose », *RFL - Rev. Francoph. Lab.*, vol. 41, n° 432, p. 43-50, mai 2011.
- [69] F. Foulet et G. Cremer, « Prélèvements et diagnostics mycologiques des onychomycoses », *Ann. Dermatol. Vénéréologie*, vol. 130, n° 2-C2, p. 1244-1247, févr. 2003.
- [70] A. Shemer, H. Trau, B. Davidovici, M. H. Grunwald, et B. Amichai, « Collection of fungi samples from nails: comparative study of curettage and drilling techniques », *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV*, vol. 22, n° 2, p. 182-185, févr. 2008.
- [71] H. S. Qureshi, H. A. Ormsby, et N. Kapadia, « Effects of modified sample collection technique on fungal culture yield: nail clipping/scraping versus microdrill », *JPMA J. Pak. Med. Assoc.*, vol. 54, n° 6, p. 301-305, juin 2004.
- [72] J. M. Weinberg, E. K. Koestenblatt, W. D. Tutrone, H. R. Tishler, et L. Najarian, « Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 49, n° 2, p. 193-197, août 2003.
- [73] N. S. Chandran, J.-Y. Pan, Z. A. D. Pramono, H.-H. Tan, et C.-S. Seow, « Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis », *Australas. J. Dermatol.*, vol. 54, n° 2, p. 105-108, mai 2013.
- [74] P. Rispaill, N. Bourgeois, et L. Lachaud, « Diagnostic biologique des onychomycoses : prééminence de l'examen direct », *RFL - Rev. Francoph. Lab.*, vol. 41, n° 432, p. 51-60, mai 2011.

- [75] R. Robert, et M. Pihet, « Conventional Methods for the Diagnosis of Dermatophytosis - Springer ».
- [76] B. E. Elewski, « Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management », *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, n° 3, p. 415-429, juill. 1998.
- [77] V. Panasiti, R. G. Borroni, V. Devirgiliis, M. Rossi, L. Fabbrizio, R. Masciangelo, U. Bottoni, et S. Calvieri, « Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses », *Mycoses*, vol. 49, n° 1, p. 26-29, 2006.
- [78] T. Abdelrahman, V. Letscher Bru, J. Waller, G. Noacco, et E. Candolfi, « Dermatophytosis: comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 16, n° 2, p. 87-91, juin 2006.
- [79] M. F. de Chauvin, R. Baran, et D. Chabasse, « Les onychomycoses », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 11, n° 1, p. 5, juin 2001.
- [80] D. Chabasse et M. Pihet, « Les dermatophytes : les difficultés du diagnostic mycologique », *RFL - Rev. Francoph. Lab.*, vol. 38, n° 406, p. 29-38, oct. 2008.
- [81] M. Feuilhade de Chauvin, « New diagnostic techniques », *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 19, p. 20-24, 2005.
- [82] J. E. Arrese, C. Piérard-Franchimont, et G. E. Piérard, « Facing up to the diagnostic uncertainty and management of onychomycoses », *Int. J. Dermatol.*, vol. 38 Suppl 2, p. 1-6, sept. 1999.
- [83] X.-F. Li, Y.-N. Shen, W. Chen, H. Chen, G.-X. Lv, et W.-D. Liu, « A new medium for diagnosis of dermatophyte infection », *Eur. J. Dermatol. EJD*, vol. 19, n° 1, p. 34-37, févr. 2009.
- [84] H. N. Liu, D. D. Lee, et C. K. Wong, « KONCPA: a new method for diagnosing tinea unguium », *Dermatol. Basel Switz.*, vol. 187, n° 3, p. 166-168, 1993.
- [85] A. Zagnoli, B. Chevalier, et B. Sassolas, « Dermatophyties et dermatophytes », *EMC - Mal. Infect.*, vol. 2, n° 3, p. 1-14, 2003.
- [86] A. K. Gupta, M. Zaman, et J. Singh, « Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay », *Br. J. Dermatol.*, vol. 157, n° 4, p. 698-703, oct. 2007.
- [87] B. Amichai, B. Davidovici, H. Trau, A. Lyakhovitsky, M. H. Grunwald, et A. Shemer, « A rationale for systemic treatment in onychomycosis with negative results on fungal examination », *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 36, n° 7, p. 724-727, oct. 2011.
- [88] I. Effendy, M. Lecha, M. Feuilhade de Chauvin, N. Di Chiacchio, R. Baran, et European Onychomycosis Observatory, « Epidemiology and clinical classification of onychomycosis », *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV*, vol. 19 Suppl 1, p. 8-12, sept. 2005.
- [89] M. Machouart-Dubach, C. Lacroix, M. F. de Chauvin, I. Le Gall, C. Giudicelli, F. Lorenzo, et F. Derouin, « Rapid discrimination among dermatophytes, *Scytalidium* spp., and other fungi with a PCR-restriction fragment length polymorphism ribotyping method », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, n° 2, p. 685-690, févr. 2001.
- [90] C. Savin, S. Huck, C. Rolland, M. Benderdouche, O. Faure, G. Noacco, J. Menotti, E. Candolfi, H. Pelloux, R. Grillot, S. Coupe, et F. Derouin, « Multicenter Evaluation of a Commercial PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Diagnostic Kit (Onychodiag) for Diagnosis of Dermatophytic Onychomycosis », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, n° 4, p. 1205-1210, févr. 2007.
- [91] J. Garg, R. Tilak, A. Garg, P. Prakash, A. K. Gulati, et G. Nath, « Rapid detection of dermatophytes from skin and hair », *BMC Res. Notes*, vol. 2, p. 60, 2009.
- [92] I. Dhib, A. Fathallah, A. Yaacoub, F. Hadj Slama, M. B. Said, et R. Zemni, « Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections », *Mycoses*, juin 2013.

- [93] A. Brillowska-Dabrowska, S. S. Nielsen, H. V. Nielsen, et M. C. Arendrup, « Optimized 5-hour multiplex PCR test for the detection of tinea unguium: performance in a routine PCR laboratory », *Med. Mycol. Off. Publ. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol.*, vol. 48, n° 6, p. 828-831, sept. 2010.
- [94] M. Walberg, C. Mørk, P. Sandven, A. T. Jorde, M. Bjørås, et P. Gaustad, « 18S rDNA polymerase chain reaction and sequencing in onychomycosis diagnostics », *Acta Derm. Venereol.*, vol. 86, n° 3, p. 223-226, 2006.
- [95] G. Yang, M. Zhang, W. Li, et L. An, « Direct Species Identification of Common Pathogenic Dermatophyte Fungi in Clinical Specimens by Semi-nested PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism », *Mycopathologia*, vol. 166, n° 4, p. 203-208, oct. 2008.
- [96] M. Monod, O. Bontems, C. Zaugg, B. Léchenne, M. Fratti, et R. Panizzon, « Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses », *J. Med. Microbiol.*, vol. 55, n° Pt 9, p. 1211-1216, sept. 2006.
- [97] V. Kardjeva, R. Summerbell, T. Kantardjiev, D. Devliotou-Panagiotidou, E. Sotiriou, et Y. Gräser, « Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, n° 4, p. 1419-1427, avr. 2006.
- [98] O. Bontems, P. M. Hauser, et M. Monod, « Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis », *Br. J. Dermatol.*, vol. 161, n° 4, p. 791-796, oct. 2009.
- [99] I. Winter, S. Uhrlaß, C. Krüger, J. Herrmann, G. Bezold, A. Winter, S. Barth, J. C. Simon, Y. Gräser, et P. Nenoff, « Molecular biological detection of dermatophytes in clinical samples when onychomycosis or tinea pedis is suspected. A prospective study comparing conventional dermatomycological diagnostics and polymerase chain reaction », *Hautarzt Z. Für Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.*, vol. 64, n° 4, p. 283-289, avr. 2013.
- [100] T. Uchida, K. Makimura, K. Ishihara, H. Goto, Y. Tajiri, M. Okuma, R. Fujisaki, K. Uchida, S. Abe, et M. Iijima, « Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples », *J. Dermatol.*, vol. 36, n° 4, p. 202-208, 2009.
- [101] M. Ebihara, K. Makimura, K. Sato, S. Abe, et R. Tsuboi, « Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences », *Br. J. Dermatol.*, vol. 161, n° 5, p. 1038-1044, nov. 2009.
- [102] X. Li, W. Tian, H. Wang, H. Chen, Y. Shen, G. Lv, et W. Liu, « Direct detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis by multiplex polymerase chain reaction-based assay », *Eur. J. Dermatol. EJD*, vol. 21, n° 1, p. 37-42, févr. 2011.
- [103] M. Arabatzis, L. e. s. Bruijnesteijn van Coppenraet, E. j. Kuijper, G. s. De Hoog, A. p. m. Lavrijsen, K. Templeton, E. m. h. Van Der Raaij-Helmer, A. Velegraki, Y. Gräser, et R. c. Summerbell, « Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme », *Br. J. Dermatol.*, vol. 157, n° 4, p. 681-689, 2007.
- [104] L. Mehlig, C. Garve, A. Ritschel, A. Zeiler, W. Brabetz, C. Weber, et A. Bauer, « Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses », *Mycoses*, juin 2013.
- [105] A. Dehée, « Les différentes techniques de quantification des génomes viraux », *Rev. Fr. Lab.*, vol. 2003, n° 351, p. 23-29, mars 2003.
- [106] B. Ninet, I. Jan, O. Bontems, B. Léchenne, O. Jousson, R. Panizzon, D. Lew, et M. Monod, « Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing

- with a commercial kit », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, n° 2, p. 826-830, févr. 2003.
- [107] C. N. Okeke, R. Tsuboi, M. Kawai, M. Hiruma, et H. Ogawa, « Isolation of an intron-containing partial sequence of the gene encoding dermatophyte actin (ACT) and detection of a fragment of the transcript by reverse transcription-nested PCR as a means of assessing the viability of dermatophytes in skin scales », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, n° 1, p. 101-106, janv. 2001.
- [108] A. Kamiya, A. Kikuchi, Y. Tomita, et T. Kanbe, « PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis », *J. Dermatol. Sci.*, vol. 34, n° 1, p. 35-48, févr. 2004.
- [109] T. Kanbe, Y. Suzuki, A. Kamiya, T. Mochizuki, M. Fujihira, et A. Kikuchi, « PCR-based identification of common dermatophyte species using primer sets specific for the DNA topoisomerase II genes », *J. Dermatol. Sci.*, vol. 32, n° 2, p. 151-161, août 2003.
- [110] C. De Bievre et M. A. Rouffaud, « analyse des séquences de l'ADN codant pour les ITS1 (séquences internes transcrites-I) de *Trichophyton rubrum* sabouraud (castellani). Comparaison avec les principales espèces de *Trichophyton*. », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 9, n° 1, p. 1, avr. 2009.
- [111] O. Adam, M. Merad, S. Antoun, J.-H. Bourhis, B. Gachot, O. Casiraghi, et E. Chachaty, « Intérêt de l'amplification génique à l'aide d'amorces universelles dans le diagnostic des infections fongiques chez le patient immunodéprimé », *Pathol. Biol.*, vol. 52, n° 9, p. 544-549, nov. 2004.
- [112] C. J. Jackson, R. C. Barton, S. L. Kelly, et E. G. Evans, « Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, n° 12, p. 4527-4534, déc. 2000.
- [113] R. Maleszka et G. D. Clark-Walker, « Yeasts have a four-fold variation in ribosomal DNA copy number », *Yeast Chichester Engl.*, vol. 9, n° 1, p. 53-58, janv. 1993.
- [114] J. Garg, R. Tilak, S. Singh, A. K. Gulati, A. Garg, P. Prakash, et G. Nath, « Evaluation of Pan-Dermatophyte Nested PCR in Diagnosis of Onychomycosis », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, n° 10, p. 3443-3445, janv. 2007.
- [115] A. Hirai, R. Kano, Y. Nakamura, S. Watanabe, et A. Hasegawa, « Molecular taxonomy of dermatophytes and related fungi by chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences », *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 83, n° 1, p. 11-20, 2003.
- [116] E. Reisler, « Actin molecular structure and function », *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 5, n° 1, p. 41-47, févr. 1993.
- [117] H. C. Li, J.-P. Bouchara, M. M.-L. Hsu, R. Barton, et T. C. Chang, « Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, n° 10, p. 3160-3166, oct. 2007.
- [118] N. M. Luk, M. Hui, T. S. Cheng, L. S. Tang, et K. M. Ho, « Evaluation of PCR for the diagnosis of dermatophytes in nail specimens from patients with suspected onychomycosis », *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 37, n° 3, p. 230-234, avr. 2012.
- [119] A. Brillowska-Dabrowska, D. M. Saunte, et M. C. Arendrup, « Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum* », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, n° 4, p. 1200-1204, janv. 2007.
- [120] C. E. Litz et R. Z. Cavagnolo, « Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study », *Br. J. Dermatol.*, vol. 163, n° 3, p. 511-514, sept. 2010.
- [121] E. Arca, M. A. Saracli, A. Akar, S. T. Yildiran, Z. Kurumlu, et A. R. Gur, « Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis », *Eur. J. Dermatol. EJD*, vol. 14, n° 1, p. 52-55, févr. 2004.
- [122] E. Berk, S. Kuştimur, A. Kalkancı, et O. M. Oztaş, « [DNA extraction and identification of *Trichophyton rubrum* by real-time polymerase chain reaction from

- direct nail scraping specimens of patients with onychomycosis] », *Mikrobiyoloji Bül.*, vol. 45, n° 1, p. 150-158, janv. 2011.
- [123] G. J. Wisselink, E. van Zanten, et A. M. D. Kooistra-Smid, « Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR », *J. Microbiol. Methods*, vol. 85, n° 1, p. 62-66, avr. 2011.
- [124] N. Kondori, A.-L. Abrahamsson, N. Ataollahy, et C. Wennerås, « Comparison of a new commercial test, Dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens », *Med. Mycol.*, vol. 48, n° 7, p. 1005-1008, nov. 2010.
- [125] A. Bergman, D. Heimer, N. Kondori, et H. Enroth, « Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR », *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 19, n° 4, p. E205-211, avr. 2013.
- [126] C. L. Alexander, G. S. Shankland, W. Carman, et C. Williams, « Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland », *Br. J. Dermatol.*, vol. 164, n° 5, p. 966-972, mai 2011.
- [127] B. Beifuss, G. Bezold, P. Gottlöber, C. Borelli, J. Wagener, M. Schaller, et H. C. Korting, « Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR–ELISA technique open to protocol transfer », *Mycoses*, vol. 54, n° 2, p. 137–145, 2011.
- [128] Y. Gräser, V. Czaika, et T. Ohst, « Diagnostic PCR of dermatophytes--an overview », *J. Dtsch. Dermatol. Ges. J. Ger. Soc. Dermatol. JDDG*, vol. 10, n° 10, p. 721-726, oct. 2012.
- [129] J. B. Reitsma, A. W. S. Rutjes, K. S. Khan, A. Coomarasamy, et P. M. Bossuyt, « A review of solutions for diagnostic accuracy studies with an imperfect or missing reference standard », *J. Clin. Epidemiol.*, vol. 62, n° 8, p. 797-806, août 2009.
- [130] R. Pouillot, G. Gerbier, et I. A. Gardner, « “TAGS”, a program for the evaluation of test accuracy in the absence of a gold standard », *Prev. Vet. Med.*, vol. 53, n° 1-2, p. 67-81, févr. 2002.
- [131] X.-H. Zhou, D. K. McClish, et N. A. Obuchowski, *Statistical methods in diagnostic medicine*. Hoboken, N.J.: Wiley, 2011.
- [132] C. L. Fletcher, R. J. Hay, et N. C. Smeeton, « Onychomycosis: the development of a clinical diagnostic aid for toenail disease. Part I. Establishing discriminating historical and clinical features », *Br. J. Dermatol.*, vol. 150, n° 4, p. 701-705, avr. 2004.
- [133] E. C. Hamer, C. B. Moore, et D. W. Denning, « Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory », *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 12, n° 2, p. 181-184, févr. 2006.
- [134] D. J. Haldane et E. Robart, « A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection », *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 13, n° 4, p. 337-339, août 1990.
- [135] M. A. Lawry, E. Haneke, K. Strobeck, S. Martin, B. Zimmer, et P. S. Romano, « Methods for diagnosing onychomycosis: a comparative study and review of the literature », *Arch. Dermatol.*, vol. 136, n° 9, p. 1112-1116, sept. 2000.
- [136] Daniel III C et Elewski BE, « The diagnosis of nail fungus infection revisited », *Arch. Dermatol.*, vol. 136, n° 9, p. 1162-1164, sept. 2000.
- [137] R. C. Summerbell, E. Cooper, U. Bunn, F. Jamieson, et A. K. Gupta, « Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes », *Med. Mycol. Off. Publ. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol.*, vol. 43, n° 1, p. 39-59, févr. 2005.
- [138] J. Verrier, M. Pronina, C. Peter, O. Bontems, M. Fratti, K. Salamin, S. Schürch, K. Gindro, J.-L. Wolfender, K. Harshman, et M. Monod, « Identification of infectious

- agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, n° 3, p. 553-561, mars 2012.
- [139] M. P. English et R. Atkinson, « An improved method for the isolation of fungi in onychomycosis », *Br. J. Dermatol.*, vol. 88, n° 3, p. 237-241, 1973.
- [140] J. Löffler, H. Hebart, U. Schumacher, H. Reitze, et H. Einsele, « Comparison of different methods for extraction of DNA of fungal pathogens from cultures and blood », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 35, n° 12, p. 3311-3312, déc. 1997.
- [141] F. Pankewitz, P. Nenoff, S. Uhrlaß, G. Bezold, I. Winter, et Y. Gräser, « Development of a novel polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis », *Br. J. Dermatol.*, vol. 168, n° 6, p. 1236-1242, juin 2013.
- [142] J. Menotti, M. Machouart, M. Benderdouche, C. Cetre-Sossah, P. Morel, L. Dubertret, F. Derouin, M. Feuilhade De Chauvin, et C. Lacroix, « Polymerase chain reaction for diagnosis of dermatophyte and *Scytalidium* spp. onychomycosis », *Br. J. Dermatol.*, vol. 151, n° 2, p. 518-519, août 2004.
- [143] M. R. Vander Straten, M. M. Balkis, et M. A. Ghannoum, « The role of nondermatophyte molds in onychomycosis: diagnosis and treatment », *Dermatol. Ther.*, vol. 15, n° 2, p. 89-98, 2002.
- [144] F. Kong, Z. Tong, X. Chen, T. Sorrell, B. Wang, Q. Wu, D. Ellis, et S. Chen, « Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 46, n° 4, p. 1192-1199, avr. 2008.
- [145] D. L. Greer, « Evolving role of nondermatophytes in onychomycosis », *Int. J. Dermatol.*, vol. 34, n° 8, p. 521-524, août 1995.
- [146] D. H. Ellis, A. B. Watson, J. E. Marley, et T. G. Williams, « Non-dermatophytes in onychomycosis of the toenails », *Br. J. Dermatol.*, vol. 136, n° 4, p. 490-493, avr. 1997.
- [147] R. C. Summerbell, J. Kane, et S. Kraiden, « Onychomycosis, Tinea Pedis and Tinea Manuum Caused by Non-Dermatophytic Filamentous Fungi Nicht-Dermatophyten-Fadenpilze als Erreger von Onychomykosen, Tinea pedis und Tinea manuum », *Mycoses*, vol. 32, n° 12, p. 609-619, 1989.
- [148] E. L. Svejgaard et J. Nilsson, « Onychomycosis in Denmark: prevalence of fungal nail infection in general practice », *Mycoses*, vol. 47, n° 3-4, p. 131-135, avr. 2004.
- [149] A. K. Gupta, E. A. Cooper, P. MacDonald, et R. C. Summerbell, « Utility of Inoculum Counting (Walshe and English Criteria) in Clinical Diagnosis of Onychomycosis Caused by Nondermatophytic Filamentous Fungi », *J. Clin. Microbiol.*, vol. 39, n° 6, p. 2115-2121, juin 2001.
- [150] H. C. Gugnani et C. A. Oyeka, « Foot infections due to *Hendersonula toruloidea* and *Scytalidium hyalinum* in coal miners », *J. Med. Vet. Mycol.*, vol. 27, n° 3, p. 167-179, 1989.
- [151] R. Bagyalakshmi, B. Senthilvelan, K. L. Therese, S. Murugusundram, et H. N. Madhavan, « Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens », *Indian J. Dermatol.*, vol. 53, n° 1, p. 15-20, janv. 2008.
- [152] E. Elavarashi, A. J. Kindo, et J. Kalyani, « Optimization of PCR-RFLP Directly from the Skin and Nails in Cases of Dermatophytosis, Targeting the ITS and the 18S Ribosomal DNA Regions », *J. Clin. Diagn. Res. JCDR*, vol. 7, n° 4, p. 646-651, avr. 2013.
- [153] A. M. C. Bergmans, L. M. Schouls, M. van der Ent, A. Klaassen, N. Böhm, et R. G. F. Wintermans, « Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples », *Clin.*

Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis., vol. 14, n° 8, p. 778-788, août 2008.

- [154] A. M. C. Bergmans, M. van der Ent, A. Klaassen, N. Böhm, G. I. Andriessse, et R. G. F. Wintermans, « Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material », *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 16, n° 6, p. 704-710, juin 2010.
- [155] L. Turin, F. Riva, G. Galbiati, et T. Cainelli, « Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens », *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 30, n° 6, p. 511-518, juin 2000.
- [156] I. Dhib, A. Fathallah, I. B. Charfeddine, S. G. Meksi, M. B. Said, F. Slama, et R. Zemni, « Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis », *J. Mycol. Médicale J. Med. Mycol.*, vol. 22, n° 3, p. 249-255, sept. 2012.
- [157] Y. Miyajima, K. Satoh, T. Uchida, T. Yamada, M. Abe, S. Watanabe, M. Makimura, et K. Makimura, « Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes », *J. Dermatol. Sci.*, vol. 69, n° 3, p. 229-235, mars 2013.
- [158] J. Brasch, V. Beck-Jendroschek, et R. Gläser, « Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay », *Mycoses*, vol. 54, n° 5, p. e313-317, sept. 2011.

N° d'identification :

TITRE

**Optimisation de la stratégie diagnostique des onychomycoses : du
prélèvement à l'identification fongique.**

Evaluation d'un kit diagnostique de PCR en temps réel.

Thèse soutenue le 30 janvier 2014

Par Dimitri PETINATAUD

RESUME :

Depuis les dernières décennies, l'utilisation de la PCR s'est développée en microbiologie. Le diagnostic des onychomycoses repose sur des outils classiques de mycologie alliant observation microscopique directe et mise en culture des prélèvements. Dans ce travail, nous proposons un état des lieux des connaissances actuelles sur les onychomycoses et nous présentons l'évaluation d'un kit PCR en temps réel commercialisé par la société Bio-Evolution et ciblant uniquement les dermatophytes.

Cette étude a été menée sur 180 échantillons issus de 90 patients consultant au CHU de Nancy et nous avons comparé les résultats de la PCR aux techniques actuellement utilisées dans le laboratoire de mycologie du CHU.

Les patients inclus dans cette étude ont subi deux prélèvements de qualités différentes pour mieux apprécier l'impact de cette étape sur les différentes techniques de cette étude.

Notre analyse a montré que ce kit présente une meilleure sensibilité que les méthodes de diagnostic classique. Après avoir discuté des avantages et inconvénients des méthodes moléculaires dans ce contexte, en considérant la littérature, nous proposons une stratégie pour optimiser le diagnostic des onychomycoses.

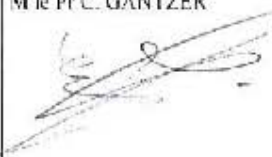




MOTS CLES : dermatophytes, onychomycoses, diagnostic, identification, mycologie, biologie moléculaire, PCR, kit, prélèvement

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

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène/Environnement
 3 – Médicament 4 – Alimentation – Nutrition
 5 - Biologie 6 – Pratique professionnelle

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : le jeudi 30 janvier 2014 à 14h

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Dimitri PETINATAUD</p> <p><u>Sujet :</u></p> <p>Optimisation de la stratégie diagnostique des onychomycoses : du prélèvement à l'identification fongique.</p> <p>Evaluation d'un kit diagnostique de PCR en temps réel.</p> <p><u>Jury :</u></p> <p>Président : M.C. GANTZER Professeur</p> <p>Directeur : Mme M. MACHOUART Professeur</p> <p>Juges :</p> <p>M. J.L. SCHMUTZ Professeur</p> <p>Mme N. CONTET-AUDONNEAU Docteur</p> <p>Mme V. LETSCHER-BRU Docteur</p>	<p align="center">Vu,</p> <p align="center">Nancy, le 14.01.2014</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p>M le Pr C. GANTZER Mme le Pr. M. MACHOUART</p>  
<p align="center">Vu et approuvé,</p> <p align="center">Nancy, le 14.01.14</p>  <p align="center">p.o. Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine.</p> 	<p align="center">Vu,</p> <p align="center">Nancy, le 20.01.2014</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p>  <p align="center">Pierre MUTZENHARDT</p> <p align="center">N° d'enregistrement : 6735</p>

N° d'identification :