

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement
Supérieur et de la Recherche
Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université BATNA 2



جامعة باتنة 2

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Microbiologie
et de Biochimie

قسم ميكروبيولوجيا وبيوكيمياء

Polycopié pédagogique

Travaux Pratiques de Mycologie

Préparé par

Dr. Lotfi LOUCIF

Polycopié destiné aux étudiants de

Licence (spécialité/niveau) : **Microbiologie/3^{ème} Année**

Année universitaire : 2022-2023

Avant-propos

Ce polycopié regroupe un ensemble de travaux pratiques de la partie Mycologie de la matière Mycologie-Algologie-Virologie destinés essentiellement aux étudiants de la troisième année licence (L3, LMD) microbiologie. Ce document a été préparé dans l'objectif de simplifier la réalisation des travaux pratiques en question à travers la présentation de leur objectif, le matériel nécessaire, le mode opératoire ainsi que la lecture, l'interprétation et l'expression des résultats. Ce polycopié a été préparé pour permettre aux étudiants de se familiariser avec les techniques de laboratoire utilisées pour l'isolement et la caractérisation des champignons.

Ce polycopié (fichier PDF) est accessible en ligne via le lien suivant :

http://staff.univ-batna2.dz/loucif_lotfi/classes/polycopi%C3%A9-des-travaux-pratiquesmycologietroisi%C3%A8me-ann%C3%A9e-licence-sp%C3%A9cialit%C3%A9

Sommaire

Avant-propos

Liste des figures

TPN°1 : observation microscopique des levures

Introduction

1. Objectif.....	1
2. Matériel/ réactifs.....	1
3. Mode opératoire du test de blastèse ou test de filamentation.....	2
3.1. Technique.....	2
3.2. Interprétation.....	2
4. Mode opératoire du test de chlamydosporulation.....	3
4.1. Technique.....	3
4.2. Interprétation.....	3
5. Mode opératoire du test de formation des pseudohyphes.....	4
5.1. Technique.....	4
5.2. Interprétation.....	4
6. Mode opératoire du test de Satoh et Makimura sp. nov.....	5
6.1. Technique.....	5
6.2. Interprétation.....	5
7. Mode opératoire du test de formation d'agrégat.....	5
7.1. Technique.....	5
7.2. Interprétation.....	6
Références bibliographiques.....	7

TPN°2 : observation microscopique des moisissures

Introduction

1. Objectif.....	8
2. Principe.....	8

3. Matériel/réactifs.....	9
4. Mode opératoire.....	9
4.1. Technique du test de drapeau	9
4.2. Technique du test d'examen d'un fragment de colonie.....	10
4.3. Technique de culture sur lame.....	10
5. Lecture.....	11
Références bibliographiques.....	16

TPN°3 : mise en évidence des capsules

Introduction

1. Objectif.....	17
2. Principe de la technique d'observation à l'état frais avec l'encre de Chine.....	17
3. Matériel/réactifs.....	17
4. Mode opératoire.....	18
4.1. État frais à l'encre de Chine.....	18
4.1.1. Technique.....	18
4.1.2. Interprétation.....	18
4.2. Méthode au Gram sérum.....	19
4.2.1. Technique.....	19
4.2.2. Interprétation	19
Références bibliographiques.....	20

TP N°04 : isolement et caractérisation macroscopique des champignons

Introduction.....	21
1. Objectif.....	21
2. Matériel/réactifs.....	21
3. Mode opératoire.....	21
3.1. Prélèvement.....	21
3.2. Isolement des champignons.....	22

3.3. Lecture.....	22
Références bibliographiques.....	25

TPN°5 : Isolement des levures à partir des produits laitiers

Introduction	
1. Objectif.....	26
2. Matériel/réactifs.....	26
3. Principe.....	26
4. Mode opératoire.....	27
4.1. Échantillonnage.....	27
4.2. Préparation des dilutions décimales.....	27
4.3. Ensemencement.....	28
4.4. Incubation.....	28
5. Expression des résultats.....	28
Références bibliographiques.....	30

TPN°6 : étude de la sensibilité aux antifongiques (antifongigramme)

Introduction	
1. Objectif.....	31
2. Principe de la technique de diffusion en milieu gélosé.....	31
3. Matériel/réactifs.....	31
4. Mode opératoire de la méthode de diffusion en milieu gélosé.....	32
5. Interprétation.....	33
Références bibliographiques.....	34

Liste des figures

Figure 1 : résultat positif du test de blastèse sous microscope optique au grossissement 10X	2
Figure 2 : résultat du test de chlamydosporulation sous microscope optique au grossissement 10X	3
Figure 3 : résultat positif du test de formation des pseudohyphes sous microscope optique au grossissement 10X	4
Figure 4 : résultat du test de Satoh et Makimura sp. nov.....	5
Figure 5 : résultat du test de formation d'agrégat sous microscope optique au grossissement X400.....	6
Figure 6 : schéma explicatif du principe de scotch test.....	12
Figure 7 : technique de la culture sur lame.....	13
Figure 8 : aspect microscopique de <i>Trichophyton tonsurans</i> sous microscope optique au grossissement X400.....	13
Figure 9 : aspects microscopiques de l'espèce <i>Absidia corymbifera</i> sous microscope optique au grossissement X100.....	14
Figure 10 : aspect microscopique de <i>Scedosporium apiospermum</i> sous microscope optique au grossissement X400	14
Figure 11 : aspect microscopique de <i>Paecilomyces lilacinus</i> sous microscope optique au grossissement X400.....	15
Figure 12 : aspect microscopique de l'espèce <i>Exophiala dermatitidis</i> sous microscope optique au grossissement X1000	15
Figure 13 : schéma explicatif de la méthode d'observation à l'état frais avec l'encre de chine	18

Figure 14 : aspects macroscopiques des levures (A : *Candida albicans*, B : *Rhodotorula*)...23

Figure 15 : aspects macroscopiques des moisissures (A : *Trichophyton tonsurans*, B : *Absidia corymbifera*, C : *Scedosporium apiospermum*, D : *Paecilomyces lilacinus*).....24

Figure 16 : schéma explicatif de la méthode de préparation des dilutions décimales.....28

Figure 17 : schéma explicatif de la technique d'antifongigramme.....33

TPN° 1 : observation microscopique des levures

Introduction

Les levures font partie de la flore commensale de l'homme. Cependant, avec l'augmentation significative et rapide de l'incidence des infections fongiques, elles ont pris une place importante au sein des infections nosocomiales. La candidose est la plus courante infection à levures causée par les membres du genre *Candida*. L'examen microscopique direct est la première étape du diagnostic au laboratoire et il est considéré comme une méthode rapide et efficace pour le diagnostic de la candidose.

1. Objectif

Caractérisation microscopique des levures.

2. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique.
- Microscope optique.
- Boîte de Pétri.
- Lame.
- Lamelle.
- Anse de platine.
- Sérum.
- Milieu riz-agar-tween 80 (RAT).
- Milieu pomme de terre-carotte-bile (PCB).
- Gélose Sabouraud.
- Bleu coton au lactophénol.
- Bouillon extrait de levure peptonée dextrose.
- Eau distillée stérile.

3. Mode opératoire du test de blastèse (test de filamentation)

3.1. Technique

- Le test de blastèse ou de germination est réalisé par ensemencement de la colonie suspecte dans un sérum.
- Après incubation pendant 2 à 4h à 35-37°C, déposer une goutte de la suspension levurienne sur une lame propre puis recouvrir la suspension par une lamelle.
- Effectuer une observation sous microscope optique aux grossissements à sec : 10X puis 40X.

3.2. Interprétation

Un résultat positif pour *Candida albicans* se traduit par l'observation d'un tube germinatif émergeant de la cellule mère avec un diamètre homogène sans constriction à sa base (figure 1).

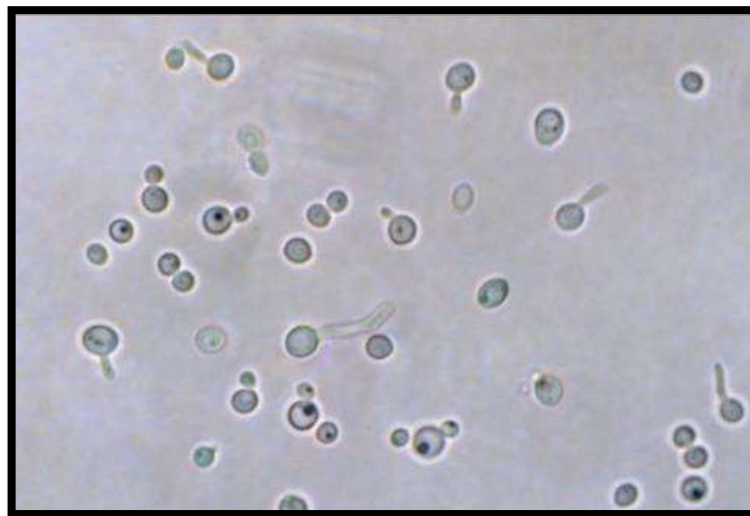


Figure 1 : résultat positif du test de blastèse sous microscope optique au grossissement 10X (2).

4. Mode opératoire du test de chlamydosporulation

4.1. Technique

- Réaliser une sub-culture de la souche suspecte en stries profondes en surface et au centre des milieux de cultures pauvres tels que : riz-agar-tween 80 (RAT) ou le milieu pomme de terre-carotte-bile (PCB).
- Recouvrir la culture avec une lamelle de microscopie passée à la flamme ou flambée à l'alcool.
- Incuber la boîte à une température de 25-28°C pendant 24 à 48h.
- La lecture s'effectue après observation microscopique à l'objectif 10X puis 40X en déposant directement la boîte de Pétri ouverte sur la platine du microscope.

4.2. Interprétation

La formation des structures arrondies de 10 à 15 µm de diamètre à paroi épaisse avec double contour produites à l'extrémité du pseudomycélium isolées ou en grappe (chlamydo-spores) est considérée comme un résultat positif (figure 2).



Figure 2 : résultat du test de chlamydosporulation sous microscope optique au grossissement 10X (2).

5. Mode opératoire du test de formation des pseudohyphes (pseudofilamentation)

Ce test permet de mettre en évidence la capacité de la levure testée à produire des pseudo-hyphes (pseudo-filaments).

5.1. Technique

- Ensemencer la levure à tester sur la gélose Sabouraud dextrose et incuber à 30°C pendant 5 jours.
- Après incubation, sur une lame propre, mélanger une colonie de la levure avec une goutte du bleu coton au lactophénol.
- Recouvrir la suspension avec une lamelle.
- Effectuer une observation sous microscope optique aux grossissements : 10X puis 40X.

5.2. Interprétation

L'observation de petites cellules bourgeonnantes ovoïdes avec une croissance rudimentaire est considérée comme un résultat positif (figure 3).

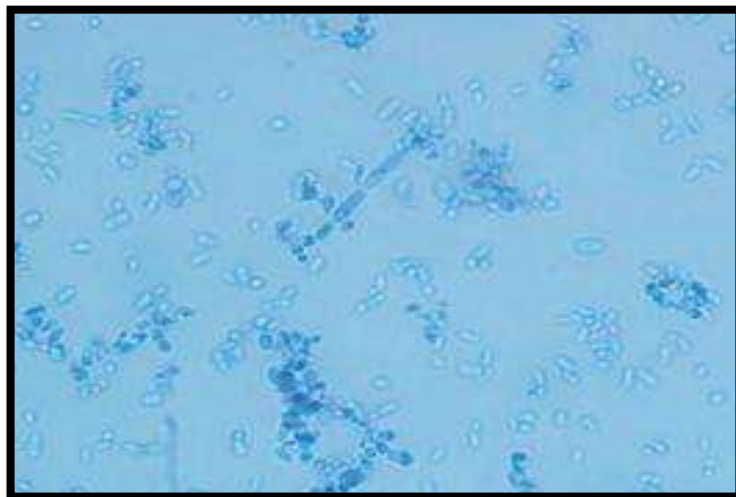


Figure 3 : résultat positif du test de formation des pseudohyphes sous microscope optique au grossissement 10X (4).

6. Mode opératoire du test de Satoh et Makimura sp. nov

6.1. Technique

- Inoculer une colonie de la levure à tester dans un bouillon d'extrait de levure peptonée dextrose. En suite incuber les bouillons inoculés pendant 3 jours à 25°C.
- Après 3 jours d'incubation, déposer une goutte du bouillon sur une lame propre puis recouvrir avec une lamelle.
- L'observation s'effectue sous microscope optique au grossissement 40X.

6.2. Interprétation

La détection des cellules ellipsoïdales à allongées, isolées, par paires ou en groupes (des agrégats de cellules) peuvent confirmer la présence de *C. auris* (figure 4).

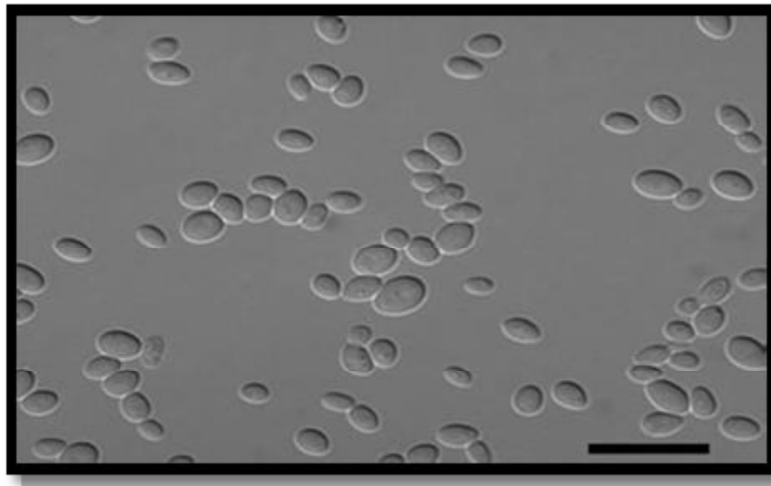


Figure 4 : résultat du test de Satoh et Makimura sp. nov (6).

7. Mode opératoire du test de formation d'agrégat

7.1. Technique

- Sur une lame de microscopie, émulsionner une seule colonie de la levure à tester dans environ 20 µl d'eau distillée stérile.
- Recouvrir la suspension par une lamelle.
- Effectuer une observation microscopique à l'objectif 40X.

7.2. Interprétation

La formation des agrégats cellulaires est considérée comme un résultat positif pour la présence de *C. auris* (figure 5).

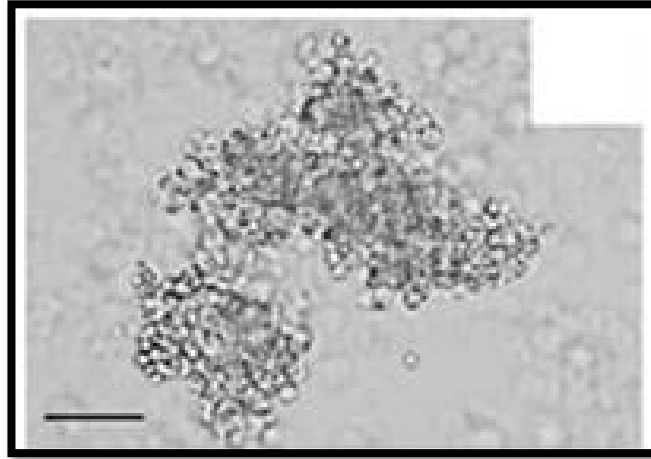


Figure 5 : résultat du test de formation d'agrégat sous microscope optique au grossissement X400 (7).

Références bibliographiques

1. Anane, S. & Khalfallah, F. (2007). Biological diagnosis of systemic candidiasis: difficulties and future prospects. *Pathol.Biol.(Paris)*, 55, 262-272.
2. Chabasse, D., Bouchara, J. P., Pihet, M., Gentile, L. D. & Cimon, B. (2010). Les levures et Levuroses. Cahier de formation biologie médicale N°44. Ouvrage réalisé par le laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU d'Angers, p199.
3. Hani, U., Shivakumar, H. G., Vaghela, R., Osmani, R. A. & Shrivastava, A. (2015). Candidiasis: a fungal infection-current challenges and progress in prevention and treatment. *Infect.Disord.Drug Targets*, 15, 42-52.
4. Hata, D. J., Humphries, R., Lockhart, S.R. (2020). *Candida auris*: An Emerging Yeast Pathogen Posing Distinct Challenges for Laboratory Diagnostics, Treatment, and Infection Prevention. *Arch.Pathol.Lab Med.*, 144, 107-114.
5. Pihet, M. & Marot, A. (2013). Diagnostic biologique des candidoses. *revue francophone des laboratoires*, 450, 47-61.
6. Satoh, K., Makimura, K., Hasumi, Y., Nishiyama, Y., Uchida, K., Yamaguchi, H. (2009) *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol.Immunol.*, 53, 41-44.
7. Szekely, A.; Borman, A. M., Johnson, E.M. (2019) *Candida auris* isolates of the Southern Asian and South African lineages exhibit different phenotypic and antifungal susceptibility profiles in vitro. *Journal of clinical microbiology*, 57, e02055-18.

TPN°2 : caractérisation microscopique des moisissures

Introduction

Au cours des dernières années, le taux des infections fongiques (profondes et superficielles) a augmenté de façon remarquable où le nombre des champignons impliqués dans des infections humaines a augmenté d'une trentaine d'espèces dans les années 50 à plus de 400 en 2009.

Les mycoses sont des infections causées par des champignons microscopiques dont certains font partie de la microflore commensale de l'homme, particulièrement au niveau de la peau. Tandis que d'autres sont des pathogènes comme les dermatophytes à savoir *Trichophyton*, *Epidermophyton*, et *Microsporum*.

1. Objectif

Observation microscopique des moisissures en utilisant trois techniques différentes: technique du drapeau, examen d'un fragment de colonie et la technique de culture sur lame.

2. Principe

L'examen direct est basé sur l'observation microscopique du prélèvement. Il permet d'apporter des résultats rapides sur la présence ou l'absence des filaments et des spores. Cet examen est indispensable, il permet d'apprécier la présence et l'abondance d'un champignon ainsi que d'orienter le diagnostic en fonction des éléments fongiques observés.

Plusieurs types de liquides de montage sont utilisés pour l'observation microscopique des moisissures à savoir ; le lugol à 2% (il colore les filaments mycéliens en brun), le noir chlorazol à 10 % (il permet la mise en évidence de filaments mycéliens de type aspergillaire) et le bleu coton au lactophénol.

3. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique.
- Microscope optique.
- Boite de Pétri.
- Ruban adhésif transparent type Scotch.
- Tige.
- Anse de platine à fil droit.
- Ose.
- Abaisse-langue.
- Lame.
- Lamelle.
- Papier filtre.
- Bleu de lactophénol.
- Culture fongique.
- Eau distillée.
- Gélose sabouraud.

4. Mode opératoire

4.1. Technique du test de drapeau

- Déposer sur une lame de microscopie une goutte du bleu de lactophénol.
- Appliquer la partie adhésive libre du ruban adhésif transparent type Scotch aseptiquement sur une partie de la surface de la colonie fongique en utilisant une tige applicatrice.
- Soulever le drapeau du ruban avec les éléments fongiques attachés.
- Appliquer la face adhésive sur une lame de microscopie sur laquelle une goutte de bleu de lactophénol a été déjà déposée.
- Couper à l'aide d'un ciseau flambé à l'alcool la partie du ruban attachée à la tige.

- Ajouter une seconde goutte du bleu de lactophénol sur la surface exposée du ruban et recouvrir par une lamelle (figure 6).
- Observer au microscope optique à l'objectif 10X puis 40X.

Le bleu de lactophénol est ajouté afin d'empêcher la formation des bulles d'air, d'imprégner les structures fongiques et de faciliter la lecture au microscope.

4.2. Technique du test d'examen d'un fragment de colonie

- Déposer une goutte du bleu de lactophénol sur une lame de microscopie.
- Prélever à l'aide d'une anse de platine à fil droit un fragment de la colonie à tester.
- Déposer le fragment de la colonie prélevé sur la goutte du bleu de lactophénol.
- Dilacérer légèrement le fragment avec deux fils droits stériles.
- Recouvrir délicatement avec une lamelle.
- Eponger l'excès du liquide avec du papier absorbant.
- Observer au microscope optique à l'objectif 10X puis 40X.

4.3. Technique de culture sur lame

- Placer un abaisse-langue sur un papier filtre dans une boîte de Pétri vide et stérile.
- Verser une quantité d'eau distillée dans la boîte de Pétri afin de créer une atmosphère humide sans déborder le support.
- Placer une lame porte-objet propre sur le support (un abaisse-langue).
- Découper un cube (1cm²) d'une surface de la gélose sabouraud déjà coulée dans une autre boîte de Pétri.
- Déposer le cube de la gélose au centre de la lame.
- Ensemencer les quatre coins du carré de gélose à l'aide d'une ose.
- Recouvrir avec une lamelle la surface inoculée du cube (figure 7).
- Fermer la boîte de Pétri et incuber à une température en fonction du champignon en question.
- Observer sous microscope à l'objectif à immersion 100X.

5. Lecture

L'identification microscopique des champignons est basée essentiellement sur l'étude des éléments fongiques : l'aspect du mycélium (siphon ou hyphe septé), les caractères et la disposition des organes sporifères (la taille et la morphologie des spores, mais surtout leur mode de regroupement).

Les figures 8-12 présentent des observations microscopiques de certaines moisissures.

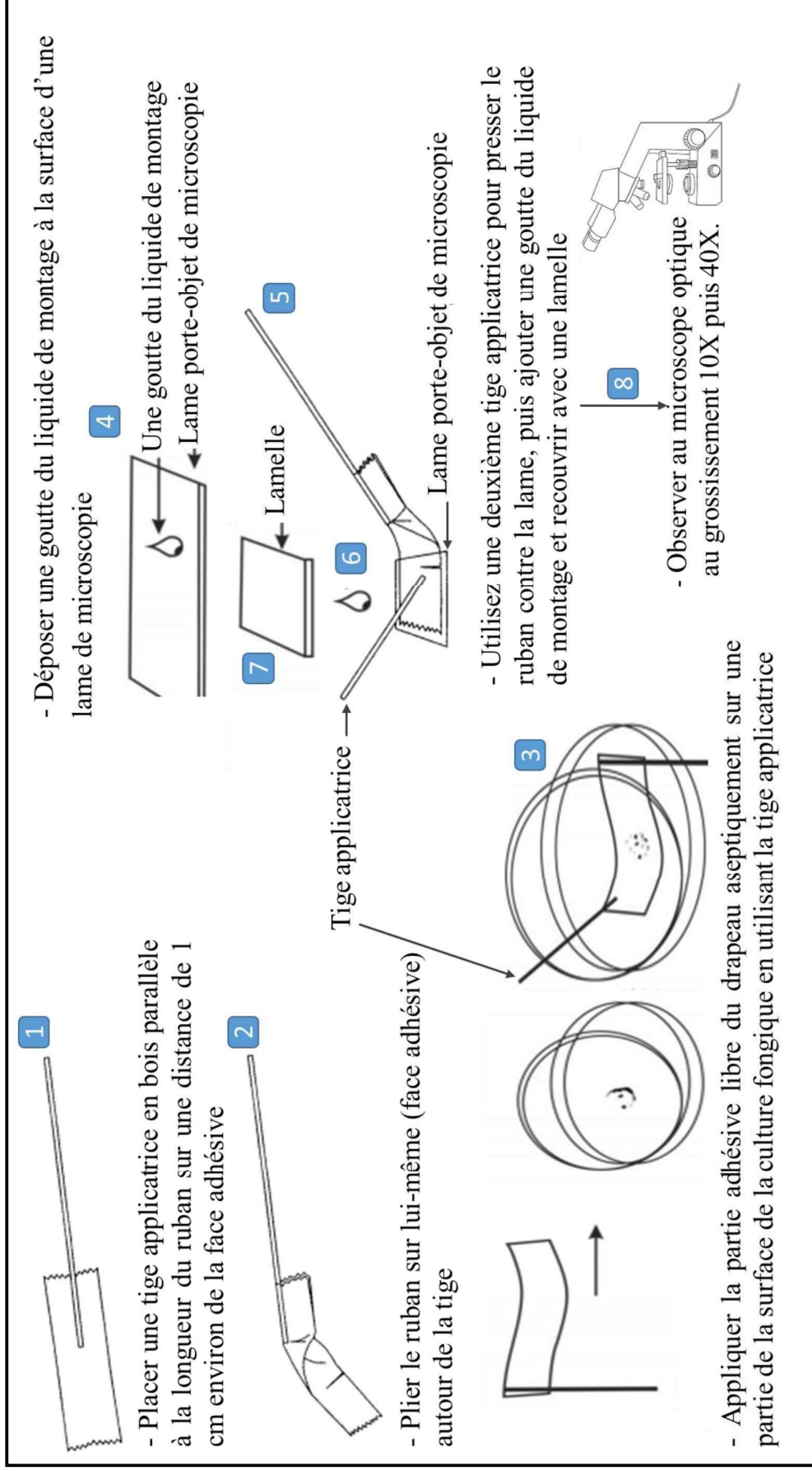


Figure 6 : schéma explicatif du principe de scotch test.

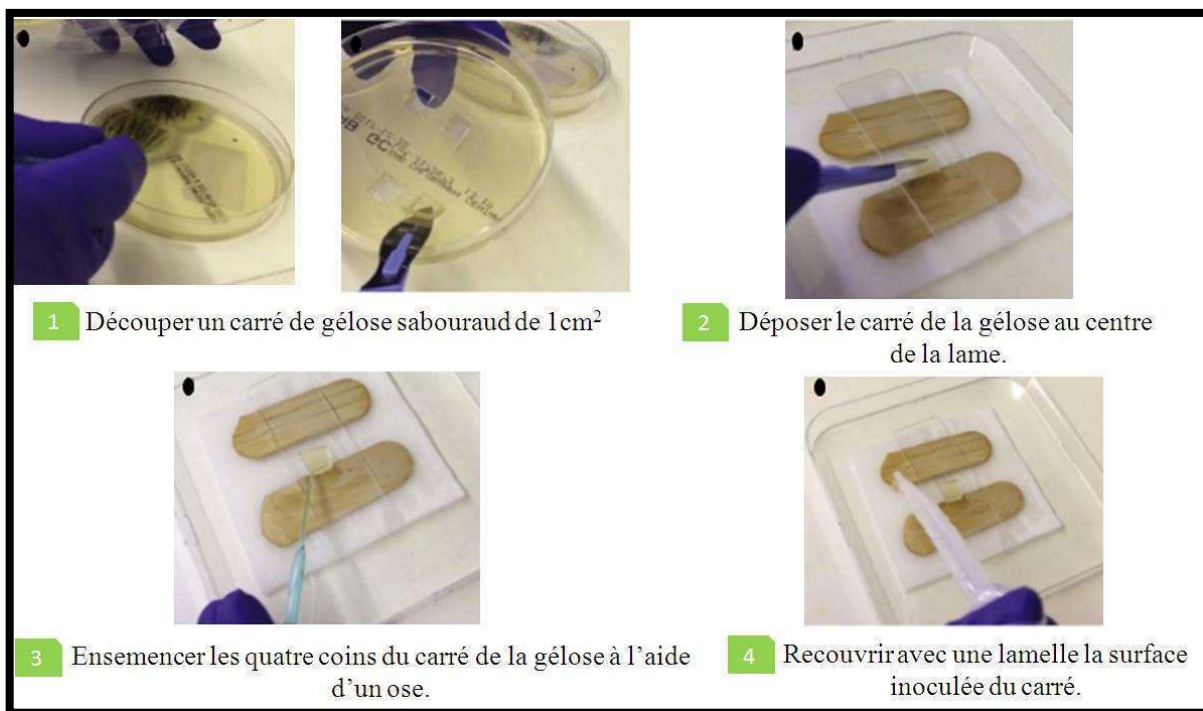


Figure 7: technique de la culture sur lame (6).

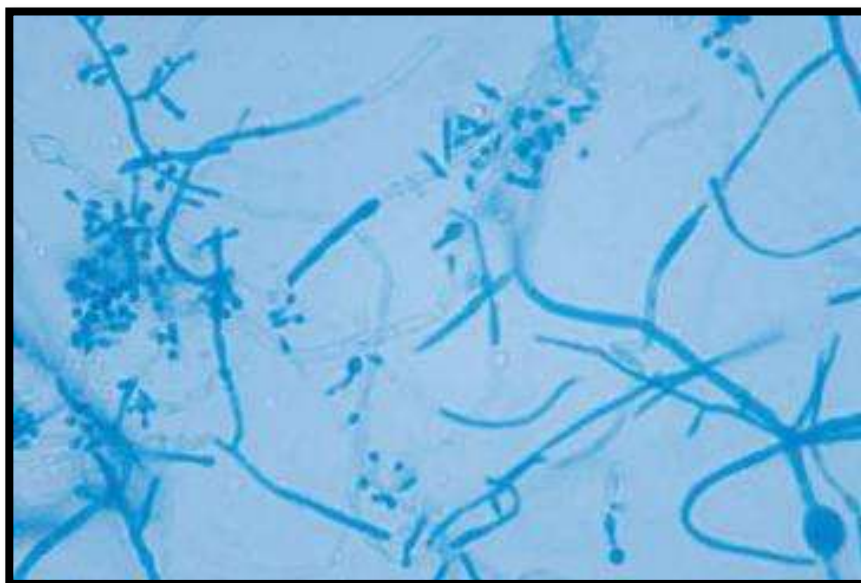


Figure 8 : aspect microscopique de *Trichophyton tonsurans* sous microscope optique au grossissement X400 (3).



Figure 9 : aspect microscopique de l'espèce *Absidia corymbifera* sous microscope optique au grossissement X100 (3).

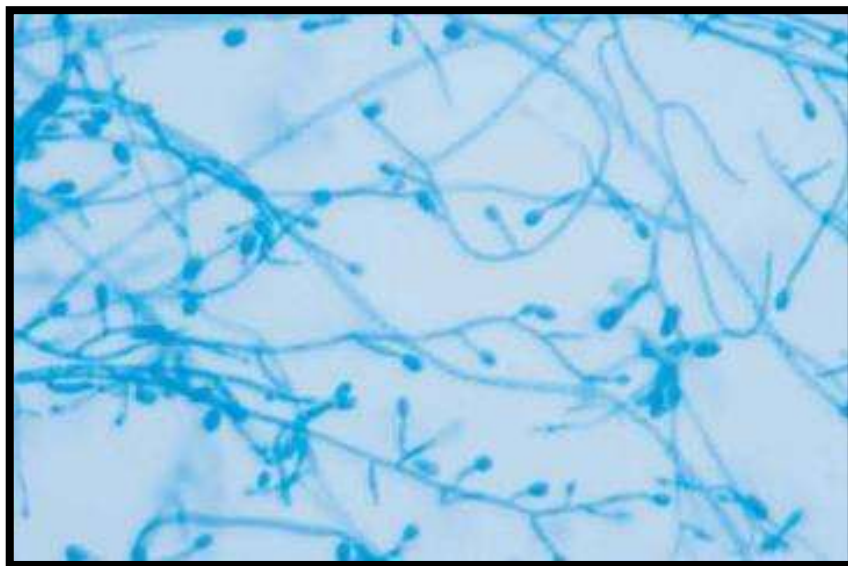


Figure 10: aspect microscopique de *Scedosporium apiospermum* sous microscope optique au grossissement X400 (3).

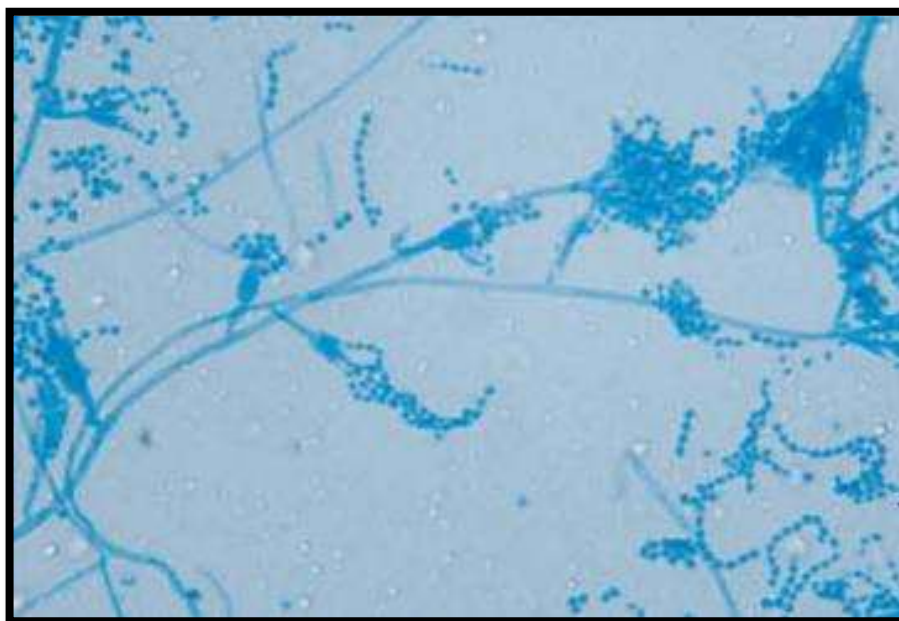


Figure 11 : aspect microscopique de *Paecilomyces lilacinus* sous microscope optique au grossissement X400 (3).

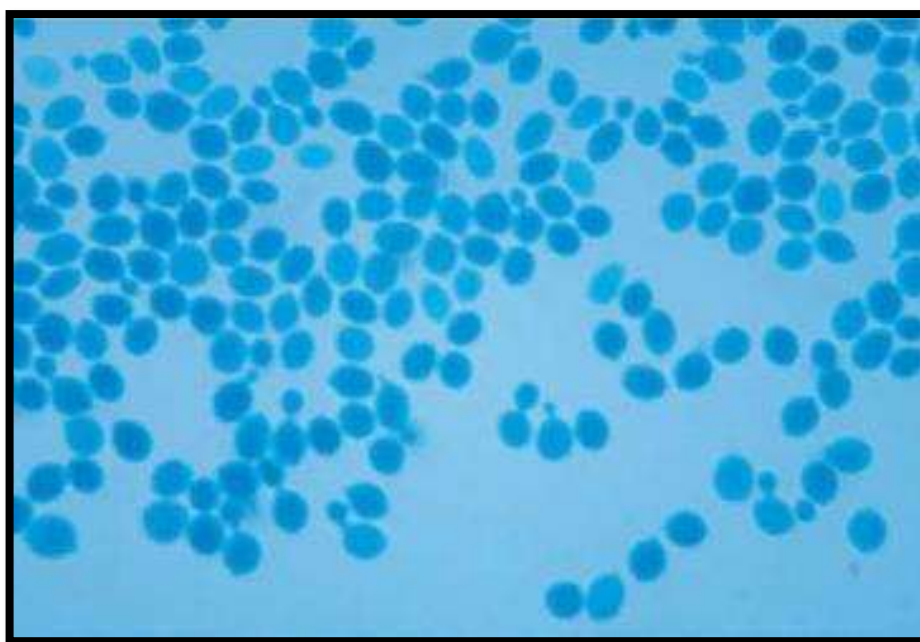


Figure 12: aspect microscopique de l'espèce *Exophiala dermatitidis* sous microscope optique au grossissement X1000 (3).

Références bibliographiques

1. Branger, A., Richer, M.M., Roustel, S. (2007) Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. *Educagri*. P 42.
2. Chabasse, D. & Guiguen, C. (2019) Dermatophytes : difficultés d'interprétation et pièges du diagnostic mycologique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2019, 26-35.
3. Chabasse, M. P., Pihet, M., Boucharaa, J.P. (2009) Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2009, 71-86.
4. Chabasse, D. & Pihet, M. (2014) Mycological diagnosis of onychomycosis. *J Mycol Med*, 24, 269-78.
5. Desoubaux, J. C. (2010) Diagnostic biologique d'une infection aspergillaire. *feuilles de Biologie*, 294, 1-8.
6. Houzé S, Delhaes, L. (2022) Parasitologie et mycologie médicales. *Elsevier Health Sciences*. P73.

TPN°3 : mise en évidence de la capsule

Introduction

Les capsules sont les couches denses et bien délimitées de molécules visqueuses accumulées à la périphérie de la paroi chez certaines bactéries et levures. La mise en évidence d'une capsule peut être réalisée par une coloration négative. Cette méthode est principalement utilisée pour la mise en évidence de la capsule de *Cryptococcus neoformans*, une levure impliquée dans des infections du système nerveux central chez les sujets immunodéprimés.

1. Objectif

Mise en évidence de la capsule chez des souches de levures.

2. Principe de la technique d'observation à l'état frais avec l'encre de Chine

L'encre de chine est une suspension de particules de carbone animée d'un fort mouvement brownien. Elle joue le rôle d'un agent de contraste permettant la mise en évidence de la capsule des microorganismes. Cette dernière se présente sous forme d'un halo clair autour de la levure sur un fond noir.

3. Matériel/réactifs

- Etuve bactériologique.
- Microscope optique.
- Lame de microscopie.
- Lamelle.
- Bac de coloration.
- Anse de platine.
- Eau distillée stérile.
- Violet de gentiane.
- Lugol.

- Alcool.
- Fuchsine.
- L'encre de chine.

4. Mode opératoire

4.1. État frais à l'encre de Chine

4.1.1. Technique

- Déposer une goutte d'eau distillée stérile sur une lame porte objet en verre propre.
- Prélever un fragment d'une colonie de la levure à tester.
- Faire une micro-suspension homogène dans la goutte d'eau distillée stérile.
- Déposer à côté de la suspension une petite goutte d'encre de chine.
- Recouvrir par une lamelle afin de mélanger les deux gouttes ; il est préférable que le mélange ne soit pas homogène pour obtenir des zones avec contrastes différents (figure 13).
- Observer immédiatement au microscope optique (objectifs 10X et 40X) en examinant en particulier la zone où l'encre de chine est diluée.

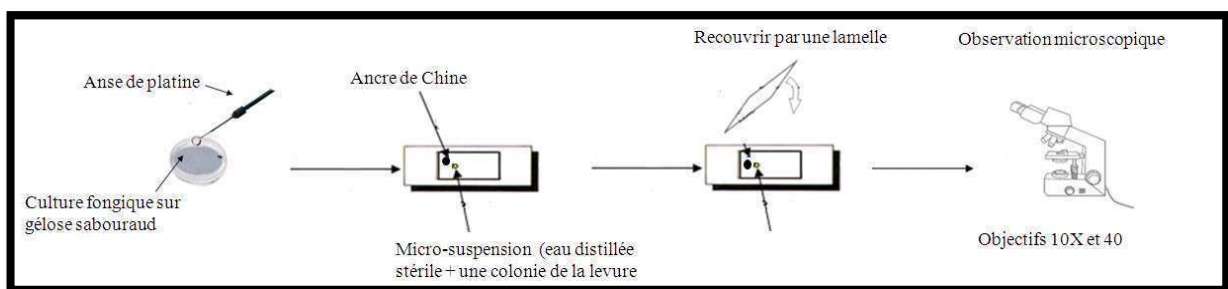


Figure 13: schéma explicatif de la méthode d'observation à l'état frais avec l'encre de chine.

4.1.2. Interprétation

La présence d'une cellule bourgeonnante entourée d'un large halo clair (correspondant à la capsule fongique) est considérée comme un résultat positif pour la présence d'une levure capsulée.

4.2. Méthode au Gram sérum

4.2.1. Technique

- Étaler une goutte de culture de la levure testée en bouillon-sérum sur une lame de microscopie.
- Colorer la lame au violet de gentiane pendant 1 minute.
- Faire agir la solution de lugol durant 1 min.
- Ajouter l'éthanol pendant 30s.
- Laver à l'eau distillée ou l'eau de robinet.
- Colorer à la fuchsine pendant 30s-1 minute.
- Laver à l'eau de robinet.
- Observer après séchage à immersion 100X.

4.2.2. Interprétation

L'apparition des halos clairs entourant les levures sur un fond rose constitué de sérum coloré par la fuchsine est un résultat positif pour la présence des capsules.

Références bibliographiques

1. Cattoir, V., Denis, F., Martin, C., Ploy, M.C., Poyart, C., Barraud, O., Bebear, C., Bebear, C., Bidet, P., Bonacorsi, S. (2016) Bactériologie médicale: Techniques usuelles. *Elsevier Health Sciences*, P18.
2. Denis, F., Bingen, E., Martin, C., Ploy, M.C., Quentin, R. (2012) Bactériologie médicale. *Elsevier Health Sciences France*.
3. Koenig, H. (1995) Guide de mycologie médicale. *Ellipses*.

TP N°04 : isolement et caractérisation macroscopique des champignons

Introduction

Les mycètes sont des organismes eucaryotes présentant un appareil végétatif très simple (Thalle) constitués d'un mycélium pluricellulaire (filamenteux : moisissures) ou unicellulaire (levure). Ce sont des organismes chimio hétérotrophes, aérobies ou anaérobies facultatifs (certains sont anaérobies stricts), symbiotiques, saprophytes ou pathogènes. Ils préfèrent pour leur croissance optimale un pH acide et une température allant de 25 à 30°C.

1. Objectif

Isolement et caractérisation macroscopique des champignons.

2. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique.
- Boite de Pétri.
- Pipettes Pasteur.
- Écouvillons.
- Gélose Sabouraud dextrose.

3. Mode opératoire

3.1. Prélèvement

Les prélèvements peuvent être réalisés à partir de différentes sources en fonction de l'objectif de l'analyse : dans le domaine médical à partir de la peau, les orifices naturels (bouche, anus, vagin, oreille), les crachats, les urines, les selles, le liquide céphalo-rachidien (LCR), le sang, les biopsies de tissus ou d'organes, etc., dans le domaine agroalimentaire à partir des produits alimentaires, et aussi dans l'environnement à partir de l'eau, air, sol, etc.

En fonction de la nature de l'échantillon à analyser, le prélèvement peut s'effectuer en utilisant : un ciseau, curette, bistouri, écouvillon ou récipient stérile (Pot, flacon ou boite de Pétri).

3.2. Isolement des champignons

La mise en culture des champignons est nécessaire pour leur isolement et identification. Elle se fait par étalement de 0,1 ml du prélèvement liquide ou de la suspension fongique sur milieu de culture spécifique coulé en tube (gélose inclinée) ou dans une boîte de Pétri.

Les milieux classiquement utilisés sont ceux de la gélose Sabouraud dextrose (digestat pancréatique de la caséine 5g/L, peptone de viande 5g/L, dextrose 40g/L, agar 15g/L), ce milieu convient pratiquement à une grande majorité des champignons y compris ceux responsables des mycoses.

L'addition d'antibiotiques tels que le chloramphénicol et/ou la gentamicine permet d'inhiber les proliférations bactériennes, surtout pour les prélèvements potentiellement multi-contaminés.

L'ajout du cycloheximide (Actidione®) comme agent sélectif au milieu Sabouraud permet l'isolement des dermatophytes mais pas lors de la recherche d'*Aspergillus* spp.

Le milieu de Czapek contenant de l'extrait de malt est très utile pour l'étude et l'identification des moisissures. Il permet d'étudier la macroscopie (caractères cultureux) et la vitesse de croissance. Également il permet de rendre l'examen microscopique optimal et donne une meilleure observation microscopique.

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à différentes températures ; 20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 45°C pendant plusieurs semaines car certains champignons peuvent avoir des vitesses de croissance très lentes.

3.3. Lecture

La lecture se fait après 48h à 76h pour les levures et tous les jours pendant 4 semaines pour les dermatophytes. Selon l'aspect des colonies on différencie les levures des champignons filamenteux :

- Pour les levures : des colonies crémeuses, lisses ou rugueuses de couleur blanche, beige ou rouge (figure 14).
- Pour les champignons filamenteux et les dermatophytes : des colonies duveteuses, cotonneuses ou poudreuses, colonies humide bombée, en forme de disque surélevé, extensif (figure 15).

Pour les champignons filamenteux, l'identification classique au laboratoire est basée essentiellement sur l'étude des caractères morphologiques comme l'aspect macroscopique de la colonie :

- **La consistance de la colonie** : glabre, plâtreuse, soyeuse, duveteuse, laineuse, poudreuse, floconneuse.
 - **La présence de rayons** : courts ou longs, fins ou larges, s'enfonçant dans la gélose.
 - **La surface** : plane, en dôme, plissée, cérébriforme.
 - **La couleur du recto et du verso de la colonie.**
- **La présence d'un pigment diffusible dans la gélose.**

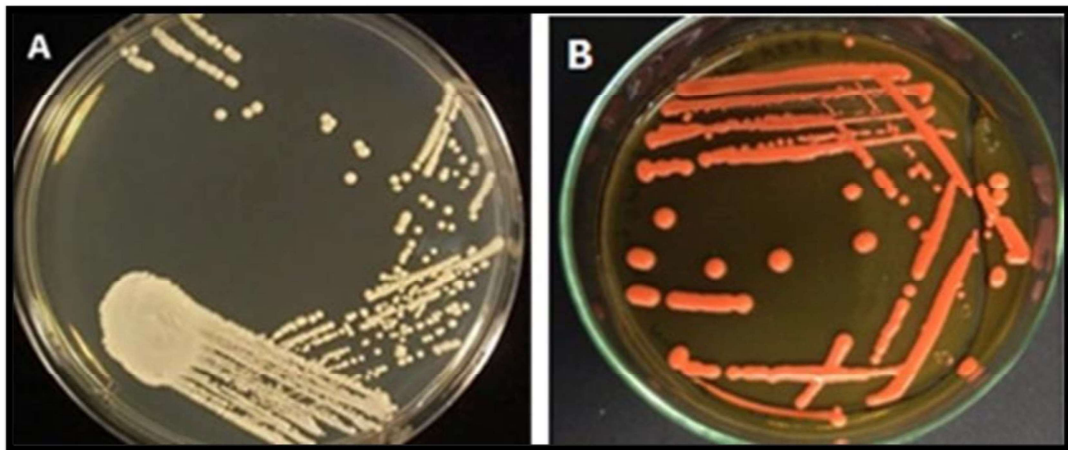


Figure 14: aspects macroscopiques des levures (A : *Candida albicans*, B : *Rhodotorula*).

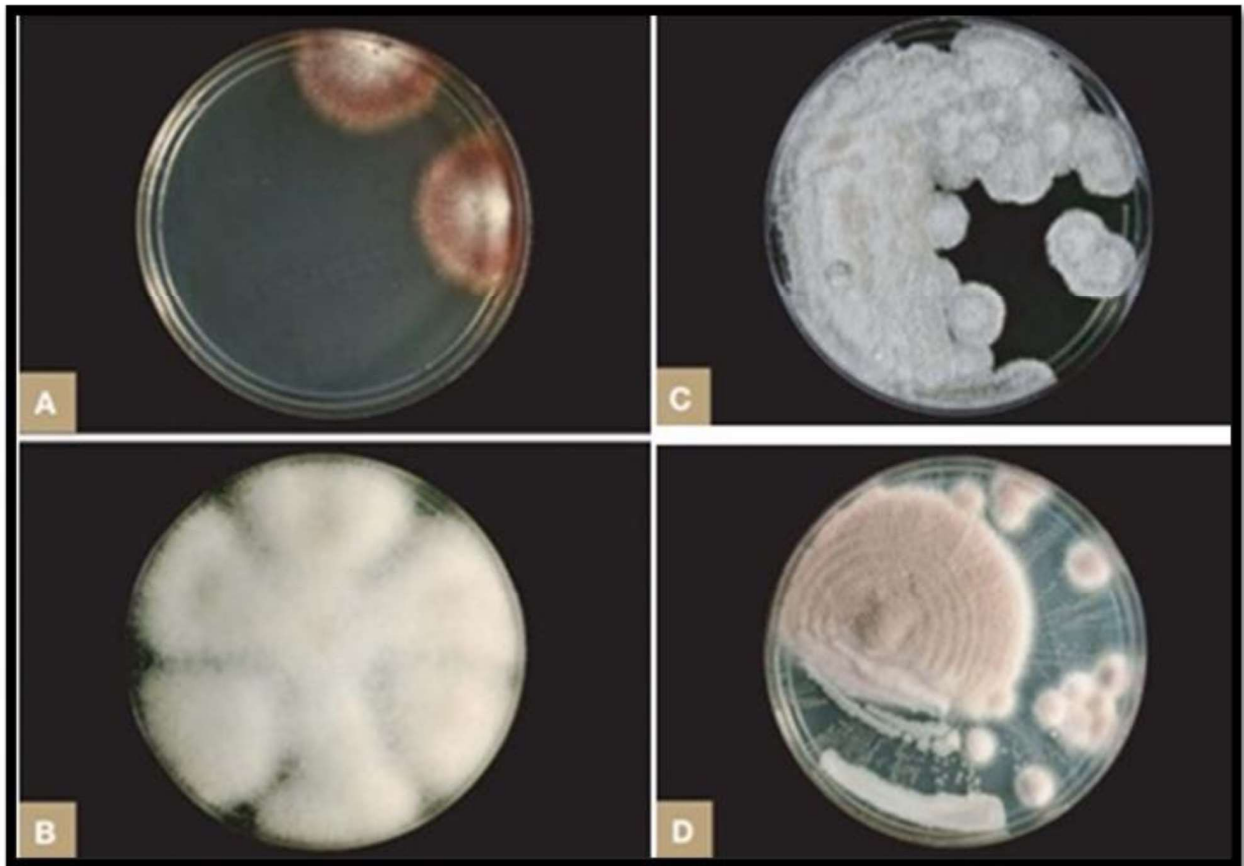


Figure 15 : aspects macroscopiques des moisissures (A : *Trichophyton tonsurans*, B : *Absidia corymbifera*, C : *Scedosporium apiospermum*, D : *Paecilomyces lilacinus*) (1).

Références bibliographiques

1. Chabasse, D., Pihet, M., Bouchara, J.P. (2009) Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine: revue générale. *Revue francophone des laboratoires*, 2009, 71-86.
2. Desoubaux, G., Chandener, J. (2010) Diagnostic biologique d'une infection aspergillaire. *Feuillets de Biologie*, 51, 33-40.
3. Fréalle, E., Bex, V., Reboux, G., Roussel, S., Bretagne, S. (2017) Méthodes d'identification et de quantification des moisissures de l'habitat: méthodes classiques, méthodes moléculaires. *Rev. Maladies Respiratoires*, 34, 1124-1137.
4. Reboux, G., Bellanger, A.P., Roussel, S., Grenouillet, F., Million, L. (2011) Moisissures et habitat: risques pour la santé et espèces impliquées. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement*, 72, 352-362.

TPN°5 : isolement des levures à partir des produits laitiers

Introduction

Le lait est un aliment presque complet et très riche (glucides, protides, lipides, sels minéraux et vitamines). Ces éléments sont présents à des concentrations satisfaisantes pour la croissance et la multiplication cellulaire, de ce fait il représente un milieu très favorable pour le développement et la prolifération des microorganismes.

Le lait lors de la traite, et au cours du transport et du stockage à la ferme ou à l'usine, peut être exposé à des risques de contamination par des microorganismes pathogènes ou d'altération comme les champignons.

1. Objectif

Isolement des levures à partir d'échantillon du lait.

2. Matériel/réactifs

- Etuve bactériologique.
- Boîtes de Pétri.
- Pipettes Pasteur.
- Pipettes graduées (1 ml).
- Glucose ou glycérol.
- Agitateur Vortex.
- Eau peptonée.
- Gélose au chlorhydrate d'oxytétracycline.
- Gélose au Dichloran rose bengale chloramphenicol.

3. Principe

La présente méthode qui cible l'isolement et dénombrement des levures viables présentes dans les produits destinés à la consommation humaine, dont l'activité d'eau est supérieure à 0,95 (œufs, viande, produits laitiers à l'exception du lait en poudre, pâtes

fraîches, légumes, fruits). Elle est basée sur les conditions favorables à la culture de levures en question.

Le dénombrement des colonies des levures et moisissures dans les boîtes sélectionnées permettra d'évaluer la charge de ces dernières par millilitre ou par gramme d'échantillons analysés.

4. Mode opératoire

4.1. Échantillonnage

L'échantillon prélevé doit être représentatif, non congelé, non altéré ou endommagé au cours du transport au laboratoire.

4.2. Préparation des dilutions décimales

L'utilisation d'un diluant avec une quantité suffisante de soluté (ex : une solution de 20 % à 35 % D-glucose ou de glycérol) est utilisée afin de réduire le choc osmotique des levures osmophiles et des moisissures xérophiles.

La préparation des dilutions décimales est réalisée dans de l'eau peptonée à 0,1 % comme diluant. Répartir aseptiquement le diluant stérile à raison de 9 ml dans des tubes stériles. Une dilution au $1/10^{\text{ième}}$ est obtenue en transférant aseptiquement 1 ml du lait à l'aide d'une pipette graduée de 1 ml stérile dans 9 ml du diluant à une température ambiante.

Une dilution au $1/100^{\text{ième}}$ est obtenue en transférant 1 ml de la dilution au $1/10$ à l'aide d'une nouvelle pipette de 1 ml stérile dans un deuxième tube de diluant. Procéder de la même manière pour les dilutions suivantes (figure 16).

Homogénéiser soigneusement chacune des dilutions pendant 5 à 10 secondes à l'aide d'un agitateur Vortex au moment de leur préparation et avant les ensemencements.

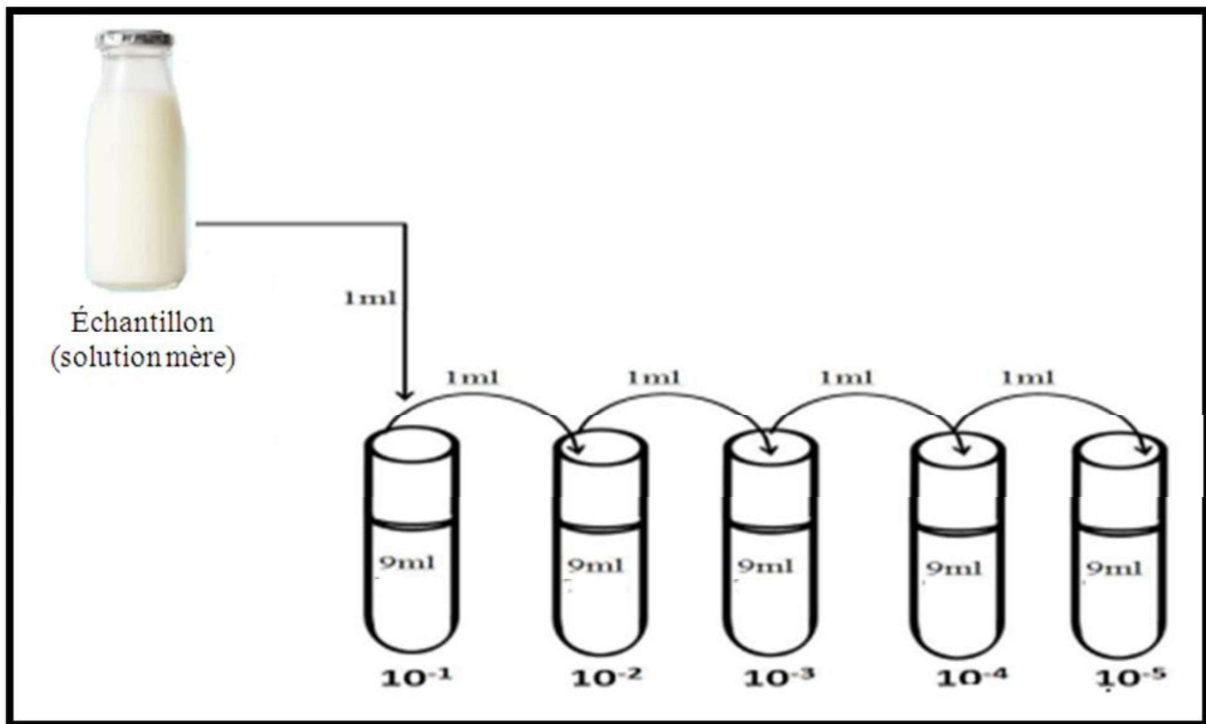


Figure 16 : schéma explicatif de la méthode de préparation des dilutions décimales.

4.3. Ensemencement

Transférer en double exemplaire 1 ml du lait et 1 ml des dilutions sélectionnées dans deux boîtes de Pétri vides et stériles. Couler 15 ml de la gélose Dichloran rose bengale chloramphenicol (DRBC) ou de la gélose au chlorhydrate d'oxytétracycline ramenées en surfusion à 45°C.

Homogénéiser soigneusement et laisser solidifier en déposant les boîtes sur une surface fraîche et plane.

4.4. Incubation

Incuber en aérobiose les boîtes à une température de 25°C ± 1° C pendant cinq jours.

5. Expression des résultats

Compter les colonies dans les boîtes de Pétri contenant entre 10 et 150 colonies au maximum. Calculer le nombre N d'UFC de levures par millilitre ou par gramme de produit analysé à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \Sigma C/V (n_1 + 0.1n_2) d$$

ΣC : la somme des colonies comptées sur les boîtes retenues.

V : le volume de l'inoculum en millilitre.

n1 : le nombre de boîtes retenues pour la première dilution.

n2 : le nombre de boîtes retenues pour la deuxième dilution.

d : le facteur de dilution correspondant à la première dilution.

Dans le cas où il y a plus de deux dilutions qui sont retenues et présentant un résultat de 10 à 150 colonies, l'équation sera comme suit :

$$N = \Sigma C / V (n1 + 0.1 n2 + 0.01 n3) d$$

n3 : est le nombre de boîtes retenues pour la troisième dilution.

Références bibliographiques

1. Journal officiel de la république Algérienne N°36 du 19 Ramadhan 1438 correspondant au 14 juin 2017. Arrêté du 26 Joumada El Oula 1438 correspondant au 23 février 2017 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou de moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25°C.
2. Journal officiel de la république Algérienne N°52 du 16 Dhou El Hidja 1436 correspondant au 30 septembre 2015. Arrêté du 19 Chaoual 1436 correspondant au 4 août 2015 rendant obligatoire la méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies dans les produits dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,95.
3. Journal officiel de la république Algérienne N°38 du 24 Chaâbane 1435 correspondant au 22 juin 2014. Arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

TPN°6 : étude de la sensibilité aux antifongiques (antifongigramme)

Introduction

La détermination de la sensibilité in vitro des champignons filamenteux ou des levures aux antifongiques permettra de guider le protocole thérapeutique chez les patients. Une détermination de la sensibilité in vitro aux antifongiques (antifongigramme) est recommandée pour toute souche de champignon (levure ou moisissure) isolée d'un site profond supposé stérile ou d'un site superficiel.

Afin de déterminer la sensibilité in vitro des champignons aux antifongiques, deux principales techniques sont disponibles : microdilutions en milieu liquide et la technique de diffusion en milieu gélosé où le choix de la méthode d'évaluation varie en fonction du type de champignon à tester.

1. Objectif

Déterminer la sensibilité aux antifongiques d'une levure et/ou une moisissure in vitro.

2. Principe de la technique de diffusion en milieu gélosé

Le principe de cette technique est de vérifier la présence ainsi que la taille des zones d'inhibition de la croissance d'un champignon se développant sur un milieu de culture sur lequel une bandelette (E-test, renfermant un gradient de l'antifongique à tester) ou un disque imprégné d'une concentration bien déterminée de l'antifongique à tester a été déposé.

3. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique.
- Vortex.

- Boîtes de Pétri.
- Pipettes Pasteur.
- Tubes à essai.
- Portoir pour tubes.
- Une règle ou un pied à coulisse.
- Écouillons.
- Densitomètre.
- Eau physiologique stérile.
- Gélose Mueller-Hinton.
- Glucose.
- Bleu de méthylène 0,5µg/ml.
- Des disques d'antifongiques/bandelettes d'antifongiques (E-test).

4. Mode opératoire de la méthode de diffusion en milieu gélosé

- A partir d'une culture pure, préparer une suspension fongique en solution saline.
- Plonger un écouillon stérile dans la suspension fongique et éliminer l'excès de liquide en essorant l'écouvillon sur les parois du tube.
- Ensemencé de façon homogène à l'aide de l'écouvillon la totalité de la surface de la gélose Mueller-Hinton additionnée de 2% de glucose (pour favoriser la croissance) et du bleu de méthylène avec une concentration de 0,5µg/ml (pour une meilleure visualisation des zones d'inhibition) dans trois directions. Pour les champignons filamenteux, le milieu Mueller-Hinton est également utilisé mais sans addition du glucose ou du bleu de méthylène.
- Déposer les disques imprégnés d'une concentration connue d'antifongique sur la surface de la gélose, préalablement ensemencée par la souche testée.

- Incuber les boîtes ensemencées pendant 24 à 72 heures selon le champignon en question.

Les différentes étapes de réalisation de la technique de diffusion en milieu gélosé (antifongigramme) sont résumées dans la figure 17.

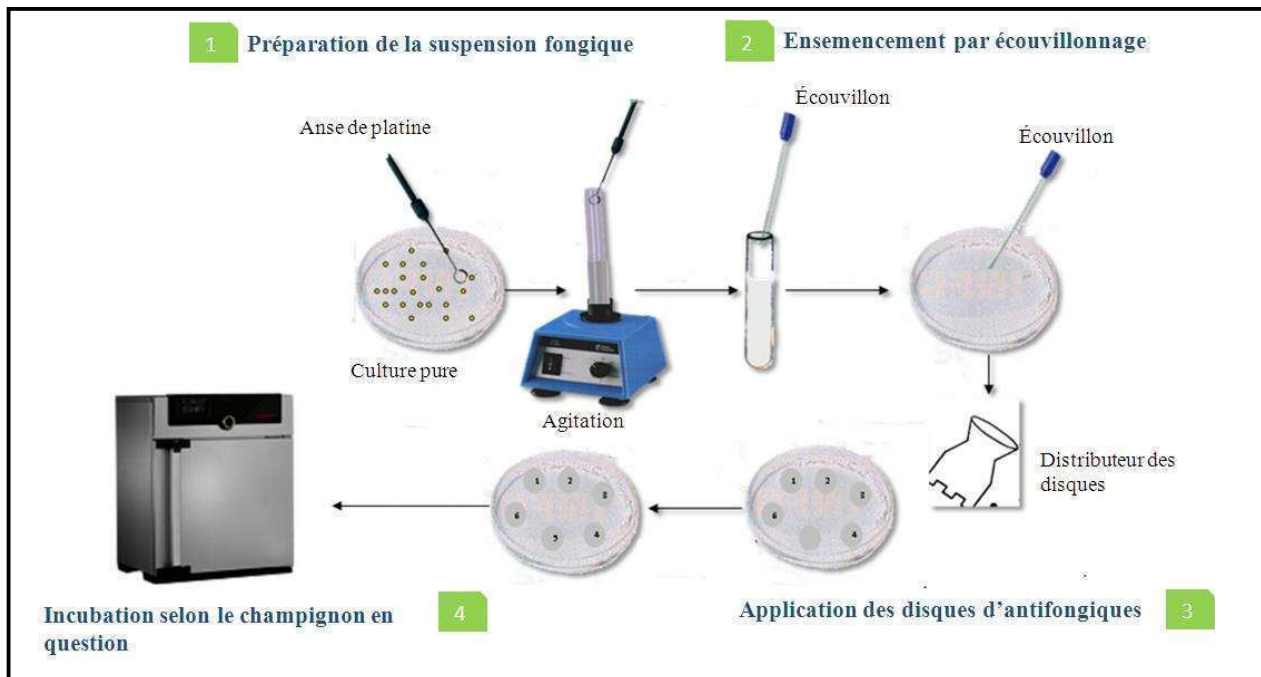


Figure 17 : schéma explicatif de la technique d'antifongigramme.

5. Interprétation

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle et de préférence un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.
- La mesure des diamètres des zones d'inhibition permet de catégoriser la souche testée en sensible, intermédiaire ou résistante en se référant aux diamètres critiques et interprétations recommandés par EUCAST.

Références bibliographiques

1. Houzé, S., Delhaes, L. (2022) Parasitologie et mycologie médicales. *Elsevier Health Sciences*.
2. Christian, R. (2013) Mycologie médicale. *Lavoisier*.
3. Paugam, A. (2010). Le point sur l'antifongigramme. *La Lettre de l'infectiologue*, 25, 222-227.