

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université «SAAD DAHLAB» BLIDA

Faculté des Sciences de la nature et de vie (SNV)

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme du master

En Biologie

Option : Microbiologie-Bactériologie

Thème :

*Diagnostic des mycoses superficielles et
évaluation de la sensibilité des champignons
isolées vis-vis de certains extraits naturelles
au CHU du Blida .*

Présenté par :

M^{elle} : CHERIF Naima

Soutenu publiquement le : 03/10/2013.

Devant le jury composé de :

<i>M^R. Benyahia. N</i>	<i>MAA</i>	<i>USDB</i>	<i>President</i>
<i>M^R. Bendjoudi. D</i>	<i>MCB</i>	<i>USDB</i>	<i>Examineur</i>
<i>M^{me} Keskas. S</i>	<i>MAB</i>	<i>USDB</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>Pr. Ouled Rouis –Saoudi .K</i>	<i>MCB</i>	<i>USDB</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M^{me} Debib .A</i>	<i>MAA</i>	<i>USDB</i>	<i>Co-promotrice</i>

Promotion 2012-2013

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier Dieu le tout puissant, pour m'avoir donné la force ; la patience et la santé durant toutes ces années d'étude.

*J'ai la chance d'effectuer ce travail minutieux dans laboratoire des urgences médicale – unité parasitologie -mycologie –de CHU de Blida, sous la direction de **M^{me} Ouled Rouis – Saoudi .K** Professeur en Parasitologie –Mycologie, maitre de conférences B à l'USDB (faculté de médecine), qu'elle trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance de m'avoir accordé sa confiance et guidé dans mon travail tout au long de cette étude, ses compétences, ses précieux conseils ,sa disponibilité et sa gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail.*

*Mes remerciements s'adressent à **M^{me} Debib .A** maitre assistante "A" à la faculté des sciences de la nature et de vie à l'USDB pour avoir accepté d'être ma Co-promotrice et pour toutes les connaissances que vous m'avez transmises au cours de cette année d'étude.*

*J'exprime mes respectueux remerciements à **M^R Benyahia .N** maitre assistant "A" à l'USDB pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de soutenance, et soyez assuré de tout mon respect.*

*Je tiens à exprimer mes reconnaissances à **M^R Bendjoufi .D** maitre de conférence B, aussi bien à **M^{me} Keskas .S** maitre assistante "B" pour avoir accepté d'examiner ce travail ; veillerez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mes sincères remerciements.*

*A **M^{me} Professeur Chekiri-Talbi .M**, maitre de conférence B en Parasitologie – Mycologie ; **M^{me} Rezkallah .L** et **M^{me} Ammour .W** maitres assistantes en Parasitologie – Mycologie, je tiens à vous remercier de m'avoir accueillie dans votre groupe, je suis reconnaissante pour la confiance que m'avez accordé, votre gentillesse, disponibilité et encouragements.*

*J'adresse aussi mes remerciements, mes reconnaissances les plus sincères à **M^{elle} Bellhadef F/Z** biologiste au sein du laboratoire de d'unité M'Hamed El Yazid (CHU Blida) pour sa sympathie, ses conseils et son aides tout le long de mon étude, merci infiniment.*

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire d'unité M'Hamed El Yazid: les responsables M^{me} Chekimi .M et M^{me} Hamaidi .DJ et toutes les biologistes chacune à son nom, pour leur accueil à chaque fois chaleureux et amical.

Ma collègue M^{me} Tahar-Djabar .K de l'institut Pasteur d'Alger, veuillez accepter mes sincères remerciements et ma profonde estime pour votre aides précieuse et tous les moments passer ensemble durant ces deux années d'études en Master.

Mes sentiments de reconnaissance et nos remerciements vont également à toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. En particulier, M^r Azizo.A, M^r Zouaoui .SA de l'USDB, M^r Tafahi DJ et son équipe du laboratoire d'hygiène de Blida.

Mes vifs remerciements vont à tous les enseignants de faculté des sciences de la nature et de vie de l'Université de l'USDB et à mes collègues et mes amis pour les moments sympathiques que nous avons passé ensemble.

Dédicaces

Je tiens à remercier le Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la volonté et la patience pour continuer et de mener à bien faire ce mémoire du Master.

C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux personnes les plus chères au monde, mon père qui m'a permis de continuer mes études dans des meilleures conditions et qui m'a pris à ne jamais baisser les bras ; à la mémoire de ma mère qui m'a donné la vie, à mes grand-pères et ma grand-mère qui m'a toujours aimé et comblé par ses bénédictions, que Dieu le tout clément les accueille en son vaste paradis.

Je dédie aussi cette modeste réalisation :

A la merveilleuse et adorable grande sœur qui m'a beaucoup encouragé et donné la force pour continuer grâce à ses conseils, patience, amitié et amour, et à mes chères tantes et oncles, qui m'ont tout donné, sans rien recevoir : je vous remercie infiniment pour votre amour, soutien, courage et sacrifices.

A ma chère jumelle Amina pour son encouragement et tous les moments passés ensemble.

A mes adorables et magnifiques frères : Ali, Mohamed surtout, aussi à Youcef, Brahim et Ahçen qui m'ont encouragé pour continuer mes études et pour leur soutien morale et financier.

A tous mes cousins et cousines du petit au grand.

A ma chère amie et grande sœur Belhade F/Z et sa famille.

A mes merveilleuse amie et soeurs : Tlidjani .M et Tayebi .K je leur dédie ce modeste travail en signe de ma profonde tendresse et ma sincère amitié.

A toutes personnes qui me reconnaissent en particulier mes amies : Amira, Aida, Safia, Souad, Tahar Djabar .K, Meriem Lahlali, Fatima et Farida.

Et en fin à toute la promotion de Master Microbiologie –Bactériologie de l'année universitaire : 2012-2013.

Naima

Résumé

Les mycoses superficielles sont des infections fongiques plus fréquentes dans les pays africains notamment l'Algérie. Il nous est donc apparu opportun d'évaluer la fréquence des mycoses superficielles au CHU de Blida, d'isoler et d'identifier les espèces responsables, et tester la sensibilité *in vitro* des ces espèces isolés à l'égard des huiles essentielles extraites des nos patrimoine végétale .

L'étude nous a montré un taux de 64,74% des mycoses superficielles, dont les onychomycoses occupent la moitié des cas avec la dominance de mycoses de la peau glabre avec 43,75%.

Les levures sont incriminées dans 79,31% contre 20,69% des dermatophytes avec en tête de liste *C.albicans* avec 31,03%, *T.mentagrophytes* 13,79% et *C.parapsilosis* avec 10,34%.

L'analyse chromatographique des huiles essentielles de romarin, eucalyptus radié et pistachier lentisque indique un taux d'identification de 86,84%, 95,31% et 92,31%.

Les tests de sensibilité des levures et dermatophytes isolées des mycoses superficielles par l'aromatogramme révèle que les 03 huiles essentielles) eucalyptus radié, pistachier lentisque et romarin) exhibent des activités antifongiques avec des halos d'inhibition de 09,00 mm jusqu'au un diamètre de 90 ,00mm.

Mots clés :

Mycoses superficielles, diagnostic mycologique, huiles essentielles, activité antifongiques.

Abstract

Superficial fungal infections are more common fungal infections in African countries including Algeria, It therefore seemed appropriate to evaluate the frequency of superficial mycoses CHU Blida, to isolate and identify the species responsible, and test the in vitro susceptibility of the isolated against essential oils extracted species of our plant Heritage.

The study has shown a rate of 64.74 % of superficial mycoses , including onychomycosis occupy half of the cases , fungal infections of the glabrous skin with 43.75% , ringworm scalp with 4, 46% and 1.78 % damage to the oral mucosa, and that women are the most affected with a rate of 57.17 % against 42.86 % of men and sex ratio of 0.75.

Yeasts are implicated in 79.31 % against 20.69% of dermatophytes with the head of *C.albicans* list with 31.03% , 13.79% and *T.mentagrophytes* , *C.parapsilosis* with 10.34% .

Chromatographic analysis of the essential oils of rosemary, *Eucalyptus radiata* and pistachio mastic shows a recognition rate of 86.84 % , 95.31 % and 92.31 % .

Susceptibility testing of yeasts and dermatophytes isolated superficial mycoses by aromagramme reveals that 03 essential oils of *Eucalyptus radiata*, mastic pistachio and Rosemary) exhibit antifungal activity with inhibition halos from 09.00 mm to a diameter 90,00mm.

Keywords :

Superficial mycoses, mycological diagnosis, essential oils, antifungal activity.

ملخص

الالتهابات الفطرية السطحية هي الالتهابات الفطرية أكثر شيوعا في البلدان الأفريقية بما فيها الجزائر ، وبالتالي فإنه يبدو مناسباً لتقييم وتيرة داء الفطريات السطحية بالمستشفى الجامعي بالبلدية ، لعزل والتعرف على الأنواع المسؤولة ، واختبار حساسيتها في المختبر اتجاه الزيوت الأساسية المستخرجة من الأنواع لدينا مصنع التراث.

وقد أظهرت الدراسة وجود نسبة 64.74 % من داء فطري سطحي، بما في ذلك داء فطريات الاظافر التي تحتل نصف الحالات ، والالتهابات الفطرية في الجلد غير المشعر مع 43.75 %، و سعة فروة الرأس مع 46، 4 % و 1.78% الأضرار إلى الغشاء المخاطي للفم ، و أن النساء هن الأكثر تضررا بنسبة 57.17 % مقابل 42.86 % من الرجال و نسبة الجنس قدرت ب 0,75.. وتورط في الخمائر بنسبة 79.31 % مقابل 20.69 % من الفطريات الجلدية , على رأس القائمة: المبيضات البيض (كانديدا البيكانز) بنسبة 31.03 % ، يليها T.mentagrophytes بنسبة 13.79 % و بنسبة تقدر ب 10.34C.parapsilosis %

أظهر التحليل الكروماتوغرافي أن الزيوت الأساسية المستخرجة من إكليل الجبل ، شجرة الكينا المتشعبة و الضرو بمعدل الاعتراف 86.84 % ، 95.31 % و 92.31 % تباعا.

إختبار الحساسية من الخمائر و الفطور الجلدية المعزولة من مختلف أنواع داء الفطريات السطحية بواسطة طريقة Aromatogramme كشف أن الزيوت الأساسية لكل من (شجرة الكينا المتشعبة ، الضرو وإكليل الجبل) تحمل نشاطا مضادا للفطريات مع حالات تثبيط من 09.00 مم إلى قطر 00,90 مم.

الكلمات

المفتاحية

:

داء فطري جهازي سطحية، تشخيص الفطريات ، والزيوت الأساسية ، والنشاط مضاد للفطريات.

Table des matières

Introduction	01
---------------------------	----

Chapitre I : Partie bibliographique

I-1-les mycoses superficielles.....	03
I-1-1-Les champignons.....	03
I-1-2-Classification des mycoses superficielles	04
I-1-2-1-Candidoses superficielles.....	04
I-1-2-2-Dermatophyties (Dermatophytoses)	06
I-1-2-3-Malassezioses	10
I-1-2-4-Autres infections superficielles dues à <i>Trichosporon sp</i>	12
I-2-Les huiles essentielles (HE).....	13
I-3- -Les plantes médicinales à huiles essentielles utilisées	18
I-3-1-Classification botaniques des plantes médicinales utilisées.....	18
I-3-2-Eucalyptus radié (<i>Eucalyptus radiata</i>).....	18
I-3-3- Lentisque (<i>Pistacia lentiscus L.</i>)	19
I-3-4- Romarin (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	19

Chapitre II : Matériel et méthodes

II-1-Matériel	21
II-1-1-Matériel biologique.....	21
II-1-2-Matériel non biologique.....	21
2 1 II-2-Méthodes.....	22
II-2-1-Diagnostic mycologique des mycoses superficielles	22
II-2-1-1-Prélèvement	22
II-2-1-2-Examen direct	23
II-2-1-3-La culture	25
II-2-1-4-Identification du champignon responsable.....	26
II-2-1-4-1-démarche de l'identification pour les levures	26
A-Caractères morphologiques	26
B-Caractères physiologiques et biochimiques	26
B.1)-Test de filamentation sur le sérum (test de blastèse)	26
B.2)-La production de chlamydospores (Test de Rice-Cream)	27
B.3)-Assimilation de certains sucres « galerie AUXACOLOR TM 2 ».....	30

II-2-1-4-2-L'identification des champignons filamenteux	34
I-2-2-Tests d'évaluation de sensibilités des champignons isolées vis-à-vis les huiles essentielles	35
I-2-2-1-Tests d'évaluation qualitative de l'activité antifongique : Aromatogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé	36
a)-Principe	36
b)-Mode opératoire (levures et dermatophytes).....	36
I-2-2-2-Evaluation quantitative de l'activité antifongique	37
II-2-2-2-1-tests préliminaires du choix de solvant idéal	37
II-2-2-2-2-Méthode de macrodilution en milieu solide.....	38
a)-préparation de l'inoculum.....	38
b) préparation de l'émulsion d'HE	38
c)-méthode de macrodilution en milieu solide	38

Chapitre III : Résultats et Discussion

III-1-Résultats	40
III-1-1-Résultats de diagnostic mycologique	40
III-1-1-1-Répartition des prélèvements globaux	40
Résultats quantitatives.....	41
III-1-1-3-Résultats qualitatives.....	61
III-1-1-3-1-Répartition des différents agents mycosiques isolées	61
III-1-1-3-2-Fréquence des champignons isolées	62
III-1-1-3-3-Répartition des agents étiologiques selon le siège.....	62
III-1-1-3-3-Répartition des agents étiologiques selon le siège.....	63
III-1-2- Résultats d'analyse chromatographiques des huiles essentielles par CPG/SM.....	66
III-1-2-1-L'analyse chromatographiques par CPG/SM des huiles essentielles d'eucalyptus radié	66
III-1-2-2-L'analyse chromatographiques par CPG/SM des huiles essentielles de pistachier lentisque	67
III-1-2-3-L'analyse chromatographiques par CPG/SM des huiles essentielles de romarin ...	68
III-3- Résultats des tests de sensibilité aux HE.....	69
III-3-1-Résultats des tests qualitatifs par la technique d'aromatogramme.....	70
III-3-2-Résultats de l'évaluation de la concentration minimale inhibitrice CMI et fongicide CMF	73

III-3-2-1-Résultats des tests préliminaires de choix de solvants.....	73
III-3-2-2-Résultats de la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF)	74
III-3-2-3-La nature de l'activité antifongique des trois huiles essentielles	74
III-2-Discussion.....	77
Conclusion	88

Références bibliographiques

Liste des figures

N°	Titre des figures	Page
01	Lame de scotch test cutané sous microscope optiques x40.	25
02	Les étapes de test de filamentation sur sérum (test de blastése).	27
03	Photo original tube germinative de <i>C.albicans</i> (x40).	27
04	Les différentes étapes de la méthode de Dalmau.	29
05	Photo originale des chlamydospores de <i>C.albicans</i> x40 (test de Rice Cream).	30
06	Les étapes de test AUXACOLOR.	32
07	Schéma de la plaque d'AUXACOLOR 2 avant (a) et après (b) l'assimilation des sucres.	33
08	Illustration de la méthode de l'aromatogramme.	37
09	La solution d'agar à 0,2%.	38
10	La série des dilutions.	38
11	Répartition des résultats de l'examen direct et culture.	40
12	Répartition des prélèvements selon la localisation des lésions.	41
13	Répartition des prélèvements en fonction de siège la peau glabre.	42
14	Répartition des prélèvements en fonction de siège des ongles.	43
15	Répartition des prélèvements en fonction de siège le cuir chevelu.	43
16	Répartition des prélèvements au niveau de muqueuses buccale.	44
17	Répartition des résultats positifs selon la localisation des lésions.	44
18	Répartition des résultats positifs selon le siège peau glabre.	45
19	Répartition des résultats positifs selon le siège ongles	45
20	Types de parasitisme pileaire.	46
21	Répartition des résultats positifs selon le sexe.	46
22	Répartition des résultats positifs selon le siège et sexe au niveau de la peau glabre.	47
23	Répartition des résultats positifs selon le siège et sexe au niveau des ongles.	48
24	Répartition des résultats positifs selon le siège et sexe au niveau de cuir chevelu.	48
25	Répartition des résultats positifs selon le siège et sexe au niveau des muqueuses buccales.	49
26	Répartition des résultats positifs selon l'âge.	49
27	Répartition des prélèvements positifs d'herpes circinées selon et l'âge.	50
28	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des petits plis selon l'âge.	51
29	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des grands plis selon l'âge.	51

30	Répartition des prélèvements positifs des Paume / plante des selon l'âge.	52
31	Répartition des prélèvements positifs des lésions de pityriasis versicolor des selon l'âge.	52
32	Répartition des prélèvements positifs des ongles des mains selon l'âge.	53
33	Répartition des prélèvements positifs des ongles des orteils selon l'âge.	53
34	Répartition des prélèvements positifs du cuir chevelu selon l'âge.	54
35	Répartition des prélèvements positifs des muqueuses buccales selon l'âge.	54
36	Répartition des prélèvements positifs d'épidermophyties circinées selon le sexe et l'âge.	55
37	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des petits plis selon le sexe et l'âge.	56
38	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des grands plis selon le sexe et l'âge.	56
39	Répartition des prélèvements positifs des paumes /plantes selon le sexe et l'âge.	57
40	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des lésions de pityriasis versicolor selon le sexe et l'âge.	58
41	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des ongles des mains selon le sexe et l'âge	59
42	Répartition des prélèvements positifs d'intertrigos des ongles des orteils selon le sexe et l'âge.	59
43	Répartition des prélèvements positifs au niveau de cuir chevelu selon le sexe et l'âge.	60
44	Répartition des prélèvements positifs au niveau des muqueuses buccales selon le sexe et l'âge.	60
45	Répartition des prélèvements positifs selon les circonstances pathologiques associées.	61
46	Répartition des différents agents mycosiques isolés.	61
47	Fréquence des champignons isolés.	62
48	Répartition des agents étiologiques selon le siège.	63
49	Répartition des agents étiologiques au niveau d'ongles des mains.	63
50	Répartition des agents étiologiques au niveau d'ongles des orteils.	64
51	Répartition des agents étiologiques au niveau de la paume des mains et plantes des pieds.	64
52	Répartition des agents étiologiques au niveau des lésions d'herpes circinée.	65
53	Répartition des agents étiologiques au niveau d'intertrigos des grands plis.	65

54	Répartition des agents étiologiques au niveau d'intertrigos des petits plis.	66
55	Distribution en pourcentage des différents composants de l'HE d'eucalyptus radié.	67
56	Distribution en pourcentage des différents composants de l'HE de pistachier lentisque.	68
57	Distribution en pourcentage des différents composants de l'HE de romarin.	69
58	Diamètres des zones d'inhibitions des champignons par la méthode d'aromatogramme.	70
59	Activité antifongique des HE par l'aromatogramme.	72
60	Diamètres des ZI des tests préliminaires.	73
61	Résultats de concentration minimale inhibitrice (CMI) et fongicide (CMF).	76

Liste des tableaux

N°	Titre de tableau	page
I	Classification botanique des plantes médicinales utilisées	18
II	Les différents types des prélèvements	21
III	Activité antifongique des trois HE testés par l'aromatogramme	70
IV	Les diamètres d'inhibition des différents solvants	73
V	Les résultats de la détermination de la CMI et CMF par la méthode de microdilution en milieu solide	74
VI	Interprétation des résultats de la CMI et CMF	75

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

ANOFEL : Association Française Des Enseignants De Parasitologie Et Mycologie.

CEDEF : Collège Des Enseignants En Dermatologie De France.

CPG/SM: Chromatographie en phase gazeuse couplé à une spectrophotométrie de masse.

DZI : Diamètre(s) de la zone d'inhibition.

H E : Huile Essentielle.

Glossaire

- Actidione** : nom commercial du cycloheximide, antibiotique antifongique qui inclus dans le milieu de culture ; inhibe la poussé de nombreuses moisissures (**Chabasse et al., 1999**).
- Anthropophile** : lorsque le principal hôte hote est l'homme (**Midgley et al., 1998**).
- Anti-mycosique** : lutte contre les affections provoquées par des champignons (**Delille, 2007**).
- Antioxydant** : prévient l'oxydation et l'altération des tissus (**Delille, 2007**).
- Arthrospores** : spores formées par fragmentation d'un filament à l'endroit des septa (**Kœnig, 1995**).
- Auxanogramme** : technique mycologique qui, pour identifier une espèce fongique (levures surtout), utiliser leur propriété d'assimilation de certains sucres (**Chabasse et al., 1999**).
- Blastospores** : spore formée par bourgeonnement (**Kœnig, 1995**).
- Candidoses** : sont des infections dues à des champignons levuriformes, du genre *Candida* (**Richard et Grob ,2006**).
- Carminatif** : qui fait expulser les gaz intestinaux (**Baba Aissa, 2011**).
- Chlamydospores** : spores rondes à paroi très épaisse représentant une forme de résistance (**Kœnig, 1995**).
- Dermatophytes** : sont des champignons microscopiques kératinophiles capables d'envahir la kératine animale ou humaine (**Roberts, 1997**).
- Dermatophytoses** : infections sont dues à des champignons filamenteux, à mycélium cloisonné, les dermatophytes (**Richard et Grob ,2006**).
- Diurétique** : au sens large qui augmente la diurèse (**Baba aissa, 2011**).
- Ectothrix** : envahissement dermatophytique in vivo des cheveux, la plupart des champignons étant sous forme d'une gaine des spores autour de cheveux (**Midgley et al., 1998**).
- Endothrix** : envahissement dermatophytique in vivo des cheveux, les spores se développant à l'intérieur du cheveux (**Midgley et al., 1998**).
- Epidermophytie circinée** : est une lésion érythémato-vésiculo-squameuse de croissance centrifuge rapide, généralement due à *T. rubrum* ou *M. canis* (**Rispail, 2008**).
- Expectorant** : qui facilite l'expectoration (expulsion par la bouche des matières qui encombrant les voies respiratoires) (**Baba aissa, 2011**).

- **Favus** : due à *T. schoenleinii* qui est une lésion de l'épiderme centrée sur le cheveu, déprimée en creuset ; le parasitisme est de type endothrix avec présence de très nombreux filaments arthrosporés (**Maslin et al., 2005**).
- Géophiles** : quand l'habitat naturel est le sol (**Midgley et al., 1998**).
- Glabe** : se dit d'une culture ou d'une structure dépourvue de poil (**Chabasse et al., 1999**).
- Intertrigo** : atteinte inflammatoire des plis cutanés (**Richard et Grob ,2006**).
- Levures** :organisme eucaryotes unicellulaires sans chlorophylle ; cosmopolites, se reproduisent par bourgeonnement (**Pfaller et al., 2010**).
- Muguet** : variété de candidose buccale siégeant au niveau de la langue, des joues,du palais et des lèvres,se traduisant par l'apparition d'amas blanc crémeux ,confluant en plaques qui jaunissant en vieillissant (**Kernbaum,2008**).
- Ongle** : lame de kératine dure placé à l'extrémité des doigts et des orteils, sertie dans la peau environnant par les replis cutanés latéraux et postérieurs (**Hérisson et al., 1994**).
- Onychomycoses** ou **onyxis** : sont des mycoses atteignant les ongles des mains ou des pieds- (**Baran et Pierard ,2004**).
- Peau glabe** : c'est le revêtement cutané dépourvu de poils et de cheveux. A l'exception des paumes des mains et des plantes des pieds, elle est néanmoins porteuse d'un fin duvet (**Rispail, 2008**).
- **Perlèche** : est une fissuration au niveau des commissures labiales. Elle est bilatérale et le fond croûteux gêne l'ouverture de la bouche (**ANOFEL, 2002**).
- Piedra blanche** : est une infection fongique superficielle, bénigne cosmopolite des cheveux due à des levures de genre trichosporon (**Colombo et al., 2011**).
- Pityriasis** : nom générique désignant diverses dermatoses caractérisées par une fine desquamation (**Kernbaum, 2008**).
- **Pityriasis capitis** : est une lésion squameuse et prurigineuse du cuir chevelu, associée à une dermite séborrhéique (« pellicules ») (**Rispail, 2008**).
- Sesquiterpènes** : composés formés de trois unité isoterpéniques et constituant de certaines huiles essentielles (**Pousset, 2004**).
- Teigne** : terme désigne les infections dermatophytique dues à un parasitisme pilaire (**Bonnetblanc, 2008**).
- Tonique** : fortifie ou stimule l'activité de l'organisme (**Delille, 2007**).
- Vaccinostyle** : plume métallique très pointue et non fendue servant à pratiquer certaines vaccinations par scarification ou des tests allergiques (**Kernbaum, 2008**).
- Zoophiles** : lorsque l'hôte principal est un animal (**Midgley et al., 1998**).

Introduction

Introduction

II- Matériel et méthodes :

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire des urgences biologiques au centre hospitalo- universitaire, unité M'Hamed El Yazid –Blida, sur une période de six mois allant du mois février 2013 jusqu'au juillet 2013.

II-1-Matériel :

II-1-1-Matériel biologique :

- **Les prélèvements** : 173 prélèvements ont été effectués sur 131 patients de différentes tranches d'âges, chaque patient a bénéficié d'un et /ou plusieurs prélèvements (**voir Tableau II**).

Tableau II : Les différents types des prélèvements :

	Nombre de prélèvement
La peau glabre	77
Ongles	74
Cuir chevelu	19
Muqueuses buccales (bouche)	03
Totale	173

-**Les huiles essentielles** utilisées pour l'évaluation de l'activité antifongique vis-à-vis des champignons isolés à partir des prélèvements sont celle d'eucalyptus radié, romarin et pistachier lentisque, qui sont achetées à raison d'un flacon de 20 ml de la société **Extral-bio** de Chiffa-Blida.

Les huiles essentielles obtenues sont extraites par la méthode d'entraînement à la vapeur d'eau à l'échelle industrielle à partir des parties aériennes de chaque plante (feuilles, tiges, fleurs, fruits) puis analysées dans le laboratoire de cette unité par chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrophotométrie de masse (CPG/SM).

II-1-2-Matériel non biologique :

L'ensemble d'utiles composant l'appareillage, verreries et autres, les milieux de la culture, réactifs et les colorants et les milieux d'identification : Rice cream (RTA) sont développés dans **l'annexe II**.

II-2-Méthodes :

II-2-1-Diagnostic mycologique des mycoses superficielles :

Le diagnostic mycologique est un outil indispensable au clinicien pour confirmer l'origine fongique.

La démarche du diagnostic mycologique d'une mycose superficielle comporte quatre étapes successives : prélèvement, examen direct, culture et en fin identification de l'espèce fongique

II-2-1-1-Prélèvement :

Le prélèvement est une étape importante dans l'établissement du diagnostic mycologique. Dans tous les cas,

- il doit s'accompagner d'une fiche de renseignement qui comporte les données clinico-biologique du chaque patient.

La fiche de renseignements comporte des informations sur l'âge ,le sexe, type de lésion et date de leur apparition ,maladie associée,notion de voyage ,contact avec les animaux,traitement et leur nature) (**voir annexe III**).

-il doit intéresser des produits pathologiques parasités par les champignons vivants et être effectué en dehors de tout traitement antifongique, local ou général.

- le matériel utilisé doit être obligatoirement stérile.

a)-Modalités du prélèvement :

Le mode de prélèvement diffère selon le siège de prélèvement :

a.1. Muqueuse et orifice naturels :

On utilise un écouvillon stérile et bien frotter les lésions.

a.2. La peau glabre :

-en cas des lésions squameux : à l'aide d'un vaccinostyle, on gratte les squames en périphérie et les recueilli dans une boîte de Pétri.

Si les lésions suintantes ou peu squameuses, frotter par un écouvillon

-en cas de suspicion de pityriasis versicolor : Le prélèvement est basé sur la technique de scotch test cutanée, en collant fortement un morceau de cellophane adhésive, puis on détache et l'on applique sur une lame porte-objet et observer directement sous microscope optique.

Cette méthode n'est réalisable dans tous les cas (région pileuse, lésions plus inflammatoire ou suintante).

a.3.Des cheveux et des poils :

- avec la pince à épiler, arracher, les cheveux cassés,
- si la lésion est très squameuse ou il y a des croûtes, racler avec le vaccinostyle,
- Après avoir fait le prélèvement au vaccinostyle, frotter avec un écouvillon humidifié avec l'eau distillé stérile à l'endroit des lésions
- en cas de teignes inflammatoires très suppurés, prélever le pus avec un écouvillon.

a.4. L'ongle :

- La partie distale et malade de l'ongle atteint doit être coupée avec une pince à ongle, puis gratter et éliminer la lisière de la partie saine.
- s'il s'agit d'un périonyxis, prélever le pus à l'écouvillon en appuyant sur le bourrelet périphérique.
- en cas de leuconychie, il est nécessaire de gratter l'ongle à sa surface.
- en cas d'onychodystrophie, avec destruction quasi-totale de l'ongle, il faut éliminer les fragments superficiels potentiellement souillés par les moisissures avant de prélever quelques fragments d'ongles disponibles.
- pour tous les prélèvements de l'ongle, cheveux et poils, squames on dispose une partie de prélèvement sur lame porte-objet pour l'examen direct, autre partie est recueilli dans boîte de Pétri pour la culture.
- en cas d'atteintes multiples chez un même malade, il faut prélever chaque lésion séparément, en changeant d'instruments à chaque fois.

II-2-1-2- Examen direct :

L'examen direct est indispensable car il apporte une réponse rapide au clinicien prescripteur, s'il est positif, il permet de débiter le traitement sans attendre le résultat de la culture souvent long (**Chabasse et Contet-audonneau, 2011**).

a)-Traitement des prélèvements kératinisés (poils, cheveux, squames et ongles) :

Le traitement avec un éclaircissant a pour but de digérer la kératine et faciliter la visualisation des éléments fongiques.

- On ajoute 2 à 3 gouttes de réactif éclaircissant (potasse à 10%, 20% ou 30% ; noir Chlorazole, lactophénol, bleu de coton) sur le produit kératinisé disposé sur lame porte –objet
- recouvert avec une lamelle.

-chauffer très doucement à la veilleuse du Bec bunsen.
-observer à la microscopie optique au grossissement x40, si nécessaire refaire l'éclaircissement.

b)-pour les muqueuses : on fait un état frais.

c)-pour le scotch test cutané fait pour le pityriasis versicolor :

On observe directement la lame à la microscopie optique.

-Résultats de l'examen direct :

➤ **Squames et fragments d'ongles:**

L'examen microscopique permet d'observer :

♣ Pour les dermatophytes, la présence de filaments mycéliennes hyalins plus au moins réguliers, septés, d'aspect en bois mort.

♣ La présence des levures bourgeonnantes : blastospores rondes ou ovales, avec parfois des filaments mycéliens ou des pseudofilaments, signes d'une candidose.

♣ Des blastospores, arthrospores cylindriques et filaments mycéliens : levures de genre *Trichosporon*.

♣ on observe, dans les squames, des amas de Blastospores rondes à ovales de 2 à 5 µm, très réfringentes, avec un double contour bien net donnant un aspect en grappe de raisin, on peut trouver des filaments courts ; cet aspect est caractéristique des levures du genre *Malassezia*.

➤ **Teignes et poils (Fathalah et Saghrouni, 2008) (voir annexe IV).**

Dans les cheveux ou les poils, le développement des dermatophytes se traduit à l'examen direct par différents aspects

L'observation des cheveux et poils montre

5 types de parasitisme pileaire: Teigne endothrix (trichophytique), teigne Favique, 03 Types de teigne ectothrix. (Microsporique, Microïde et Megaspore).

➤ **Le pityriasis versicolor: (Figure 7)**

Le diagnostic est confirmé par la présence des levures disposées en grappes de raisin, associées ou non à des pseudofilaments.

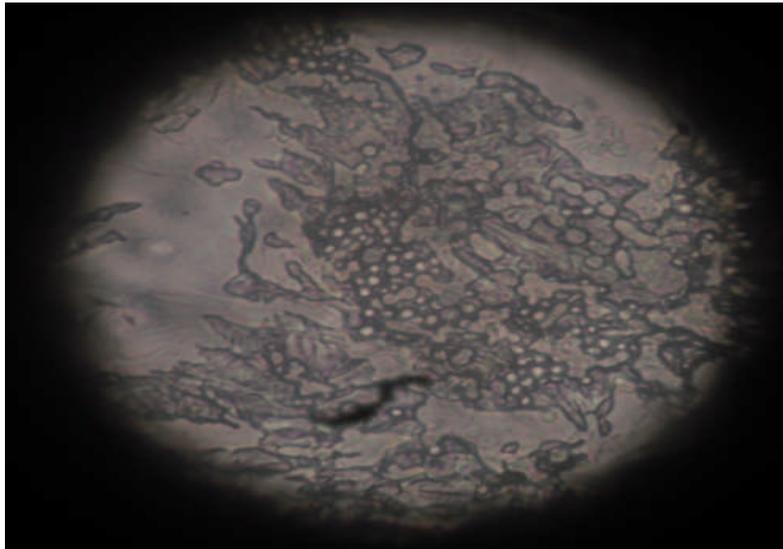


Figure 01 : Lame de scotch test cutané sous microscope optiques x40 (original, 2013).

II-2-1-3-La culture :

La culture permet l'isolement et l'identification de l'espèce fongique

Elle est obligatoire à une exception près de Pityriasis versicolor (**Fathalah et Saghrouni, 2008**).

Le milieu d'ensemencement est le milieu Sabouraud additionné à des antibiotiques (chloramphénicol qui inhibe la croissance des bactéries et /ou l'actidione afin d'éliminer les moisissures contaminantes.

a)-l'ensemencement :

-près de la flamme de bec Bunsen, nous avons pris à l'aide d'un écouvillon stérile des débris ou des fragments d'ongles, squames, des poils et cheveux recueillis dans une boîte de Pétri.

-on les déspose en des points régulièrement espacées sur la pente et au centre de la gélose Sabouraud incliné.

-pour le prélèvement recueilli par écouvillonnage, l'ensemencement se fait par la technique des stries à l'aide d'écouvillon, en balayant lentement la surface de la gélose et dessinant des stries.

b)-incubation :

Avant d'incuber les tubes ensemencés à l'étuve, aérer les cultures en ouvrant le tube à vis puis On le ferme partiellement (les champignons sont aérobies).

L'incubation se fait à une température de 25° C à 30° C pendant un temps variables jusqu'à un mois :

7-30 jours pour les dermatophytes ; 24 h à 48 h pour les levures ; 4-7 jours les moisissures
-vérifier les résultats au moins deux fois par semaine.

II-2-1-4- Identification du champignon responsable :

II-2-1-4-1- démarche de l'identification pour les levures :

Les plus fréquents des levures sont les candidoses, et particulièrement celles due à *C. albicans*.

A-Caractères morphologiques :

a)-aspect macroscopique :

-la description de l'aspect, la couleur, la forme, la consistance des colonies obtenues sur le milieu de culture permettra une orientation de l'identification de l'espèce.

-la lecture se fait après 24 h à 48 h : colonies blanchâtres crémeuses, lisses et luisantes, bombées pour les levures *Candida* sauf *C.kreusei*, les colonies sont mates ; colonies blanchâtres à crème et plissés pour les *Trichosporon*.

b)-aspect microscopique :

-à l'aide d'une pipette Pasteur stérile préalablement flambée au bec bunsun, on prélève une colonie du tube de la culture et la déposer entre lame et lamelle.

-observer au microscope optique au grossissement X40, des levures qui apparaissent sous forme ovalaire ou ovoïde de 2 à 8 μ de diamètre avec présence ou non de bourgeons multilatéraux.

B-Caractères physiologiques et biochimiques :

La démarche classique d'identification d'une levure est basée sur trois principaux caractères physiologiques :

A)-test de filamentation sur le sérum (test de blastése)

B)-la production de chlamydozoospores (test de Rice-Cream).

C)-système standardisé de type galeries « galerie AUXACOLOR ».

B.1)-Test de filamentation sur le sérum (test de blastése) :

-**But** : ce test permet une identification rapide de *C.albicans* au moins de 4heures.

-**Principe** : repose sur le fait que seul *C.albicans* est capable de développer de minces tubes germinatifs à partir de la cellule mère après une incubation de 4 h dans le sérum.

-Mode opératoire :

Emulsionner une pointe de pipette de levures dans un tube en verre contenant 1ml de sérum humain

Mettre à l'étuve à 37 °C ,3 à 4 heures maximum

Prélever une goutte du culot et observer au microscope entre lame et lamelle.

Résultat : si la levure est *C.albicans*, on observe un ou plusieurs fins tubes germinatifs partent de la levure, ne présentent aucune constriction à la base du filament qui peut être cloisonné (voir figures 02 et 03).

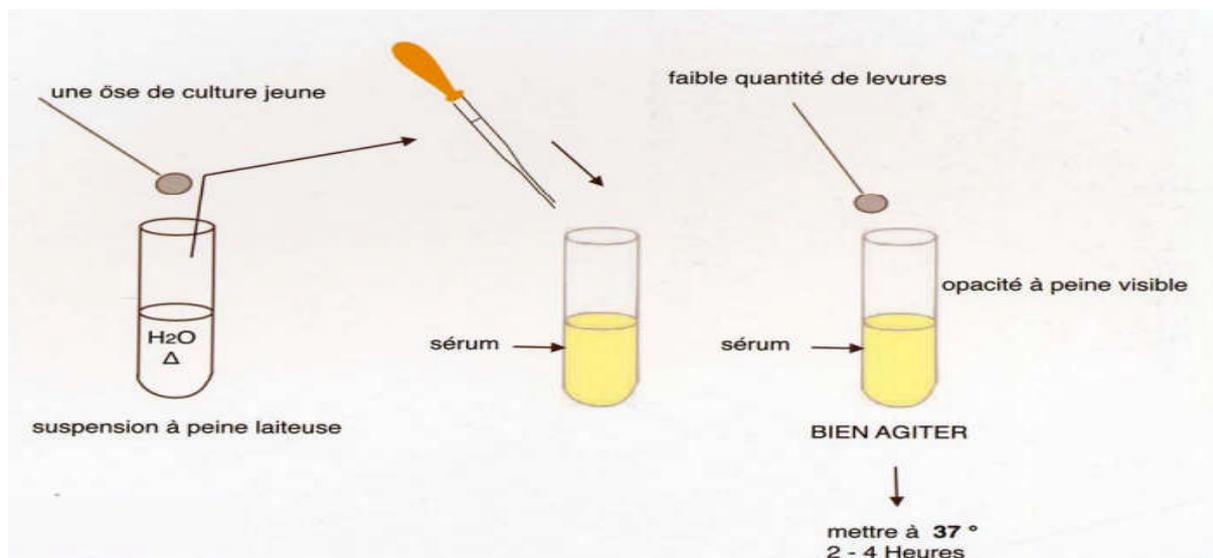


Figure 02: Les étapes de test de filamentation sur sérum (test de blastése) (Fathalah et Saghrouni, 2008).

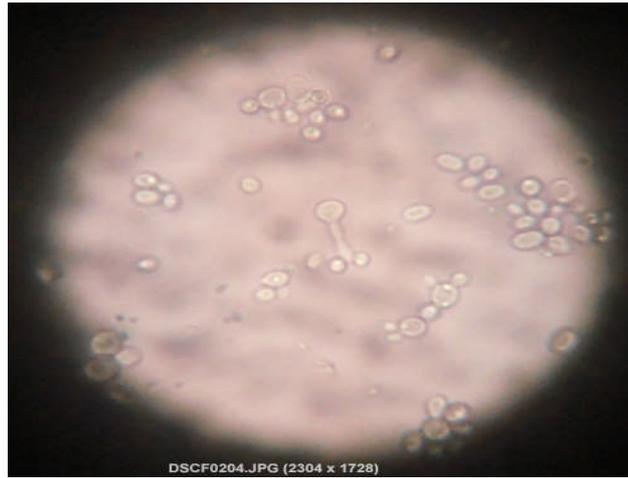


Figure 03: Photo original tube germinatif de *C.albicans* (x40) (Original, 2013).

B.2)-La production de chlamydozoaires (Test de Rice-Cream) :

But :

Ce test a pour objectif de favoriser chez certains champignons, et en particulier chez *C.albicans*, l'apparition des structures morphologiques particulières : chlamydozoaires.

Principe :

Le principe repose sur la recherche de chlamydozoaires et de pseudomycéliums sur un milieu pauvre en 48 h à 72 h.

Mode opératoire :

La méthode de Dalmau (Larone ,2002) (voir figure 04)

Cette technique repose sur l'utilisation d'une boîte de Pétri contenant le milieu Rice-Cream pour 1-3 ou 1-4 levure.

- 1)-premièrement, on coule le milieu Rice-Cream dans une boîte de Pétri et laisse refroidir.
- 2)-on prélève un fragment d'une colonie suspectée à partir d'une culture jeune des levures à l'aide d'une pipette Pasteur stérile préalablement flambée au bec bunsen et refroidie.
- 3)-déposer le fragment de colonie au centre sous forme d'une strie (ne pas couper la gélose)
- 4)-faire 3 à 4 stries verticales puis 3 à 4 stries horizontales de façon qu'ils se croisent avec les premières.
- 5)-couvrir les stries par une lame passer préalablement à la flamme de Buc Bunsen, on ferme la boîte sans oublier de mentionner la date, numéro de malade.
- 6)-incuber à température ambiante, à l'obscurité pendant 3 jours.



1) Préparation du milieu Rice-Cream.



2) Prélèvement d'une colonie



3) Dépôt de colonie sous d'un strie



4) Stries horizontales et verticales



5) Stérilisation de lamelle



6) Couverture des stries par la lamelle stérilisé



7) Incubation

Figure 04: Les différentes étapes de la méthode de Dalmau (Original, 2013).

-Résultat : (Figure 05)

-La production de chlamydospores est observée directement par examen de la boîte

En plaçant, la boîte de Pétri stérile sans couvercle sous microscope et utiliser le grossissement x 40.

-La présence de chlamydospores terminales (structures arrondies de 10 à 15 μm de diamètre, à paroi épaisse, produits à l'extrémité du pseudomycélium, elles peuvent être produites isolément ou en grappe permet d'identifier *C.albicans*.

*-Tandisque la présence isolée de pseudomycélium est rattaché à la présence d'une autre espèce de genre *Candida*.

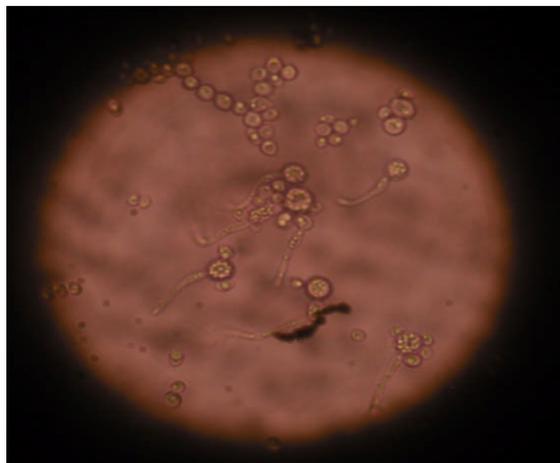


Figure 05 : photo originale des chlamydospores de *C.albicans* x40 (test de Rice Cream) (Original, 2013).

B.3)-Assimilation de certains sucres « galerie AUXACOLORTM 2 » :

La fréquence des infections fongiques et en particulier celles dues aux levures a très nettement augmenté, ainsi que la variabilité des localisations de ces infections et la diversification des espèces rencontrées fait que la recherche de levures dans les produits pathologiques superficielles ou profondes est devenue une nécessité.

AUXACOLORTM 2 répond à ce besoin, en permettant d'identifier les espèces les plus fréquemment rencontrées en clinique, facile à mettre en œuvre et à interpréter, il peut s'intégrer aisément dans tous les laboratoires.

a-Principe du test :

La galerie AUXACOLORTM 2 est un système d'identification dont le principe repose sur l'assimilation des sucres .la croissance des levures est visualisée par le virage d'un indicateur de pH.

La galerie comporte également 3 tests enzymatiques dont un test de détection de l'activité phénoloxidasique de *Cryptococcus neoformans*.

b-La composition de galerie :

b.1-Mode opératoire :

-Matériel fourni : la composition du coffret est détaillés dans **l'annexe V**.

-Matériel nécessaire non fourni par le coffret est mentionné dans **l'annexe V**.

Etapes :

-Amener les réactifs à température ambiante avant l'utilisation.

1-Inoculation de la microplaque :(voir figure 06)

a)-préparer l'inoculum à partir d'une culture de 24 à 48 h réalisée sur milieu de sabouraud (+/- Antibiotiques).

b)-dans des conditions stériles, ensemercer le milieu de suspension (R2) avec des colonies de souches pures en quantité suffisante (1 à 5 colonies identiques) pour obtenir une opacité équivalente au témoin (1,5 McFarland).

c)-homogénéiser la suspension manuellement.

d)-prélever et distribuer, à l'aide d'une pipette, 100µl de l'inoculum dans chacune des cupules de la microplaque (R1).

e)-recouvrir la microplaque (R1) avec l'adhésif en s'assurant que l'adhésion est parfaitement uniforme.

g)-incuber 48h (72h si nécessaire) à 30 ° C (± 2° C).

b.2-Lecture des résultats

La lecture définitive doit s'effectuer à 48 h .même si une première lecture à24h peut déjà donner un code correct et permettre l'identification de certaines levures, nous recommandons de réaliser l'interprétation définitive à 48 h.

En cas de suspicion d'infection à cryptocoque, la lecture définitive s'effectuera à 72 h.

-pour faciliter la lecture, il est possible de regarder sur l'envers de la microplaque ou de décoller l'adhésif.

-noter les résultats en se référant au tableau d'interprétation et les reporter sur le carnet prévu à cet effet.



1) Préparation de l'inoculum



2) Prélèvement de 100µl d'inoculum préparé

3) Dépôt de 100µl dans chaque cupule



4) S'assurer que toutes les cupules sont remplies

5) Couverture par le ruban adhésif.



5) Mentionner le N° et la date

6) Incubation à l'étuve.

Figure 06: Les étapes de test AUXACOLOR (Original, 2013).



(a)

(b)

Figure 07: Schéma de la plaque d'**AUXACOLOR 2** avant (a) et après (b) l'assimilation des sucres (Original ,2013).

-pour les 13 tests d'assimilation de sucre, chaque sucre est déshydraté en présence d'un milieu de base et d'un indicateur de pH : le pourpre de bromocrésol ; la croissance d'une levure se traduit par le virage de l'indicateur du bleu au jaune et par l'apparition d'un trouble dans la cupule.

*bleu-gris et bleu vert sont considérés comme négatifs.

*jaune pâle et jaune –vert sont considérés comme positifs.

-pour le test de détection de l'activité N-acétyl –galactosaminidase (hexosaminidase : HEX.) :

* une réaction positive se traduit par une coloration jaune de la cupule ;

*un test négatif reste incolore.

-pour le test phénoloxydase (POX.) associé à un test de détection de l'activité proline-arylamidase (PRO.) :

*activité POX positive traduit par une coloration marron de la cupule ;

*activité PRO positive se traduit par une coloration jaune.

*une absence de coloration ou une coloration grise correspond à une réaction négative pour ces deux tests.

*la co-existence des tests POX et PRO dans la même cupule se justifie par le fait que ces deux tests ne sont jamais positifs en même temps.

-méthodologie pour le codage :

Les 16 caractères biochimiques, répartis dans 15 cupules (les tests POX et PRO étant associés dans une même cupule), sont utilisés dans l'identification.

-un profil numérique à 5 chiffres est obtenu en regroupant par 3 les valeurs des 15 tests suivants (voir tableau III) :

On attribue à chaque réaction négative la valeur zéro et à chaque réaction positive une valeur en rapport avec sa position dans le triplet (1 pour la position 1, 2 pour la position 2 et 4 pour la position 3).

Tableau III : Méthodologie de codage.

1 ^{er} chiffre	Glucose	Maltose	Saccharose
2 ^{ème} chiffre	Galactose	Lactose	Raffinose
3 ^{ème} chiffre	Inositol	Cellobiose	Trehaltose
4 ^{ème} chiffre	Adonitol	Melezitose	Xylose
5 ^{ème} chiffre	Arabinose	Hexosaminidase	Phénoloxidase

L'addition des trois valeurs donne un chiffre qui permet l'obtention d'un profil numérique à 5 chiffres

-l'activité proline-arylamidase sera notée + ou –selon la couleur observée.

II-2-1-4-2- L'identification des champignons filamenteux :

L'identification d'un dermatophyte est réalisée par :

- L'évaluation de la vitesse de la pousse ;
- **L'examen macroscopique des colonies:** (taille, couleur recto verso, forme, relief, la présence d'un pigment diffusible ou non.
- **L'examen microscopique:**

Elle se fait à partir d'un fragment de culture dissocié au bleu coton ou au lactophénol et examiné entre lame et lamelle.

On étudiera :

- L'aspect des filaments mycéliens : les dermatophytes ont des filaments mycéliens cloisonnés, de diamètre habituellement régulier,
- la présence des chlamydospores parfois disposés en chaînettes (*T.verrucosum*, *T.violaceum*, et *T.schoenleini*), ou isolés et terminales (*M.audouinii*).
- l'abondance et la morphologie des microconidies .
- la présence et la morphologie des macroconidies.

I-2-2-Tests d'évaluation de sensibilités des champignons isolées vis-à-vis les huiles essentielles :

Pour évaluer l'activité antifongique de nos HE, deux types de tests ont été retenus :

a)-Tests pour l'évaluation qualitative de l'activité antifongique :

On a appliqué la technique par contact direct; qui est l'aromatogramme.

b)-Tests pour l'évaluation quantitative de l'activité antifongique :

Ces tests consistent à déterminer la concentration minimale inhibitrice CMI et la concentration minimale fongicide CMF pour les champignons avérés très sensibles à nos huiles essentielles.

Il est à noter que ces tests sont réalisés en duplicata.

-Les champignons testés :

Ils sont en nombre de 9 (8 levures et 1 dermatophyte), le choix des champignons repose sur leur fréquence, leur pathogénie (**voir tableau IV**).

Tableau IV : Origines des champignons testés par les huiles essentielles.

Souches fongiques	Origine de prélèvements
<i>C.albicans</i> (1)*	périonyxis des mains chez une femme
<i>C.albicans</i> (2)*	périonyxis des mains chez un enfant
<i>C.parapsilosis</i> (1)	d'ongles mains
<i>C.parapsilosis</i> (2)	squames abdomen et tronc
<i>C.famata</i>	ongles de pieds
<i>C.zeylanoides</i>	plis inguinaux
<i>Trichosporon mucoides</i>	Ongles
<i>Malassezia sp</i>	Pityriasis versicolor (tronc et dos)
<i>Trichophyton violaceum var. glabrum</i>	Ongles des orteils

*(1) et (2) sont rapportée selon l'origine des souches fongiques

- **Huiles essentielles** : sont celles de eucalyptus radié, *Pistacia lentiscus* et le romarin.

Elles ont été choisies tant que la richesse du patrimoine végétale d'Algérie,

Peu d'études d'activité antifongiques ont été faites sur l'HE de lentisque et d'eucalyptus radié, surtout sur les agents des mycoses humaines.

I-2-2-1-Tests d'évaluation qualitative de l'activité antifongique : Aromatogramme ou méthode de diffusion en milieu gélosé :

a)-Principe :

Il s'agit d'une méthode en milieu gélosé à l'agar réalisée dans une boîte de Pétri. Le contact se fait par l'intermédiaire d'un disque de papier sur lequel on dispose une quantité donnée d'huile essentielle (Pibiri, 2005).

b)-Mode opératoire (levures et dermatophytes) :

Le protocole de base des aromatogrammes qu'on a adopté est celui qui a été utilisé par plusieurs auteurs auquel quelques modifications ont été apportées selon nos conditions expérimentales (Mebarki, 2010, Ouraini et al, 2007, Ouraini et al, 2005).

-Préparation de l'inoculum :

-A partir d'une culture sur milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol de 48 h pour les levures (pour *Malassezia sp* culture sur milieu de Sabouraud recouvert d'huile d'olive) et de 7-14 jours pour le dermatophyte ; on prélève 2-3 colonies des levures, pour le dermatophyte on racle à l'aide de pipette Pasteur la partie aérienne de culture, que l'on suspend dans une solution d'eau physiologique stérile (0,9% Na Cl).

- la suspension obtenue pour les levures doit être ajustés à 1.5McFarland, celle obtenue pour le dermatophytes est quantifié à la cellule de Malassez jusqu'à obtention d'une densité entre 5×10^5 et 5×10^6 spore/ml.

-dépôts des disques : (figure 08)

-on fait fondre le milieu Sabouraud +ou -chloramphénicol dans un bain marie, puis on verse simultanément et aseptiquement une 1ère couche de chaque milieu dans une boîte de Pétri à raison de 15ml par boîte avec deux répétitions par souche ; concernant *Malassezia sp* une ajoute au milieu de culture en surfusion 1% d'huile d'olive commerciale (Koenig, 1995).

-après refroidissement à température ambiante, on ensemence les boîtes par la méthode de râteau 200µl de suspension fongique; on laisse solidifier sur la paillasse.

-à l'aide d'une pince stérile, on prélève un disque de papier whattman n°3 de 6mm de diamètre stérilisé préalablement au poupinelle, et on l'imbibe d'HE pure.

-on dépose le disque sur la gélose sèche des boîtes de Pétri

-on laisse les boîtes durant 20minutes à température ambiante pour permettre la diffusion de l'HE

-elles sont ensuite mises à l'étuve à 25 ° C pendant 48h pour les levures, 5-7jours à 26° C pour le dermatophyte.

-après incubation, on mesure les diamètres des halos d'inhibition autour du disque

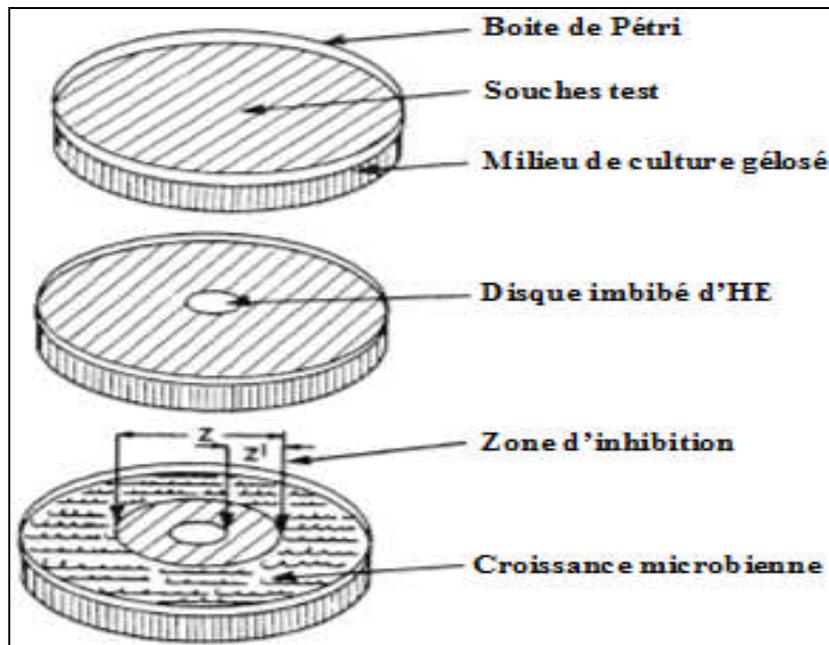


Figure 08 : Illustration de la méthode de l'aromatogramme. (Zaika, 1988).

I-2-2-2-Evaluation quantitative de l'activité antifongique :

La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI et la concentration minimale fongicide CMF par la méthode de macrodilution en milieu solide :

On pratique cette méthode pour les champignons qui sont révéles très sensibles aux huiles essentielles testés par la méthode de l'aromatogramme :

- ✚ *T.mucoïdes* très fortement sensible à l'HE de romarin.
- ✚ *C.albicans* (2) très fortement sensible envers l'HE d'eucalyptus radié,
- ✚ Et *C.famata* très fortement sensibles envers l'HE de pistachier lentisque.

I-2-2-2-1-Tests préliminaires du choix de solvant idéal :

Dans le but d'obtention d'une meilleure solubilisation de nos HE, nous avons effectué des tests préliminaires pour choisir un solvant ou une solution solubilisant

En effet on a choisi : l'éthanol, méthanol le tween80, et la solution d'agar à 0,2% qui sont couramment utilisés dans ce type de tests.

I-2-2-2-Méthode de macrodilution en milieu solide :(Ouraini et *al.*, 2007 ; Mebarki, 2010) :

a)-Préparation de l'inoculum :

On suit les mêmes étapes que les méthodes d'évaluation qualitatives pour préparer L'inoculum.

b) Préparation de l'émulsion d'HE :

- Les HE ont été utilisés sous forme d'émulsion pour pouvoir être manipulés comme solutions
- une solution stérile d'agar-agar à 0,2% a été choisie comme agent émulsionnant du fait qu'elle soit dépourvue de toute influence sur l'activité des HE
- la solution d'agar à 0,2% permet d'obtenir, dans le milieu, une répartition homogène des HE et d'augmenter au maximum le contact germe -composé.
- à partir d'une solution mère d'HE dilué au 1/10, une série de solution allant de 2% à 0,125% préparées avec la solution d'agar à 0,2% (voir figures 09 et 10).

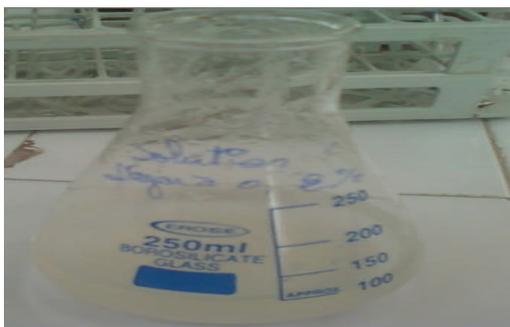


Figure 09 : La solution d'agar à 0,2% (Original, 2013).



Figure 10 : La série des dilutions (Original, 2013).

c)-méthode de macrodilution en milieu solide :

À partir de tubes contenant des concentrations différents d'HE, nous prélevons 2 ml que l'on ajoute aseptiquement à 18 ml du milieu Sabouraud additionné de chloramphénicol préalablement fondu et refroidi à température ambiante.

- les tubes sont agités manuellement puis le contenu est coulé dans des boîtes de Pétri.
 - une boîte de pétri contenant 20ml de milieu sans huile essentielle est utilisé comme témoin.
 - l'inoculation des souches fongiques a été faite par la méthode des disques :
- Des disques stériles de papier wattman n°3 de 6 mm de diamètre imbibés de la suspension fongique sont déposés à la surface en milieu gélosé contenant ou pas l'HE.

-Les boîtes témoins et essais sont mises en incubation pendant 72 h à 25° C.

-La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la plus petite concentration d'HE pour laquelle aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

-Pour les boîtes qui ne présentent pas de croissance ; le disque de mycélium est transféré sur un milieu gélosé (Sabouraud+chloramphénicol) neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide sur les levures.

-La concentration minimale fongicide (CMF) est définie comme étant la plus faible concentration d'HE pour laquelle il y a absence totale de colonie en comparaison avec les témoins après 72 h d'incubation à 25° C.