



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH**  
**FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES**  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence Sciences & Techniques**  
**Sciences Biologiques Appliquées et Santé**  
**(LST - SBAS)**

**Intérêt de l'uréase dans l'identification des  
champignons**

**Présenté par : ELABID Aya**

**Encadré par : PR. Said Haloti (FST FES)**

**PR. Telmçani Zineb(CHU FES)**

**Dr. BEN-SAGHROUNE Hayat(CHU FES)**

**Soutenu le : 04/07/2022**

**Devant le jury composé de :**

- Pr.Haloti Said
- Pr.SEFRIOUI SAMIRA
- Dr.Hayat BEN-SAGHROUNE

**Stage effectué à :Laboratoire de parasitologie-mycologie CHU FES**

**Année universitaire 2021-2022**

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à ma Chère famille qui m'a doté d'une éducation digne qui m'ont encouragé et qui sont ma source d'inspiration.*

*A ma Chère maman*

*Vous avez été toujours à mes côtés pour me soutenir et m'aider.*

*Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A vous mon cher frère wissam et ma belle sœur israe*

*A tous mes chers amis et collègues que je considère comme une deuxième famille.*

*A tous les gens qui ont contribué à la réalisation de ce travail. A tous les techniciens de laboratoire de Parasitologie qui m'ont aidé à apprendre énormément de connaissances.*

# *Remerciement*

Au terme de ce travail, je tiens à présenter mes sincères remerciements à ceux qui m'ont beaucoup appris au cours de ce stage, et à ceux qui ont eu la gentillesse de m'aider par leurs présences et leurs conseils.

J'adresse mes vifs remerciements à mon encadrant, Professeur Haloti Saïd à la Faculté des Sciences et Techniques Fès, pour votre soutien, votre disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Je garde un excellent souvenir de la qualité de l'enseignement que vous m'avez prodigué. J'ai eu la chance et le privilège de travailler sous votre direction, de profiter de votre culture scientifique, vos compétences professionnelles ainsi que vos qualités humaines qui vous valent l'admiration et le respect. Je saisis cette occasion pour vous exprimer ma gratitude tout en vous témoignant mon respect.

Je tiens à remercier Professeur Telmçani zineb chef de laboratoire de parasitologie-mycologie au sein de CHU FES, pour votre encadrement, votre soutien, vos connaissances scientifiques qui ont permis d'enrichir ce travail. Vos conseils et votre bienveillance pour assurer le bon déroulement du travail.

Mes chaleureux remerciements à Dr.BEN-SAGHEROUNE Hayat, vous m'avez fait le grand honneur d'accepter de me diriger dans ce travail avec bienveillance et rigueur. Votre attachement au travail bien fait est l'objet de ma considération. Votre amabilité, votre dynamisme, votre dévouement pour ce travail et votre compétence ont suscité mon admiration. J'espère être digne de la confiance que vous avez placée en moi en me guidant dans l'élaboration et la mise au point de ce travail.

Finalement, je remercie les membres du jury et particulièrement professeur SEFRIQUI SAMIRA pour m'avoir honorée en acceptant d'évaluer et de juger ce travail. Nous vous prions, d'accepter dans ce travail le témoignage de notre haute considération, de notre profonde reconnaissance et notre sincère respect.

# *Listes des Figures*

<b>Figure 1:</b> Organisation de Hyphe des champignons microscopiques.....	2
<b>Figure2:</b> Aspect filamenteux d'un champignon microscopique.....	2
<b>Figure 3:</b> Aspect levuriformes sous microscope (Etat Frais).....	3
<b>Figure4:</b> Aspect microscopique d'un champignon Dimorphiques.....	4
<b>Figure5:</b> Photo d'une teigne tondante microscopique.....	6
<b>Figure6:</b> Photo d'une teigne tondante trichophytique.....	6
<b>Figure 7:</b> Photo de teigne inflammatoire.....	6
<b>Figure 8:</b> Photo d'un ongle de pied (onyxis).....	7
<b>Figure9:</b> Photo de l'ensemble de matériels utilisés.....	13
<b>Figure10:</b> Solution de Potasse(KOH).....	15
<b>Figure 11:</b> Photo des différents Milieu Sabouraud.....	15
<b>Figure 12:</b> Photo du réactif d'urée et des micropipette utilisés pour le Test à l'uréase.....	15
<b>Figure 13:</b> Résultat Positive et Négative du Test à Uréase.....	17
<b>Figure 14:</b> Résultats de la réaction du test à l'uréase.....	17
<b>Figure 15:</b> Proportion de souches trouvées au sein du Laboratoire de Parasitologie.....	19
<b>Figure17:</b> Aspect macroscopique(a)et microscopique(b) sur sabouraud (× 40) de Scopulariopsis sp.....	20
<b>Figure 18:</b> Aspect microscopique d'un Aspergillus (× 40).....	20
<b>Figure 19:</b> Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) de trichophyton Rubrum.....	21
<b>Figure 20:</b> Aspect macroscopique (a) et Microscopique (b) de Trichophyton Violaceum...	21
<b>Figure 21:</b> Aspect macroscopique sur milieu chromogène de Candida Albicans.....	22
<b>Figure 22:</b> Aspect macroscopique sur milieu chromogène de Candida Tropicalis.....	22
<b>Figure 23:</b> Aspect macroscopique de levure Candida Glabrata sur milieu chromogène.....	23
<b>Figure 24:</b> Aspect macroscopique(b) et microscopique(a) (×40) de Géotrichum.....	23

## *Liste des Tableaux*

<b><u>Tableau 1</u></b> : récapitulatif de Test Uréases pour les différents Champignons trouvés.....	18
<b><u>Tableau 2</u></b> : Récapitulation des durées de positivité des souches.....	19

# *Sommaire :*

## **Partie Bibliographique**

<b>Introduction</b> .....	1
<b>I. Mycologie</b> .....	2
1. <b>Définition des champignons</b> .....	2
2. <b>Organisation et Structure des champignons</b> .....	2
3. <b>Classification des champignons</b> .....	3
a. <b>Aspect Filamenteux</b> .....	3
b. <b>Aspect levure</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
c. <b>Aspect Dimorphique</b> .....	4
4. <b>Nutrition</b> .....	5
5. <b>Pouvoir Pathogène des champignons</b> .....	5
6. <b>Epidémiologie des mycoses</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1. <b>Différents types d'infections fongiques</b> .....	6
6.1.1 <b>Les Dermatophytoses</b> .....	6
6.1.1.1 <b>Les teignes</b> .....	6
6.1.1.2 <b>L'Onyxis</b> .....	7
6.2 <b>Levures</b> .....	8
6.3 <b>Facteurs favorisant l'atteinte mycologiques</b> .....	8
6.4 <b>Mode de contamination</b> .....	9
6.5. <b>Milieus de cultures mycologiques</b> .....	9
6.6. <b>Tests d'identification des champignons</b> .....	10
7. <b>Test d'uréase</b> .....	10
<b>Matériels et Méthodes</b> .....	12
<b>Introduction</b> .....	13
<b>1. Matériel</b> .....	13
1.1 <b>Matériel biologiques</b> .....	14
1.1.1 <b>Prélèvement</b> .....	14
1.1.2 <b>Examen Direct</b> .....	14
1.1.3 <b>Culture</b> .....	14
<b>2. Méthodes</b> .....	15
2.1. <b>Préparation du milieu Sabouraud</b> .....	15

2.2. Mode opératoire .....	15
3. Résultats et discussions.....	17
Conclusion .....	25
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>26</b>

# **Présentation de la Structure d'accueil**

Les travaux de constructions du Centre Hospitalier Hassan II de Fès ont démarrés en novembre 2001 et c'est en Janvier 2009 que le nouveau complexe hospitalier a été inauguré par sa majesté le Roi Mohamed VI.

Le CHU est un centre hospitalier universitaire composé de 5 hôpitaux à savoir :

- Hôpital des Spécialités
- Hôpital Mère-Enfant
- Hôpital d'Oncologie
- Hôpital Omar Drissi
- Hôpital Ibn Al Hassan

Il est composé de plusieurs services répartis sur des bâtiments identifiés par l'ordre alphabétiques, et celui qui nous intéresse dans ce travail est le Laboratoire central des analyses médicales. Il est situé au bâtiment J et comporte plusieurs services :

<b>Service d'hématologie</b>	<b>Service d'Anatomie-pathologie</b>
<b>Service de biochimie</b>	<b>Service de Génétique médicale et biologie</b>
<b>Service de Parasitologie</b>	<b>Service de Bactériologie- Immuno-Analyses</b>

Notre stage s'est déroulé au sein du service de Parasitologie dont le rôle est de faire des tests mycologiques parasitologiques.

Le service se devise en 3Unités :

- Unité de Mycologie : A la recherche des champignons et Levures isolés dans des liquides d'origine humaine.
- Unité de parasitologie des selles (EPS) : Coproculture à la recherche des parasites dans les selles.
- Unité de Sérologie : A la recherche des anticorps spécifiques pour diagnostiquer la pathologie.

**Partie**  
**Bibliographique**



# Introduction

Les mycoses font partie des maladies négligées selon l’OMS. Elles sont des affections ne mettant pas en jeu le pronostic vital. Toutefois, par leur ténacité, leur contagiosité et leur impact négatif sur la qualité de vie des personnes atteintes et leurs fréquences, ces mycoses sont une réelle préoccupation de santé publique. Elles constituent un motif fréquent de consultation en pratique médicale courante. Les manifestations cliniques sont variables entraînant le retard du diagnostic et de la prise en charge.

Les mycoses étant définies comme des lésions qui s’installent chez l’Homme à cause des champignons microscopiques pathogènes liés soit à une localisation profonde qui est primitivement et secondairement au niveau des tissus sous cutanés ou par envahissement d’os ou d’un viscère, soit liés à une localisation superficielle caractérisée par une atteinte de la peau et des muqueuses ainsi que les muqueuses tels que les levures, les dermatophytes et les teignes superficielles.

Ainsi l’objectif de notre travail, étant d’isoler et d’identifier les champignons trouvés dans divers prélèvements d’origine humaine, en se basant sur le test à l’uréase et sur son intérêt dans le diagnostic mycologique au sein du laboratoire de parasitologie-mycologie du centre Hospitalier Hassan II FES.

## **I. Mycologie :**

La mycologie médicale est la branche de la médecine et plus spécifiquement de la biologie médicale consacrée à l'étude des champignons filamenteux, levuriformes... [2]

C'est une science compliqué qui demande des années d'études et d'expériences ainsi que le nombre d'espèces est assez important d'où la nécessité de l'introduction de différents tests d'identification capables de différencier entre les différents champignons.

### **1. Définition des champignons :**

Les champignons microscopiques sont des Organismes unicellulaires ou pluricellulaires dont les cellules possèdent un noyau (eucaryotes). Ils ne sont ni des plantes (dépourvus de chlorophylle) ni des animaux (non mobile) et créent un règne appelé Fungi. Leur nutrition se fait par absorption exigeant une source de carbone qui provient des matières organiques en décomposition (saprophyte), on les qualifie d'hétérotrophes.

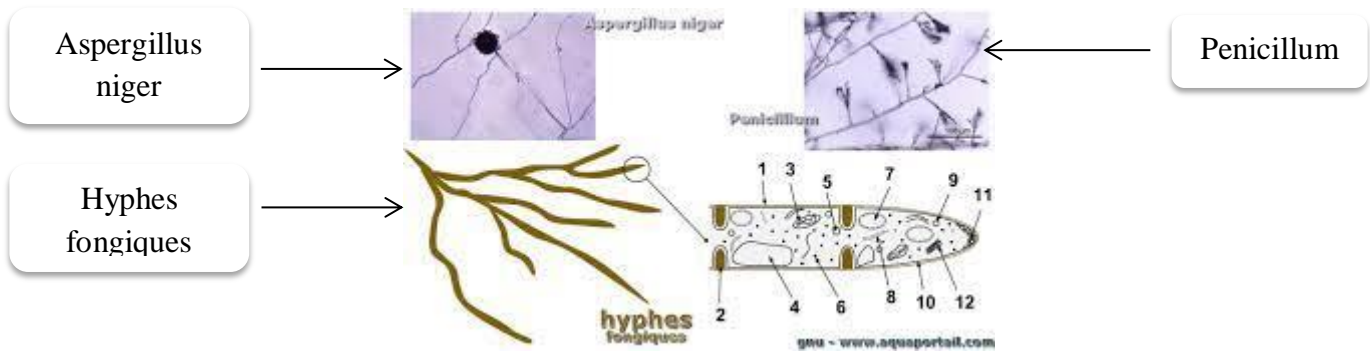
Les champignons peuvent être soit pathogènes dont on connaît à peine 150 espèces et sont responsables de mycoses superficielles, des lésions cutanées et profondes soit bénins et ne causent la maladie que si l'immunité est affaiblie, ils sont dites opportunistes.

Il existe des champignons dites commensales qui s'installent au niveau des structures de l'hôte et tire profit (tous ses besoins) sans nuire à ce dernier, mais aussi sans lui porter d'avantage, il existe un équilibre dynamique entre le commensalisme et le parasitisme. Si ce dernier est rompu, les champignons commensales peuvent devenir parasites et causent la pathologie (Exemple des candidoses).

### **2. Organisation et Structure des champignons :**

L'organisation cellulaire des champignons est appelée le thalle. Chez les Champignons microscopiques, les cellules peuvent être unicellulaires exemple (levure *saccharomyces cerevisiae*) ou Dimorphiques (changent de forme selon les conditions de milieu) ou encore pluricellulaire (moisissures). Cependant, certaines levures sont capables de former des structures filamenteuses (pseudomycélie) sous certaines conditions.

L'unité cellulaire des champignons est appelé hyphes. C'est une cellule tubulaire emprisonnée dans une paroi rigide de chitine (Figure 1). L'ensemble de ces hyphes constitue le mycélium ou thalle qui est le constituant essentiel du sporophore qui représente un moyen nécessaire dans la reproduction asexuée ou sexuée de ces champignons.



**Figure 1: Organisation de Hyphe des champignons microscopiques**

### **3. Classification des champignons :**

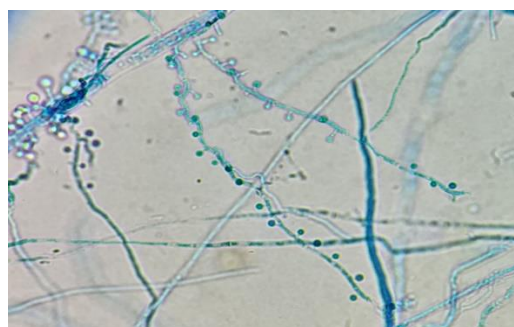
Les champignons font partie très longtemps du règne végétal, mais actuellement sont classés dans un règne fongique à part : Fungi

Cette classification est basée sur : La taille, la morphologie, le type de spore ou de reproduction.

#### **a. Aspect Filamenteux**

C'est un aspect fondamentale des champignons qui est souvent cotonneux, les filaments sont ramifiés et très fins dont l'ensemble forme un mycélium (Figure2).

Il existe 2 types de Mycélium : ceux qui sont Siphonnés dont les filaments ne présentent pas de cloisons, on les appelle des SIPHONS dont les hyphes sont beaucoup plus larges (10 à 15  $\mu\text{m}$ ), et ceux qui sont cloisonnés dont les filaments sont réguliers et fins avec septum (cloison transversales) qualifiés des HYPHES dont les hyphes sont fins (5 à 7  $\mu\text{m}$  de large).



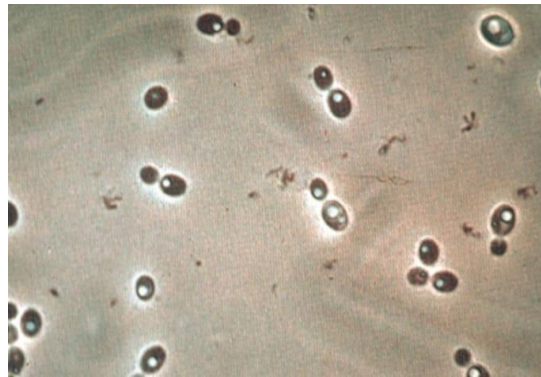
**Figure 2: Aspect filamenteux d'un champignon microscopique coloré au Bleu de Lactophénol**

**b. Aspect levure :**

Le thalle se réduit à un état unicellulaire, leur hyphes s'individualise en plusieurs cellules arrondies (pseudo-mycélium).

Les levures ont une petite taille comprise entre 10 et 50  $\mu\text{m}$  (Figure3), leur forme est variable selon l'espèce et peut être sphérique, ovoïde, allongée ou cylindrique et se reproduisent par bourgeonnement.

Certaines levures, appartenant par exemple au genre *Candida*, peuvent donner naissance par bourgeonnement successif à un pseudo mycélium ou même à des filaments mycéliens vrais.



**Figure 3:Aspect levuriformes sous microscope (Etat Frais)**

**c. Aspect Dimorphique :**

Les champignons Dimorphiques sont des champignons qui se présentent sous deux formes différentes:

Forme levure: forme parasitaire in vivo dans les organes du malade. C'est une forme intracellulaire, de 2 à 4  $\mu\text{m}$  (Figure4), entouré d'un halo clair (pseudo-capsule).

Forme mycélienne: forme saprophytique(forme de contamination).C'est une forme filamenteuse à 25°C avec mycélium produisant différents types de spores: microconidies unicellulaires et macroconidies pluriseptées. [3]



**Figure 4: Aspect microscopique d'un champignon Dimorphiques coloré au Bleu de Lactophénol**

#### **4. Nutrition :**

Les champignons sont des organismes hétérotrophes, incapables de synthétiser leurs molécules carbonées à partir du dioxyde de carbone atmosphérique. Ils vivent aux dépens de matières organiques préformées, le passage de ses substances se fait par absorption. La majorité des champignons sont capables de se développer sur des milieux très simples contenant une source de carbone (glucose) et d'azote (sulfate d'ammonium) et des sels minéraux (potassium, phosphate, magnésium, fer et zinc). Quelques-uns nécessitent pour leur croissance l'apport de vitamines telles la thiamine ou la biotine. [5]

#### **5. Pouvoir Pathogène des champignons**

Les champignons pathogènes sont responsables d'infections généralisées et représentent un problème majeur de santé mondiale, ils peuvent être responsables chez l'Homme d'infections résultant du parasitisme, mycoses superficielles ou profondes le plus souvent opportunistes.

Les patients immunodéprimés sont particulièrement vulnérables à ces infections. Parmi les différentes espèces de champignons, *Candida albicans* est impliqué dans plus de la moitié des candidoses et toujours considéré comme un agent pathogène. Cette levure est responsable d'infections des muqueuses gynécologiques et digestives, qui peuvent évoluer en maladies systémiques.

La notion de « champignons opportunistes » est née de ces situations où l'Homme, devient plus réceptif à des espèces fongiques issues de l'environnement ou déjà présentes dans l'organisme « hôte », dont le pouvoir pathogène est quasi nul chez le sujet sain. Les champignons sont de deux types :

- ❖ les opportunistes commensaux habituel de l'Homme qui appartiennent au microbiote et n'entraînent pas de lésions. Ils sont habituellement retrouvés au niveau du revêtement et des muqueuses digestive ou vaginale (*Candida albicans*).
- ❖ champignons opportunistes d'origine exogène qui regroupent les micromycètes de notre environnement (*Cryptococcus néoformans*) et qui possèdent de réels facteurs de virulences qui vont s'exprimer chez les sujets fragilisés présentant des facteurs de risque spécifiques. [6]

## **6. Epidémiologie des mycoses :**

Les champignons les plus répandus dans le monde, provoquent des maladies parasitaires qui se localisent sur la peau, sous-cutané ou dans des organes internes. Au cours de ces dernières années l'incidence des infections fongiques superficielles ainsi que profondes a augmenté, le nombre de champignons incriminés en pathologie humaine est passé de moins d'une trentaine d'espèces dans les années 50 à plus de 400 actuellement. [8]

### **6.1. Différents types d'infections fongiques :**

#### **6.1.1 Les Dermatophytoses**

##### **6.1.1.1 Les teignes :**

Ce sont des lésions qui correspondent à une atteinte du cuir chevelu par (*tinea capitis*) pour les enfants avant la puberté. Elle est plus rare chez les femmes et beaucoup plus chez l'homme adulte, sauf pour les teignes faviques qui peuvent débuter dans l'enfance et évoluer durant toute la vie quel que soit le sexe. D'autre part elle peut être liée à une atteinte des poils de barbe ou de moustache. Ils sont de deux types :

a. Les Teignes tondantes : Elles touchent principalement l'enfant d'âge scolaire surtout les garçons. Ce type de teigne provoque une cassure plus ou moins proche du point d'émergence du cheveu et on distingue deux formes :

- ❖ Les Teignes tondantes microscopiques correspondent à des grandes plaques ovalaires de 2 à 4 cm de diamètre squameuses (Figure5), avec des cheveux cassés courts, peu ou pas inflammatoires bien limitées d'un à plusieurs centimètres de diamètre. Ils sont souvent transmis par les animaux domestiques (chat, chien...).
- ❖ Les teignes tondantes trichophytiques : Il s'agit de petites plaques grisâtres de 1 à 2 cm de diamètre (Figure6), de forme irrégulière squameuses, parfois peu visibles pouvant secondairement fusionner pour former de grandes plaques. Elle est due généralement à l'espèce *Trichophyton*. [9] [10]



**Figure 5:Photo d'une teigne tondante microscopique**

**Figure 6:Photo d'une teigne tondante trichophytique<sup>[1]</sup>**

- b. *Teignes faviques*: Ce type de teigne est très contagieuse et se présente au départ comme une petite croûte jaunâtre friable centrée par un cheveu qui en grandissant et en fusionnant prend l'aspect d'un godet. L'aspect de ces cheveux montre une fluorescence de couleur vert-jaune sur toute leur longueur à la lampe de Wood (outil de visualisation).<sup>[11]</sup>
- c. *Teignes inflammatoires*: Elles sont plus rares et peuvent atteindre l'enfant, la femme adulte (kérion de Celse) ou l'homme au niveau de la barbe (sycosis) sous forme d'une folliculite aiguë suppurée (Figure 7). Provoquée par (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum*).<sup>[12]</sup>



**Figure 7:Photo de teigne inflammatoire<sup>[2]</sup>**

#### 6.1.1.2 *L'Onyxis* :

C'est une inflammation du derme sous l'ongle entraînant l'épaississement et la déformation de ce dernier. Les champignons responsables sont soit des dermatophytes (voisins de ceux des teignes du cuir chevelu) soit des levures de l'espèce *Candida albicans*.<sup>[13]</sup>



**Figure 8:Photo d'un ongle de pied (onyxis)<sup>[3]</sup>**



## 6.2 Levuroses :

Une levurose est une affection parasitaire causée par un champignon microscopique (micromycète) de type levure. Elle constitue donc un type de mycose et entre dans le champ de la mycologie médicale.

Les deux types de levurose les plus communes chez l'homme sont les candidoses, causées par des levures du genre *Candida* et la cryptococcose causée par *Cryptococcus neoformans*.

- ❖ Les Candidoses : Les champignons levuriformes du genre *Candida* sont les agents responsables de candidoses. C'est une infection due à *Candida. spp* qui se manifeste par des lésions cutanéomuqueuses. Les infections peuvent se produire n'importe où et sont plus fréquentes au niveau des plis cutanés et sur les organes génitaux. <sup>[14]</sup>
- ❖ Les Cryptococcose : C'est une maladie fongique la plus grave qui affecte les humains causées par *Cryptococcus* qui est un champignon environnemental unique présent dans les sols contaminés. Ce champignon pathogène provoque des méningites chez les personnes immunodéprimées. <sup>[15]</sup>

## 6.3 Facteurs favorisant l'atteinte mycologiques :

- ❖ Les Hormones : Les femmes résistent mieux que les hommes à de nombreuses mycoses, sauf pendant la grossesse et lors de la prise contraceptive orale...les mycoses sont favorisées.
- ❖ Les causes iatrogènes ont multiplié par 3 à 10 le risque fongique :
  - Des médicaments qui exercent un effet dépressur sur le système immunitaire (corticoïde immunosuppresseur, chimiothérapie).
  - Des médicaments qui perturbent la flore commensale endogène et favorisent le développement des germes opportunistes. L'usage d'antibiotiques à large spectre favorise la colonisation de la bouche par les levures *Candida*.

- ❖ Rupture des barrières cutanées et muqueuses

- Au niveau d'excoriations cutanées ou muqueuses même minimales.
- les techniques de réanimation comme le cathétérisme, l'usage de sondes, le matériel de dialyse, certains actes chirurgicaux sont des sources classiques d'infections fongiques nosocomiales.

- ❖ Certaines professions : Bergers, agriculteurs, vétérinaires...
- ❖ Pratiques de sports : équitations, natation.



- ❖ Les voyages et le brassage des populations facilitent la propagation des espèces exotiques.
- ❖ De nombreux états pathologiques favorisent la survenue d'une mycose : traumatisme cutanés, diabète ; SIDA etc...<sup>[16]</sup>.

#### **6.4 Mode de contamination :**

##### ➤ Mycoses d'origine exogène :

Les champignons pénètrent dans l'organisme via :

- La voie respiratoire ou pulmonaire par inhalation.
  - La voie cutanée :
    - Mycoses superficielles provoquées par les espèces kératinophile (dermatophytes)
    - Mycoses sous-cutanées ou profondes qui s'infiltrant par une porte d'entrée : piqûres d'épines ou d'aiguilles, blessures, plaies opératoires, brûlures...
  - La voie sanguine et tissulaire : cathéter, interventions chirurgicales.
  - La voie muqueuse :
    - Les voies urogénitales : relations sexuelles ; pose sondes urinaires.
    - La voie gastro-entériques : ingestion d'aliments souillés (produits laitiers, fruits..).
- Mycoses d'origine endogène :

Les champignons sont présents à l'état commensal au niveau des muqueuses de l'hôte deviennent pathogènes à la suite d'un développement excessif.

Les plus fréquents sont les Candidoses : *Candida albicans*, commensale de l'intestin et des muqueuses est toujours pathogène au niveau de la peau et dans certains liquides biologiques.

#### **6.5. Milieux de cultures mycologiques :**

- ❖ Les milieux de cultures doivent apporter des éléments nutritifs permettant de favoriser la croissance des champignons ou levures à savoir :
  - Source de carbone (sucre : Glucose Fructose...).
  - Source d'azote (Peptone : apport au milieu de culture des acides aminés, des peptides (source d'énergie)).
  - Un pH convenable à leur développement.

Le principal milieu de culture sélectif utilisé pour l'isolement des dermatophytes, des levures et de divers autres champignons est le Milieu Sabouraud stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20min, et les différents milieux sabouraud utilisés sont :

- Gélose Sabouraud Simple.
- Gélose Sabouraud au Chloramphénicol (antibiotique qui empêche la croissance des bactéries).
- Gélose Sabouraud Actidione (inhibe les *Aspergillus*, les levures du genre *Cryptococcus*, certaines levures du genre *Candida*).
- ❖ Solution de Potasse (KOH) : c'est un produit éclaircissant permettant la mise en évidence des filaments et de levures lors de l'examen microscopique.

### **6.6. Tests d'identification des champignons :**

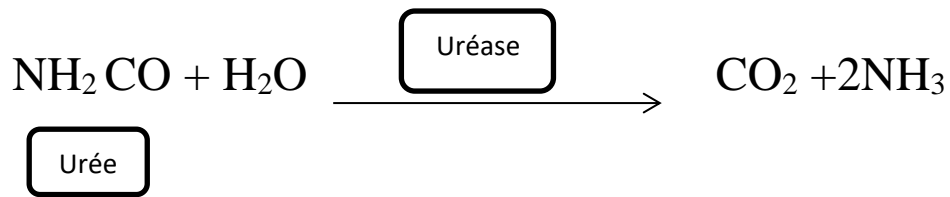
Il s'agit d'une série de tests :

- Test de filamentation sur sérum (3 H) : Il permet la mise en évidence des filaments afin de caractériser les germes de type *Candida albicans*.
- Test de chlamydosporulation sur des milieux pauvres : à la recherche de pseudofilaments par culture sur des milieux pauvres en sucre à 27°C, 24-48H.
- Test d'assimilation des sucres : Auxanogramme permet de déterminer l'influence des différentes conditions environnementales microbiennes pour la croissance et le développement des champignons (48 à 72 H).
- Tests d'identification rapide : -RTT *glabrata* (Rapid trehalose test): est basé sur la capacité de *Candida glabrata* à hydrolyser le tréhalose mais pas le maltose. Il nécessite un inoculum de seulement quatre à six colonies, et les résultats sont obtenus en 20 min.
- Tests d'agglutination sur des particules de latex : Ce test permet de distinguer l'espèce *C. albicans* par agglutination de particules de latex sensibilisées par un anticorps monoclonal qui lui est spécifique (15 min).
- L'identification des espèces par spectrométrie de masse : Permet la séparation des molécules transformées en ions en fonction de leur rapport masse/charge.
- Test d'uréase.

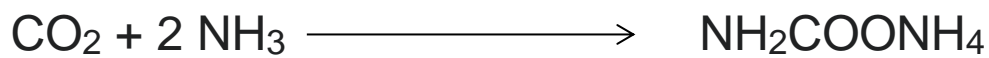
### **7. Test d'uréase :**

L'uréase appartient à la superfamille des amidohydrolase, ce sont des métaloenzyme contenant le Nickel de poids moléculaire élevé. Ils se trouvent dans de nombreuses levures, bactéries, champignons ainsi que dans le sol autant qu'un enzyme de sol.

L'uréase est un enzyme qui catalyse la transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac sous la réaction :



L'Hydrolyse de l'urée se fait en deux étapes : Dans un premier temps sont produit les carbamate d'ammoniac, les Carbamates s'hydrolysent rapidement et spontanément en acide carbonique et en ammoniac.



L'activité uréasique augmente le pH de l'environnement au fur et à mesure que la production d'ammoniac ( qui est basique) augmente.

Cet enzyme est un critère biochimique dans l'identification des champignons.

chez les levures les uréases sont cytoplasmique et ont été découvertes comme ayant une activité uréolytiques.

#### L'intérêt du test :

Le test à l'uréase est un test rapide permet la visualisation d'un résultat positif ou négatif au bout de quelques heures. Il permet de distinguer entre les souches des champignons qui ont un aspect microscopique identiques (les même filaments par exemple) tout en se basant sur la couleur du milieu.

#### Principe du test :

L'Hydrolyse de l'urée par l'uréase aboutit à la formation d'ammoniac qui alcalinise le milieu ce qui permet le changement de pH qui est détecté par un changement de couleur du phénol d'un orange clair (à pH =6,8) à un rose fushia (à pH=8,1).

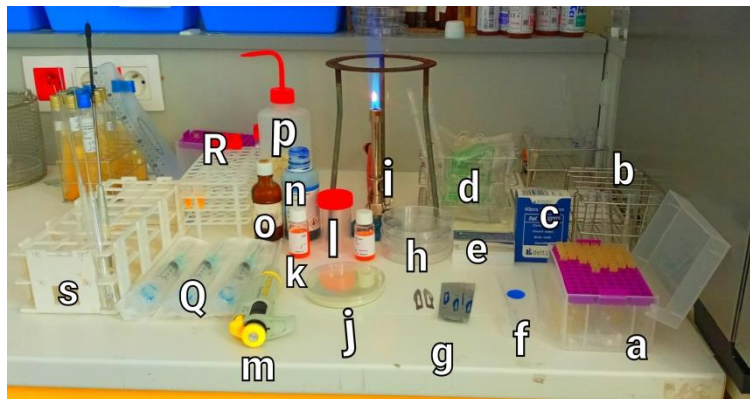
# **Matériels et Méthodes**

## Introduction

Pendant deux mois de stage, 151 prélèvements ont été réalisés au sein de laboratoire de parasitologie-mycologie du centre Hospitalier Hassan II. L'objectif de notre projet de fin d'études porte sur l'identification et la caractérisation de ces champignons isolés au niveau de plusieurs sites infectés par l'utilisation du test à l'urée.

## 1 Matériels

- Dans notre étude l'ensemble de matériels utilisés est le suivant :



**Figure 9: Photo prise au service de parasitologie –mycologie de l'ensemble de matériels utilisés**

- a : Cône jaune*
- b : Tubes à hémolyse*
- c :Lame*
- d :sérum*
- e :Lamelle*
- f :conte gouttes*
- g :lame de bistouri*
- h :Boîte de pétri*
- i :Bec Benzen*
- j :milieu chromogène*
- k :milieu de l'urée*
- L :Flacon*
- m :Pipette*
- n :Bleu de Lactophénol*
- o :solution de potasse (KOH)*
- p :Eau physiologique*
- Q :Seringue*
- R :eppendorf*
- S :ensemenseur*

## **1.1 Matériels biologiques**

### **1.1.1 Prélèvement :**

Le Prélèvement doit être en dehors de tout traitement antifongique ou après l'arrêt du traitement 2 semaines à 2 mois avec un matériel stérile et doit intéresser des tissus parasités par des champignons.

Plusieurs région du corps humain font l'objet d'un prélèvement en vue d'un examen mycologique :

- **De la peau glabre :**

On Prélève les squames, en périphérie des lésions.

+Si lésions squameuses on utilise un écouvillon ou compresses.

+En cas de suspicion on utilise le Scotch test cutané.

+Si c'est du pus ou de la lymphe on utilise un écouvillon.

- **Des cheveux et des poils :**

On prélève en périphérie et sur les plaques d'alopecie.

+Si c'est des squames ou croûtes on procède avec des curettes.

+Si c'est des poils ou des cheveux on utilise une pince à épiler.

- **Des Ongles :**

On gratte et on découpe l'ongle en utilisant une lame de Bistouri.

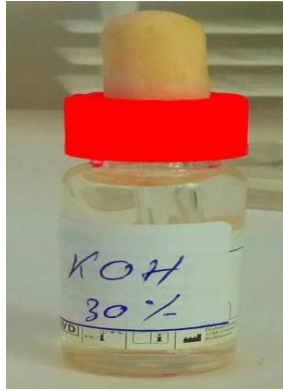
- **Le Sang (Hémoculture), Biopsie, Pus ...**

### **1.1.2 Examen Direct :**

Il s'agit d'un examen direct à l'état frais des prélèvements par l'utilisation du potasse (KOH) 30% mettant en évidence des filaments de 2 à 4 µm de diamètre cloisonnés ou septés et parfois ramifiés témoignent de la croissance des champignons.

### **1.1.3 Culture :**

La culture est réalisée sur des milieux fongiques spécifiques (milieu de Sabouraud). Elle permet l'identification précise du genre et de l'espèce du champignon impliqué. La pousse se fait en 3 à 5 jours à 25–30 °C et 37 °C. L'aspect macroscopique et l'analyse microscopique de la culture permettent le diagnostic du champignon.



**Figure 10: Solution de Potasse (KOH)**



**Figure 11: Photo des différents Milieu Sabouraud**

- Matériels utilisés pour l'identification de ces champignons trouvés par le Test à l'uréase :



**Figure 12: Photo du réactif d'urée et des micropipette utilisés pour le Test à l'uréase**

## **2 Méthodes :**

### **2.1. Préparation du milieu Sabouraud**

On dissout 42 grammes de poudre d'agar dans 1 litre d'eau distillée. On chauffe lentement tout en agitant fréquemment, puis on porte le tout à l'ébullition jusqu'à dissolution complète. On répartit la solution préparée à raison de 8 ml par tubes sous forme inclinés et on les stérilise à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Pour la gélose sabouraud chloramphénicol, on ajoute l'antibiotique éventuellement et on homogénéise le tout, puis on coule la solution dans les tubes inclinés. On laisse refroidir et on met les tubes au réfrigérateur à 4°C.

### **2.2. Mode opératoire**

Outils de prélèvement : Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une lame à Bistouri et une Boite de Pétri Stérile en cas d'un ongle, squames, cuir chevelu ...etc.

Une fois les prélèvements sont réalisés et avant de procéder à la culture on commence, par l'identification des prélèvements selon l'ordre dans un registre où il était mentionné le N°, le service, type de Prélèvement ...

Des étiquettes sont Préparées pour l'identification des tubes de Gélose Sabouraud. Trois températures sont utilisées :

En cas d'un Prélèvement externe (ongle,cuir chevelu...) on incube les tubes de gélose sabouraud aux température suivante :

- ❖ Sabouraud Simple : 27 C°
- ❖ Sabouraud Actidione : 27 C°
- ❖ Sabouraud Chloramphénicol (2 tubes sont utilisés) un est incubé à 37 C° et l'autre à 27C°.

En cas d'un Prélèvement profond : (pus,sang,crachat...)

- ❖ Sabouraud Simple : 37C°
- ❖ Sabouraud Actidione : 37C°
- ❖ Sabouraud Chloramphénicol : un à 37C° et l'autre à 27C°.

Dans des conditions stériles,l'ensemencement consiste à déposer des petits fragments de prélèvements réalisés sur la gélose sabouraud inclinée contenue dans des tubes à essais. Pour des prélèvements liquides comme les Hémoculture...,on a mis des stries sur la gélose et puis on a fait couler la solution soit par une seringue ou des contes gouttes et on a incubé dans l'étuve à 37C°.

Pour l'examen direct, une goutte de solution contenant des fragments d'ongle dilué dans une solution de potasse, et laissé toute une nuit est mis entre lame est lamelle et observer sous microscope. Après croissance des champignons on a réalisé le test à l'uréase de la manière suivante :

Le tube contenant le bouillon à l'urée de Rustigian et Stuart, a été inoculé abondamment à partir d'une culture pure de 18 à 24 heures soumis à une légère agitation pour suspendre les colonies.

Les tubes ensemencés sont incubés à 35°C dans une étuve pendant 24 heures. Le lendemain on a examiné les bouillons pour le changement de couleur.



### **3 Résultats et discussions:**

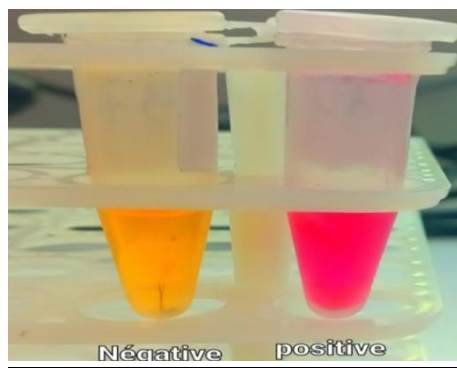
Pendant la période d'étude, 151 Prélèvements ont été réalisés au service de parasitologie-mycologie, dont 91 ont été incubés à 27°C de types ongle, cheveux... et 60 incubés à 37°C (sang, crachat...). Cette différence de température d'incubation dépend de la nature des prélèvements.

Grâce à l'utilisation du test à l'urée appliqué sur les différents prélèvements, nous avons confirmé l'identification des différents champignons, levures et moisissures dans les différents prélèvements réalisés au laboratoire mycologiques.

L'inoculum de 2 à 3 colonies à partir d'une culture pur de 24 heures dans le bouillon de l'urée aboutit à des résultats différents pour chaque microorganisme examiné :

#### **❖ Résultat du test à l'urée :**

- Un résultat positif est indiqué par la présence d'une couleur rose vif (fuchsia) dans le bouillon.
- Un résultat négatif si pas de changement de couleur dans le bouillon.








**Figure 13: Résultat Positive et Négative du Test à Urée**


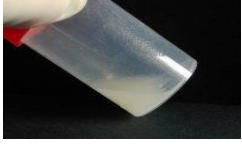
L'ensemble des résultats du test à l'urée pour les différents champignons, levures et moisissures trouvés au sein du Laboratoire mycologique est regroupés dans la figure ci dessous :



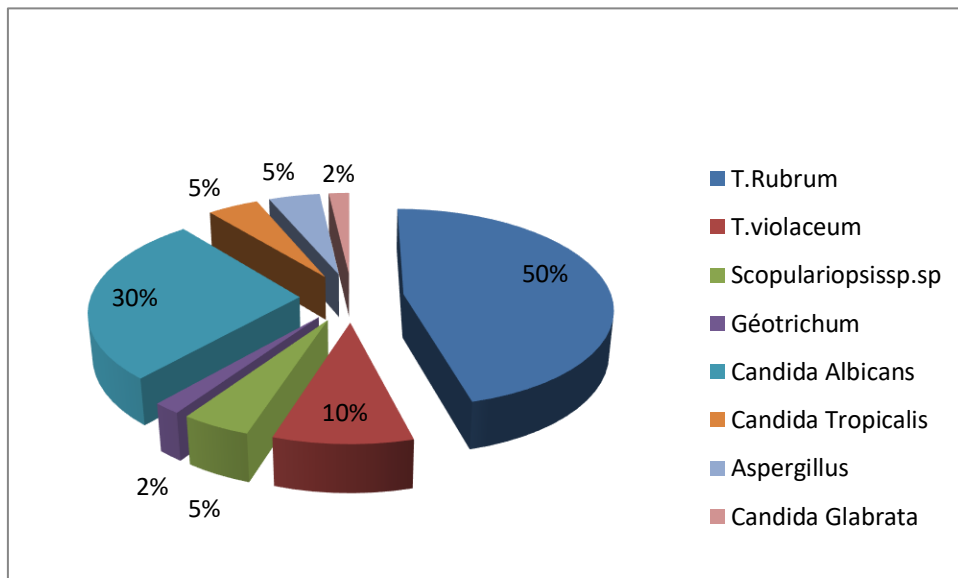
**Figure 14: Résultats de la réaction du test à l'urée**

Les champignons identifiés à partir des différents prélèvements par l'utilisation du test à l'uréase sont regroupés dans le tableau 1 ci-dessous :

N° de Patient	Type de Prélèvement	Type de souches recherchées	Résultat de Test Uréase
1	Ongle Pied 	<i>Scopulariopsis sp.</i>	Positif
2	Ongle pied 	<i>Trichphyton Rubrum</i>	Négatif
3	Ongle pied 	<i>Géotrichum</i>	Positif
4	Ongle main 	<i>Candida Albicans</i>	Négatif
5	Ongle main 	<i>Candida Tropicalis</i>	Négatif

6	Cuir chevelu (poils) 	<i>Trichophyton violaceum</i>	Positif
7	Expectoration 	<i>Aspergillus</i>	Positif
8	Prélèvement Vaginal	<i>Candida Glabrata</i>	Négatif

❖ Pendant les deux mois de stage au service de Parasitologie-Mycologie la répartition des Proportions variables des Souches est la suivante :



**Figure 15:Proportion de souches trouvées au sein du Laboratoire Parasitologie-Mycologie**

❖ Durant ces deux mois de stage la fréquence des champignons trouvés au sein du laboratoire était prédominante pour l'espèce *Trichophyton.rubrum* qui était très abondant avec un pourcentage de 50% obtenus après l'identification de plusieurs prélèvements par le test à l'uréase suivi de *candida albicans* qui était fréquente avec un pourcentage de 30%.

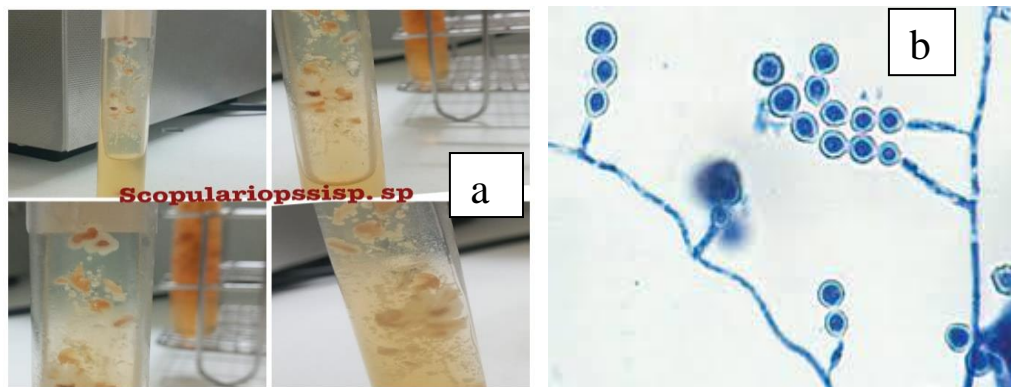
Tableau 2 : Durées de croissance des différents souches isolés

Les Différentes souches trouvées	Date de culture	Durée de poussés de la colonie	Date d'apparition de colonie
<i>Scopulariopsis.sp</i>	19/04/22	16 jours	05/05/22
<i>Candida Albicans</i>	29/04/22	48 Heure	01/05/22
<i>T.Rubrum</i>	11/05/22	1 semaine	18/05/22
<i>T.violaceum</i>	16/05/22	10 jours	26/05/22
<i>Aspergillus</i>	16/05/22	3 jours	19/05/22
<i>Géotrichum</i>	17/05/22	8 jours	25/05/22
<i>Candia Tropicalis</i>	24/05/22	24 Heure	25/05/22

Description des différents champignons identifiés. Au cours de notre travail nous avons confirmé l'identification 8 espèces:

- **Scopulariopsis. Sp:**

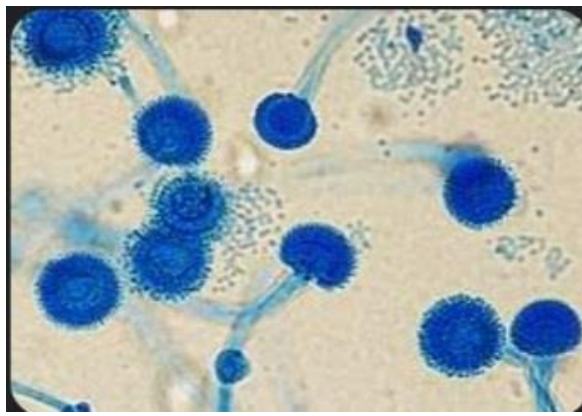
C'est un champignon saprophyte, omniprésent dans l'environnement, sa transmission est plus rapide, il est rarement pathogène mais il provoque des infections humaines en cas d'une immunodéficience. Il se localise au niveau des ongles, la peau et les cheveux. Sa structure représente des hyphes cloisonnés étroits et ramifiés (Figure5). Dans notre étude cette espèce représente 5% de l'ensemble des champignons identifiés.



**Figure 16:Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) sur sabouraud (× 40) de Scopulariopsis.sp**

- **Aspergillus:**

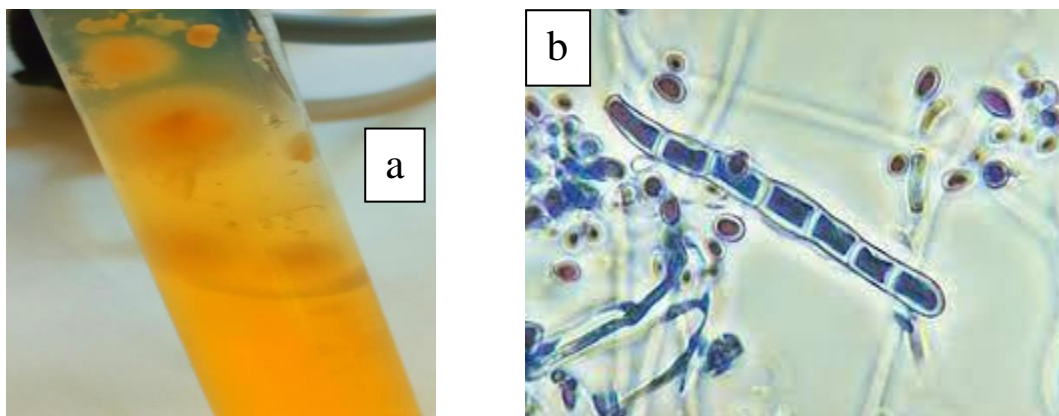
Ce sont des champignons filamenteux de type moisissure, dont la colonie se présente sous forme duveteuse. Le thalle présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores qui se termine en vésicule (Figure 18). Certaines espèces d'*Aspergillus* peuvent être pathogènes pour l'Homme et provoque des aspergilloses. Cette espèce présente dans notre étude 2% au niveau d'un prélèvement de type crachat.



**Figure 17: Aspect microscopique d' *Aspergillus* (× 40)**

■ ***Trichophyton Rubrum***

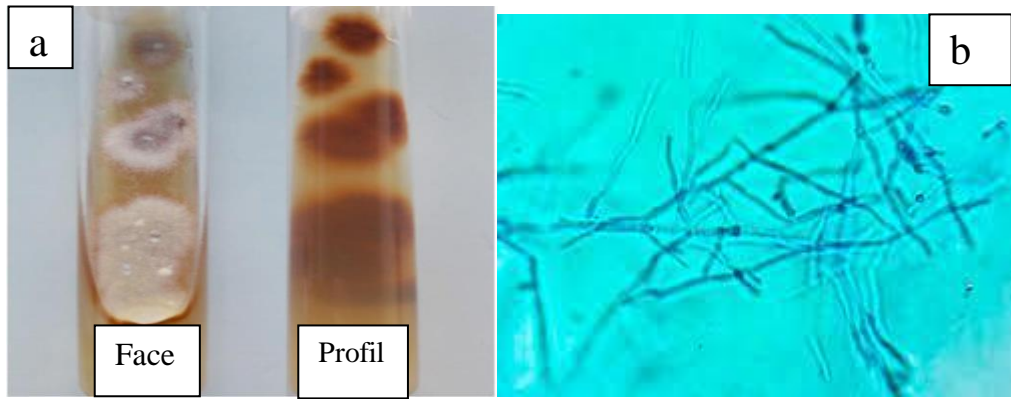
C'est un champignon filamenteux qui a une affinité pour la kératine, c'est un agent pathogène des dermatophytes qui croit idéalement à une température de 27°C (Figure 19), il peut se transmettre directement par contact avec des lésions cutanées mais le plus souvent la contamination est indirecte par l'intermédiaire des sols souillés par les squames ou les débris d'ongles, il provoque des lésions et des onyxis des pieds et de main, teigne ... Cette espèce représente 50% dans l'ensemble des champignons identifiés par le test à l'uréases.



**Figure 18: Aspect macroscopique (a) et microscopique (b) de *trichophyton Rubrum***

■ ***Trichophyton Violaceum* :**

C'est un champignon filamenteux avec des microconidie isolées en bouquets, de forme ronde et variable (Figure 20), il est anthropophile et se transmet de façon direct et indirect, par l'intermédiaire des brosse ... il est responsable de la teigne. Dans notre étude cette espèce représente 10% au niveau des prélèvements de types cuir chevelu ...

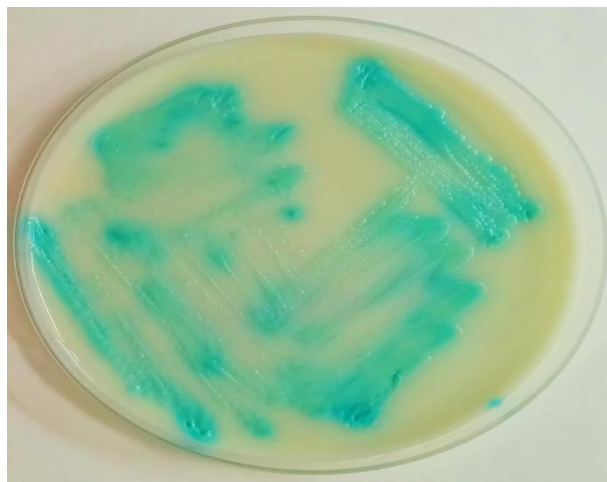


**Figure 19: Aspect macroscopique (a) et Microscopique (b) de *Trichophyton violaceum***  
**Avec des filaments rétrogrades et des chlamydozoïdes**

Au cours de notre travail, nous avons confirmé l'identification de 3 espèces de levures à savoir :

- ***Candida Albicans* :**

C'est un champignon levuriformes, de couleur verte sur milieu chromogène (Figure 21) et de colonie grande ronde, favorisé en culture à 37°C°, constitutif de la flore de la muqueuse (buccales, digestives, génitales) de l'être humain, mais le tube digestive reste son principal réservoir. Sa présence n'est pas pathologique que si un déséquilibre hormonal ou immunitaire s'installe et qui peut être responsable d'une multiplication de ce champignon conduisant à une candidose touchant les muqueuses et la peau. Cette espèce représente 30% des levures identifiés par le test sur des prélèvements de types ongle pied et main .

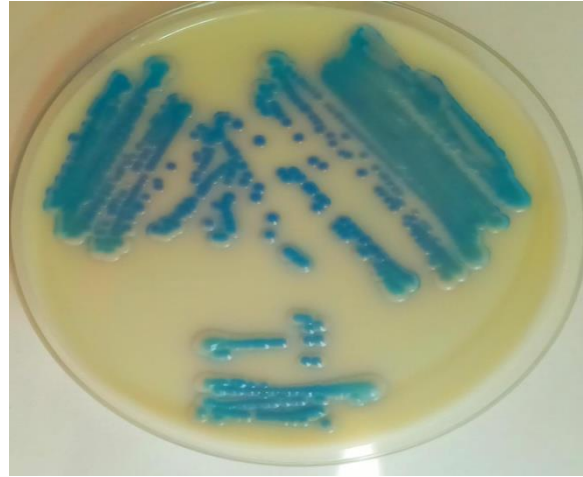


**Figure 20: Aspect macroscopique sur milieu chromogène de *Candida Albicans***



- **Candida Tropicalis :**

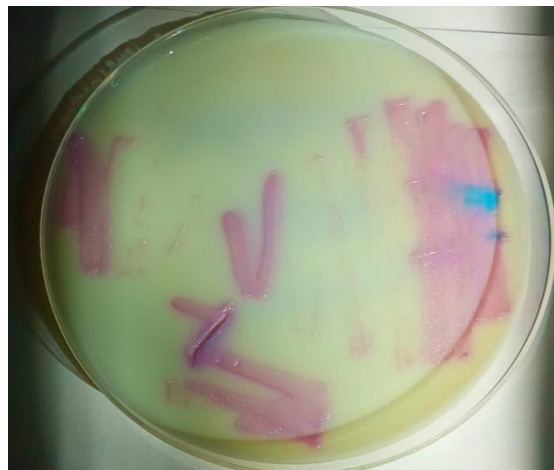
C'est une levure de forme variable, ronde de couleur bleu sur milieu chromogène (Figure 22) il provoque chez l'homme des infections superficielles cutano-muqueuses, des onyxis ainsi que des infections profonde. Elle représente 5% de l'ensemble des levures identifiés.



**Figure 21:Aspect macroscopique sur milieu chromogène de Candida Tropicalis**

- **Candida Glabrata :**

Levure non dimorphique, sous forme des petits blastoconidies, avec des colonies brillantes lisses, de couleur cèrmeuse, rose (Figure 23), il sont considérés comme des commensales relativement non pathogène des tissus muqueux humains. Elle représente 2% des différents levures identifiés.

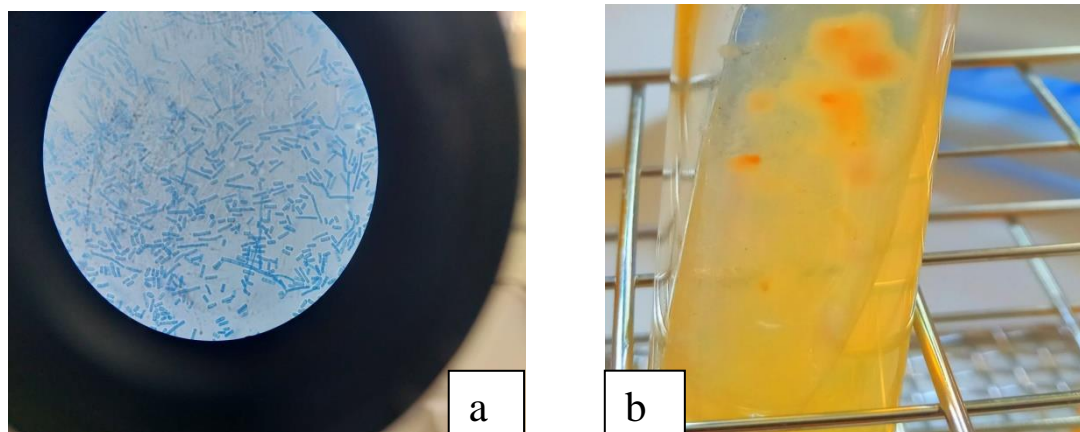


**Figure 22:Aspect macroscopique de levure Candida Glabrata sur milieu chromogène**

- **Géotrichum (représente 2% de l'ensemble des champignons identifiés):**

C'est un champignon moisissure saprophyte du tube digestif, il est organisé en hyphes cloisonnées de forme rectangulaire (Figure 21.a), et représente des véritables champignons qui sont en expansion très rapide et qui se développe à une température moyenne entre 5 et

25C°, donnant naissance à des formes pathologiques. Il représente 2% dans l'ensemble des moisissures identifiées.



**Figure 23: Aspect macroscopique(b) et microscopique(a) (x40) de *Géotrichum***

### **Discussion :**

Différents genre de champignons et levures ont été retrouvés dans les différents types de prélèvements réalisés chez les patients ayant consulté au service de parasitologie-mycologie du Centre Hospitalier Hassan II. Après l'isolement, nous avons réalisé des cultures des différents microorganismes sur des milieux de cultures spécifiques, qui ont été identifiés par la suite par le test à l'uréase.

Le Test à l'uréase détecte si le champignon ou levure examiné dégrade l'urée, permettant l'alcalinisation du milieu et le changement du pH d'un milieu acide à un pH basique, sinon aucun changement de couleur ne sera remarqué dans le bouillon à l'urée ce qui montre que cette espèce de champignon ou levure possède une réaction négative d'uréase.

Sur le plan biologique et durant notre étude nous avons isolé 3 espèces fongiques de levures à savoir les *Candida Albicans*, *Candida Tropicalis* et *candida Glabrata*, 2 espèces de dermatophytes, le *Trichophyton Rubrum* et *Trichophyton Violaceum*, ainsi que 2 moisissures de genre *Géotrichum* et *Aspergillus*.

Toutes ces différentes espèces ont été identifiées par le Test à l'uréase qui constitue un véritable test d'identification permettant la différenciation entre les champignons ayant un aspect microscopiques identiques et plus précisément la même forme des filaments. Les résultats trouvés étaient compatibles avec la littérature pour les champignons microscopiques au sein de laboratoire de parasitologie-mycologie de CHU de FES, la réalisation de la culture de l'inoculum des colonies dans le bouillon d'urée a permis le changement de la couleur d'un orange(jaunâtre) à un rose fuchsia pour les moisissures, et les deux espèces de *scopulariopsis* et *T.Violaceum*, alors que pour *Trichophyton.Rubrum* et les différents espèces



de *candida* ne présentent aucun changement de couleur ce qui montre que le test est négatif. Tous ces données obtenues rejoint ceux de la littérature concernant l'étude des méthodes de diagnostic et d'identification d'une onychomycose Journal de Mycologie Médicale numéro 4 Décembre 2014 où les champignons identifiés étaient les mêmes dans notre étude.

A travers cette étude, on a pu démontré que ce test à l'uréase constitue une méthode rapide et fiable et validé pour l'identification des champignons microscopiques

## **Conclusion**

Test à l'uréase est un test fondamental d'action rapide dans l'identification des champignons microscopiques qui constituent des agents infectieux qui affectent les humains, ce qui rend l'examen mycologique est indispensable et devrait être pratiqué devant toute suspicion de mycose afin de confirmer les causes de ces infections pour éviter l'accroissement de leur fréquence, ainsi que de faciliter leur diagnostic biologique pour permettre la prescription d'un traitement adéquat .

# REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

1. L'écologie des champignons in *L'univers des champignons*, Presses de l'Université de Montréal, ).
2. Jean-Christophe Guéguen et David Garon, *Biodiversité et évolution du monde fongique*, EDP Sciences, 2015, 220 p. (ISBN 978-2-7598-1893-8 et 2759818934,).
3. (thèse de doctorat préparée à l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (agroparistech) pour obtenir le grade de docteur de l'institut agronomique vétérinaire et forestier de France spécialité : sciences de la vie et de la santé école doctorale n°581 agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (abies).
4. (leber, 1 (2016) *clinical microbiology procedures handbook*, 4th ed. asm press, american society for microbiology, washington, d.c., 2954 pp. (chapitre 8, volume 2).
5. (Jacques GUINBERTEAU, Patrick JOLY, Jacqueline NICOT, Jean Marc OLIVIER, « CHAMPIGNONS », *Encyclopédie Universalise* [en ligne], consulté le 13 mai 2022. [universalis.fr/encyclopedie/champignons/](http://universalis.fr/encyclopedie/champignons/)).
6. ( Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL)).
7. Codex œnologique international :UREASE E.C.3.5.1.5 CAS N° :9002-13-5 (oen5/2005)
8. Public health England : Urease test, American society for microbiology : Urease Test Protocol
9. . (WORLD HEALTH ORGANIZATION II ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ 8 avril 1976 A29/19 VINGT-NEUVIEME ASSEMBLEE MONDIALE DE LA SANTE Point 2.5.11 de l'ordre du jour provisoire Rapport du Directeur général MALADIES MYCOSIQUES)
10. (N.Contet-Audonnoeu. Dermatophytes et dermatophytoses.D.Chabasse, 8-614-A10.EMC 2011
11. .( D. Chabasse. Les dermatophytes : d'où viennent-ils ? Comment sont-ils devenus des parasites ? *Journal de Mycologie Médicale* (2008) 18, 27—35)

12. (D.Chabasse, M.Pihet. Les dermatophytes: les difficultés du diagnostic mycologique. REVUE FRANCOPHONE DES) LABORATOIRES - NOVEMBRE 2008 - N°406).
13. Anofel, *Parasitologie, Mycologie*, Format Utile, 1998, 6<sup>e</sup> éd., 480 p. (ISBN 2-910657-14-0), p. 305-318, 329-343.)
14. . (Référence Index Fungorum : Cryptococcus neoformans
15. ( 2016-2017 UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone)
16. Askin Erdigan et satish S.C. Rao (small intestinal fungal overgrowth à avril 2015
17. INDEX FUnorum : trichophyton rubrum

### **Références des figures :**

1. Référence : »Leiva-Salinas M, Marin-Cabanas I, Betlloch I et al. Tinea capitis in schoolchildren in a rural area in southern Ethiopia »,2019
2. Référence :Campus de Parasitologie-Mycologie - Association Française des Enseignants de Parasitologie et Mycologie (ANOFEL),2018
3. Référence :Jacques BEJOT, « ONYXIS », Encyclopædia Universalis,2018