

**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°104

***LE MICROBIOTE FONGIQUE CUTANE DE L'HOMME, DU  
CHIEN ET DU CHAT : ACTUALITES ET COMPARAISON***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 7 décembre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*MIACHON Sophie*





**VETAGRO SUP  
CAMPUS VETERINAIRE DE LYON**

Année 2018 - Thèse n°104

***LE MICROBIOTE FONGIQUE CUTANE DE L'HOMME, DU  
CHIEN ET DU CHAT : ACTUALITES ET COMPARAISON***

**THESE**

Présentée à l'UNIVERSITE CLAUDE-BERNARD - LYON I  
(Médecine - Pharmacie)

et soutenue publiquement le 7 décembre 2018  
pour obtenir le grade de Docteur Vétérinaire

par

*MIACHON Sophie*





## Liste des Enseignants du Campus Vétérinaire de Lyon (1er mars 2018)

Nom	Prénom	Département	Grade
ABITBOL	Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
ARCANGIOLI	Marie-Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
AYRAL	Florence	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BECKER	Claire	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BELLUCO	Sara	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENAMOU-SMITH	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
BENOIT	Etienne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BERNY	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
BOULOCHER	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BOURDOISEAU	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
BOURGOIN	Gilles	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
BRUYERE	Pierre	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BUFF	Samuel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
BURONFOSSE	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
CACHON	Thibaut	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CADORÉ	Jean-Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
CAROZZO	Claude	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
CHABANNE	Luc	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
CHALVET-MONFRAY	Karine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DE BOYER DES ROCHES	Alice	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
DEMONT	Pierre	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
DJELOUADJI	Zorée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
ESCRIOU	Catherine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
FRIKHA	Mohamed-Ridha	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GALIA	Wessam	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
GILOT-FROMONT	Emmanuelle	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
GONTHIER	Alain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
GRANCHER	Denis	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
GREZEL	Delphine	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
HUGONNARD	Marine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
JANKOWIAK	Bernard	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
JAUSSAUD	Philippe	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
JEANNIN	Anne	DEPT-ELEVAGE-SPV	Inspecteur en santé publique vétérinaire (ISPV)
JOSSON-SCHRAMME	Anne	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Contractuel
JUNOT	Stéphane	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
KODJO	Angeli	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
KRAFFT	Emilie	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
LAABERKI	Maria-Halima	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
LAMBERT	Véronique	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LE GRAND	Dominique	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
LEBLOND	Agnès	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LEDOUX	Dorothée	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Stagiaire
LEFEVRE	Sébastien	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences Stagiaire
LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
LEPAGE	Olivier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
LOUZIER	Vanessa	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
MARCHAL	Thierry	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MATEOS	Stevana	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
MOISSONNIER	Pierre	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
MOUNIER	Luc	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
PEPIN	Michel	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
PIN	Didier	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PONCE	Frédérique	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
PORTIER	Karine	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
POUZOT-NEVORET	Céline	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
PROUILLAC	Caroline	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
REMY	Denise	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
RENE MARTELLET	Magalie	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences
RIVES	Germain	DEPT-ELEVAGE-SPV	Maître de conférences Contractuel
ROGER	Thierry	DEPT-BASIC-SCIENCES	Professeur
SABATIER	Philippe	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
SAWAYA	Serge	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
SCHRAMME	Michael	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
SERGEANT	Delphine	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur
THIEBAULT	Jean-Jacques	DEPT-BASIC-SCIENCES	Maître de conférences
THOMAS-CANCIAN	Aurélien	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
TORTEREAU	Antonin	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences
VIGUIER	Eric	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Professeur
VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	DEPT-AC-LOISIR-SPORT	Maître de conférences Contractuel
ZENNER	Lionel	DEPT-ELEVAGE-SPV	Professeur



# Remerciements

**A Monsieur le Professeur Jean-François NICOLAS,**

De la faculté de médecine de Lyon,  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,  
Hommages respectueux.

**A Monsieur le Professeur Didier PIN,**

De VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon,  
Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et encadrée tout au long de ce travail,  
Pour votre écoute, votre disponibilité et vos précieux conseils,  
Sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Gilles BOURDOISEAU,**

De VetAgroSup, Campus Vétérinaire de Lyon,  
Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle de second assesseur,  
Et pour l'intérêt porté à ce travail,  
Sincères remerciements.





# Table des matières

<b>TABLE DES FIGURES</b> .....	<b>11</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>PARTIE 1 : LA PEAU : UNE PROTECTION CONTRE LES CHAMPIGNONS PATHOGENES</b> ...	<b>19</b>
I. <b>UNE BARRIERE PHYSIQUE</b> .....	19
A. <i>Bases anatomiques</i> .....	19
B. <i>La couche cornée : un élément clé de la barrière physique cutanée</i> .....	20
C. <i>Les couches sous-jacentes et leurs structures d'adhésion : une deuxième ligne de défense</i> .....	23
II. <b>UNE BARRIERE CHIMIQUE</b> .....	25
A. <i>Les lipides épidermiques et sébacés</i> .....	25
1.    Les lipides épidermiques .....	26
a.    Les lipides lamellaires de la couche cornée .....	26
i.    Les corps lamellaires (ou corps d'Odland) : transport et maturation des lipides lamellaires .....	26
ii.   Une composition variable des lipides lamellaires .....	28
iii.  Une organisation spécifique en lamelles .....	29
iv.  Des rôles divers .....	30
•    Rôle de barrière physique et chimique .....	30
•    Rôle dans la formation du manteau acide .....	30
•    Rôle dans la signalisation cellulaire .....	31
•    Rôle antimicrobien .....	31
b.    Les lipides de l'enveloppe lipidique cornéocytaire (ELC).....	31
i.    Structure et composition de l'ELC.....	31
ii.   Formation de l'ELC .....	32
iii.  Fonctions de l'ELC .....	33
c.    Les lipides extra-cutanés et l'homéostasie cutanée .....	33
2.    Les lipides sébacés .....	34
a.    Les glandes sébacées et leur sécrétion holocrine.....	34
b.    La composition du sébum .....	34
c.    Les fonctions du sébum.....	35
B. <i>Les peptides antimicrobiens (PAM)</i> .....	35
1.    Les $\beta$ -défensines et les cathélicidines : des PAM cutanés majoritaires .....	36
2.    Domaine d'expression des $\beta$ -défensines et des cathélicidines .....	36
3.    Rôle premier des PAM : une fonction antimicrobienne .....	38
4.    De nombreux rôles secondaires.....	40
III. <b>UNE BARRIERE IMMUNITAIRE</b> .....	41
A. <i>La reconnaissance des champignons pathogènes : un point clé dans l'immunité cutanée</i> .....	41
1.    Reconnaissance via les PRR .....	41
2.    Les cellules dendritiques : un lien entre immunité innée et adaptative .....	43
B. <i>Immunité innée</i> .....	44
1.    Une barrière physique et des substances protectrices.....	44
2.    Action des cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles, éosinophiles, monocytes) .....	44
3.    Action du complément .....	46
4.    Action des cellules lymphoïdes innées, des cellules NKT et des cellules T $\gamma\delta$ .....	47
C. <i>Immunité adaptative</i> .....	47
1.    Immunité à médiation cellulaire et lymphocytes T (LT).....	47
a.    LT helper .....	48
b.    LT régulateur (LTreg).....	49
c.    LT effecteur (LTeff) .....	50
2.    Immunité à médiation humorale et lymphocytes B (LB) .....	50
a.    Mécanismes directs.....	50
b.    Mécanismes indirects.....	51

**PARTIE 2 : ... MAIS AUSSI UN MILIEU DE VIE POUR DE NOMBREUX MICRO-ORGANISMES FONGIQUES..... 53**

I.	METHODES D'ETUDE .....	53
A.	<i>Méthode historique : la culture fongique</i> .....	54
1.	Milieus et conditions de culture .....	54
2.	Identification des champignons .....	54
a.	Principes généraux pour les champignons filamenteux et les levures .....	54
b.	Application aux espèces de <i>Malassezia</i> .....	56
3.	Résultats de l'étude du mycobiote .....	58
4.	Avantages et inconvénients de la culture fongique .....	59
B.	<i>Apports du séquençage de nouvelle génération</i> .....	60
1.	Présentation du HMP ( <i>Human Microbiome Project</i> ).....	60
2.	Prélèvement.....	61
3.	Extraction de l'ADN.....	62
4.	Méthodes de séquençage de nouvelle génération .....	62
a.	Séquençage d'amplicons et « métagénomique » ciblée .....	63
b.	Méthode <i>Whole Genome Shotgun</i> (séquençage aléatoire de l'intégralité du génome) et métagénomique globale .....	65
c.	Séquençage du métatranscriptome et métatranscriptomique.....	65
5.	Contrôles et témoins .....	65
6.	Méthodes d'analyse.....	66
a.	Analyses primaires .....	66
b.	Analyses secondaires .....	68
7.	Avantages, inconvénients et limites de chaque méthode .....	69
a.	Séquençage des amplicons .....	69
b.	Méthode <i>Shotgun</i> .....	71
II.	REPARTITION DU MYCOBIOTE FONGIQUE CUTANE ET INFLUENCE DE DIVERS FACTEURS .....	72
A.	<i>Répartition générale et comparaison des mycobiotés cutanés humain, canin et félin</i> .....	72
1.	Mycobiote cutané de l'homme .....	72
2.	Mycobiote cutané du chien.....	74
3.	Mycobiote cutané du chat.....	76
B.	<i>Influence de différents facteurs</i> .....	77
1.	Age.....	77
a.	Acquisition du mycobiote dans les premiers jours de vie .....	78
b.	Changements du mycobiote à la puberté.....	79
2.	Sexe .....	80
3.	Hygiène.....	81
4.	Traitements médicaux.....	82
5.	Ethnie et style de vie.....	82
6.	Races de chat .....	82
7.	Statut immunitaire.....	83
8.	Environnement extérieur .....	83
a.	Contact humain-environnement extérieur .....	83
b.	Contact carnivores domestiques – environnement extérieur .....	85
c.	Contacts humain – humain et humain – carnivores domestiques.....	85
9.	Temps.....	86
III.	DES RELATIONS ETROITES ENTRE ORGANISMES VIVANTS.....	87
A.	<i>Relation hôte - champignon</i> .....	88
1.	Définition d'une niche naturelle sans nuisance envers l'hôte.....	88
2.	Tolérance et éducation du système immunitaire : du commensalisme au mutualisme.....	88
a.	Tolérance des commensaux .....	89
b.	Education du système immunitaire.....	90
3.	Homéostasie cutanée et dysbiose .....	91
B.	<i>Relation bactérie - champignon</i> .....	94
C.	<i>Relation champignon - champignon</i> .....	97

<b>PARTIE 3 : DU COMMENSALISME A LA PATHOGENICITE OPPORTUNISTE : EXEMPLE DE MALASSEZIA .....</b>	<b>99</b>
I. LA PATHOGENICITE DE <i>MALASSEZIA</i> LORS DE DERMATITE A <i>MALASSEZIA</i> PRIMAIRE .....	99
A. <i>Généralités sur les Malassezia</i> .....	99
B. <i>Diversité de l'espèce M. pachydermatis</i> .....	99
C. <i>Facteurs prédisposants de la dermatite à Malassezia</i> .....	100
D. <i>Facteurs de virulence de M. pachydermatis</i> .....	101
E. <i>Réaction immunitaire et hypersensibilité</i> .....	104
F. <i>Aspect clinique de la dermatite à Malassezia</i> .....	104
G. <i>Diagnostic et traitement</i> .....	106
II. LE STATUT PATHOGENE DE <i>MALASSEZIA</i> LORS DE DERMATITE ATOPIQUE (DA) .....	108
A. <i>Perturbation de la barrière cutanée lors de DA</i> .....	108
1. Evaluation de l'imperméabilité de la barrière cutanée par la mesure de la Perte Insensible en Eau (PIE) ..	108
2. Diminution du taux de céramides et de lipides épidermiques .....	109
3. Altération de l'expression de la filaggrine .....	109
4. Altération des jonctions serrées épidermiques .....	110
5. Modification de l'expression des PAM .....	110
B. <i>Réponse immunologique inappropriée</i> .....	110
C. <i>Rôles pathogènes de Malassezia lors de DA</i> .....	111
D. <i>Présentation et diagnostic cliniques de la DA canine</i> .....	114
E. <i>Approche thérapeutique de la DA canine et des proliférations de Malassezia secondaires</i> .....	117
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>121</b>



# Table des figures

FIGURE 1 : COMPOSITION DE LA PEAU (D'APRES MILLER <i>ET AL.</i> , 2013) .....	20
FIGURE 2 : COMPOSITION MICROSCOPIQUE DE LA COUCHE CORNEE (D'APRES PROKSCH <i>ET</i> JENSEN, 2008 ; MILLER <i>ET AL.</i> , 2013)...	21
FIGURE 3 : LIPIDES LAMELLAIRES DE LA COUCHE CORNEE (D'APRES PROKSCH <i>ET</i> JENSEN, 2008) .....	22
FIGURE 4 : STRUCTURES CLES DANS LE ROLE DE PROTECTION DE L'EPIDERME (D'APRES PROKSCH <i>ET</i> JENSEN, 2008 ; MILLER <i>ET AL.</i> , 2013) .....	25
FIGURE 5 : SCHEMA DES PROCESSUS ENZYMATIQUES IMPLIQUES DANS LA FORMATION DES LIPIDES LAMELLAIRES DE LA COUCHE CORNEE (D'APRES SMEDEN <i>ET AL.</i> , 2014) .....	27
FIGURE 6 : SCHEMA EXPLICATIF DES DIFFERENTES SOUS CLASSES DE CERAMIDES (D'APRES SMEDEN <i>ET AL.</i> , 2014) .....	28
FIGURE 7 : ORGANISATION LIPIDIQUE DE LA COUCHE CORNEE CHEZ L'HOMME (D'APRES SMEDEN <i>ET AL.</i> , 2014) .....	30
FIGURE 8 : SCHEMA DE LA FORMATION ET DE LA STRUCTURE DE L'ELC (D'APRES AKIYAMA, 2017) .....	32
FIGURE 9 : ETAPES ET ENZYMES IMPLIQUEES DANS LA SYNTHESE DES CERAMIDES DE L'ELC AU NIVEAU DES KERATINOCYTES (D'APRES AKIYAMA, 2017).....	33
FIGURE 10 : DISTRIBUTION BIOGEOGRAPHIQUE DES PAM CUTANES CHEZ L'HOMME (D'APRES BRANDWEIN <i>ET AL.</i> , 2017) .....	37
FIGURE 11 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EXPRESSION DES PAM HUMAINS CUTANES (D'APRES NIYONSABA <i>ET AL.</i> , 2017) .	38
FIGURE 12 : SCHEMA DES DIFFERENTS MODES D'ACTION DES PAM (D'APRES AGEITOS <i>ET AL.</i> , 2017) .....	39
FIGURE 13 : MODELE SCHEMATIQUE DE LA LIBERATION DE CYTOKINES ET DE CHIMIOKINES INDUITES PAR LES PAM DES KERATINOCYTES HUMAINS (D'APRES SCHAUBER <i>ET</i> GALLO, 2007) .....	40
FIGURE 14 : MODELE DE LA STRUCTURE DE LA PAROI FONGIQUE (D'APRES WILLIAMS, 2012).....	42
FIGURE 15 : PRR ET VOIES DE SIGNALISATION ABOUTISSANT A LA DIFFERENCIATION DES LTH (D'APRES VERMA <i>ET AL.</i> , 2015).....	43
FIGURE 16 : MODELES DE PHAGOCYTOSE DES PATHOGENES FONGIQUES SUIVANT LEUR MORPHOTYPE (D'APRES WILLIAMS, 2012) ..	45
FIGURE 17 : MODE D'ACTION DU COMPLEMENT FACE A <i>C. ALBICANS</i> (D'APRES ZIPFEL <i>ET</i> SKERKA, 2012) .....	46
FIGURE 18 : LES DIFFERENTES POPULATIONS DE LT ET LEUR ROLE ANTIFONGIQUE (D'APRES VERMA <i>ET AL.</i> , 2015) .....	48
FIGURE 19 : EXEMPLE DE DIFFERENTES PHIALOCONIDIUMS CARACTERISTIQUES D'UN GENRE FONGIQUE (D'APRES TILLE, 2014) .....	55
FIGURE 20 : METHODE D'IDENTIFICATION DE 9 ESPECES DE <i>MALASSEZIA</i> PROPOSEE PAR L'EQUIPE DE KANEKO <i>ET AL.</i> (2007).....	57
FIGURE 21 : SCHEMA DES DEUX APPROCHES D'ETUDE POSSIBLES DU MICROBIOME CUTANE (D'APRES FERETTI <i>ET AL.</i> , 2016) .....	63
FIGURE 22 : DIAGRAMME SCHEMATIQUE DE L'ITS, AVEC LES AMORCES DE PCR ET LES BASES DE DONNEES TAXONOMIQUES (D'APRES DIAZ <i>ET AL.</i> , 2017 ; USYK <i>ET AL.</i> , 2017).....	64
FIGURE 23 : APPROCHE PAR LA METHODE DES COORDONNEES PRINCIPALES DE L'INFLUENCE DU SUJET, DU SITE CORPOREL ET DU MICROENVIRONNEMENT CONSIDERES SUR LE MYCOBIOTE CANIN (D'APRES MEASON-SMITH <i>ET AL.</i> , 2015).....	69
FIGURE 24 : COMPOSITION DES COMMUNAUTES FONGIQUES SELON LE SITE CORPOREL CHEZ L'HOMME ADULTE (ENTRE 18 ET 39 ANS) (D'APRES JO <i>ET AL.</i> , 2017) .....	74
FIGURE 25 : ABONDANCE RELATIVE DES DIFFERENTS TAXONS FONGIQUES SELON LE SITE CORPOREL CONSIDERE CHEZ DES CHIENS SAINS (D'APRES MEASON-SMITH <i>ET AL.</i> , 2015) .....	75
FIGURE 26 : ABONDANCE RELATIVE DES DIFFERENTS TAXONS FONGIQUES SELON LE SITE CORPOREL CONSIDERE CHEZ DES CHATS SAINS (D'APRES MEASON-SMITH <i>ET AL.</i> , 2017) .....	77
FIGURE 27 : COMPOSITION DES COMMUNAUTES FONGIQUES SELON LES SITES CORPORELS CHEZ L'ENFANT (ENTRE 8 ET 13 ANS) (D'APRES JO <i>ET AL.</i> , 2017) .....	80
FIGURE 28 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES TRANSMISSIONS DE MICRO-ORGANISMES FONGIQUES ENTRE L'ETRE HUMAIN, LES SURFACES ET L'AIR AMBIANT (D'APRES TONG <i>ET AL.</i> , 2017) .....	84
FIGURE 29 : SCHEMA DES DIFFERENTES INTERACTIONS A LA SURFACE DE LA PEAU (D'APRES SCHOMMER <i>ET</i> GALLO, 2013).....	87
FIGURE 30 : SCHEMA DES VOIES DE SIGNALISATIONS POSSIBLES LIEES A LA PLASTICITE DES CELLULES DENDRITIQUES AU CONTACT DE <i>C. ALBICANS</i> (D'APRES BONIFAZI <i>ET AL.</i> , 2009) .....	90
FIGURE 31 : SCHEMA DE PLUSIEURS PARAMETRES INFLUENÇANT L'HOMÉOSTASIE CUTANÉE (D'APRES SCHOMMER <i>ET</i> GALLO, 2013) .....	92
FIGURE 32 : REPARTITION DES REGNES MICROBIENS CUTANES CHEZ L'HOMME (D'APRES BELKAID <i>ET</i> SEGRE, 2014).....	95
FIGURE 33 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA DIVERSITE DU MICROBIOTE CUTANE EN FONCTION DES SITES CORPORELS ET DES REGNES FONGIQUE OU BACTERIEN (D'APRES FINDLEY <i>ET AL.</i> , 2013) .....	96
FIGURE 34 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU GENE DE L'ARNr FONGIQUE (D'APRES SUGITA <i>ET AL.</i> , 2005) .....	99
FIGURE 35 : MODELE DES INTERACTIONS ENTRE <i>MALASSEZIA</i> ET L'EPIDERME HUMAIN (D'APRES GAITANIS <i>ET AL.</i> , 2013) .....	102
FIGURE 36 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE MONTRANT L'ARCHITECTURE DES BIOFILMS DE SOUCHES DE <i>M.</i> <i>PACHYDERMATIS</i> ISOLEES CHEZ DES CHIENS SANS LESION CUTANEE (D'APRES FIGUEREDO <i>ET AL.</i> , 2012) .....	103
FIGURE 37 : MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE MONTRANT L'ARCHITECTURE DES BIOFILMS DE SOUCHES DE <i>M.</i> <i>PACHYDERMATIS</i> ISOLEES CHEZ DES CHIENS AVEC OU SANS LESIONS CUTANEEES.....	103

FIGURE 38 : LESIONS DE DERMATITE A <i>MALASSEZIA</i> CHEZ LE CHIEN (D'APRES MILLER <i>ET AL.</i> , 2013) .....	105
FIGURE 39 : LESIONS DE DERMATITE A <i>MALASSEZIA</i> CHEZ LE CHAT (D'APRES MILLER <i>ET AL.</i> , 2013) .....	106
FIGURE 40 : MECANISMES PAR LESQUELS <i>MALASSEZIA SP.</i> CONCOURT A L'INFLAMMATION CHEZ UN INDIVIDU ATTEINT DE DA (D'APRES GLATZ <i>ET AL.</i> , 2015) .....	112
FIGURE 41 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LE POURCENTAGE DE CHIENS DE DEUX GROUPES (SAINS EN BLANC ET ATTEINTS DE DERMATITE ATOPIQUE EN NOIR) MONTRANT UN LIEN ENTRE LES IGE ET LES PROTEINES PROVENANT DES EXTRAITS DE <i>M.</i> <i>PACHYDERMATIS</i> (D'APRES CHEN <i>ET AL.</i> , 2002) .....	113
FIGURE 42 : LESIONS DE DERMATITE ATOPIQUE CHEZ LE CHIEN (D'APRES MILLER <i>ET AL.</i> , 2013) .....	115

# Table des tableaux

TABLEAU I : LES DIFFERENTES BARRIERES CUTANEEES (D'APRES PROKSCH <i>ET AL.</i> , 2008).....	19
TABLEAU II : LES FONCTIONS PROTECTRICES DE LA COUCHE CORNEE (D'APRES PROKSCH <i>ET</i> JENSEN, 2008 ; MILLER <i>ET AL.</i> , 2013)...	21
TABLEAU III : LES COMPOSANTS DES STRUCTURES D'ADHESION (D'APRES MILLER <i>ET AL.</i> , 2013).....	24
TABLEAU IV : FONCTION PROTECTRICE DES DIFFERENTES IMMUNOGLOBULINES CONTRE LES INFECTIONS FONGIQUES (D'APRES VERMA <i>ET AL.</i> , 2015).....	50
TABLEAU V : SENSIBILITE ET SPECIFICITE DE LA METHODE D'IDENTIFICATION DES ESPECES DE <i>MALASSEZIA</i> DE KANEKO <i>ET AL.</i> (2007)	57
TABLEAU VI : TAILLE ET TEMPS NECESSAIRE POUR UNE ANALYSE TYPE DE 8.2 M DE LECTURES PAR LES DIFFERENTES BASES DE DONNEES (D'APRES TANG <i>ET AL.</i> , 2015).....	71
TABLEAU VII : PROPORTIONS RELATIVES DE 3 CATEGORIES DE MICRO-ORGANISMES FONGIQUES EN FONCTION DU STATUT « SAIN » VS « ATTEINT DE DERMATITE ATOPIQUE » CHEZ L'HOMME (D'APRES ZHANG <i>ET AL.</i> , 2013) .....	93
TABLEAU VIII : POURCENTAGES DES GROUPES DE <i>MALASSEZIA PACHYDERMATIS</i> ISOLES DE CHIENS SAINS OU ATTEINTS DE DERMATITE ATOPIQUE (D'APRES KOBAYASHI <i>ET AL.</i> , 2011) .....	100
TABLEAU IX : CMI, ECV ET NOMBRES DE SOUCHES DE TYPE NON SAUVAGES DE <i>M. PACHYDERMATIS</i> DES DIFFERENTS DERIVES AZOLES DANS L'ETUDE DE BRILHANTE <i>ET AL.</i> (2018) .....	107
TABLEAU X : ENSEMBLE DE CRITERES DE DIAGNOSTIC DE LA DA CANINE (D'APRES FAVROT <i>ET AL.</i> , 2010) .....	116
TABLEAU XI : SPECIFICITE ET SENSIBILITE DES GROUPES DE CRITERES PROVENANT DES DIFFERENTES ETUDES (D'APRES FAVROT <i>ET AL.</i> , 2010) .....	116





# Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique  
BID : deux fois par jour du latin *Bis In Die*  
CAM : Complexe d'Attaque Membranaire  
cBD :  $\beta$ -défensine canine ou canine *Beta Defensin*  
CL : Cellule de Langerhans  
CLI : Cellules Lymphoïdes Innées  
CLR : *C-type Lectins Receptors*  
CMH : Complexe d'Histocompatibilité Majeure  
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes  
DA : Dermatite Atopique  
DAPP : Dermatite par Allergie aux Piqûres de Puces  
EC : Enveloppe Cornée  
ECV : Valeur seuil épidémiologique ou *Epidemiological Cut-off Value*  
ELC : Enveloppe Lipidique Cornéocytaire  
feCath : Cathélicidine féline  
FeLV : Virus de la Leucose Féline  
FIV : Virus d'Immunodéficience Féline  
hBD :  $\beta$ -défensine humaine ou *human Beta Defensin*  
HMP : *Human Microbiome Project*  
IFN : Interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IGS : *Intergenic Spacer*  
IL : Interleukine  
INSD : *International Nucleotide Sequence Databases*  
ITS : *Internal Transcribed Spacer*  
K9CATH : Cathélicidine canine  
LB : Lymphocyte B  
LL-37 : Cathélicidine humaine  
LT : Lymphocyte T  
LTeff : Lymphocyte T effecteur  
LTh : Lymphocyte T *helper*  
LTreg : Lymphocyte T régulateur  
NK : *Natural Killer*  
PAM : Peptide AntiMicrobien  
PAMP : *Pathogen-Associated Molecular Pattern*  
PCoA : Analyse en Coordonnées Principales  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
PIE : Perte Insensible en Eau  
PO : par voie orale ou *Per Os*  
PRR : *Pattern-Recognition Receptors*  
SID : une fois par jour

TLR : *Toll-Like Receptors*

TNF : Facteur de nécrose tumorale ou *Tumor Necrosis Factor*

ULC : *Ultra Long Chain*

UTO : Unité Taxonomique Opérationnelle

UV : Ultra-Violet

# INTRODUCTION

« Chacun d'entre nous est constitué de 40 billions de cellules qui contiennent, environ 22 000 gènes chacune, mais aussi de 100 billions de microbes qui contiennent, environ, 2 millions de gènes microbiens...», ainsi commence la conférence intitulée « La science du microbiome humain : une vision pour le futur » en 2013.

Notre peau est un écosystème composé de plusieurs billions de micro-organismes commensaux, parmi lesquels se trouvent des bactéries, des champignons et des virus. L'ensemble de ces micro-organismes est appelé microbiote cutané. Loin de constituer une menace pour son hôte, cette vaste communauté microbienne posséderait un rôle essentiel dans la protection de celui-ci contre les micro-organismes pathogènes. Par contre, une perturbation de la barrière cutanée ou un déséquilibre de son microbiote pourraient avoir des conséquences désastreuses sur notre peau en participant à l'émergence de maladies inflammatoires. Le microbiote cutané, à l'instar du microbiote intestinal, est devenu, depuis quelques années, de première importance pour la recherche sur la santé en cherchant à répondre à ces deux questions : dans quelles mesures ces micro-organismes commensaux contribuent-ils à maintenir un statut cutané sain et peuvent-ils, dans certaines circonstances, constituer un facteur favorisant les dermatoses ? La finalité des études serait de parvenir à une manipulation des microbiotes à des fins thérapeutiques.

Les nouvelles méthodes de séquençage génomique ont révolutionné notre compréhension du microbiote cutané, limitée jusqu'à maintenant par les méthodes traditionnelles de culture *in vitro*. Des règnes jusqu'à présent sous-estimés ont été mis en exergue, notamment celui des Champignons aussi appelés Mycètes ou Fungi. Il est constitué d'organismes eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires, hétérotrophes vis-à-vis du carbone, thallophytes et cryptogames. Notre travail s'est focalisé sur ces derniers qui forment le microbiote fongique ou mycobiote.

Le but de cette étude bibliographique est de faire le point des connaissances scientifiques actuelles du mycobiote cutané du chien et du chat domestiques et de les comparer avec celles sur le mycobiote de l'homme.

Dans une première partie, nous rappellerons les caractéristiques qui font de la peau un environnement inhospitalier pour les microorganismes pathogènes, avant d'aborder, dans une seconde partie, comment des micro-organismes commensaux en font leur milieu de vie. Cette seconde partie vise à expliquer les nouvelles méthodes d'étude métagénomiques, à répertorier les différentes espèces fongiques des mycobiotés cutanés de l'homme, du chien et du chat, ainsi qu'à appréhender les interactions qu'ils entretiennent. Notre troisième partie envisagera le risque de l'acquisition d'un pouvoir pathogène par certains agents fongiques commensaux.



# Partie 1 : La peau : une protection contre les champignons pathogènes ...

La peau est l'organe le plus étendu du corps que ce soit chez l'homme ou chez les animaux domestiques. Sa fonction première est d'assurer un rôle de barrière entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme (*inside-outside barrier*) fournissant ainsi un environnement pour tous les autres organes et prévenant les déperditions d'eau, d'électrolytes et de macromolécules. Elle assure également un rôle de barrière entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme (*outside-inside barrier*) protégeant l'organisme contre les agents physiques, chimiques et microbiologiques (notamment les agents bactériens et fongiques). Afin d'assurer cette fonction, la peau possède différents types de barrière : une barrière physique, une barrière chimique et une barrière immunitaire.

Tableau I : Les différentes barrières cutanées (d'après Proksch *et al.*, 2008)

Type de barrière	Éléments considérés
Physique	Couche cornée, structures d'adhésion (desmosomes et jonctions serrées)
Chimique/Biochimique	Lipides, acides organiques, lysozymes
Immunitaire (innée et acquise)	Peptides antimicrobiens, lymphocytes, neutrophiles, monocytes, cellules de Langerhans

## I. Une barrière physique

La structure, l'épaisseur et la pilosité de la peau varient entre les espèces, mais aussi selon l'âge, le sexe, la race de l'individu et d'un site corporel à l'autre. En moyenne, l'épaisseur de la peau du chat est de 0,4 à 2,0 mm, celle du chien de 0,5 à 5,0 mm et celle de l'homme de 1 à 3 mm. En général, chez le chat et le chien, la peau est plus épaisse en partie dorsale (front, croupe, base de la queue) qu'en partie ventrale (zones axillaires, inguinales et péri anale). (Miller *et al.*, 2013a)

Nos carnivores domestiques possèdent une fourrure dense associée à une peau fine, suggérant une fonction protectrice de la fourrure. La peau du cochon est celle qui se rapproche le plus de celle de l'homme, en faisant un excellent modèle pour la recherche. (Proksch *et al.*, 2008)

### A. Bases anatomiques

La peau est organisée en trois compartiments : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme constitue un revêtement cutané et assure la majeure partie de la fonction protectrice de la peau. Le derme est constitué de cellules, d'une matrice extracellulaire (fibres de collagène et d'élastine) et du liquide dermique. Il contient les glandes sébacées et des glandes sudoripares ainsi que les follicules pileux, et sert de support à l'épiderme. L'hypoderme est constitué de lobules adipeux et assure plusieurs fonctions : l'amortissement des chocs, le stockage de substances lipophiles et la constitution de réserves énergétiques. (Miller *et al.*, 2013a)

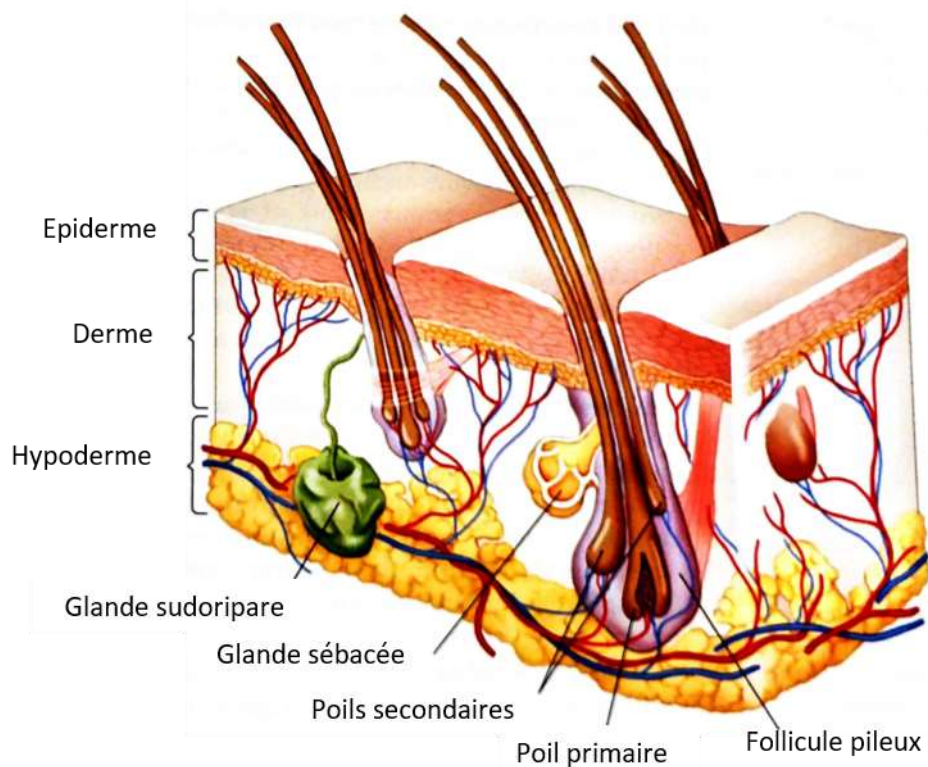


Figure 1 : Composition de la peau (d'après Miller *et al.*, 2013a)

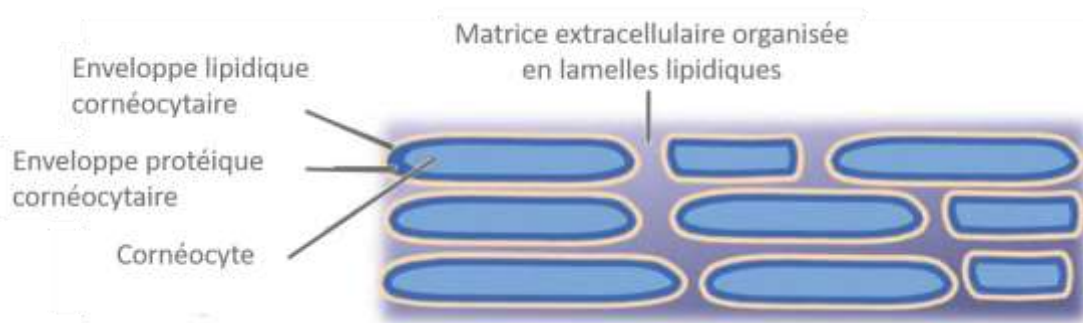
L'épiderme est subdivisé en 4 couches ou strates : la couche basale, la couche épineuse, la couche granuleuse et la couche cornée (de la plus profonde à la plus superficielle). Chez le chien et le chat, l'épiderme en général est fin (0,1 à 0,5 mm d'épaisseur) et plus épais au niveau des coussinets et de la truffe (jusqu'à 1,5 mm d'épaisseur). Chez l'homme, l'épaisseur varie de 0,04 mm au niveau des paupières à 1,5 mm au niveau des paumes et des voûtes plantaires. En moyenne, elle est comprise entre 0,06 et 1 mm. (Miller *et al.*, 2013a)

L'épiderme est constitué de quatre types cellulaires, qui sont plus ou moins impliqués dans la protection de la peau contre les agents pathogènes : les kératinocytes (85%), les mélanocytes (5%), les cellules de Langerhans (3 à 8%) et les cellules de Merkel (2%). Les kératinocytes sont des cellules épithéliales contenant une protéine fibreuse extrêmement résistante : la kératine. Les mélanocytes produisent des granules, appelés mélanosomes, contenant de la mélanine. Ils protègent la peau contre les UV et lui donnent sa couleur. Les cellules de Langerhans ont un rôle dans la barrière immunitaire cutanée : ce sont des cellules présentatrices d'antigènes. Enfin, les cellules de Merkel servent de mécanorécepteurs participant ainsi à la sensibilité tactile inconsciente. (Miller *et al.*, 2013a)

## **B. La couche cornée : un élément clé de la barrière physique cutanée**

La couche cornée (*stratum corneum*) est la plus superficielle de l'épiderme. Elle sert de barrière principale contre la pénétration de micro-organismes, grâce à deux propriétés majeures : sa kératinisation et sa faculté de desquamation. Cette dernière est normalement contrebalancée par la prolifération des kératinocytes de la couche basale, permettant de maintenir ainsi une épaisseur constante de l'épiderme. Le renouvellement complet de

l'épiderme prend 22 jours chez le chien contre 28 jours chez l'homme. La couche cornée est formée de multiples assises cellulaires constituées de cornéocytes entourés d'une matrice extracellulaire lipidique. On assimile souvent cette couche à un véritable mur dans lequel les cornéocytes seraient les briques et la matrice lipidique serait le mortier. (Baroni *et al.*, 2012 ; Miller *et al.*, 2013a)



**Figure 2 : Composition microscopique de la couche cornée (d'après Proksch et Jensen, 2008 ; Miller *et al.*, 2013)**

L'épaisseur de la couche cornée est de 3 à 35  $\mu\text{m}$  chez le chat et de 5 à 1500  $\mu\text{m}$  chez le chien. Chez l'homme, l'épaisseur moyenne est de 2 à 4  $\mu\text{m}$  mais elle est de 10  $\mu\text{m}$  au niveau du dos et de plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  au niveau des voûtes plantaires. Cependant, les méthodes de prélèvements et la préparation histologique (fixation, déshydratation, utilisation de paraffine) aboutiraient à la perte approximative de la moitié de l'épaisseur de la couche cornée. Cette dernière est plus fine au niveau des zones corporelles avec peu ou pas de poils. (Miller *et al.*, 2013a)

**Tableau II : Les fonctions protectrices de la couche cornée (d'après Proksch et Jensen, 2008 ; Miller *et al.*, 2013a)**

Fonctions	Composants	Mécanismes biochimiques
<b>Perméabilité</b>	Cornéocytes et lipides lamellaires	Lipides hydrophobes
<b>Intégrité mécanique</b>	Enveloppe cornée (EC), kératine	Involucrine, filaments de kératine
<b>Cohésion/Desquamation</b>	Cornéodesmosomes	Sérine protéase
<b>Hydratation</b>	Acides aminés, urée	Humectants hygroscopiques
<b>Imperméabilité à l'eau</b>	Lipides lamellaires	Lipides apolaires
<b>Protection UV</b>	Mélanine, acide urocanique	Réflexion, absorption
<b>Défense antimicrobienne</b>	Cornéocytes, lipides lamellaires, sécrétions	Desquamation, acides gras libres, peptides antimicrobiens (PAM)
<b>Signalement (cytokines)</b>	Cytosol des cornéocytes	Sérine protéase, interleukines

Les cornéocytes sont des kératinocytes arrivés à leur stade ultime de différenciation : il s'agit de cellules mortes, aplaties, anuclées, éosinophiles. Ils contiennent une matrice filamenteuse dense intégralement formée par des filaments de kératine agrégés par la filaggrine (Proksch et Jensen, 2008). Les cornéocytes ne possèdent pas de réelle membrane cellulaire mais ont à la place une enveloppe cornée (EC), qui remplace leur membrane plasmique. Cette EC est constituée de nombreuses protéines (loricine, involucrine, filaggrine, elafine, cystatine A, cornifeline, protéines riches en proline) et forme une véritable paroi à la fois dure et résistante. Les cornéocytes sont réunis par des cornéodesmosomes (desmosomes renforcés par un dépôt de cornéodesmosine). (Miller *et al.*, 2013a)

La matrice extracellulaire, dans laquelle sont inclus les cornéocytes, est formée de lipides organisés en lamelles lipidiques. La synthèse de ces lipides a lieu au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme, où ils sont regroupés dans des granules (les corps lamellaires ou corps d'Odland). Ces granules migrent vers l'apex des kératinocytes de la couche granuleuse et fusionnent avec leur membrane plasmique, libérant leur contenu (des céramides, des acides gras libres, des enzymes hydrolytiques, du cholestérol et des stérols). Les lipides sont modifiés et assemblés en lamelles parallèles à la surface de la peau. Les involucrines de l'EC forment des liaisons covalentes avec les céramides de la matrice extracellulaire, fournissant ainsi, une couche protectrice supplémentaire aux cornéocytes (l'enveloppe lipidique cornéocytaire), mais aussi un moyen de liaison avec les lipides lamellaires (Proksch *et Jensen*, 2008). Les lipides intercellulaires assurent donc un véritable rôle de ciment entre les cornéocytes. (Miller *et al.*, 2013a)

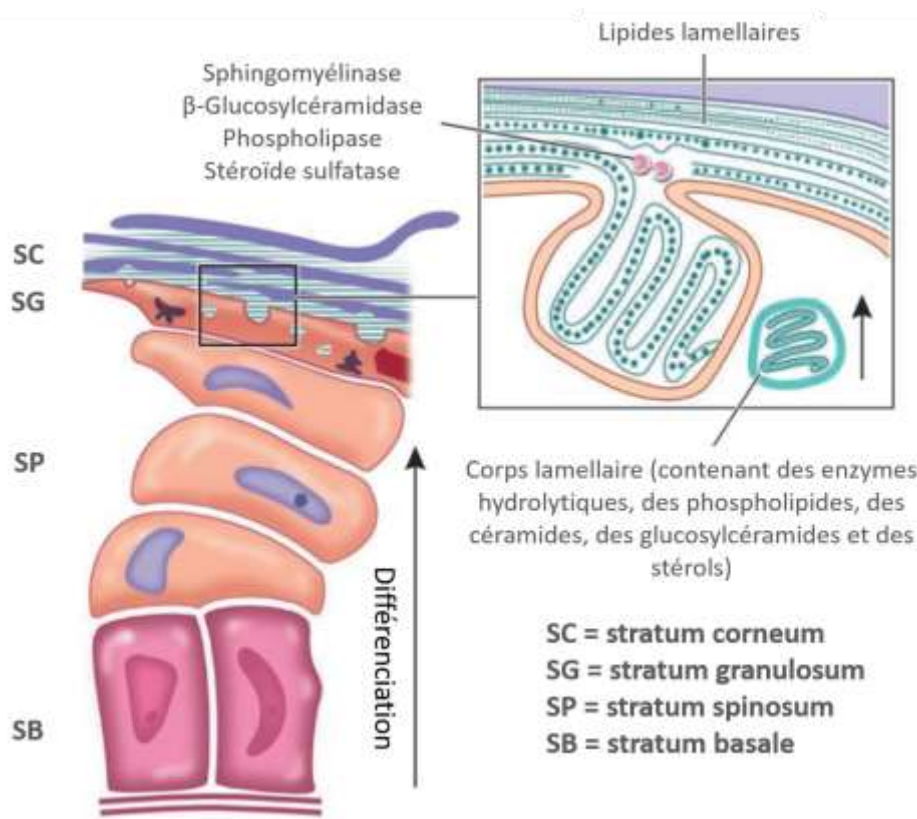


Figure 3 : Lipides lamellaires de la couche cornée (d'après Proksch *et Jensen*, 2008)

La couche cornée est, en outre, « recouverte d'un manteau acide ». Le pH à la surface de la peau du chien est de 4,84-9,95 et celui du chat de 5,6-7,4, contre 4,5-5,5 chez l'homme. Il dépend de nombreux facteurs endogènes et varie selon les sites corporels, le sexe, la race et le temps. L'influence des variations du pH cutané sur le microbiote, la perméabilité cutanée et la kératinisation ne sont pas encore complètement élucidés, mais elles auraient un rôle à jouer dans la prévention des infections cutanées. (Baroni *et al.*, 2012)



### **C. Les couches sous-jacentes et leurs structures d'adhésion : une deuxième ligne de défense**

Outre la couche cornée, l'épiderme est composé de plusieurs couches, qui constituent une deuxième ligne de défense contre les agents pathogènes, via leur participation au processus de kératinisation, de prolifération et leurs structures d'adhésions.

La couche claire (*stratum lucidum*) est constituée d'une fine assise de cellules mortes complètement kératinisées. Elle ne s'observe qu'au niveau de la peau épaisse de nos carnivores domestiques : bien développée au niveau des coussinets, moins développée au niveau de la truffe et absente des autres sites corporels. Elle constitue une zone de transition entre la couche granuleuse et la couche cornée. (Miller *et al.*, 2013a)

La couche granuleuse (*stratum granulosum*) est discontinue et parfois invisible chez nos carnivores domestiques. Elle est constituée d'une ou deux assises cellulaires. Chez l'homme elle peut contenir entre trois et cinq assises cellulaires. Les cellules de cette couche sont aplaties dorso-ventralement, basophiles, avec de petits noyaux et contiennent des grains de kératohyaline. En fait, ce ne sont pas de véritables grains puisqu'ils ne possèdent pas de membrane mais plutôt des agrégats insolubles qui contiennent, essentiellement, de la profilaggrine. La profilaggrine peut ensuite être clivée en filaggrine par une réaction dépendante du calcium. La filaggrine est une protéine qui permet l'agrégation des filaments de kératine. Son gène est muté chez certains individus atteints de dermatite atopique (DA). La cohésion entre les kératinocytes de cette couche est assurée par des jonctions serrées qui permettent de contrôler le passage des molécules par la voie extracellulaire. Ces jonctions serrées sont formées, majoritairement, par deux types de protéines chez l'homme : les occludines et les claudines. Les occludines se situent exclusivement dans la couche granuleuse, alors que les claudines-4 se trouvent dans toutes les couches suprabasales et les claudines-1 et -7 dans toutes les couches de l'épiderme (Baroni *et al.*, 2012 ; Miller *et al.*, 2013a).

La couche épineuse (*stratum spinosum*) est formée par les cellules filles des kératinocytes basaux. Chez le chat et le chien, elle est constituée d'une ou deux assises cellulaires, mais peut être plus épaisse (jusqu'à vingt assises) au niveau des coussinets, de la truffe et des jonctions muco-cutanées. Chez l'homme, elle compte 5 ou 6 assises en moyenne. Les kératinocytes épineux, appelés également acanthocytes, synthétisent des filaments de kératine K1 et K10. Au fur et à mesure de leur différenciation, ils acquièrent une forme losangique, un faible rapport nucléo-plasmique et un cytoplasme basophile à éosinophile. L'adhérence entre les kératinocytes et entre les kératinocytes et la matrice extracellulaire est assurée par quatre types de structure : des desmosomes, des zones d'adhérence (zonula adherens), des hémidesmosomes et des contacts focaux. (Miller *et al.*, 2013a)

**Tableau III : Les composants des structures d'adhésion (d'après Miller *et al.*, 2013a)**

Structures d'adhésion	Protéines transmembranaires	Protéines de la plaque	Cytosquelette	Fonction et localisation
Hémidesmosomes	Intégrines $\alpha 6\beta 4$	Plectine	Cytokératines K5 et K14	Adhésion cellule-lame basale / Kératinocytes basaux
Contacts focaux	Intégrines $\beta 1$	Taline, vinculine, actine $\alpha$ , paxilline, zykine	Actine	Adhésion cellule-lame basale / Kératinocytes basaux
Desmosomes	Cadhérines : desmogléines et desmocollines	Plakoglobine, desmoplakine, desmocalmine, plakophiline	Cytokératines K1 et K10	Adhésion cellule-cellule / Tous les kératinocytes
Jonctions adhérentes	Cadhérines E et P	Plakoglobine, caténine $\alpha$ et $\beta$ , actine $\alpha$ , vinculine	Actine	Adhésion cellule-cellule / Tous les kératinocytes

La couche basale (*stratum basale*) repose sur le derme. Elle est formée d'une unique couche de petites cellules cuboïdes qui sont majoritairement des kératinocytes basaux. Ces kératinocytes sont séparés en deux populations, qui ont des fonctions différentes : la première a une fonction de prolifération et de réparation et la seconde sert d'ancrage à l'épiderme.

En effet, les kératinocytes basaux sont les seuls capables de se multiplier et de donner naissance à d'autres kératinocytes. Les cellules filles produites se dirigent vers la surface de la peau et se différencient progressivement durant leur trajet jusqu'à leur desquamation. Par contre, seuls 15% des kératinocytes sont impliqués dans ce processus, car les autres cellules sont à l'état quiescent. Ce phénomène permet de conserver un épiderme d'épaisseur constante et d'assurer ainsi l'intégrité de la barrière physique.

Les kératinocytes basaux synthétisent également des filaments de kératine K5 et K14, formant des filaments intermédiaires, qui se fixent sur les desmosomes et les hémidesmosomes. Les desmosomes permettent l'adhésion entre les kératinocytes et les hémidesmosomes relient les kératinocytes à la lame basale sous-jacente. Ils permettent ensemble de stabiliser la structure de l'épiderme. (Baroni *et al.*, 2012 ; Miller *et al.*, 2013a)

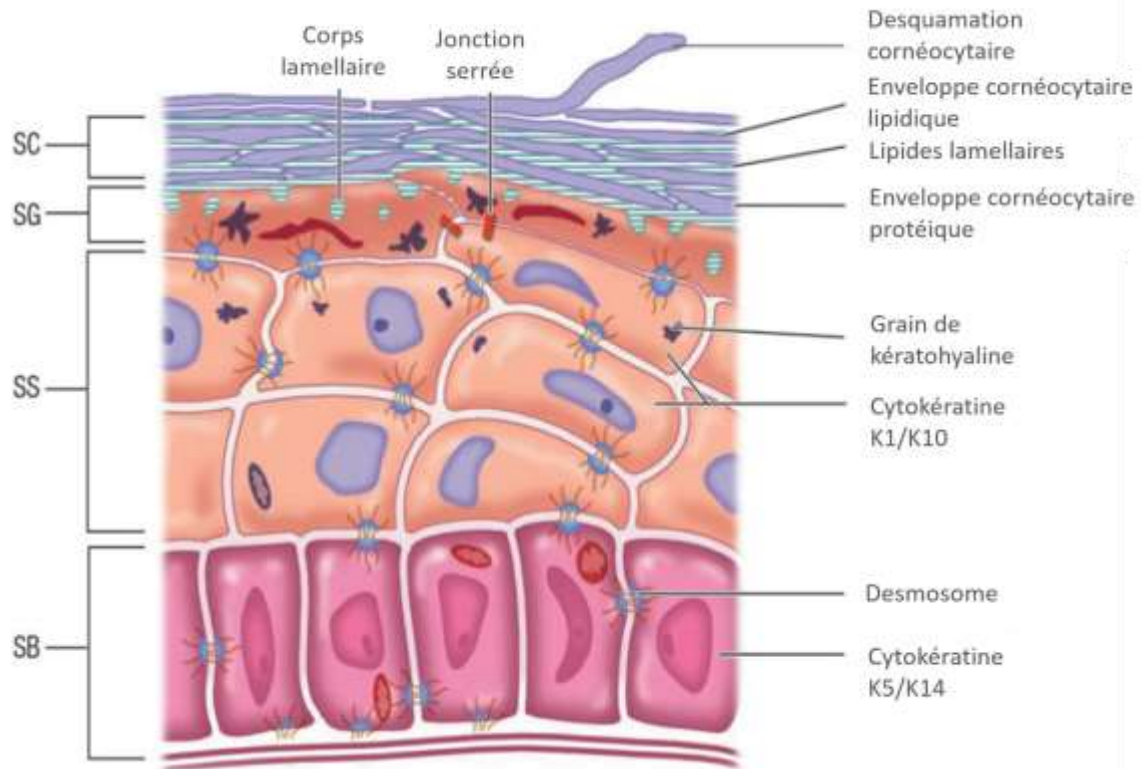


Figure 4 : Structures clés dans le rôle de protection de l'épiderme (d'après Proksch et Jensen, 2008 ; Miller *et al.*, 2013a)

En définitive, toute modification de la différenciation ou de la composition épidermiques aboutit à une détérioration de la barrière cutanée et, potentiellement, à la perturbation du microbiote et à la colonisation de la peau par des agents pathogènes.

## II. Une barrière chimique

En plus de son rôle de barrière physique, séparant deux milieux distincts et régulant le passage des molécules et la colonisation par des micro-organismes, la peau possède également un rôle de barrière chimique. Ce dernier est, notamment, assuré par les lipides épidermiques et sébacés, qui ont diverses fonctions, et par des peptides antimicrobiens (PAM) qui ont une fonction régulatrice directe sur les micro-organismes fongiques.

### A. Les lipides épidermiques et sébacés

Chez les mammifères, les kératinocytes, les glandes sudoripares apoclines et les glandes sébacées produisent une couche lipidique protectrice qui recouvre la peau. Les lipides cutanés du chien et du chat seraient, principalement, d'origine épidermique alors que ceux de l'homme seraient, principalement, d'origine sébacée. En effet, cette couche lipidique contient plus de stérols, de cholestérol et de céramides et moins de triglycérides, d'acides gras libres et de squalènes chez le chien et le chat que chez l'homme.

La formation d'une barrière cutanée lipidique est primordiale afin de faire face aux agressions par des micro-organismes pathogènes ; mais aussi, afin de prévenir les pertes d'eau et d'électrolytes, essentiels pour la survie d'autres micro-organismes, qui eux sont bénéfiques. Certains lipides ont, en outre, des propriétés antimicrobiennes directes.

## 1. Les lipides épidermiques

L'imperméabilité de la barrière cutanée est assurée par deux types de lipides : les lipides lamellaires présents dans l'espace extracellulaire de la couche cornée et les lipides formant l'enveloppe lipidique cornéocytaire.

### a. Les lipides lamellaires de la couche cornée

La matrice extracellulaire lipidique de la couche cornée ne représente pas moins de 10% de la masse totale de cette couche. Les précurseurs de ces lipides sont synthétisés par les kératinocytes de la couche granuleuse, stockés dans les corps d'Odland, puis excrétés dans le milieu extracellulaire, à la jonction entre la couche granuleuse et la couche cornée, où ils sont modifiés afin d'assurer leurs fonctions.

#### i. Les corps lamellaires (ou corps d'Odland) : transport et maturation des lipides lamellaires

Les corps lamellaires jouent un rôle clé dans la libération des précurseurs des lipides de la matrice extracellulaire. Ils se forment dans les kératinocytes de la couche granuleuse de l'épiderme. Ce sont des granules constitués d'une bicouche lipidique, qui sont issus de l'appareil de Golgi durant la différenciation des kératinocytes. Ils contiennent du cholestérol, des phospholipides, des glucosylcéramides et de la sphingomyéline. En plus de ces lipides, ils internalisent aussi des enzymes, des PAM et d'autres protéines. Un système de transporteurs, comme ceux de la famille ABC, est essentiel pour l'inclusion des glucosylcéramides, du cholestérol et des phospholipides dans les corps lamellaires. (Feingold et Elias, 2014)

La composition lipidique des corps lamellaires diffère de celle des lipides lamellaires extracellulaires de la couche cornée. En fait, après leur sécrétion, les lipides des corps lamellaires sont métabolisés au niveau de la couche cornée par des enzymes, qui sont apportés comme eux par les corps lamellaires. Des phospholipases convertissent les phospholipides en acides gras libres et en glycérol, alors que la sphingomyélinase convertit les sphingomyélines en céramides et que la  $\beta$ -glucocérébrosidase convertit les glucosylcéramides en céramides. Le cholestérol sulfate, qui est le seul à ne pas être transporté via des corps lamellaires, est aussi converti en cholestérol par une enzyme sulfatase stéroïde. (Feingold et Elias, 2014)

En plus de son rôle dans l'instauration d'une barrière cutanée imperméable, le métabolisme des lipides des corps lamellaires possède d'autres rôles clés. Par exemple, le processus de conversion du sulfate de cholestérol en cholestérol joue un rôle important dans la régulation de la cohésion de la couche cornée et dans le phénomène de desquamation. (Feingold et Elias, 2014)

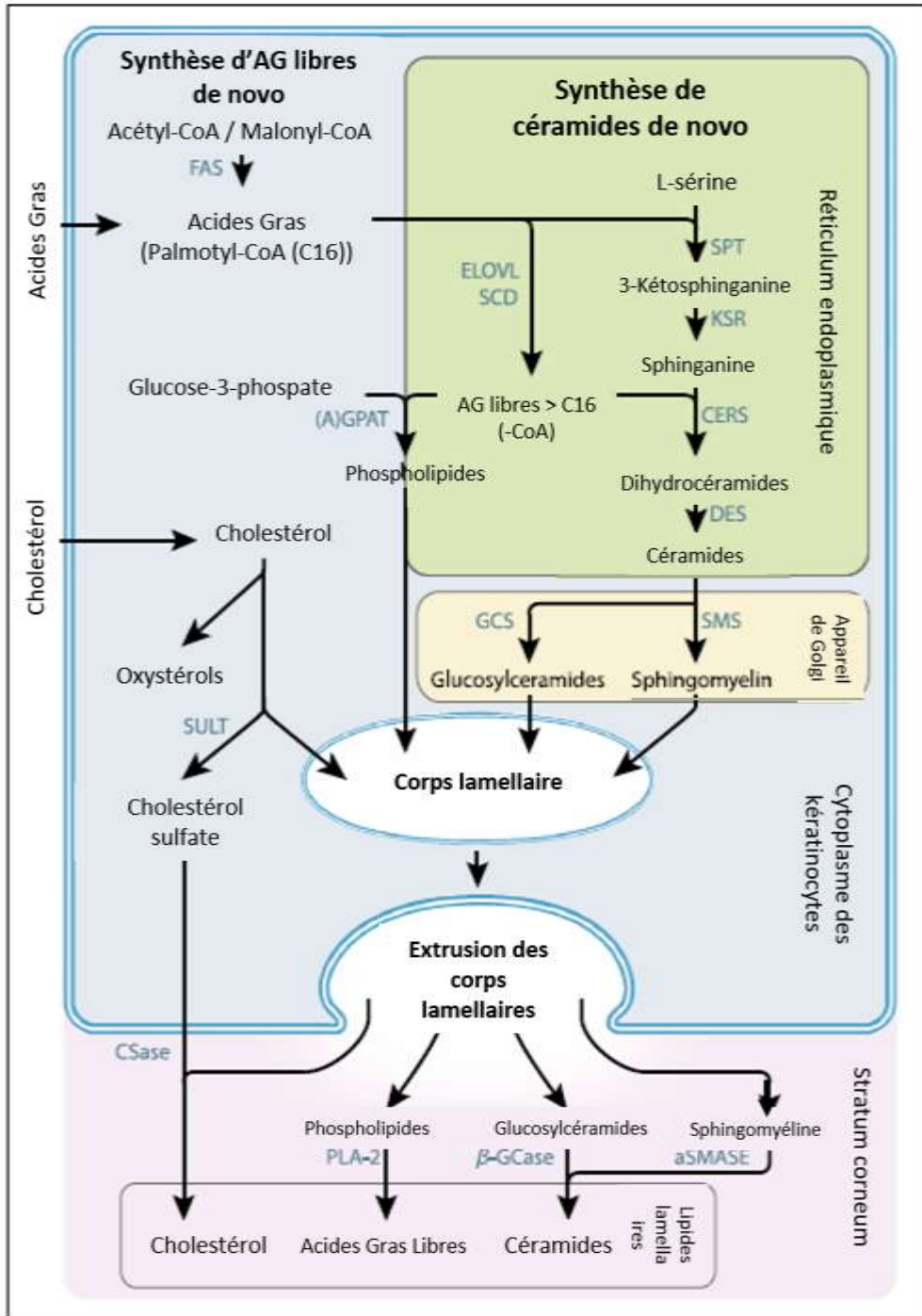


Figure 5 : Schéma des processus enzymatiques impliqués dans la formation des lipides lamellaires de la couche cornée (d'après Smeden *et al.*, 2014)

En cas d'atteinte de la barrière cutanée, des corps lamellaires préformés sont sécrétés et initient une réponse réparatrice rapide. Cette sécrétion est régulée, notamment, par la concentration en calcium et en potassium de la partie superficielle de l'épiderme. De nouveaux corps lamellaires sont également synthétisés dans la couche granuleuse de l'épiderme, jusqu'à la restauration complète de la fonction protectrice de la peau. (Feingold *et Elias*, 2014)

En cas de dermatite atopique, les enzymes, qui permettent la maturation des lipides, et les protéines, qui servent à leur transport, sont altérées. L'exocytose des corps lamellaires est probablement incomplète et retardée dans le temps. (Smeden *et al.*, 2014)

ii. Une composition variable des lipides lamellaires

La composition de la matrice extracellulaire lipidique est étudiée via des techniques de chromatographie sur couche fine. Cette dernière se compose, approximativement, chez l'homme de 50% de céramides, 25% de cholestérol et 15% d'acides gras libres, avec une petite proportion de phospholipides. Celle du chien est très similaire : 65,6% de céramides, 11,6% d'acides gras et 7,7% de cholestérol. (Yoon *et al.*, 2013) Cette composition dépend du site corporel considéré. (Feingold *et Elias*, 2014 ; Angelbeck-Schulze *et al.*, 2014)

Les céramides sont formés par la combinaison de deux chaînes carbonées : une molécule de base sphingoïde et un acide gras, liés par une liaison amide. Au total, il existe 12 sous-classes de céramides qui diffèrent selon la molécule de base, la longueur de l'acide gras et le fait qu'il soit hydroxylé ou non (voir figure 6). (Smeden *et al.*, 2014)

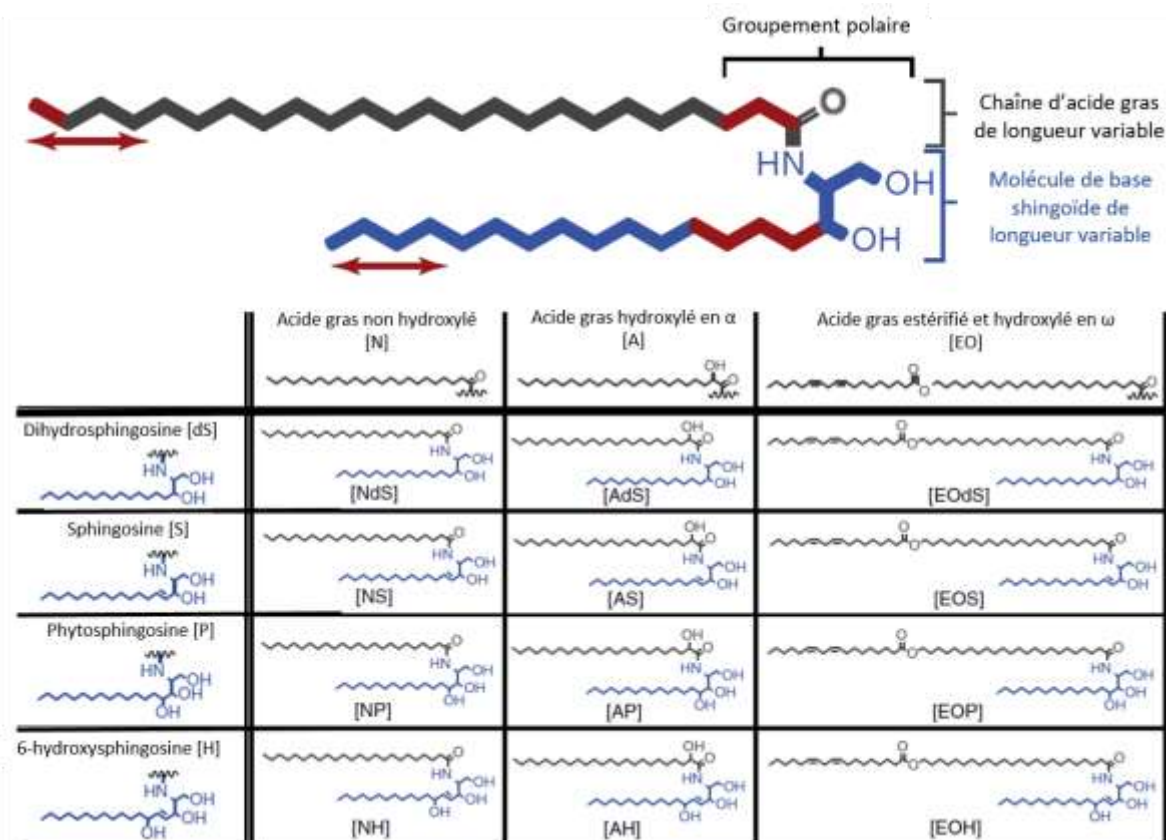


Figure 6 : Schéma explicatif des différentes sous classes de céramides (d'après Smeden *et al.*, 2014)

Les acides gras épidermiques sont formés d'une seule chaîne carbonée. Ils sont majoritairement saturés et peuvent contenir jusqu'à 36 atomes de carbone. Néanmoins, ce sont les chaînes C18, C24 et C26 qui prédominent. (Smeden *et al.*, 2014)

Les traitements topiques à base de glucocorticoïdes inhibent la synthèse des céramides, du cholestérol et des acides gras dans l'épiderme altérant la barrière cutanée. (Feingold *et Elias*, 2014)

Des maladies cutanées sont associées à des changements dans la composition lipidique de la matrice extracellulaire de la couche cornée et à une fonction de barrière altérée. Par exemple, dans le cas de la dermatite atopique (DA), chez l'homme comme chez le chien, la quantité totale des lipides de la couche cornée est réduite par rapport à celle d'un individu sain. Le taux de céramides est plus faible et peut être lié au fait qu'il y ait moins de sphingosine, un précurseur des céramides. Toutefois, chez l'homme, une augmentation du taux de céramides avec des chaînes carbonées courtes et une diminution du taux d'acide gras avec des chaînes carbonées très longues (supérieures à 24 atomes de carbone) sont notées. Ceci permet d'émettre l'hypothèse qu'il n'y aurait pas seulement la composition globale lipidique cutanée qui jouerait un rôle important dans cette maladie, mais aussi la longueur des chaînes carbonées des lipides. (Smeden *et al.*, 2014 ; Angelbeck-Schulze *et al.*, 2014)

### iii. Une organisation spécifique en lamelles

La matrice extracellulaire lipidique possède une organisation en lamelles qui lui est propre. Les lipides sont disposés perpendiculairement à la membrane des cornéocytes et parallèles les uns aux autres. Les lamelles lipidiques dans les espaces intercellulaires sont assemblées par 3, 6, 9 ou 12. La méthode de diffraction des rayons X permet d'établir que l'organisation des lipides lamellaires possède une périodicité spécifique avec une phase courte de 6 nm et une phase longue de 13 nm, notée respectivement SPP et LPP dans la figure 7. (Smeden *et al.*, 2014)

En plus de cette organisation lamellaire, les lipides de la couche cornée possèdent une organisation latérale, définie comme l'organisation des lipides au sein même des lamelles. Les lipides possèdent majoritairement une organisation dite orthorhombique très compacte, tandis que les lipides restants possèdent une organisation hexagonale, moins dense, voire sont, même, intégrés au sein d'une phase aqueuse. La longueur des chaînes carbonées des acides gras jouerait un rôle primordial dans ce type d'organisation latérale, organisation qui est primordiale pour limiter les déperditions d'eau. (Smeden *et al.*, 2014)

En cas de DA, les lipides lamellaires sont préférentiellement orientés de manière hexagonale, contribuant ainsi à la perte de l'imperméabilité de la barrière cutanée. (Smeden *et al.*, 2014)



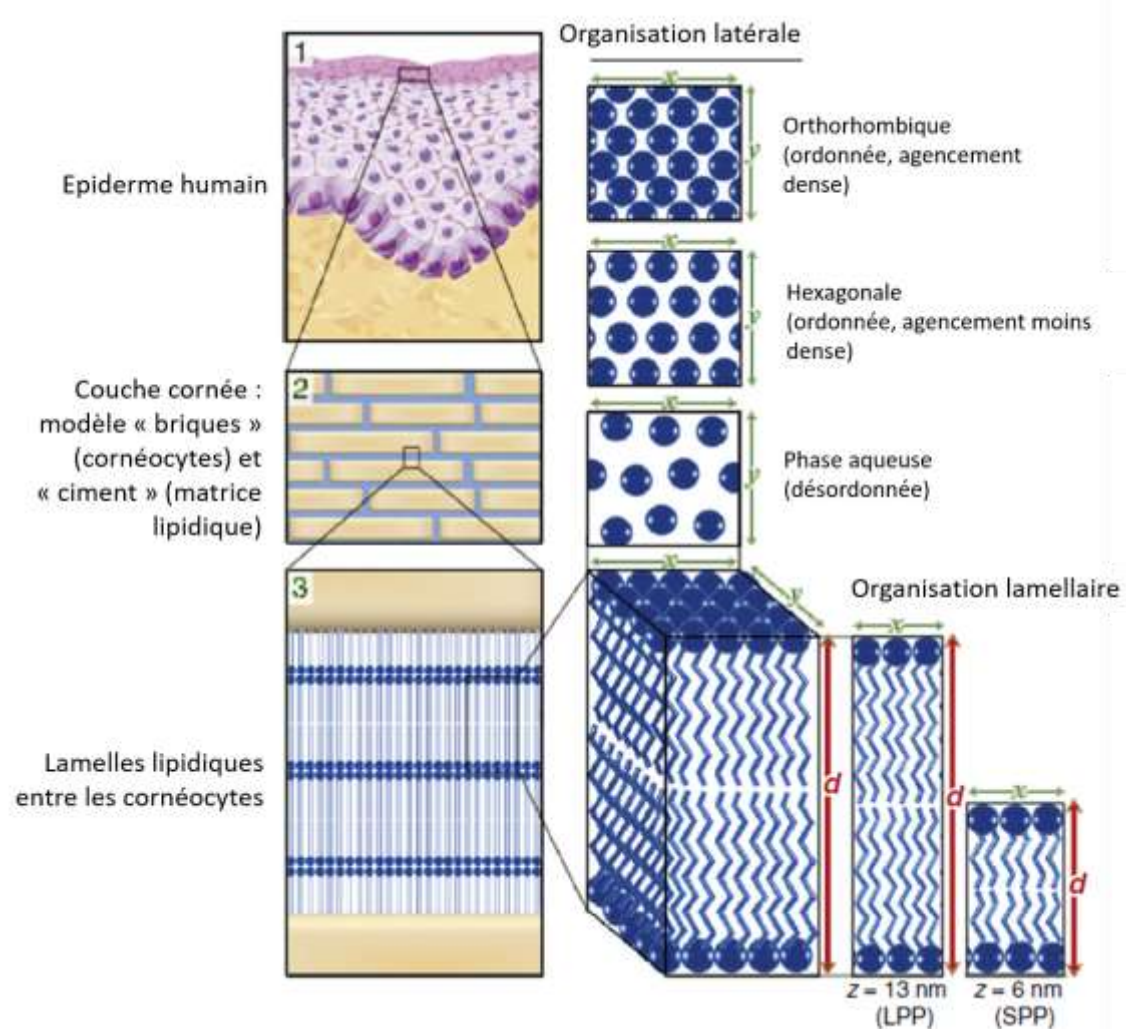


Figure 7 : Organisation lipidique de la couche cornée chez l'homme (d'après Smeden *et al.*, 2014)

#### iv. Des rôles divers

- Rôle de barrière physique et chimique

Les lipides lamellaires, notamment les céramides, sont des éléments clés de la barrière cutanée, physique et chimique, qui permettent une rétention hydrique mais aussi une certaine protection contre les agents pathogènes. (Miller *et al.*, 2013a)

- Rôle dans la formation du manteau acide

Les acides gras, formés à partir de phospholipides, contribuent à l'acidification de la couche cornée, qui est un paramètre crucial de la régulation de nombreuses enzymes. Si le pH cutané augmente, l'action de certaines enzymes est réduite menant à la baisse de production des céramides et, ainsi, à une fonction protectrice cutanée altérée, alors que celle d'autres enzymes (protéases) est augmentée stimulant ainsi la desquamation, la différenciation des kératinocytes en cornéocytes et inhibant la sécrétion des corps lamellaires. (Feingold *et Elias*, 2014)



- Rôle dans la signalisation cellulaire

Les lipides lamellaires possèdent également un rôle dans certaines voies de signalisation, via des récepteurs spécifiques exprimés au niveau de l'épiderme. Il existe deux types de récepteurs (PPAR et LXR) qui sont activés, soit par les acides gras, soit par le cholestérol oxydé. Les sphingolipides sont aussi des molécules de signalisation cellulaire. Par exemple, la sphingosine est capable d'inhiber la protéine kinase C, qui joue un rôle dans la division et la différenciation des kératinocytes. (Drake *et al.*, 2008 ; Feingold *et Elias*, 2014)

- Rôle antimicrobien

Les bases sphingoïdes (sphingosine, dihydrosphingosine, phytosphingosine et 6-hydroxysphingosine) possèdent un pouvoir antimicrobien à large spectre (antibactérien et antifongique). Elles sont issues de l'hydrolyse des céramides de la couche cornée par des céramidases. Les bases sphingosine et phytosphingosine possèdent des propriétés antifongiques contre *Candida albicans*, en interférant avec la synthèse de la paroi fongique ; alors que ce champignon est résistant à l'action de la dihydrosphingosine. La sphingosine, la dihydrosphingosine et la phytosphingosine possèdent une action synergique avec les PAM, notamment la cathélicidine LL-37. La production de ces lipides antimicrobiens augmente suite à l'altération de la barrière cutanée, mais celle-ci est bloquée en cas d'apport de lipides exogènes par un topique. (Drake *et al.*, 2008 ; Fischer *et al.*, 2014)

b. Les lipides de l'enveloppe lipidique cornéocytaire (ELC)

Les cornéocytes sont entourés d'une enveloppe protéique, précédemment décrite, formée de filaggrine, de loricrine et d'involucrine ; mais aussi d'une seconde enveloppe formée d'une monocouche de lipides non polaires.

i. Structure et composition de l'ELC

L'ELC est une couche fine, unique, composée de céramides et d'acides gras avec de longues chaînes carbonées, dits ULC pour *Ultra Long Chain* en anglais. Elle se situe entre l'enveloppe cornéocytaire protéique et les lipides lamellaires intercellulaires. L'ELC est liée à la pathogénie de certaines maladies cutanées, notamment l'ichtyose. L'ELC est majoritairement composée d'hydroxycéramides- $\omega$  liés à des acides gras ULC, de type EOS (voir figure 6). Les céramides et les acides gras ULC de l'ELC sont liés de manière covalente à l'enveloppe cornéocytaire et la recouvrent entièrement. Cette liaison se fait entre les résidus glutamates des molécules d'involucrine de l'enveloppe cornéocytaire et les résidus hydroxy- $\omega$  des lipides. (Elias *et al.*, 2014 ; Akiyama, 2017)

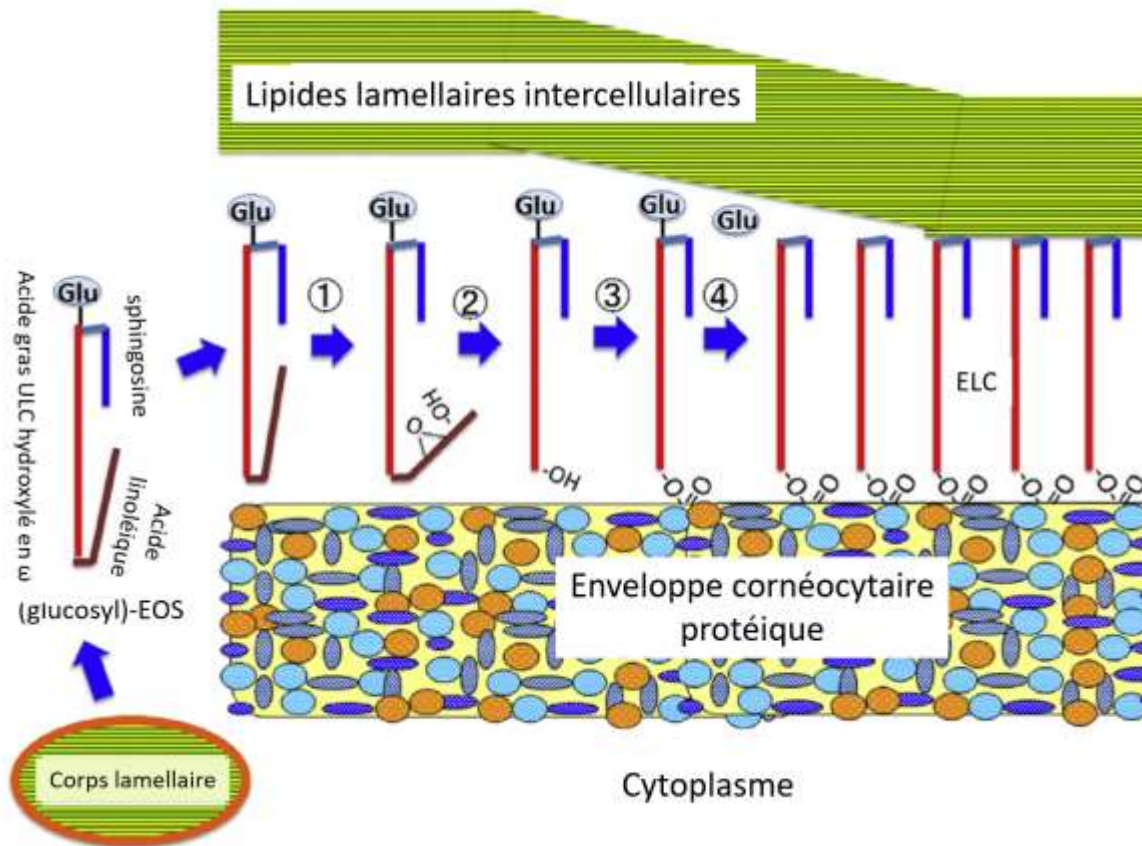


Figure 8 : Schéma de la formation et de la structure de l'ELC (d'après Akiyama, 2017)

## ii. Formation de l'ELC

La formation des lipides de l'ELC comprend plusieurs étapes au sein des kératinocytes et l'intervention de nombreuses enzymes comme le montre la figure 9. Le transport des précurseurs de l'ELC se fait ensuite via les corps lamellaires. Il existe deux hypothèses différentes quant à l'origine des céramides de l'ELC : soit ils dérivent de la membrane qui limite les corps lamellaires, soit ils font partie du pool de céramides extracellulaires sécrétés lors de la fusion des corps lamellaires avec la membrane plasmique des kératinocytes de la couche granuleuse. La dernière étape de la formation de l'ELC est la perte d'une molécule de glucose, qui permet la mise en place des liaisons covalentes avec l'enveloppe cornée. (Elias *et al.*, 2014 ; Akiyama, 2017)

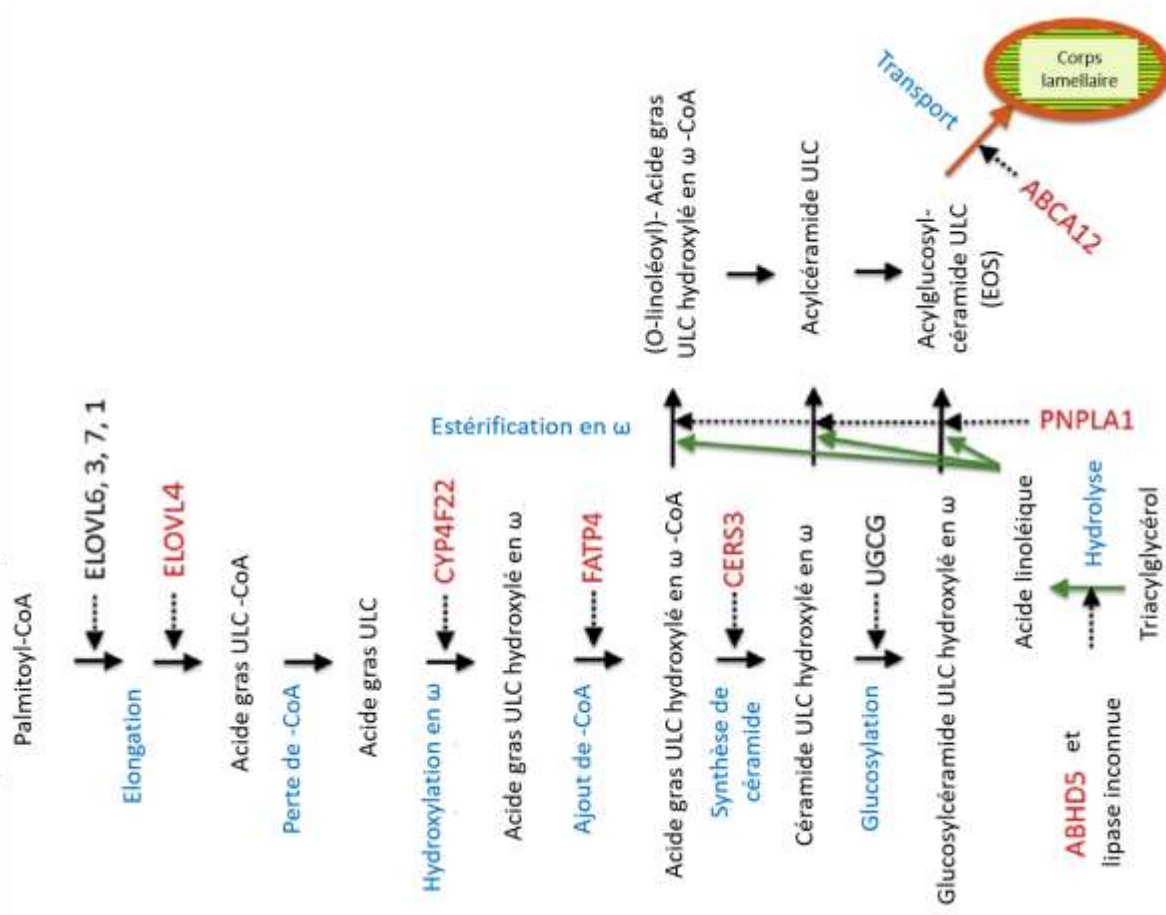


Figure 9 : Etapes et enzymes impliquées dans la synthèse des céramides de l'ELC au niveau des kératinocytes (d'après Akiyama, 2017)

L'enzyme de chaque étape est indiquée par une flèche en pointillés. Les enzymes connues pour être déficientes en cas d'ichtyose sont en rouge. Les flèches vertes indiquent l'apport de l'acide linoléique lors de l'estérification en  $\omega$ .

Les céramides EOS de l'ELC sont résistantes aux céramidases, conférant à celle-ci une fonction de point d'attache pour la matrice lipidique extracellulaire. L'ELC contribuerait également à la cohésion de la couche cornée, limiterait l'absorption des substances nocives par les cornéocytes et assurerait la fonction de membrane semi-perméable. (Smeden *et al.*, 2014 ; Elias *et al.*, 2014)

### c. Les lipides extra-cutanés et l'homéostasie cutanée

Les acides gras essentiels, tels que les stérols ou l'acide arachidonique, sont nécessaires à la formation et au maintien d'une couche cornée fonctionnelle. Ils ne sont pas synthétisés par les mammifères et doivent être obtenus via l'alimentation. Ils forment une source de lipides annexe pour la formation des corps lamellaires. Par exemple, chez le chat et le chien, l'acide linoléique est incorporé dans les céramides 1, 4 et 9. (Miller *et al.*, 2013a ; Feingold *et al.*, 2014)

## 2. Les lipides sébacés

### a. Les glandes sébacées et leur sécrétion holocrine

Les glandes sébacées sont présentes dans le derme de tous les mammifères. Elles sont dispersées sur tout le corps du chien et du chat, mais sont particulièrement développées et nombreuses au niveau des jonctions cutanéomuqueuses, des espaces interdigités, du cou, du dos, du menton et de la queue. Elles sont absentes des coussinets et de la truffe. Les glandes sébacées sont, pour la plupart, associées aux follicules pileux, formant des unités pilo-sébacées. Elles s'ouvrent par un canal dans l'infundibulum folliculaire, le sébum atteignant la surface de la peau par l'ostiole folliculaire. Les glandes sébacées sont des structures uni- ou pluri-lobulaires dont les acini sont connectés avec le conduit excréteur. (Miller *et al.*, 2013a ; Schneider, 2016)

Les glandes sébacées sont formées de sébocytes, c'est-à-dire de cellules spécialisées qui subissent une migration et une différenciation spécifiques au sein des acini. Lorsqu'elles atteignent la zone de maturation, ces cellules se différencient : elles accumulent des gouttelettes lipidiques et leurs autres organites cytoplasmiques dégénèrent. Au stade ultime de différenciation, dans la zone de lyse, les sébocytes se disloquent et les lipides ainsi que des débris cellulaires sont libérés. Ce type particulier de sécrétion est qualifié d'holocrine : l'ensemble de la cellule et de son contenu constituent le produit sécrété, appelé ici sébum. Le sébum forme une émulsion protectrice qui s'étale à la surface de la peau. (Miller *et al.*, 2013a ; Schneider, 2016)

Les glandes sébacées sont impliquées dans la pathogénie de diverses maladies cutanées telles que l'acné ou la séborrhée. Cette dernière, due à une sécrétion excessive de sébum, se manifeste cliniquement par un toucher gras de la peau et des poils. Chez le chien, elle peut être primaire ou secondaire à une prolifération de *Malassezia*, ainsi qu'à de nombreuses causes d'inflammation cutanée. (Yoon *et al.*, 2013)

### b. La composition du sébum

Le sébum qualifié de « natif », lorsqu'il vient d'être sécrété, est constitué de débris cellulaires et de lipides non polaires : squalène (précurseur du cholestérol), cholestérol, cérides et triglycérides. Durant leur passage dans le canal pileux, les triglycérides sont partiellement hydrolysés par des lipases en acides gras et en glycérol. Le sébum final de l'homme contient majoritairement des lipides peu polaires : 57,5% de triglycérides et d'acides gras, 26% de cérides, 12% de squalène et 4,5% de cholestérol. Cette composition dépend de l'espèce considérée et de l'âge du sujet, notamment du passage à la puberté chez l'homme. Chez l'adulte, de nombreux facteurs influencent la production et la composition des lipides sébacés : des stéroïdes, d'autres hormones, des facteurs de croissance, des régulateurs neuroendocriniens ... (Feingold *et Elias*, 2014 ; Schneider, 2016 ; Lovaszi *et al.*, 2018)

La composition du sébum dépend de l'espèce chez le chien. Yoon *et al.* (2013) l'étudient chez le Shih Tzu et en donne la composition suivante : 45,2% de triglycérides, 19,2% de cérides, 18,3% d'esters du cholestérol, 8,5% de cholestérol et 5,3% d'acides gras. Cette composition est aussi susceptible de varier en fonction de l'état physiologique ou pathologique. Par exemple, en cas de séborrhée chez le chien, les lipides sébacés contiennent moins d'acides gras mais plus de cérides et de triglycérides. (Yoon *et al.*, 2013)

### c. Les fonctions du sébum

La principale fonction des lipides sébacés est de constituer un film à la fois imperméable à l'eau, photoprotecteur et jouant un rôle dans la thermorégulation. Ils possèdent, également, un rôle structural, moindre que celui des lipides épidermiques, mais néanmoins important pour le maintien de l'intégrité de la barrière cutanée. (Lovaszi *et al.*, 2018)

Les lipides sébacés ont une influence sur le système immunitaire cutané. Ils interagissent avec les macrophages, via une voie d'activation secondaire, pour une fonction de réparation et d'homéostasie tissulaire. Ils interagissent également avec les kératinocytes via des mécanismes incomplètement élucidés. En outre, les sébocytes ont des propriétés pro-inflammatoires via la production de PAM, de cytokines, de chimiokines et d'adipokines. (Lovaszi *et al.*, 2018)

Les glandes sébacées sécrètent des acides qui sont à l'origine du manteau acide épidermique. Ce fin film, légèrement acide, constitue une barrière à la pénétration et au maintien des organismes pathogènes bactériens et fongiques. (Lovaszi *et al.*, 2018)

La maturation de certains acides gras essentiels, tels que les acides linoléique et linoléinique, via une enzyme désaturase, a lieu dans les glandes sébacées. Cette dégradation produit l'acide sapiénique qui possède des fonctions antibactériennes et antifongiques. (Lovaszi *et al.*, 2018) En outre, l'étude des personnes atteintes de teigne du cuir chevelu (teigne récurrente chez les enfants et disparaissant à la puberté) illustre l'activité antifongique du sébum. Il est prouvé que les chaînes carbonées, courtes, à nombre de carbone impair, des acides gras sébacés sont à l'origine de ce pouvoir antifongique. (Fischer *et al.*, 2014)

## **B. Les peptides antimicrobiens (PAM)**

La peau synthétise un certain nombre de peptides antimicrobiens (PAM) qui sont de petites protéines, majoritairement cationiques, produites par les cellules immunitaires et épithéliales.

Ces peptides ont un rôle antibactérien, antifongique et antiviral direct, participant ainsi au système immunitaire inné ; mais aussi des propriétés immunomodulatrices, qui leur permettent d'intervenir dans le système immunitaire adaptatif. De plus, certains PAM sont capables de stimuler la migration et la prolifération des kératinocytes et la production de chimiokines et de cytokines. La capacité de la peau à moduler sa propre colonisation par des agents fongiques a des conséquences directes sur la constitution de son microbiote et le rejet des agents pathogènes.

## 1. Les $\beta$ -défensines et les cathélicidines : des PAM cutanés majoritaires

Le premier PAM cutané humain, découvert en 1997, est une  $\beta$ -défensine humaine (hBD). Depuis, de nombreux autres PAM ont été découverts dans la peau humaine : d'autres hBD, la cathélicidine LL-37, les protéines S100 (dont la S100A7 connue sous le nom de psoriasine), la RNase 7 et la dermcidine (Niyonsaba *et al.*, 2017). D'autres peptides ont été identifiés dans la sueur : KR-20, RK31 et KS30 (Schauber *et Gallo*, 2007). Les 2 principales familles de PAM de la peau, chez l'homme ou chez nos carnivores domestiques, sont les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines.

Les défensines forment une famille de PAM, dont la caractéristique est de posséder des résidus cystéine reliés par des ponts disulfures. Elles sont subdivisées en trois sous-familles ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\theta$ ). Les  $\alpha$ -défensines sont présentes chez les primates mais absentes chez nos mammifères domestiques, les  $\beta$ -défensines sont présentes chez tous les mammifères et les  $\theta$ -défensines ne sont présentes que chez les primates à l'exclusion de l'homme. Seules les  $\beta$ -défensines sont exprimées dans la peau.

Il existe environ 90 gènes qui codent 6 types de  $\beta$ -défensines humaines dont seulement 3 sont détectées dans l'épiderme : hBD1, hBD2 et hBD3 ; contre 43 gènes qui codent 6  $\beta$ -défensines canines : cBD1, cBD2, cBD3, cBD102, cBD103 et cBD127. Les  $\beta$ -défensines félines n'ont pas été étudiées. (Schauber *et Gallo*, 2007 ; Wingate *et al.*, 2008 ; Gallo *et Hooper*, 2012 ; Leonard *et al.*, 2012b ; Santoro *et Maddox*, 2014 ; Ageitos *et al.*, 2017 ; Niyonsaba *et al.*, 2017)

Les cathélicidines varient de par leur séquence d'acides aminés, leur structure et leur taille. Le précurseur, appelé prépropeptide et codé par un unique gène, est stocké dans des granules sous forme inactive. Le propeptide des cathélicidines est obtenu par clivage par une élastase. Il possède une région N-terminale et un domaine cathéline qui sont conservés d'une espèce à l'autre, formant le caractère commun des membres de cette famille de molécules. Par contre, la région C-terminale, codant le peptide mature présente une hétérogénéité entre les espèces. Les peptides matures sont classés en 4 sous-groupes : les peptides avec des hélices  $\alpha$ , les peptides riches en proline et en arginine, les peptides riches en tryptophanes et enfin les peptides avec des ponts disulfures.

L'homme, le chien et le chat possèdent une unique cathélicidine nommée LL-37, K9CATH et feCath, respectivement. Chez ces espèces, le peptide mature est une hélice  $\alpha$  linéaire, qui faciliterait l'interaction entre le peptide et les membranes microbiennes. (Sang *et al.*, 2007 ; Léonard *et al.*, 2011 ; Kosciuczuk *et al.*, 2012 ; Léonard *et al.*, 2012b ; Santoro *et Maddox*, 2014)

## 2. Domaine d'expression des $\beta$ -défensines et des cathélicidines

L'expression des PAM est soit constitutive, soit induite par des stimuli de différentes natures : inflammation, contact avec des agents pathogènes, phénomène de cicatrisation, blessure ... Au niveau cutané, les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines sont produites par les kératinocytes folliculaires à des taux plus élevés que par les autres cellules. Néanmoins, tous les kératinocytes sont capables de les produire. En augmentant l'activité des kératinocytes, certaines cellules sécrétrices de la peau (comme celles des glandes sudoripares apocrines et des glandes sébacées) peuvent contribuer à l'augmentation du taux de PAM. Cette

expression serait spécifique d'un agent microbien pour un PAM donné. Par exemple, *Malassezia furfur* est capable d'induire l'expression de hBD2 et hBD3, *Candida albicans* celle de hBD2. (Gallo *et Hooper*, 2012)

L'expression de hBD1 est, à la fois, constitutive et inductible au niveau de l'épiderme, alors que l'expression de hBD2 et hBD3 est, généralement, inductible (Niyonsaba *et al.*, 2017). D'après l'étude de Brandwein *et al.*, (2017) la sécrétion des  $\beta$ -défensines humaines varie avec le site corporel comme décrit sur la figure 10.

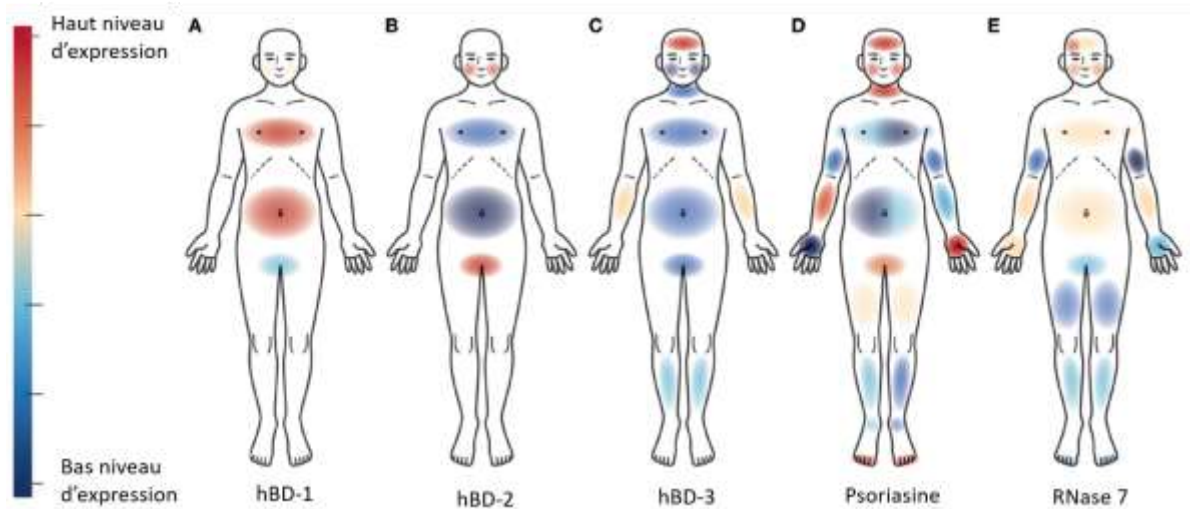


Figure 10 : Distribution biogéographique des PAM cutanés chez l'homme (d'après Brandwein *et al.*, 2017)

Le PAM le plus exprimé dans la peau du chien est la  $\beta$ -défensine canine 103 (cBD103), qui dérive d'un gène orthologue de la  $\beta$ -défensine humaine 3. Il n'existerait pas de différence de répartition des  $\beta$ -défensines canines entre les régions corporelles, dorsales et ventrales (Leonard *et al.*, 2012a). L'expression des  $\beta$ -défensines félines n'a pas été étudiée, bien qu'une  $\beta$ -défensine féline 103 semble avoir été identifiée.

Les cathélicidines humaine, canine et féline sont majoritairement exprimées dans la moelle osseuse au niveau des granules et du cytoplasme de neutrophiles, et dans une moindre mesure dans la peau et l'intestin. LL-37 est aussi exprimée au niveau d'autres cellules immunitaires (notamment les monocytes et les lymphocytes).

LL-37, K9CATH et feCath possèdent une expression, à la fois, constitutive et inductible. Ainsi, LL-37 possède une expression constitutive par les neutrophiles, les mastocytes, les macrophages et les monocytes ; alors que son expression par les kératinocytes est inductible. La vitamine D3 induit l'expression de LL-37 par les kératinocytes et les monocytes, mais n'est pas inductrice de l'expression de K9CATH et de feCath. (Sang *et al.*, 2007 ; Léonard *et al.*, 2011 ; Kosciuzuk *et al.*, 2012 ; Léonard *et al.*, 2012b ; Santoro *et Maddox*, 2014 ; Niyonsaba *et al.*, 2017)



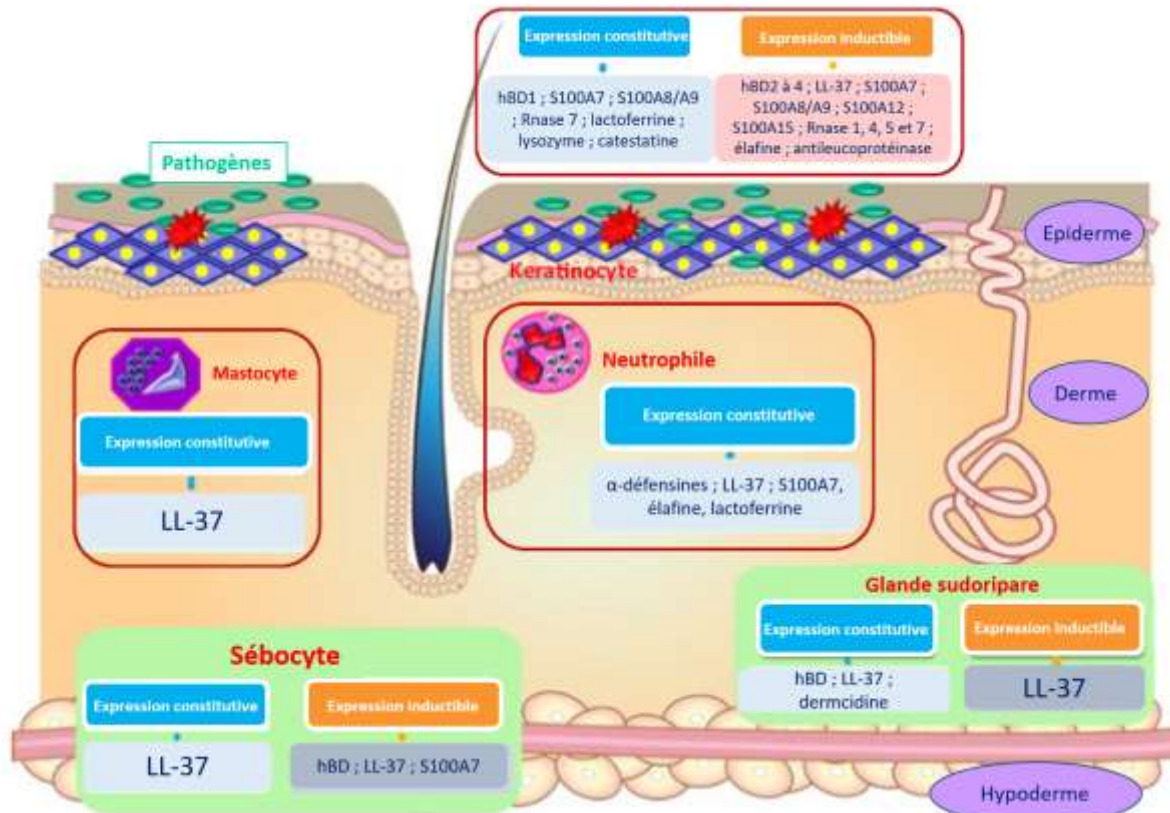


Figure 11 : Représentation schématique de l'expression des PAM humains cutanés (d'après Niyonsaba et al., 2017)

L'expression des PAM est modulée par le statut médical de l'individu. En 2002, l'étude d'Ong et al. avait montré une expression de LL-37, hBD2 et hBD3 moindre, au niveau des zones lésionnelles, chez des individus atteints de dermatite atopique (DA) comparativement à celle d'un individu sain. Depuis, l'équipe de Harder et al. (2010) a observé une expression plus importante des PAM en cas de DA. Les chiens atteints de DA ont une expression plus élevée de cBD1, mais une expression réduite de cBD103. (Leonard et al., 2012b ; Brandwein et al., 2017)

### 3. Rôle premier des PAM : une fonction antimicrobienne

Tous les PAM cités auparavant ont une fonction fongicide, à l'exception de feCath. Afin d'étudier le pouvoir antimicrobien des différents PAM, des concentrations inhibitrices fongiques et fongicides minimales sont calculées. Ainsi, hBD3 et cBD103 sont les PAM les plus efficaces contre *Malassezia pachydermatis* et *Candida albicans* (Santoro et Maddox, 2014 ; Niyonsaba et al., 2017). Il est aussi notable que hBD3 possède une action synergique avec LL-37 (Ageitos et al., 2017).

La cible des PAM est la membrane microbienne. Leur conformation, leur charge cationique, leur caractère plus ou moins hydrophobe (environ 50%) et amphipathique permet aux PAM de se fixer aux membranes des microbes et de les endommager. La perte du gradient membranaire des micro-organismes aboutit à leur destruction. Il existe plusieurs modèles d'action membranaire des PAM présentés dans la figure 12. Par exemple, LL-37



forme un pore à travers la membrane cellulaire ou inhibe sa formation. Ainsi, puisque les PAM n'interagissent pas via des récepteurs spécifiques, ils possèdent un large spectre d'action et les micro-organismes cibles ne développent que peu de résistance. (Travkova *et al.*, 2017 ; Ageitos *et al.*, 2017)

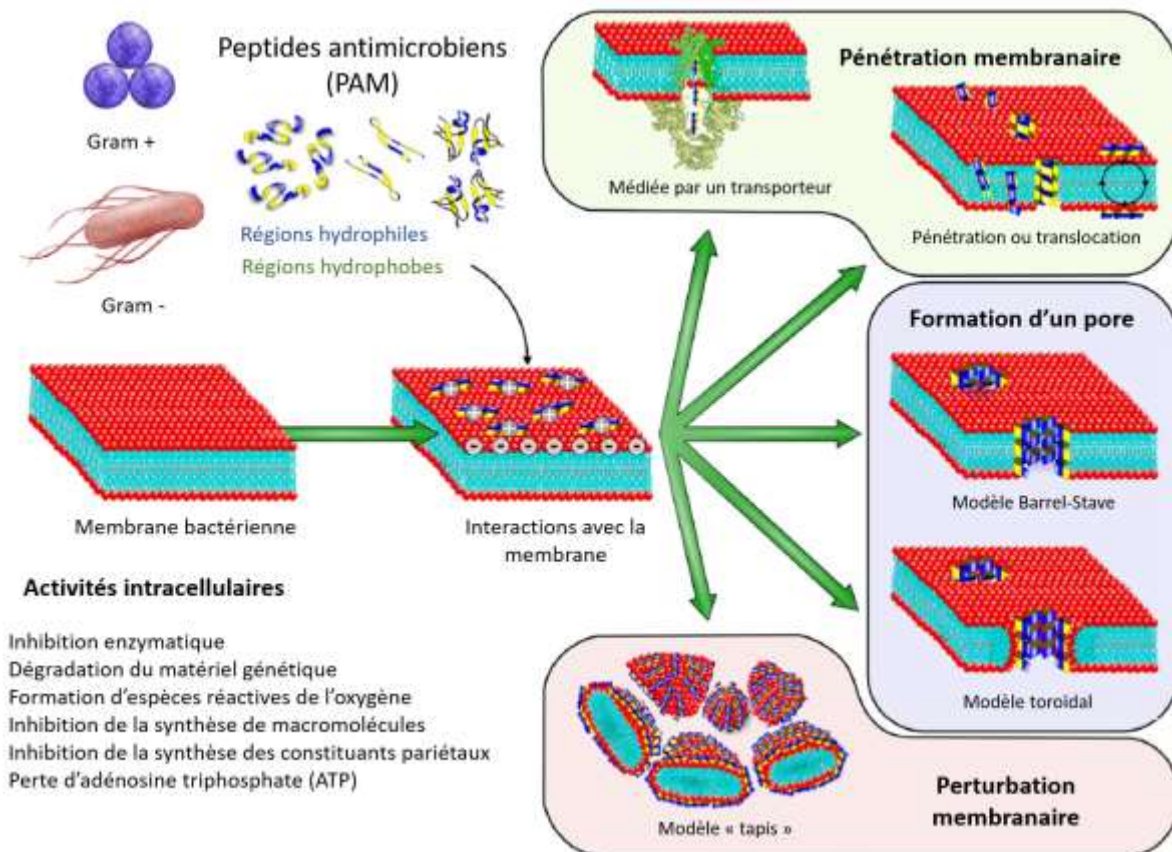


Figure 12 : Schéma des différents modes d'action des PAM (d'après Ageitos *et al.*, 2017)

Un des problèmes majeur engendré par ce type de mécanisme réside dans les effets potentiellement néfastes des peptides sur les membranes des cellules de l'hôte. Cependant, comme expliqué précédemment, les PAM sont stockés à l'intérieur de granules sous forme inactive (propeptides), ce qui réduit la possibilité de destruction des membranes cellulaires de l'hôte (Gallo *et Hooper*, 2012). De plus, la plupart des PAM ont une affinité bien supérieure pour les cellules microbiennes que pour les cellules de l'hôte. Toutefois, ce n'est pas le cas pour certains PAM comme, par exemple, LL-37 (Travkova *et al.*, 2017).

Récemment, des mécanismes n'impliquant pas la destruction de la membrane microbienne ont été suspectés pour certains PAM, autres que les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines. Ces PAM seraient capables soit d'inhiber les voies de signalisation intracellulaires (menant à l'apoptose cellulaire), soit d'entrer dans les cellules et d'interagir avec des cibles intracellulaires. D'autres modes d'action des PAM restent, vraisemblablement, à découvrir. (Zhu *et al.*, 2017)

#### 4. De nombreux rôles secondaires

Récemment, en plus de leur rôle antimicrobien, un rôle d'activateur du système immunitaire adaptatif a été démontré en médecine humaine.

Les  $\beta$ -défensines et les cathélicidines, à des concentrations nanomoléculaires, ont des propriétés chimiotactiques pour les leucocytes. Les leucocytes sont attirés jusqu'au site de l'infection grâce à un gradient différentiel de PAM. Les  $\beta$ -défensines humaines et LL-37 sont chimiotactiques pour les monocytes, les lymphocytes T naïfs et les cellules dendritiques immatures. De plus, hBD2 et hBD3 ont la possibilité d'attirer les cellules dendritiques immatures et les lymphocytes T mémoires grâce au récepteur de chimiokines CCR6 et les monocytes grâce au récepteur CCR2 (Schauber *et* Gallo, 2007 ; Gallo *et* Hooper, 2012 ; Leonard *et al.*, 2012b).

Des études concernant des propriétés chimiotactiques des  $\beta$ -défensines et des cathélicidines, canines et félines, seraient nécessaires.

De plus, les PAM possèdent un rôle dans la formation de la barrière cutanée. LL-37 induit la prolifération, la migration et la différenciation des kératinocytes, ce qui laisse, également, entrevoir un rôle important des PAM dans la cicatrisation cutanée (Schauber *et* Gallo, 2007 ; Niyonsaba *et al.*, 2017). En outre, hBD3 et LL-37 ont une influence sur les jonctions serrées des couches granuleuses et cornée de l'épiderme, suggérant un rôle important dans l'homéostasie cutanée (Niyonsaba *et al.*, 2017).

A des concentrations inférieures à celles nécessaires pour leur propriété antimicrobienne, les  $\beta$ -défensines humaines et la cathélicidine LL-37 induisent la libération de chimiokines et de cytokines par les kératinocytes, comme décrit dans la figure 13 (Schauber *et* Gallo, 2007).

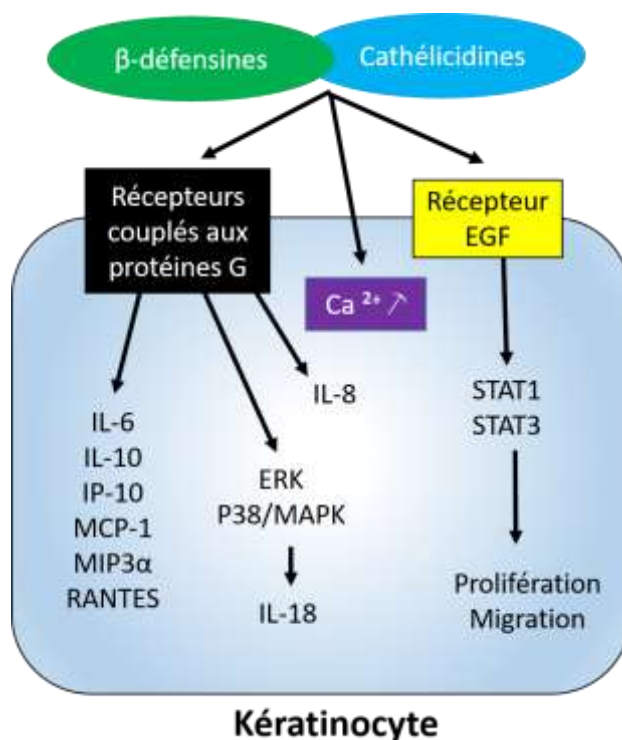


Figure 13 : Modèle schématique de la libération de cytokines et de chimiokines induites par les PAM des kératinocytes humains (d'après Schauber *et* Gallo, 2007)

En dernier lieu, certains PAM sont capables d'influer sur le statut inflammatoire cutané. Ainsi, LL-37 peut être pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. L'activité pro-inflammatoire de LL-37 inclut la diminution de l'expression des interleukines (IL) 10, l'augmentation de celle de l'IL-1 $\beta$ , l'IL-12p40 et l'IL-18, la production d'interférons (IFN) de type I, la dégranulation des mastocytes et la libération de facteurs de l'inflammation. A l'inverse, LL-37 peut inhiber la production d'IFN- $\gamma$ , d'IL4, d'IL12 et de facteur de nécrose tumorale-  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Gallo *et Hooper*, 2012 ; Niyonsaba *et al.*, 2017).

En définitive, malgré leur importance, il n'existe que peu d'études sur les PAM du chien et du chat.

### III. Une barrière immunitaire

Pendant longtemps, l'immunité adaptative a été considérée comme la plus efficace contre les pathogènes fongiques. Néanmoins, il est prouvé que les deux systèmes immunitaires (adaptatif et inné) contribuent à protéger l'individu. Le système immunitaire ne possède pas une réponse unique à un pathogène fongique : elle est adaptée au pathogène (genre, espèce, morphotype), à l'hôte (âge, statut immunitaire, facteurs génétiques) et au site d'infection.

Le système immunitaire cutané est composé de cellules résidentes et de cellules migrantes. L'épiderme contient des cellules dendritiques et des lymphocytes intra-épidermiques. Le derme contient des lymphocytes T (LT), des cellules dendritiques, des cellules Natural Killer (NK), des mastocytes et des histiocytes. Il contient également des capillaires qui sont le point d'entrée des leucocytes dans le derme. (Williams, 2012)

#### A. La reconnaissance des champignons pathogènes : un point clé dans l'immunité cutanée

##### 1. Reconnaissance via les PRR

Les champignons sont reconnus par l'hôte via des PRR (*Pattern-Recognition Receptors*), qui sont des récepteurs présents au niveau des membranes des cellules de l'immunité innée (notamment les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les cellules épithéliales). Les PRR reconnaissent des PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Pattern*), qui sont présents sur les champignons. Les PAMP regroupent, majoritairement, des composants de la paroi fongique : la chitine, les  $\alpha$ - et  $\beta$ -glycanes et les mannanes, mais aussi des composants intracellulaires, tels que l'ADN fongique dans certains cas particuliers. Les polysaccharides internes de la paroi fongique sont les plus conservés au sein du règne fongique et permettent d'initier une réponse immune effective, alors que les glycanes externes de la paroi fongique sont souvent responsables d'un échappement à la réponse immune. (Brown, 2011 ; Verma *et al.*, 2015 ; Snarr *et al.*, 2017)

Outre cette reconnaissance directe via des récepteurs membranaires, il existe une voie indirecte. En effet, les phagocytes peuvent reconnaître les organismes fongiques en sécrétant des PRR solubles qui les recouvrent (opsonisation) et la reconnaissance se fait alors via des récepteurs opsoniques. (Brown, 2011)

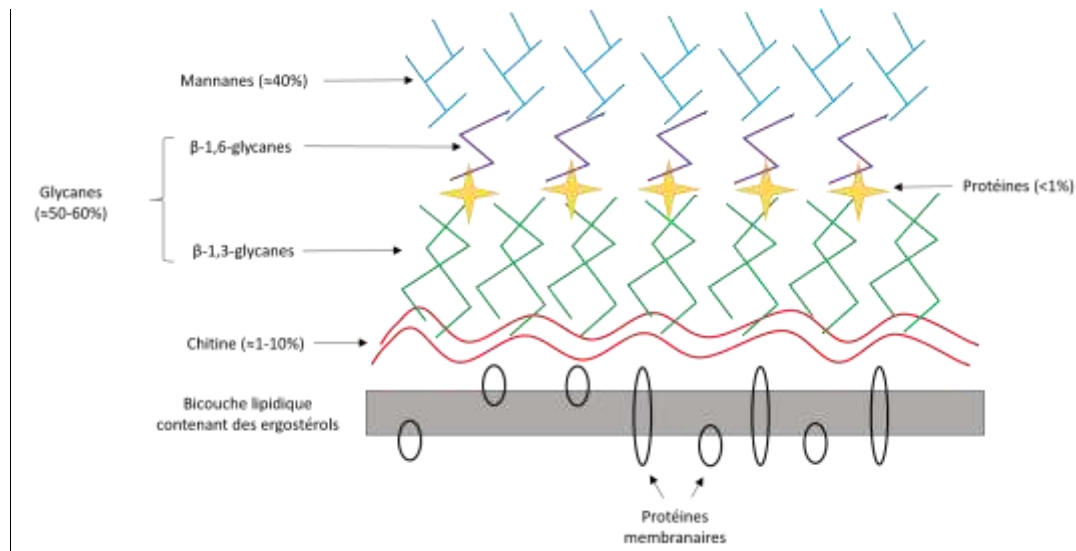


Figure 14 : Modèle de la structure de la paroi fongique (d'après Williams, 2012)

Il existe deux catégories principales de PRR : les TLR (*Toll-Like Receptors*) et les CLR (*C-Type Lectins Receptors*). Leur rôle est rendu complexe par le changement possible de composition de la paroi fongique durant la croissance et le cycle sexuel des champignons. Par exemple, *C. albicans* est capable de changer de morphologie entre une forme filamenteuse et une forme levure, ce qui lui permet de ne pas être reconnu par le système immunitaire et concourt ainsi à sa virulence. (Brown, 2011 ; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2012 ; Verma *et al.*, 2015)

Historiquement, les TLR sont les premiers récepteurs à avoir été identifiés. Il en existe 5 types différents et les plus impliqués dans la reconnaissance des champignons pathogènes sont les TLR2, 4 et 9. La reconnaissance des pathogènes par les TLR induit une cascade de signaux intracellulaires, médiée par la protéine MyD88, qui aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires, TNF et IL-1 $\beta$ , et à la différenciation des lymphocytes, en LTh1 ou en LTh2. (Brown, 2011 ; Williams, 2012 ; Verma *et al.*, 2015)

Le CLR le plus étudié est la Dectine-1. Cette dernière reconnaît le  $\beta$ -1,3-glycane de la paroi fongique. Elle influence l'immunité innée et adaptative, et induit la différenciation des lymphocytes en LTh1 ou LTh17. La différenciation en LTh17 est favorisée par l'interaction de la Dectine-1 avec le TLR2 via la production d'IL-6 et d'IL-23. De plus, la Dectine-1 permet la production de pro-IL-1 $\beta$ , d'IL-6, d'IL-10, d'IL-23 et de TNF- $\alpha$ . Certains champignons ont développé un mécanisme qui leur permet de masquer leur  $\beta$ -1,3-glycane et, ainsi, de limiter leur détection par les cellules immunes. (Brown, 2011 ; Leibundgut-Landmann *et al.*, 2012 ; Verma *et al.*, 2015)

Bien que les TLR et la Dectine-1 soient impliqués dans la reconnaissance de la majorité des champignons, il reste évident que certains récepteurs sont spécialisés dans la reconnaissance d'un genre ou même d'une espèce spécifique de pathogène. Par exemple, le CLR Mincle est spécialisé dans la reconnaissance des espèces de *Malassezia*. De plus, les pathogènes fongiques peuvent être reconnus par plusieurs types de récepteurs différents sur des cellules immunes différentes, n'entraînant pas exactement la même réponse immunitaire. Enfin, les PRR seraient aussi capables d'interagir les uns avec les autres. Le rôle de ces récepteurs reste insuffisamment étudié ou étudié pour un nombre limité d'organismes fongiques. (Brown, 2011)

Les organismes fongiques développent de multiples stratégies afin d'empêcher leur reconnaissance par les cellules de l'immunité. Le mécanisme le plus souvent utilisé est la dissimulation des PAMP. Par exemple, *Cryptococcus neoformans* possède une capsule formée de polysaccharides qui recouvre les composants de sa paroi, empêchant la reconnaissance des constituants de sa paroi par les cellules de l'hôte. D'autres pathogènes utilisent des composants ou possèdent des morphologies qui ne sont pas reconnus par les PRR. Par exemple, l'hyphe de *Candida albicans* ne possède pas de  $\beta$ -glycane, contrairement à la levure. (Brown, 2011 ; Williams, 2012)

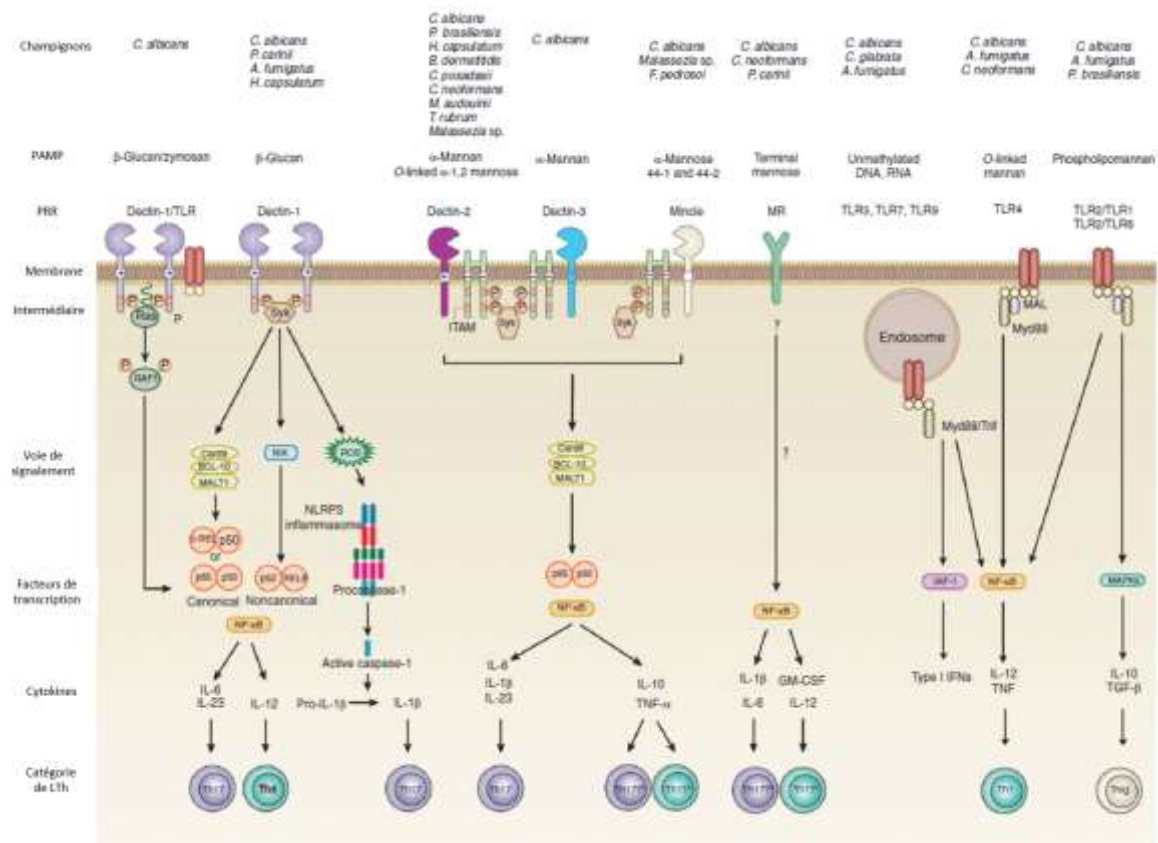


Figure 15 : PRR et voies de signalisation aboutissant à la différenciation des LTh (d'après Verma *et al.*, 2015)

## 2. Les cellules dendritiques : un lien entre immunité innée et adaptative

Les cellules dendritiques sont à l'intersection entre immunité innée et immunité adaptative. Lorsqu'elles rencontrent un antigène fongique, les cellules dendritiques peuvent amplifier l'immunité innée via la sécrétion de cytokines, qui recrutent et activent d'autres cellules immunitaires. Elles sont, également, capables de capter l'antigène, de le phagocyter et de le préparer afin de le présenter aux cellules T CD4+ naïves grâce aux complexes d'histocompatibilité majeure (CMH), initiant ainsi l'immunité adaptative. Les cellules T naïves spécifiques se différencient en lymphocytes T effecteurs (LT eff) ou régulateurs (LT reg) et permettent la distinction entre les réponses immunes Th1, Th2 et Th17. (Miller *et al.*, 2013a ; Verma *et al.*, 2015)

Les cellules de Langerhans (CL) sont localisées dans l'épiderme profond (couche épineuse), où elles ont un rôle de sentinelles et sont capables d'auto-régénération. Elles forment une sous-population de cellules dendritiques et sont les principales cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les cellules de Langerhans interagissent avec les kératinocytes et forment un réseau qui couvre la totalité de la surface corporelle. Elles expriment à leur surface un CLR : la CD207, ainsi que d'autres molécules : CMH I, CMH II et CD1. Après la phagocytose des antigènes, les CL migrent vers les nœuds lymphatiques drainant la peau où elles interagissent avec les LT et initient la réponse immune adaptative. Par exemple, la réponse immune Th17 nécessite l'intervention des CL, via la production d'IL-6, d'IL-1 $\beta$  et d'IL-23. (Williams, 2012 ; Tay *et al.*, 2013 ; Verma *et al.*, 2015)

D'autres cellules présentatrices d'antigènes sont localisées dans le derme : les cellules dendritiques myéloïdes, les cellules dendritiques plasmacytoïdes et les macrophages. Lors d'inflammation, elles sont rapidement mobilisées et migrent vers les nœuds lymphatiques drainant la peau en seulement 48 heures contre 4 jours pour les CL. (Williams, 2012 ; Tay *et al.*, 2013)

## **B. Immunité innée**

L'immunité innée cutanée comprend : une barrière physique épidermique, des substances protectrices telles que des enzymes et des PAM, des protéines solubles (le complément notamment) et une action des cellules phagocytaires.

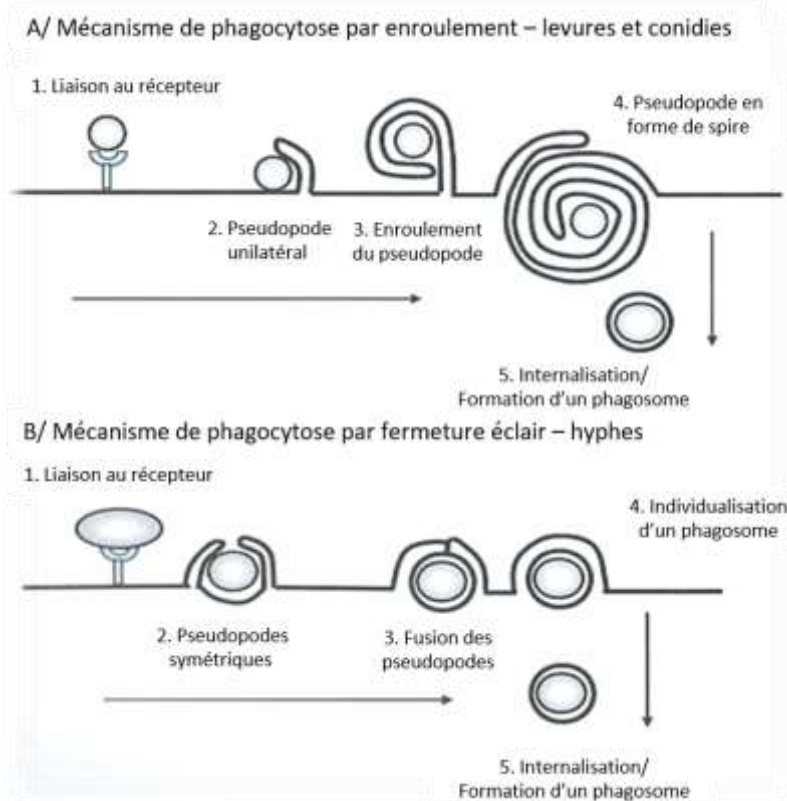
### **1. Une barrière physique et des substances protectrices**

La fonction protectrice de la peau réside, principalement, au niveau de la couche cornée de l'épiderme mais pas seulement. Il faut aussi considérer la barrière chimique composée par les lipides épidermiques et sébacés, les PAM et les différentes enzymes fongicides.

### **2. Action des cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles, éosinophiles, monocytes)**

Suite à la reconnaissance des pathogènes fongiques, ces derniers sont internalisés par les phagocytes, via un processus dépendant de l'actine, selon deux modalités. Les levures et les conidies sont phagocytées par un mécanisme dit « d'enroulement », alors que les hyphes sont phagocytés par un mécanisme dit de « fermeture éclair » (décrits dans la figure 16). Une vésicule intracellulaire, appelée phagosome et contenant le pathogène, est ainsi formée. Ce mécanisme d'internalisation dépend de nombreux facteurs : le type de cellule immunitaire, la présence ou non d'opsonines, la composition pariétale du pathogène et sa forme morphologique. Il est important de considérer le fait que la phagocytose est plus efficace en présence d'opsonines, mais elle est, aussi, permise par des récepteurs non opsoniques. En effet, il est démontré que les TLR influencent la phagocytose. (Brown, 2011)





**Figure 16 : Modèles de phagocytose des pathogènes fongiques suivant leur morphotype (d'après Williams, 2012)**

Suite à l'internalisation de l'agent pathogène, le phagosome subit un processus de maturation qui aboutit à la formation d'un phagolysosome, c'est-à-dire un compartiment avec des propriétés antimicrobiennes dans lequel le pathogène est tué et digéré. La maturation comprend une étape d'acidification et la mise en place de mécanismes fongicides oxydatifs et nonoxydatifs. Ces mécanismes sont contrôlés par des cytokines qui peuvent soit les augmenter (IFN- $\gamma$ ) soit les diminuer (IL-10). Les mécanismes oxydatifs consistent en la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, qui possèdent des propriétés fongicides, ainsi qu'en l'activation de protéases antifongiques. Les mécanismes non oxydatifs, mis en place par les cellules phagocytaires et en particulier les neutrophiles, sont de 3 types : la production de PAM, la production d'hydrolases et la limitation de l'accès aux nutriments par les pathogènes (notamment la séquestration de fer et de zinc). (Brown, 2011 ; Hamad, 2011)

Les neutrophiles sont également capables de détruire les pathogènes fongiques de manière singulière grâce au système de NET (*Neutrophil Extracellular Traps*). Il s'agit de brins d'ADN, d'histones et de granules contenant des protéines, extériorisés par les neutrophiles constituant un piège pour les pathogènes qui sont ensuite phagocytés. Ce mécanisme permet notamment la destruction de *C. albicans*, tant sous sa forme d'hyphe que de levure. (Brown, 2011 ; Hamad, 2011)

Des mécanismes d'échappement sont de nouveau mis en place par les pathogènes, qui peuvent soit inhiber la maturation du phagosome, soit s'échapper de ce dernier, soit résister à ses propriétés antimicrobiennes (production d'enzymes anti-oxydantes ou mise en

place de mécanismes protecteurs). Par exemple, *C. neoformans* produit de la mélanine et du mannitol, qui permettent de moduler la réponse immunitaire innée. En effet, la mélanine interagit avec les radicaux libres produits lors des mécanismes oxydatifs, neutralise les défensines et rend l'endocytose de *C. neoformans* moins efficace. Le mannitol interagit, lui aussi, avec les radicaux libres. De plus, certains organismes fongiques ciblent des cellules ou des récepteurs qui sont dits permissifs. (Brown, 2011 ; Hamad, 2011 ; Williams, 2012)

L'interaction des pathogènes avec les PRR des phagocytes présente un rôle clé dans l'induction d'une immunité adaptative, en induisant la sécrétion de cytokines et de chimiokines, qui présentent soit un profil pro-inflammatoire et mènent à une réponse de type Th1 ou Th17, soit un profil anti-inflammatoire et une réponse de type Th2 est initiée. (Brown, 2011)

### 3. Action du complément

Il existe trois voies d'activation du complément : la voie classique, la voie alternative et la voie des lectines. Elles mènent toutes au clivage de la convertase C3 en C3a et C3b. C3a permet le recrutement des cellules inflammatoires (notamment des neutrophiles) et agit comme une anaphylatoxine. C3b peut induire la formation d'un complexe protéique, appelé Complexe d'Attaque Membranaire (CAM). Le CAM forme un pore dans la membrane fongique induisant une lyse osmotique et la mort du pathogène. (Williams, 2012 ; Miller *et al.*, 2013a)

Le complément possède d'autres fonctions, que la formation d'un CAM, permettant la protection contre les pathogènes fongiques. Les facteurs du complément, en particulier C3b, permettent l'opsonisation des cellules fongiques et ainsi l'activation de la phagocytose par les macrophages. De plus, les facteurs du complément sont impliqués dans la formation d'une réponse immunitaire protectrice de type Th1, via la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-8 et TNF). C3a, C5a et C3b possèdent également des propriétés chimiotactiques, qui permettent le recrutement des cellules immunitaires jusqu'au lieu de l'infection. (Williams, 2012 ; Zipfel *et Skerka*, 2012)

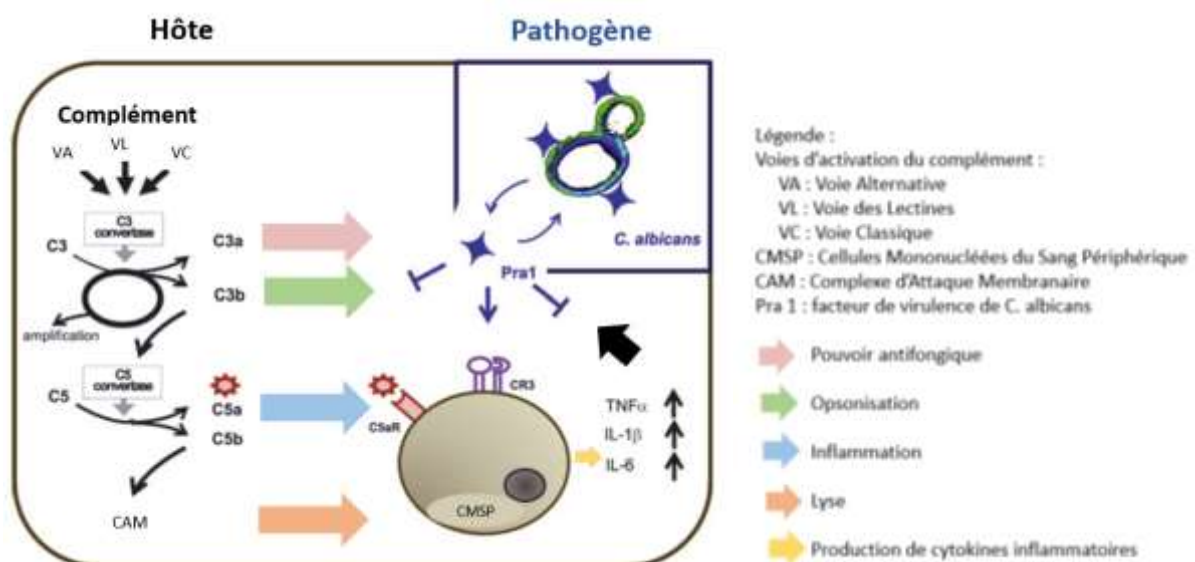


Figure 17 : Mode d'action du complément face à *C. albicans* (d'après Zipfel *et Skerka*, 2012)



Les organismes fongiques utilisent des mécanismes qui modulent l'activation du complément. Par exemple, dans le cas de *C. albicans*, l'antigène Pra 1 peut se lier aux protéines du complément ou interagir avec ses récepteurs exprimés au niveau de la surface des macrophages et des neutrophiles, empêchant l'action du complément. (Brown, 2011 ; Zipfel et Skerka, 2012)

#### 4. Action des cellules lymphoïdes innées, des cellules NKT et des cellules T $\gamma\delta$

Les Cellules Lymphoïdes Innées (CLI) forment une famille de cellules dépourvues de récepteurs spécifiques aux antigènes, découvertes récemment au niveau du derme. Elles sont séparées en 3 catégories selon les cytokines qu'elles produisent et selon leur mode de développement. Les CLI du groupe 1 produisent des IFN- $\gamma$  et sont subdivisées en cellules Natural Killer (NK) et en cellules non cytotoxiques helper like (CLI1). L'importance du rôle des cellules NK, considérant les infections fongiques, est peu connue. Les cellules NK possèdent un pouvoir cytotoxique propre contre les virus (non démontré pour les champignons), via l'expression de perforines et de granzymes. Elles stimulent aussi la phagocytose des pathogènes par les macrophages, via la production d'IFN- $\gamma$ , et la production des cytokines de la voie Th1. Les CLI1 produisent des IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , et d'autres cytokines de la réponse Th1. Les CLI du groupe 2 produisent des IL-4, IL-5 et IL-13 (cytokines de la voie Th2) et celles du groupe 3 des IL-17 et des IL-22 (cytokines de la voie Th17). (Williams, 2012 ; Tay *et al.*, 2013 ; Yang *et al.*, 2017)

Les cellules NKT et les cellules T  $\gamma\delta$ , présentes au niveau du derme, reconnaissent un CMH non classique CD1. Ces deux types de cellules produisent rapidement des cytokines après leur stimulation, notamment les cellules NKT qui produisent des IL-4 et IFN- $\gamma$ , jouant un rôle dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative. (Williams, 2012)

Le rôle de ces cellules reste encore peu exploré de par leur découverte récente.

### C. Immunité adaptative

Alors que l'immunité innée permet une protection effective contre certains pathogènes, parfois une protection complète nécessite aussi l'intervention de l'immunité adaptative, initiée via les cellules dendritiques.

#### 1. Immunité à médiation cellulaire et lymphocytes T (LT)

Les signaux des TLR et des CLR induisent l'expression du CMH II et de cytokines qui permettent la présentation antigénique et ainsi la différenciation des LT. (Leibundgut-Landmann *et al.*, 2012) L'activation complète des LT nécessite deux signaux distincts. Si le second signal n'a pas lieu, les LT ne produisent pas de réponse immunitaire protectrice et l'hôte devient tolérant à l'antigène. Ce stade est alors qualifié d'anergique. (Miller *et al.*, 2013a)

Les cellules de l'immunité adaptative sont, essentiellement, présentes dans le derme. Les lymphocytes sont majoritairement situés au niveau des zones péri vasculaires, ce qui leur permet de migrer, perpétuellement, entre la peau et les nœuds lymphatiques. Chez

l'homme sain, il y a plus de LT CD4+ que de LT CD8+. Au niveau du derme, il y a une prédominance de la lignée Th1/Treg, alors que la lignée Th2 prédomine au niveau de l'épiderme. Les LT qui résident de manière permanente au niveau de la peau sont majoritairement des cellules mémoires qui expriment un CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*). Les lymphocytes T intra épidermiques sont majoritairement des LT CD8+. Ils sont, également, présents dans la gaine des follicules pileux. (Williams, 2012)

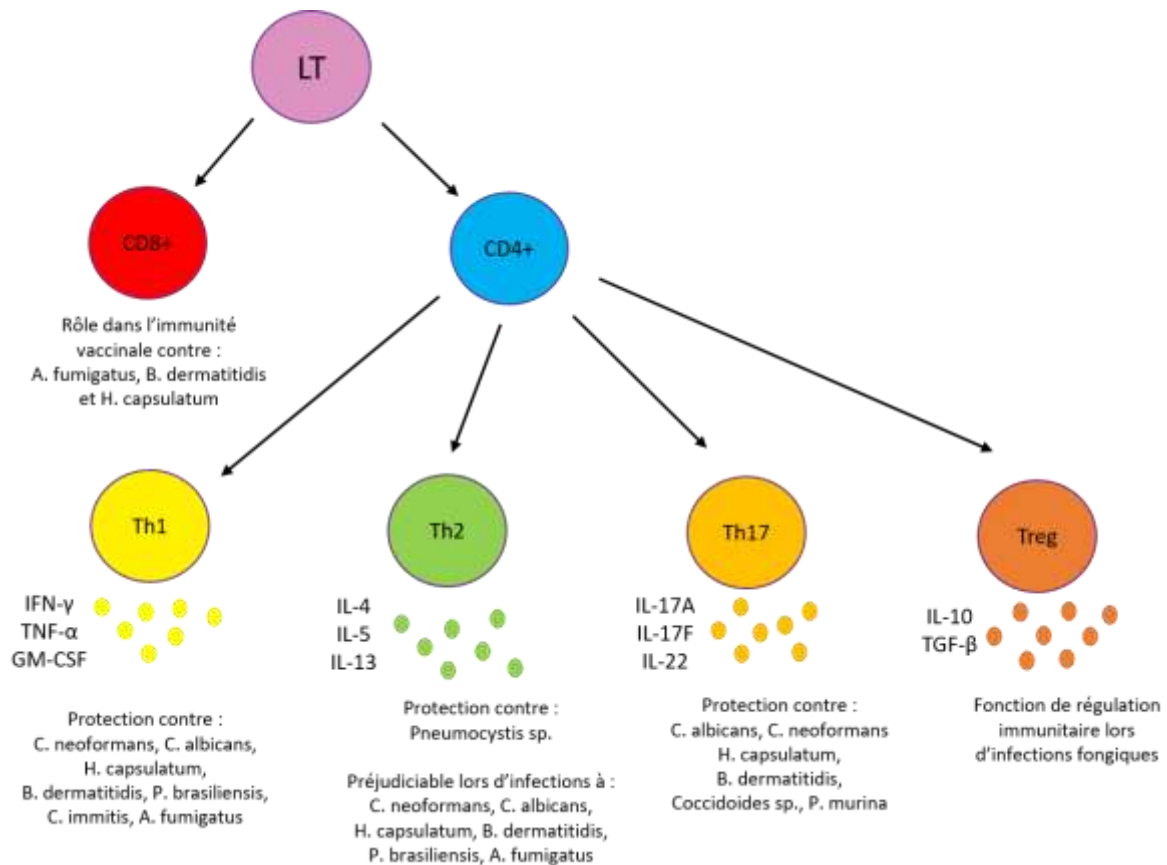


Figure 18 : Les différentes populations de LT et leur rôle antifongique (d'après Verma *et al.*, 2015)

a. LT helper

Il existe, principalement, trois catégories de LTh : les LTh1, les LTh2 et Les LTh17. Les réponses impliquant les LTh1 et les LTh17 sont protectrices face à un agent pathogène fongique, alors que la réponse impliquant les LTh2 est en faveur de l'agent pathogène avec des propriétés anti-inflammatoires.

Les CPA produisent de l'IL-12, qui est à l'origine de la différenciation en LTh1. Ces derniers produisent une réponse antifongique, via la libération de facteurs pro-inflammatoires : IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF et IL-2. L'IFN- $\gamma$  induit l'activation de macrophages, promeut la phagocytose et la présentation d'antigènes par les CPA et permet la formation de lymphocytes T mémoires. Le TNF- $\alpha$  possède des fonctions similaires à l'IFN- $\gamma$  notamment l'activation des macrophages. (Verma *et al.*, 2015) L'IL-2 promeut la différenciation des lymphocytes en LT cytotoxiques.

La différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en LTh17 est médiée par le TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) et IL-6. De plus, l'IL-23 permet la maintenance et l'expression de ce type de cellules immunitaires. Les LTh17 produisent des cytokines : IL-17A, IL-17F et IL-22. Il existe 2 mécanismes différents menant à la destruction des pathogènes fongiques. Lors d'infection systémique, les Th17, grâce à des chimiokines induisent le recrutement de neutrophiles, qui ont notamment un pouvoir candidacide. Lors d'infection mineure, IL-17 stimule la libération de PAM par les kératinocytes. Néanmoins, les cytokines produites par les LTh17 pourraient, également, avoir un rôle pro-inflammatoire, anti-inflammatoire ou un rôle de régulation ; en fonction du pathogène considéré, du site et du stade d'infection et du statut immunitaire de l'hôte. Le rôle de ces LTh17 reste incomplètement compris. (Hamad, 2011 ; Verma *et al.*, 2015)

La réponse Th2 peut être préjudiciable à la destruction des pathogènes fongiques, à cause de la synthèse trop importante des cytokines IL-4, IL-5, IL-13 et les immunoglobulines E (IgE) sécrétées par les lymphocytes B (LB). Les IL-4 et 13 interviennent dans l'activation alternative des macrophages, qui est associée à une croissance non contrôlée des organismes pathogènes. En effet, cette voie alternative d'activation des macrophages fait intervenir des taux faibles d'oxyde nitrique, qui ne permettent pas d'activité fongicide. De plus, IL-4 permet l'accès des champignons à des micronutriments présents dans les macrophages, ainsi que la stimulation d'un récepteur de la transferrine impliquée dans les transferts de fer, ce qui augmenterait la croissance fongique. De plus, des taux élevés d'IL-4 sont associés à une diminution de la production d'IFN- $\gamma$ , qui conduit à la production d'immunoglobulines non protectrices (IgE notamment). Par ailleurs, IL-4 stimule la croissance et la différenciation des LB en plasmocytes et en LB mémoires. Ainsi, contrairement aux réponses Th1 et Th17, la réponse Th2, de par ses capacités anti-inflammatoires, permettrait la persistance du pathogène, mais aussi une certaine mémoire immunologique. (Hamad, 2011 ; Verma *et al.*, 2015)

Néanmoins, cette vision simplifiée des réponses immunitaires ne prend pas en compte la balance subtile entre les réponses Th1, Th2 et Th17, qui doit être mise en œuvre afin d'obtenir une réponse protectrice ou tolérogène, suivant les cas, ni les autres catégories de LTh : les LTh9 et les LTh22. La balance entre inflammation et réponse tolérogène est un processus complexe qui implique des éléments de l'immunité innée et des éléments de l'immunité adaptative supplémentaires. (Hamad, 2011)

#### b. LT régulateur (LTreg)

Afin de limiter les dommages collatéraux, lors de la destruction des organismes pathogènes, une régulation de l'inflammation par les LTreg est nécessaire. Cette catégorie de cellules immunitaires permet d'activer de nombreux mécanismes afin de diminuer l'inflammation : sécrétion d'IL-10, de TGF- $\beta$  et d'IL-35 ; rétention d'IL-2 ; cytolysse des CPA ; synthèse d'une adénosine immunosuppressive ; régulation négative de la fonction des CPA par des molécules cytotoxiques. Les LTreg stimulent également la différenciation des LT CD4<sup>+</sup> en LTh17, et permettraient de promouvoir une immunité antifongique durable. A l'inverse, les LTreg en sécrétant l'IL-10 qui inhibe l'IFN- $\gamma$ , peuvent favoriser les mycoses chroniques. Ces effets pléiotropes dépendent du microenvironnement, des cytokines et du temps. (Williams, 2012 ; Verma *et al.*, 2015)

c. LT effecteur (LTeff)

Les cytokines sécrétées par les LT CD4+ et les macrophages (IFN- $\gamma$  et TNF) attirent sur le lieu de l'inflammation des LT CD8+ cytotoxiques. Ces derniers sont capables de détruire soit des macrophages infectés soit directement des cellules fongiques, via la libération de perforines et de granulysines, présentes dans des granules cytoplasmiques. Les perforines dégradent la membrane cytoplasmique des pathogènes et les granulysines agissent sur les voies d'apoptose cellulaire. (Williams, 2012)

L'action des LT CD8 + dans l'immunité contre les micro-organismes fongiques n'a pas été totalement démontrée. (Verma *et al.*, 2015)

2. Immunité à médiation humorale et lymphocytes B (LB)

L'activation des LB ne nécessite pas de présentation d'antigènes : les LB réagissent directement au contact des antigènes fongiques et sécrètent des immunoglobulines (Ig). Les Ig permettent une protection immune en ciblant les antigènes des parois fongiques : le  $\beta$ -glycane (*A. fumigatus*, *C. albicans*, *C. neoformans*), l'agglutinine (*C. albicans*), le glucuronoxylmannane (*C. neoformans*), la protéine 60 (*H. capsulatum*). Les Ig permettent la protection de l'hôte par des mécanismes classés en 2 groupes : les mécanismes directs et les mécanismes indirects. (Verma *et al.*, 2015)

a. Mécanismes directs

Il s'agit de ceux qui impliquent directement la liaison des Ig aux pathogènes et induisent l'inhibition de leur croissance ou leur destruction. L'activité fongicide de certaines immunoglobulines est démontrée comme décrit dans le tableau IV. (Verma *et al.*, 2015)

**Tableau IV : Fonction protectrice des différentes immunoglobulines contre les infections fongiques (d'après Verma *et al.*, 2015)**

	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Pathogènes considérés	Protection contre <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>P. brasiliensis</i>	Protection contre <i>C. neoformans</i> , <i>C. albicans</i> , <i>H. capsulatum</i> , <i>P. murina</i> , <i>P. brasiliensis</i>	Protection contre <i>C. albicans</i>	Sécrétés lors de réponse Th2 ; action fongicide non caractérisée	Fonction inconnue contre les pathogènes fongiques
Mécanismes	Opsonisation, CCAD, modification de la réponse inflammatoire, activité fongicide directe	Opsonisation, activation du complément, activité fongicide directe	Activité fongicide directe (infection systémique), rôle non complètement élucidé dans les autres cas		

En outre, les anticorps une fois liés aux pathogènes fongiques sont capables d'interférer avec leur métabolisme et d'altérer l'expression de leurs gènes, ce qui permet de supprimer leur virulence. (Verma *et al.*, 2015)

b. Mécanismes indirects

Les mécanismes indirects consistent en la stimulation des cellules immunes effectrices par les Ig. Cela comprend : l'opsonisation, l'activation du complément, la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (CCAD). Cette dernière induit la lyse des cellules qui comportent les anticorps concernés. (Verma *et al.*, 2015)

Les pathogènes fongiques développent des mécanismes afin de ralentir, moduler ou supprimer l'induction de cette réponse immune protectrice. Par exemple, *C. albicans* peut induire la production de cytokines immunosuppressives comme IL-10. (Brown, 2011)



## Partie 2 : ... mais aussi un milieu de vie pour de nombreux micro-organismes fongiques

La peau n'est pas seulement une barrière contre les micro-organismes pathogènes, c'est aussi un écosystème, dynamique et complexe, composé de différentes niches qui accueillent un microbiote divers. Les microbiotes humain, canin et félin consistent en un nombre surprenant de micro-organismes qui vivent en association avec leur hôte. Ces communautés de micro-organismes regroupent des eucaryotes, des archées, des bactéries et des virus. Ces microbes ne sont généralement pas dangereux pour leur hôte et peuvent, même, être bénéfiques. Ils éduquent le système immunitaire de l'hôte, contribuent au déclenchement de l'immunité innée et participent à l'homéostasie cutanée.

Un grand nombre d'études ont montré que le changement de composition du microbiote cutané est souvent associé à des maladies cutanées ; d'où l'hypothèse qu'en agissant sur le microbiote de l'hôte, il soit possible de soigner sa maladie. Gueniche *et al.* (2008) ont mené une étude prospective, en double aveugle, contre placebo, lors de laquelle, ils ont démontré l'effet bénéfique de l'application d'un topique contenant une bactérie non pathogène, *Vitreoscilla filiformis*, sur une cohorte de 75 patients atteints de DA. (Gueniche *et al.*, 2008) Cette bactérie modulerait la réponse du système immunitaire induite par des allergènes, permettant une diminution de l'inflammation, et serait également à l'origine de la sécrétion de PAM. (Volz *et al.*, 2014) Toutefois, la majorité des études, concernant le microbiote cutané fongique, ne sont qu'au stade de sa caractérisation chez des sujets sains et des relations complexes qu'il entretient avec son hôte.

### I. Méthodes d'étude

Historiquement, les études se focalisaient sur une espèce fongique donnée (notamment les *Malassezia* et les dermatophytes) isolée de son milieu et des autres espèces. De ce fait, la croissance de nombreuses espèces fongiques étaient inhibées car le microenvironnement reproduit expérimentalement n'était pas le bon. Par exemple, certaines espèces de *Malassezia* ; dites lipophiles car leur croissance dépend de la présence d'acide gras cutanés, ne pouvaient pas croître en culture.

Les avancées dans le domaine de la génomique et, notamment, du séquençage à haut débit ont permis l'avènement d'un nouveau champ de recherche nommé métagénomique, permettant l'étude de communautés entières de micro-organismes et s'affranchissant des biais des études basées sur la culture. Au lieu d'étudier le génome d'un micro-organisme fongique donné, dont la croissance a été obtenue en laboratoire, l'approche métagénomique consiste en l'étude de l'ensemble des génomes des communautés fongiques, nommé microbiome fongique, prélevées directement à la surface de la peau des sujets. Cette nouvelle approche révolutionne notre compréhension du microbiote et voit l'avènement de la notion d'holobionte ou supra-organisme (Turnbraugh *et al.*, 2007), qui se définit comme une unité biologique contenant à la fois l'hôte et tous les micro-organismes qu'il héberge.

## **A. Méthode historique : la culture fongique**

La culture fongique a longtemps été utilisée pour l'isolement et l'identification des micro-organismes fongiques cutanés. Le prélèvement est réalisé par écouvillonnage ou raclage superficiel, épilation des poils ou, plus rarement, grâce à des biopsies cutanées.

### **1. Milieux et conditions de culture**

Différents types de milieu de culture sont utilisables. Pour une croissance et une identification optimale des micro-organismes fongiques, une batterie de plusieurs milieux est souvent utilisée. Les milieux de culture contiennent des nutriments, peuvent être acidifiés avec un pH entre 3,5 et 5,0 (ajout d'acide hydrochlorique ou phosphorique) et peuvent, aussi, avoir un pouvoir osmotique selon la concentration de glucides qu'ils contiennent. (Kurtzman *et al.*, 2010)

Selon l'objectif de la culture, des milieux avec ou sans cycloheximide et avec ou sans antibiotique sont utilisés. En fait, l'ajout de 0,5 µg/mL de cycloheximide et de 16 µg/mL de chloramphénicol au milieu permet d'inhiber la croissance, respectivement, des moisissures et des bactéries contaminantes. Toutefois, la croissance de certains agents fongiques (notamment *C. neoformans*, *Candida sp.*, *Aspergillus sp.*) étant, partiellement ou complètement, inhibée par le cycloheximide, des milieux qui en sont exempts sont nécessairement inclus dans les études du mycobiote fongique. Il est également possible d'utiliser d'autres antibiotiques que le chloramphénicol, tels que l'association gentamicine-chloramphénicol ou la ciprofloxacine. (Tille, 2014)

L'ensemencement est réalisé en déposant l'échantillon avec précaution, à la surface d'une gélose, en boîte de Pétri ou en tube, dans une enceinte de sécurité biologique, afin de prévenir les infections acquises par voie respiratoire, et sous hotte à flux laminaire, afin de limiter les contaminations. L'ensemble est mis à incuber : à température ambiante (soit 20-25°C) pour les micro-organismes mésophiles ou à 30-37°C pour les autres, avec un taux d'humidité compris entre 40 et 50%, pendant 3 à 4 semaines, et observé quotidiennement. Les colonies qui se développent sont repiquées afin de s'assurer de la pureté de l'agent fongique isolé, qui est ensuite identifié. (Kurtzman *et al.*, 2010 ; Findley *et al.*, 2013 ; Tille, 2014)

### **2. Identification des champignons**

#### **a. Principes généraux pour les champignons filamenteux et les levures**

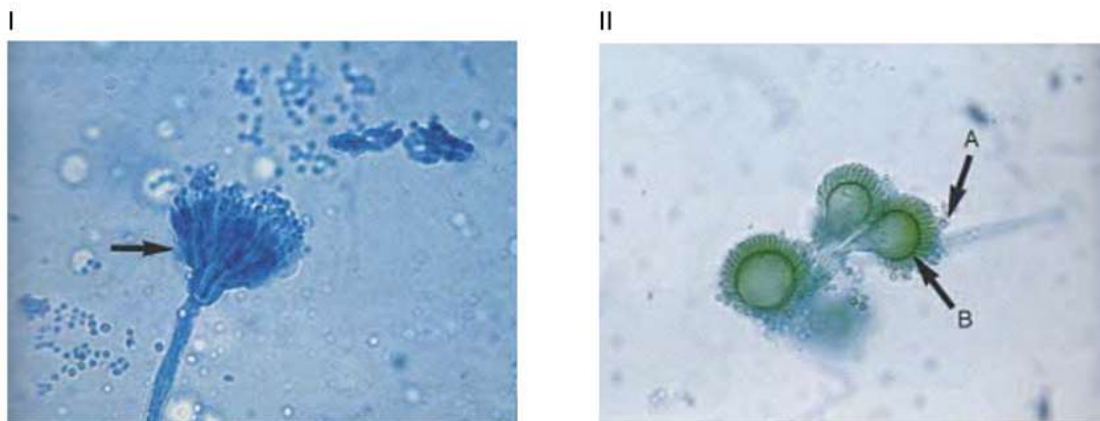
Les champignons filamenteux sont identifiés grâce aux caractéristiques morphologiques des cultures et à leur aspect microscopique, mais aussi grâce à leur taux de croissance.

Le taux de croissance est un paramètre qui peut aider à l'identification, mais qui doit être combiné à d'autres paramètres, car il peut être variable chez certains champignons et dépendre de l'inoculum de départ. On distingue trois catégories : les champignons à croissance rapide (5 jours ou moins), intermédiaire (6 à 10 jours) et lente (11 à 21 jours).



De la même façon, l'aspect macroscopique des colonies est une aide à l'identification, mais peut être variable selon le milieu choisi et les conditions d'incubation. Par exemple, *H. capsulatum*, dont la colonie a un aspect blanc et duveteux en culture sur le milieu BHI Agar (*Brain Heart Infusion*), ressemble à une levure si ce milieu est complété avec du sang. Il convient de considérer plusieurs critères afin de qualifier l'aspect macroscopique des colonies : la couleur (recto et verso des boîtes de Pétri et pigments diffusibles), la topographie (plane, en relief, cratériforme, convexe...), la texture (cotonneuse, glabre, veloutée, granuleuse, laineuse ...) et les marges des colonies (ondulées, lobées, érodées ...). (Kurtzman *et al.*, 2010 ; Tille, 2014)

Dans la plupart des cas, l'identification finale est faite grâce à l'aspect microscopique du champignon. Les préparations sont colorées à l'aide d'une solution de bleu de lactophénol : les éléments fongiques apparaissant bleus, ils sont plus facilement identifiables. La forme de l'appareil végétatif (hyphes septés ou non, largeur) et de l'appareil reproducteur est évaluée. Les critères observés, lors de l'évaluation de l'appareil reproducteur d'un micro-organisme fongique, sont : la forme des conidiophores (absents, simples ou ramifiés), des cellules conidiogènes, des conidies et des organes de fructification. Les spores sont divisées en spores directes (issues de la multiplication asexuée), subdivisées en endospores (spores internes) et en conidies (spores externes), et spores indirectes (issues de la reproduction sexuée). Par exemple, les phialoconidies sont caractéristiques des genres *Aspergillus* et *Penicillium*. (Tille, 2014)



**Figure 19 : Exemple de différentes phialoconidies caractéristiques d'un genre fongique (d'après Tille, 2014)**

**I : Phialoconidies caractéristiques du genre *Penicillium* (la flèche désigne les branches secondaires appelées métules qui portent les phialides)**

**II : Phialoconidies caractéristiques du genre *Aspergillus* (A : conidies, B : conidiophores)**

Les critères à prendre en compte lors de l'identification des levures sont les caractéristiques morphologiques des cultures, leur aspect microscopique (appareil végétatif et reproducteur) et le résultat de tests spécifiques. L'aspect macroscopique des cultures est évalué à l'aide des mêmes critères que les champignons filamenteux.

L'identification des levures par leur aspect microscopique est possible grâce à l'évaluation de la forme des cellules, la présence ou non d'une capsule, la formation de tubes germinatifs et la caractérisation des hyphes, des pseudohyphes, des spores indirectes (rarement observées) et des conidies. Par exemple, les cellules en forme de « bouteilles » sont identifiées comme des *Malassezia*. Les tubes germinatifs sont des structures qui sont

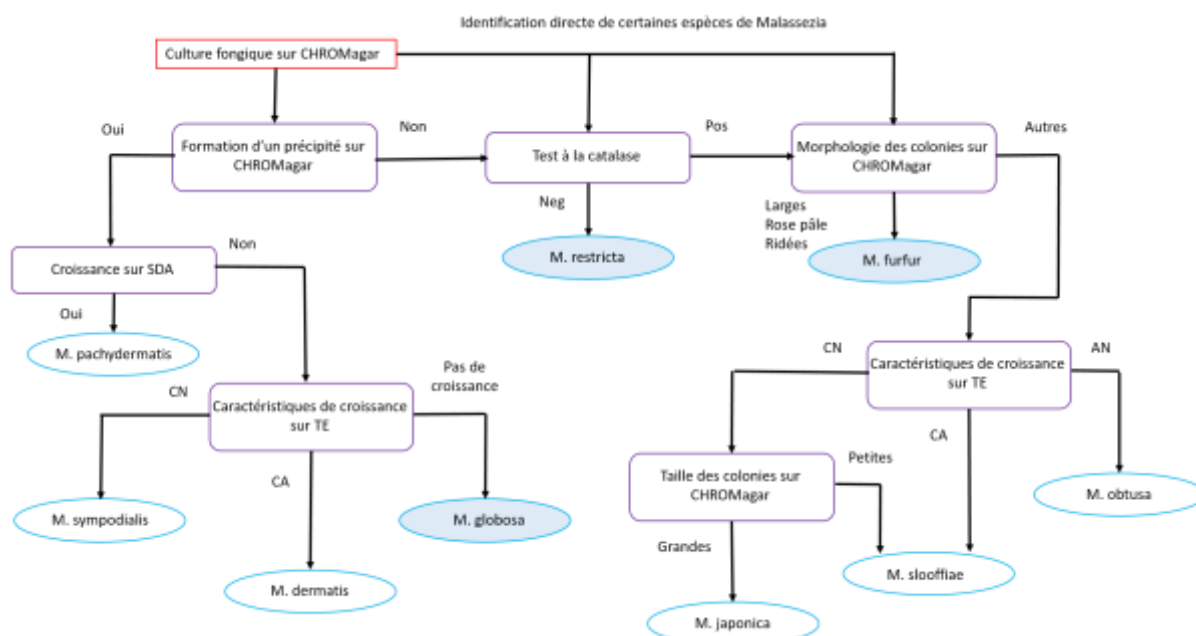
caractéristiques des espèces *Candida albicans* et *Candida dubliniensis*. Par contre, cette caractéristique a une fiabilité limitée car les tubes germinatifs peuvent être confondus avec des pseudohyphes et leur formation dépend de nombreux facteurs (température, inoculum, milieu de culture, souche fongique). Des pseudohyphes sont formés lorsque les cellules filles fongiques obtenues par bourgeonnement ne sont pas séparées de la cellule mère formant, ainsi, une chaîne de cellules fongiques. Ils peuvent être difficilement différenciables des hyphes. La reproduction asexuée des levures peut se faire par bourgeonnement, donnant naissance à des blastoconidies (caractéristiques de *Cryptococcus*), ou par fission, donnant naissance à des arthroconidies (caractéristiques des dermatophytes).

Le principe des tests physiologiques repose sur la fermentation des glucides, l'assimilation de sources de carbone ou d'azote par les levures, la pousse à diverses températures (notamment à 37°C), la croissance sur des milieux contenant une concentration élevée en sucres ou en chlorure de sodium, le test de l'hydrolyse de l'urée et la sensibilité à plusieurs antifongiques. (Kurtzman *et al.*, 2010 ; Tille, 2014)

b. Application aux espèces de *Malassezia*

L'exemple de *Malassezia* est intéressant car cette levure possède des propriétés spécifiques en culture, qui permettent de différencier les différentes espèces.

L'équipe de Kaneko *et al.* (2007) a mis en place une méthode d'identification de 9 espèces de *Malassezia*, basée sur la culture fongique. Dans un premier temps, la morphologie des colonies est observée sur le milieu spécifique CHROMagar *Malassezia*. La production de précipités, la taille et la couleur des colonies sont notées et permettent de différencier *M. furfur* des autres espèces de *Malassezia*. Ensuite, la dépendance lipidique des *Malassezia* est évaluée grâce à l'utilisation d'un milieu SDA (*Sabouraud's Dextrose Agar*), qui ne contient donc pas de lipide : seule *M. pachydermatis* est capable de croître sur un tel milieu. L'assimilation du créomophore et du Tween 60 est évaluée et un test d'hydrolyse de l'esculine (l'hydrolyse de l'esculine produit du glucose et de l'esculétine qui en présence de fer III forme un précipité noir) est réalisé. Le test à la catalase est également utilisé, *M. restricta* étant la seule espèce avec un résultat négatif. Le dernier critère d'importance est la croissance à 40°C. A l'exception de *M. yamatoensis*, les espèces de *Malassezia* sont identifiées grâce à la combinaison des tests précédents (voir figure 20). (Kaneko *et al.*, 2007 ; Kurtzman *et al.*, 2010)



**Légende :**  
 TE = milieu gélosé enrichi en Tween 60 et en Esculine ; SDA = gélose de Sabouraud Dextrose.  
 Pos = positif ; Neg = négatif ; CN = Croissance et formation d'un précipité Noir ; CA = Croissance et Absence de formation d'un précipité noir ; AN = Absence de croissance mais formation d'un précipité Noir .

**Figure 20 : Méthode d'identification de 9 espèces de *Malassezia* proposée par l'équipe de Kaneko *et al.* (2007)**

La sensibilité et la spécificité de cette méthode d'identification sont indiquées dans le tableau V. Elle est validée notamment pour trois espèces de *Malassezia* ayant une importance médicale chez l'homme à savoir *M. furfur*, *M. globosa* et *M. restricta*, avec un taux de concordance avec l'analyse moléculaire de 98,1 %. En effet, il faut noter que certaines souches ont un comportement atypique et ne sont pas identifiables par cette méthode. De plus, les espèces *M. nana*, *M. yamatoensis* et *M. equi*, de découverte récente, ne sont pas incluses. (Kaneko *et al.*, 2007)

**Tableau V : Sensibilité et spécificité de la méthode d'identification des espèces de *Malassezia* de Kaneko *et al.* (2007)**

Espèces de <i>Malassezia</i>	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
<i>M. pachydermatis</i>	95.4	100
<i>M. sympodialis</i>	100	97.7
<i>M. globosa</i>	100	100
<i>M. dermatis</i>	100	71.4
<i>M. furfur</i>	100	100
<i>M. slooffiae</i>	100	97.3
<i>M. obtusa</i>	100	100
<i>M. restricta</i>	100	100
<i>M. japonica</i>	100	100
<i>M. yamatoensis</i>	Non applicable	Non applicable

### 3. Résultats de l'étude du mycobiote

La plupart des études des mycobiotes canins et félins décrivent la prévalence d'organismes potentiellement pathogènes précis, comme les *Malassezia* ou les dermatophytes au niveau des oreilles et de la peau, mais il existe peu d'études basées sur la culture fongique avec un champ large de recherche.

L'étude de Campbell *et al.* (2010) montre que le mycobiote des oreilles de chiens sains, de chiens atteints de dermatite atopique (DA) ou de chiens atteints d'otites se compose, majoritairement, de champignons saprophytes (34%) et de *Malassezia pachydermatis* (17%). Les champignons saprophytes, isolés en culture, appartiennent notamment aux genres *Penicillium* (64%) et *Aspergillus* (19%). Ces derniers sont omniprésents dans l'environnement et pourraient constituer des membres transitoires de la flore cutanée. Une autre étude française (Verneuil *et al.*, 2014) s'intéresse à la conjonctive oculaire et à la zone cutanée adjacente (surface cutanée du canthus médial et du chanfrein) des chiens. Ils ont identifié 14 genres fongiques dont les plus fréquents sont : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus*. *Alternaria* et *Cladosporium* sont des champignons dématés présents dans le sol et les plantes en décomposition ; alors que *Penicillium* et *Aspergillus* sont des moisissures telluriques dont les spores sont fréquemment retrouvées dans l'atmosphère.

Les résultats des études sur le mycobiote cutané félin sont variables. Les genres fongiques le plus souvent retrouvés, par culture fongique, sont *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria* et *Malassezia*. (Meason-Smith *et al.*, 2017) Néanmoins, les genres fongiques saprophytes présents dans la fourrure et sur la peau des chats varient en fonction de leur lieu de vie. Ainsi, les genres les plus communément isolés chez des chats de la côte Est des Etats-Unis sont *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Scopulariosis* et *Chrysosporium* ; alors que ceux isolés chez des chats vivant en Iran sont *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor* et *Cladosporium*. Comme chez les chiens, la plupart de ces agents saprophytes proviennent, probablement, de contaminations à partir de l'environnement. (Khosravi, 1996 ; Boyanowski *et al.*, 2000) L'espèce la plus fréquente de *Malassezia* du mycobiote cutané félin est *Malassezia pachydermatis* (84% des *Malassezia* isolées dans l'étude de Volk *et al.*, 2010) qui peut être associée à d'autres espèces lipodépendantes : *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. nana* ou *M. slooffiae*. *M. pachydermatis* est communément isolée à partir de la peau et du conduit auditif externe des chats, alors que *M. nana* colonise uniquement le conduit auditif externe et *M. sooffiae* la zone périunguéal. La quantité de *Malassezia* serait également dépendante de la race : les Sphynx ont une population de *Malassezia* plus importante sur la peau que les autres races de chat (Devon Rex, Cornish Rex et Européens). (Volk *et al.*, 2010)

Des dermatophytes sont également isolés chez des chats sains. Dans l'étude de Patel *et al.* (2005), entre 2 et 16% des chats étudiés sont porteurs de *Microsporum canis* ou de *Trichophyton mentagrophytes*. Ceci indique que les chats peuvent véhiculer des agents fongiques potentiellement pathogènes pour l'être humain. De plus, *Trichophyton rubrum* (agent principal des dermatophytoses des pieds chez l'homme ou pieds d'athlètes) est également retrouvé dans la fourrure de chats d'intérieur asymptomatiques. (Boyanowski *et al.*, 2000 ; Miller *et al.*, 2013b) En outre, la diversité fongique cutanée de chats infectés par le FIV ou le FeLV est plus importante et le genre *Malassezia* est plus communément isolé en

comparaison de chats sains. Par contre, l'association entre un statut immunitaire déprimé et la colonisation de la peau de ces chats par des agents pathogènes, tels que *C. albicans*, *C. neoformans* ou les dermatophytes, reste sujet à controverse. (Sierra *et al.*, 2000)

Lors de leur étude visant à comparer les méthodes de culture fongique et de séquençage d'amplicons, Findley *et al.* (2013) ont isolé plus de 130 champignons à partir de la peau humaine : 62 *Malassezia*, 25 *Penicillium*, 19 *Aspergillus* et d'autres champignons en moindre quantité (*Alternaria*, *Candida*, *Chaetomium*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhodotorula* et *Trichophyton*). Ainsi, la méthode de culture fongique a permis de montrer que le mycobiote cutané humain est dominé par les *Malassezia* avec, occasionnellement, la présence de *Candida* et d'autres genres tels que *Rhodotorula*, *Debaromyces* et *Cryptococcus*. Concernant les espèces de *Malassezia*, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis* et *M. furfur* sont isolées à partir de la peau humaine. La quantité de *Malassezia* est relativement plus élevée au niveau des sites sébacés (front et cuir chevelu) qu'au niveau des autres sites corporels. *M. globosa* est plus présente au niveau de la tête que du dos alors que *M. sympodialis* a une répartition opposée avec une présence accrue au niveau du dos. (Findley *et al.*, 2013 ; Jo *et al.*, 2017)

#### 4. Avantages et inconvénients de la culture fongique

La culture fongique permet d'étudier les champignons dans leur globalité : leurs caractères morphologiques et physiologiques, ainsi que leurs propriétés biologiques générales. Elle permet, également, de différencier les agents fongiques vivants qui constituent le mycobiote, des organismes morts qui ne croissent pas en culture et ne sont que transitoirement retrouvés au niveau de la peau, ce que ne permettent pas les techniques génomiques seules. (Kurtzman *et al.*, 2010 ; Byrd *et al.*, 2018)

Néanmoins, la culture fongique ne permet pas d'appréhender la diversité et la composition relative des communautés fongiques, car les conditions optimales de culture et les vitesses de croissance sont extrêmement variables entre les différentes espèces fongiques. En fait, la majorité des micro-organismes fongiques (plus de 90%) ne peuvent pas croître dans les conditions expérimentales de laboratoire, menant à une sous-estimation de la diversité fongique. (Noli, 2017) De plus, les espèces fongiques avec des vitesses de croissance rapides ont longtemps été surestimées et celles avec des vitesses de croissance lentes sous-estimées. Par exemple, dans de nombreuses études du mycobiote cutané, l'abondance relative de *M. restricta* est faible alors que celle de *M. sympodialis* est élevée. Or, *M. restricta* a une croissance relativement lente et *M. sympodialis* une croissance relativement rapide. En outre, les résultats obtenus par culture fongique ne sont que peu reproductibles car fortement dépendants de la méthode en elle-même. (Sugita *et al.*, 2010)

L'identification microscopique des champignons est difficile dans certains cas. Par exemple, la visualisation de chlamydospores est, normalement, caractéristique des levures *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* ou *Metschnikowia sp.* ; mais, occasionnellement, dans de vieilles cultures, elle peut refléter la présence d'autres taxons fongiques comme *Trichosporon* ou *Cryptococcus*. De plus, la plupart du temps, seule la reproduction asexuée est observable en culture, rendant l'identification microscopique plus compliquée. (Tille, 2014)

Les tests biochimiques permettant de différencier les micro-organismes fongiques ne sont pas tous standardisés et les résultats dépendent de la technique employée. Par exemple, la méthode de Kaneko *et al.* (2007), qui permet de différencier les espèces de *Malassezia*, n'est pas considérée comme une référence. Certaines équipes de recherche utilisent d'autres méthodes englobant d'autres paramètres tels que la culture sur milieu de Dixon ou Dixon modifié, la pousse à différentes températures ou l'assimilation d'autres Tweens que le Tween 60. (Kaneko *et al.*, 2007 ; Kurzman *et al.*, 2010)

D'autres approches moléculaires sont mises en place afin de combler les lacunes de la culture fongique. Les analyses reposant sur le polymorphisme de la longueur des fragments de restriction complètent cette approche. Néanmoins, ces méthodes génétiques à bas débit ne permettent d'étudier qu'une portion des communautés fongiques et sous-estiment, la plupart du temps, leur diversité. (Jo *et al.*, 2017)

## **B. Apports du séquençage de nouvelle génération**

Le séquençage du microbiome cutané est un véritable challenge du fait de plusieurs de ses caractéristiques. Tout d'abord, la biomasse cutanée est faible, ensuite il existe un risque de contamination élevé (par des microbes provenant de l'environnement mais aussi par l'ADN de l'hôte) et enfin, la peau est composée de plusieurs niches spécifiques hébergeant des microbiotes divers qu'il faut prendre en considération. (Kong *et al.*, 2017)

Le microbiome donnant lieu à de nombreuses études transverses, il est nécessaire d'analyser en amont leur conception. Une standardisation serait souhaitable afin de permettre une reproductibilité et une comparaison entre les différentes études. C'est dans cette optique que le GSC (*Genomic Standards Consortium*) promeut, depuis septembre 2005, des standards et des checklists concernant les études sur le métagénome. Cela concerne aussi bien la conception des études dans leur globalité que l'échantillonnage, le séquençage, les contrôles, les analyses par les *pipeline* bio-informatiques (définis comme les outils permettant le traitement automatique des données au travers d'une chaîne de logiciels et d'algorithmes) ou encore la publication des résultats. (Kong *et al.*, 2017 ; site du GSC)

### **1. Présentation du HMP (*Human Microbiome Project*)**

Le microbiome humain est étudié par de nombreux organismes de recherche internationaux, notamment par le HMP qui regroupe les NIH américains (*National Institutes of Health*). Le HMP se fixe quatre missions : caractériser les communautés de micro-organismes présentes dans les niches écologiques majeures du corps humain, évaluer les répercussions du métabolisme de ces micro-organismes sur l'écologie du corps humain, comprendre les mécanismes à l'origine de la similarité ou au contraire de la différence de microbiotes entre les individus et déterminer le rôle de ces microbiotes dans la mise en place de l'homéostasie ou dans le développement d'une maladie. (Muszer *et al.*, 2015) Afin de réaliser ces objectifs, ce projet comprend deux phases.

La phase initiale HMP1, lancée en 2008 et terminée en 2013, a pour but de caractériser les communautés microbiennes, de plusieurs sites corporels (voies respiratoires hautes, cavité orale, peau, tractus gastro-intestinal et tractus uro-génital), de 300 individus sains. A l'origine, une méthode de séquençage direct de l'ARNr (Acide RiboNucléique

ribosomique) 16S est utilisée, puis la méthode *Shotgun* est mise en œuvre, afin de caractériser la complexité des communautés microbiennes et de définir s'il existe un microbiome central de l'homme sain, c'est-à-dire un microbiome qui serait identique entre tous les individus sains et divergerait en cas de maladie.

La seconde phase de ce projet, nommée iHMP (*integrative Human Microbiome Project*), est la création de bases de données longitudinales, concernant à la fois le microbiome et le génome de l'hôte, à partir de trois études de cohortes différentes. Le premier groupe d'étude s'intéresse aux grossesses et à la naissance des prématurés, le deuxième aux MICI (Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin) et le troisième au diabète de type 2. Chaque groupe d'étude développe de nouvelles méthodes d'analyse statistique et observe les changements du microbiome en cas de dysbiose. (Site du HMP ; Turnbaugh *et al.*, 2007)

Dans les années qui suivent le lancement du HMP, de nombreuses études ont vu le jour afin d'identifier les membres du microbiote dans des conditions physiologiques et pathologiques. La plupart se sont intéressées au microbiote bactérien, mais certaines commencent également à analyser le mycobiote. Cette recherche débute à peine chez nos carnivores domestiques.

## 2. Prélèvement

Il s'agit dans un premier temps de définir une « population d'étude » selon des critères d'exclusion et d'inclusion qui sont propres à chaque étude : espèce, race, âge, sexe, statut médical, zone géographique d'origine... Plus la population d'étude est hétérogène, moins les analyses statistiques pourront être pointues. Ensuite, les commémoratifs sont récupérés, ainsi que l'anamnèse en cas de maladie cutanée. Un critère d'exclusion retrouvé dans la majorité des études, s'intéressant à la relation entre le mycobiote et l'hôte, consiste en l'application d'un topique ou la prise d'un antifongique systémique par le sujet étudié, dans un certain laps de temps avant l'étude. La collecte de ces informations est primordiale pour les analyses qui suivront le séquençage. (Kong *et al.*, 2017, Shankar, 2017)

De nombreux facteurs entraînent une variation du microbiote cutané. Etant donné qu'il est impossible de tous les contrôler, une standardisation de la conception des études semble nécessaire. Par exemple, le lavage de la peau pouvant altérer la communauté microbienne cutanée, la plupart des études stipulent un délai minimum sans lavage avant le prélèvement. (Kong *et al.*, 2017)

Il existe différentes méthodes de prélèvement cutané : l'écouvillonnage, la biopsie, le raclage, superficiel ou profond, et le le prélèvement à l'aide de cellophane adhésive. Chaque méthode possède des avantages et des inconvénients concernant le volume de biomasse récolté, la profondeur du prélèvement et l'inconfort du sujet. (Kong *et al.*, 2017)

La méthode la plus utilisée est l'écouvillonnage car c'est une technique non invasive qui permet un prélèvement correct de la biomasse. L'écouvillon est humidifié à l'aide d'une solution tampon et fermement frotté sur la surface cutanée pendant, approximativement, 30 secondes. La procédure peut être répétée deux fois afin de récolter d'avantage de biomasse. Récemment, des méthodes d'enrichissement microbien ont vu le jour, afin de pallier le manque de biomasse cutanée lors des prélèvements. Il n'existe pas de consensus considérant ces méthodes d'enrichissement. (Feretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017)

Lors du prélèvement, il faut considérer plusieurs facteurs : la localisation de l'échantillon prélevé car le microbiote peut varier en fonction du site corporel et la fréquence de prélèvement. Le fait de répéter le prélèvement dans le temps ou de manière symétrique au niveau du corps pourrait constituer un contrôle interne. Il est important que chaque groupe d'étude standardise sa méthode de prélèvement afin de diminuer les biais. (Kong *et al.*, 2017)

Dans la majorité des études, les échantillons prélevés sont ensuite refroidis, puis congelés à -80°C. (Kong *et al.*, 2017)

### 3. Extraction de l'ADN

Le choix de la méthode d'extraction de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique) tout comme celui de l'échantillonnage est primordial. Les méthodes d'extraction conventionnelles combinent une lyse chimique des cellules (parfois avec l'ajout d'enzymes) et une lyse physique (par la chaleur ou par action mécanique). (Kong *et al.*, 2017)

Le fait que certaines membranes et parois fongiques soient plus sensibles à ces méthodes que d'autres peut constituer un biais. Si la lyse des cellules fongiques n'est pas assez efficace, les champignons les moins sensibles aux méthodes de lyse seront sous-estimés ; au contraire si la lyse est trop intense, cela peut aboutir à la fragmentation de l'ADN des espèces fongiques les plus sensibles. Une fragmentation excessive de l'ADN peut induire des pertes durant la préparation, compromettre la lecture des séquences et réduire la qualité de reconstruction des génomes au cours de la méthode *Shotgun*. (Feretti *et al.*, 2016)

Suite à la lyse des cellules fongiques, l'ADN récolté est purifié via différentes approches, comme la précipitation par des solutés alcooliques ou la liaison à des colonnes par affinité. La méthode de séquençage dicte les caractères que doit avoir l'ADN en termes de taille de fragments, de quantité et de pureté. (Kong *et al.*, 2017)

### 4. Méthodes de séquençage de nouvelle génération

Il existe principalement deux approches de séquençage du mycobiome : le séquençage d'amplicons ciblés et la métagénomique via la méthode *Shotgun*. A la fin du séquençage, des bibliothèques qui regroupent l'ensemble des fragments d'ADN séquencés sont obtenues.



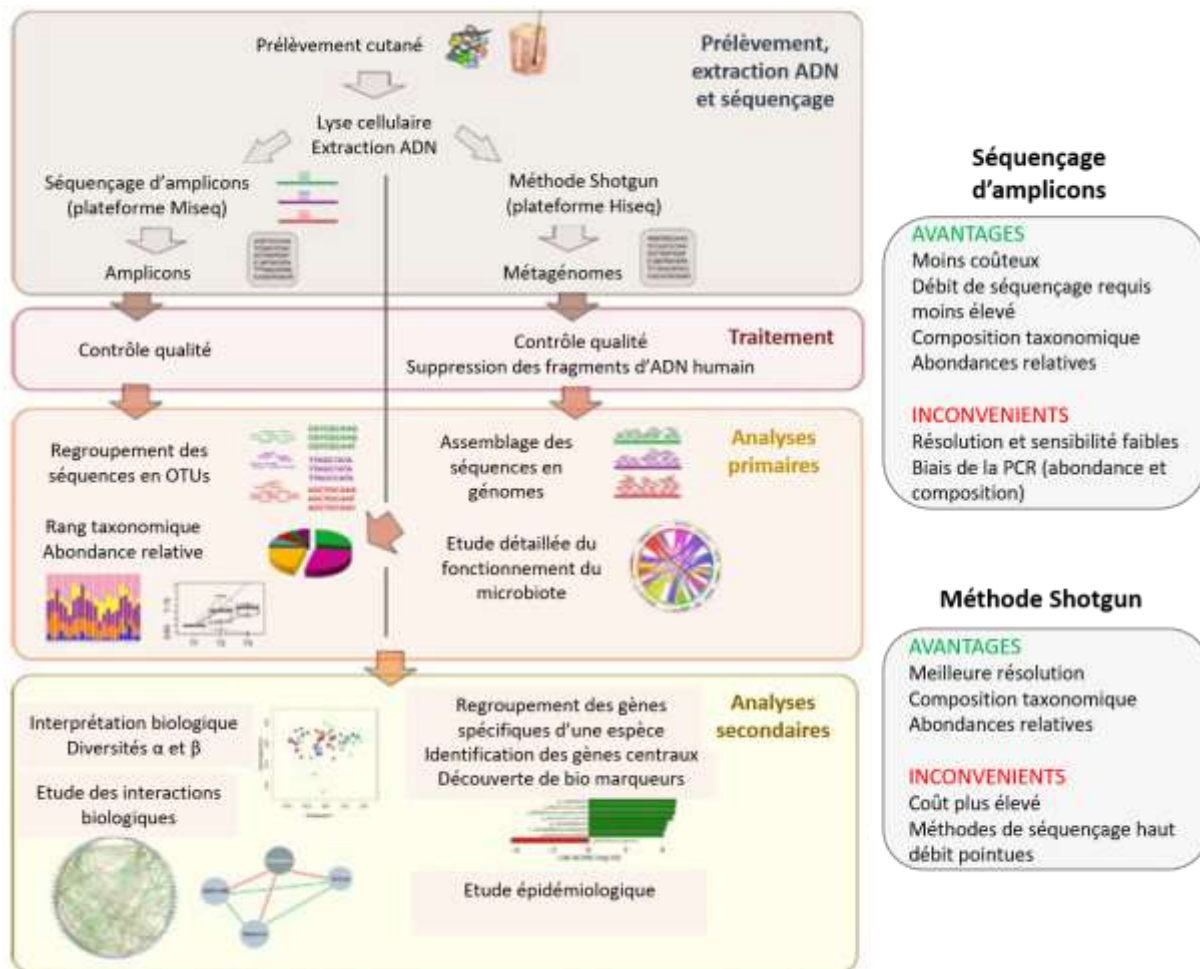


Figure 21 : Schéma des deux approches d'étude possibles du microbiome cutané (d'après Feretti *et al.*, 2016)

a. Séquençage d'amplicons et « métagénomique » ciblée

Lors de cette approche ciblée, des régions spécifiques de l'ADN sont d'abord amplifiées par PCR (*Polymerase Chain Reaction*), puis séquencées. Il s'agit de choisir des régions dont la variation interspécifique excède la variation intraspécifique. Chez les bactéries et les archées, cette approche utilise exclusivement le gène de l'ARNr 16S. Il n'existe pas de consensus aussi tranché concernant les champignons : les gènes des ARNr 18S ou 28S, des régions ITS (*Internal Transcribed Spacer regions*) 1 ou 2 ou encore les gènes d'autres protéines, notamment la grande sous-unité de l'ARN polymérase II (RPB1), sont utilisés. (Conrad *et al.*, 2012 ; Feretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017) Néanmoins, l'amplification par PCR des gènes d'autres protéines que celles des sous-unités des ribosomes fongiques, est moins fiable, limitant de facto l'utilisation de ces régions. (Conrad *et al.*, 2012)

Les gènes de l'ARNr 18S, comme ceux de son homologue, l'ARNr 16S, contiennent des séquences conservées et d'autres domaines hypervariables, qui sont utilisés pour évaluer la composition taxonomique d'une communauté fongique. Les domaines hypervariables sont la cible d'amorces spécifiques conçues à partir des domaines conservés et amplifiés par PCR.

Néanmoins, l'ARNr 18S possède moins de domaines hypervariables que l'ARNr 16S, lui conférant une résolution taxonomique moindre. (Conrad *et al.*, 2012 ; Feretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017)

En fait, pour les études du mycobiome, le locus le plus usité est l'ITS qui se situe entre les gènes des ARNr 18S et 28S. L'ITS est constitué d'une région hypervariable ITS1, d'une région conservée de l'ARNr 5,8S et d'une seconde région variable ITS2. (Diaz *et al.*, 2017) Selon l'étude de Conrad *et al.* (2012), outre RPB1 dont l'amplification est difficile, l'ITS est la région qui possède le pouvoir de discrimination entre les différentes espèces fongiques le plus élevé (0,75 pour les *Ascomycota* et 0,79 pour les *Basidiomycota*). L'ITS apparait donc comme la région la plus indiquée pour le séquençage d'amplicons. Toutefois, les limites de cette région en termes d'identification de certaines espèces fongiques doivent être encore documentées. Par exemple, les genres *Cladosporium*, *Penicillium* et *Fusarium* possèdent des séquences d'ITS similaires et les séquences des ITS au sein du genre *Aspergillus* sont identiques entre certaines espèces, ce qui peut introduire des erreurs dans les études des mycobiomes. Il peut alors paraître nécessaire de coupler les séquençages d'amplicons de plusieurs régions précédemment citées, mais l'étude de Conrad *et al.* (2012) révèle que le gain concernant la discrimination des espèces fongiques reste modéré. La nécessité de ce couplage doit donc être évaluée en fonction de l'objectif de l'étude et des moyens temporels, technologiques et financiers qui lui sont alloués. Il est également important de noter que lorsque des comparaisons quantitatives entre espèces fongiques sont initiées, il faut prendre en compte le fait que le locus de l'ITS est dupliqué entre 100 à 200 fois. (Tang *et al.*, 2015)

Le choix de la région hypervariable, des amorces et du nombre de cycle de PCR est primordial car il influe sur l'analyse de la communauté fongique. Comme expliqué précédemment, certaines régions hypervariables permettent une approche taxonomique plus précise que d'autres. De plus, les amorces ne sont pas universelles et leur choix éclairé conduit inévitablement à l'amplification préférentielle de certaines espèces, biaisant par la suite l'interprétation taxonomique. En outre, plus le nombre de cycles de PCR est important, plus la diversité des séquences obtenues est faible et cela peut conduire à la non détection des taxons fongiques les moins abondants. La plupart des études utilisent environ 30 cycles de PCR afin d'éviter une suramplification. La longueur des amplicons dépend du but initial de l'étude. Plus les amplicons sont longs et plus la résolution taxonomique sera précise, mais il existe une longueur limite intrinsèque à la technique de PCR. (Feretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017 ; Usyk *et al.*, 2017)

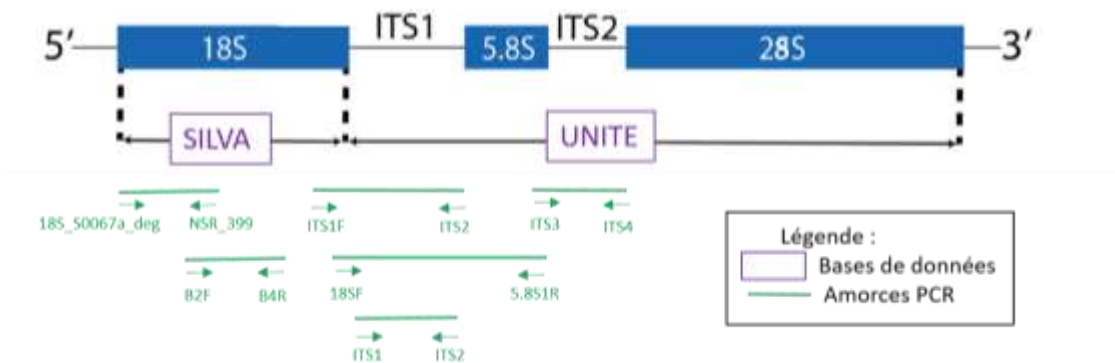


Figure 22 : Diagramme schématisique de l'ITS, avec les amorces de PCR et les bases de données taxonomiques (d'après Diaz *et al.*, 2017 ; Usyk *et al.*, 2017)

Suite à la PCR, les amplicons obtenus sont séquencés et regroupés par similarité de séquence. Le séquençage via les plateformes MiSeq (Illumina) ou Ion Torrent (Life technologies) semble être le plus usité pour ces études du fait de son haut débit de séquençage. Les séquences avec plus de 97% de ressemblance sont considérées comme appartenant aux mêmes micro-organismes ou en tous cas à des organismes très proches génétiquement. Elles sont regroupées en UTO (Unités Taxonomiques Opérationnelles) qui sont à la base de la classification taxonomique et de l'analyse quantitative des données. (Tang *et al.*, 2015 ; Feretti *et al.*, 2016)

b. Méthode *Whole Genome Shotgun* (séquençage aléatoire de l'intégralité du génome) et métagénomique globale

A l'inverse du séquençage d'amplicons, la méthode *Shotgun* permet le séquençage direct de la totalité de l'ADN récolté. Ce dernier est fragmenté en une multitude de fragments qui sont ensuite séquencés. Pour les espèces fongiques déjà identifiées, il s'agit de définir leur souche et leur fonctionnement ; alors que pour les micro-organismes fongiques non encore identifiés, cette méthode permet de définir leurs caractéristiques, leur taxonomie et leur mode de fonctionnement.

Comme la majorité des échantillons contiennent peu d'ADN, ce dernier est amplifié avant le séquençage. Plusieurs méthodes d'amplification de l'ADN existent mais la plus usitée reste la PCR. Une PCR en temps réel (quantitative) peut être réalisée afin d'estimer la contamination de l'échantillon par l'ADN humain, canin ou félin. (Feretti *et al.*, 2016)

Concernant le séquençage, les plateformes Illumina s'avèrent être le standard pour cette méthode. Comme la taille des microbiomes est à priori inconnue, le séquençage est basé sur les études précédentes. Plus le séquençage est précis, plus il sera aisé de reconstruire le génome des micro-organismes fongiques présents en faible abondance et plus il sera aisé de détecter les erreurs d'attribution de bases. (Feretti *et al.*, 2016)

c. Séquençage du métatranscriptome et métatranscriptomique

La métatranscriptomique est l'analyse du transcriptome de l'ensemble des micro-organismes et de l'hôte, c'est-à-dire des ARN issus de la transcription de leurs génomes. Elle permet donc l'étude de l'expression des génomes et du fonctionnement de l'ensemble du microbiote. Outre les difficultés liées aux techniques d'extraction et de purification des ARN, les outils bio-informatiques d'analyse ne sont pas encore disponibles.

Lorsque les analyses de données seront optimisées et standardisées, cette approche des microbiomes pourrait permettre de réelles avancées dans la recherche sur les microbiomes. (D'Argenio, 2018)

## 5. Contrôles et témoins

Lorsque l'on considère une population atteinte d'une maladie cutanée précise, il semble opportun d'étudier en amont ou en parallèle une population dite « saine », regroupant des individus sains ayant les mêmes caractéristiques que la population d'intérêt (en terme de race, d'espèce, d'âge, de sexe...). (Kong *et al.*, 2017)

Comme pour toute étude, des contrôles positifs et négatifs sont mis en place et sont analysés via les plateformes parallèlement aux échantillons d'intérêt. Les contrôles négatifs correspondent à des échantillons qui ne contiennent aucun matériel biologique d'intérêt (la plupart du temps des solutions tampons). Ces contrôles négatifs permettent d'identifier les contaminants lors des étapes de prélèvement, d'extraction de l'ADN et de séquençage, ainsi que les artéfacts d'amplification de la PCR. Les contrôles positifs correspondent à des échantillons dont la composition microbienne est préalablement connue. Ils sont plus compliqués à mettre en place et souvent absents des études sur le mycobiote car il n'existe pas de contrôle positif de référence comme pour les bactéries. Deux types de contrôles positifs sont envisageables : un échantillon contenant soit une souche fongique unique pure, soit des concentrations équimolaires de plusieurs taxons susceptibles d'être retrouvés dans l'échantillon d'intérêt. (Kong *et al.*, 2017 ; Shankar, 2017)

Il existe un contrôle qualité des produits de séquençage pour les études métagénomiques globales et ciblées : les fragments séquencés (appelés lectures) de faible qualité sont supprimés, les fragments qui n'ont été que partiellement séquencés sont également supprimés, ainsi que les lectures identiques et redondantes qui forment des artéfacts. Pour les études métagénomiques de type *Shotgun*, les contrôles impliquent la suppression des lectures d'ADN humain (elles peuvent représenter jusqu'à 90% du total des lectures). L'ADN humain peut être supprimé des échantillons par plusieurs méthodes (DeconSeq, CS-SCORE) ou par alignement des lectures avec le génome humain de référence. (Feretti *et al.*, 2016)

## 6. Méthodes d'analyse

Les méthodes d'analyses, qu'elles fassent suite aux méthodes métagénomiques globales ou ciblées, peuvent être classées en 2 catégories. Les analyses primaires pour le séquençage d'amplicons comprennent les regroupements en UTO et l'attribution d'une taxonomie donnée ; alors que pour la méthode *Shotgun*, il s'agit de reconstruire les génomes, ensuite de leur attribuer une taxonomie et d'étudier le fonctionnement des micro-organismes. Les analyses secondaires regroupent l'utilisation de biomarqueurs, les études statistiques et écologiques. (Feretti *et al.*, 2016)

### a. Analyses primaires

La première donnée obtenue grâce aux moyens informatiques est l'identification des micro-organismes et leur relative abondance. Des études statistiques et des analyses comparatives entre les échantillons sont ensuite systématiquement lancées. (Feretti *et al.*, 2016)

La nomenclature des espèces fongiques rend l'attribution des rangs taxonomiques difficile. En effet, à l'inverse d'autres organismes comme les bactéries par exemple, un organisme fongique dispose de plusieurs noms en fonction de découvertes historiques ou géographiques et des différents stades sexués et asexués. Une homogénéisation de la nomenclature à travers l'initiative *One name one fungus* (un nom pour un champignon) est réalisée afin de supprimer tous les synonymes se reportant au même champignon. (Diaz *et al.*, 2017 ; Usyk *et al.*, 2017)

Concernant la méthode de séquençage des amplicons, la première stratégie de regroupement consiste à comparer les séquences présentes dans l'échantillon d'intérêt avec les séquences d'une base de données de référence afin de former des UTO. En général, un seuil de similarité est fixé à 97%. En examinant les régions hypervariables des séquences, un rang taxonomique leur est attribué par comparaison avec des bases de données de références (GenBank, Findley, UNITE, RTL et THF pour l'ITS et SILVA pour l'ARNr 18S). La résolution taxonomique est limitée au Genre et parfois à l'Espèce.

Il arrive que certaines séquences soient absentes des bases de données. Ces séquences sont alors comparées entre elles et regroupées par similarité : elles forment des *clusters* qui peuvent soit être intégrés aux bases de données soit restés comme tel, définissant des taxons inconnus. Ainsi, dans l'étude de Paulino *et al.* (2006), plus de 95% des séquences des librairies sont regroupées en 2 phylotypes inconnus qui peuvent être reliés phylogénétiquement à *Malassezia furfur* mais avec moins de 97% de similarité.

Suite à cela, des tables d'UTO sont construites et constituent le point de départ des analyses statistiques. Il s'agit de tableaux à double entrée contenant le nombre de séquences par échantillon et par UTO. Il existe également des *pipeline* bio-informatiques, qui à partir des données brutes du séquençage d'ADN effectuent les analyses des mycobiotomes. Les plus usités sont QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) et *Mothur*. (Tang *et al.*, 2015 ; Ferretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017 ; Usyk *et al.*, 2017 ; D'Argenio, 2018)

Récemment, la pertinence biologique du regroupement des lectures en UTO est remise en cause. En effet, cette stratégie de regroupement peut induire un biais car des taxons très proches génétiquement ne seront pas différenciés. Des stratégies de remplacement voient le jour : DADA2 (*Divide Amplicon Denoising Algorithm 2*) est un algorithme en libre accès implémenté dans R qui permet l'attribution d'un rang taxonomique à l'échelle de l'Espèce ; ou UNOISE2, qui est un autre algorithme qui permet le regroupement des lectures en ZOTU (*Zero-Radius Operational Taxonomic Unit*), c'est-à-dire en UTO avec une similarité supérieure à 97%. (D'Argenio, 2018)

Concernant la méthode *Shotgun*, les fragments d'ADN séquencés sont assemblés afin de reconstruire les génomes des micro-organismes fongiques. Il n'existe pas de consensus quant à la meilleure stratégie de construction des génomes. Des stratégies de construction basées sur la comparaison avec des banques génomiques de référence sont utilisées : chaque lecture est alignée sur un modèle de génome de référence. On appelle « profondeur » le nombre moyen de lectures qui se superposent et « recouvrement » l'étalement des lectures sur la zone d'intérêt. Le recouvrement est un facteur essentiel, afin de s'assurer que les génomes obtenus sont représentatifs de l'ensemble des communautés fongiques présentes.

Un assemblage de novo est initié lorsqu'il n'existe aucun génome de référence plausible : les fragments d'ADN chevauchants permettent de reconstruire des contigs, ensuite un processus de *scaffolding* permet de réduire les zones non couvertes des génomes et de relier les contigs entre eux. Cette stratégie de construction très chronophage nécessite des moyens informatiques plus conséquents (nécessité d'algorithmes bio-informatiques performants) et présente le risque de former des contigs chimériques à partir de fragments appartenant à des micro-organismes différents.

La caractérisation taxonomique des génomes peut, également, être basée sur la construction aléatoire de génomes à partir des fragments séquencés ou sur des modèles probabilistes de construction ou sur la fréquence relative des 4 nucléotides. La méthode

*Shotgun* peut aussi être couplée avec l'utilisation de marqueurs génétiques (universels ou spécifiques d'espèces) afin d'identifier les microorganismes en présence. (Ma *et al.*, 2014 ; Ferretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017 ; D'Argenio, 2018)

La méthode *Shotgun* permet d'étudier, outre la composition du microbiote, son possible fonctionnement. Le but est d'établir un catalogue de gènes à partir du métagénome reconstitué et de le comparer à une base de données de référence, regroupant la fonction de ces gènes. Lorsque les gènes ne sont pas référencés, une recherche par analogie est lancée. Cette analyse permet ainsi de déduire le métabolisme, les moyens de survies et parfois l'évolution des microorganismes. Toutefois, elle est compliquée par le fait de devoir travailler sur un métagénome auquel il manque parfois des codons *start* ou *stop* et qui se compose à la fois de régions codantes et non codantes, qui ne peuvent être distinguées une fois les génomes reconstitués. Une autre approche consiste donc en l'identification préférentielle des lectures des séquences codant pour des protéines. (Ma *et al.*, 2014 ; Ferretti *et al.*, 2016 ; D'Argenio, 2018)

#### b. Analyses secondaires

Du fait du caractère pluridisciplinaire des études sur le mycobiome, un modèle statistique unique n'est pas exploitable afin de caractériser le lien entre le microbiome fongique et les autres paramètres mesurés. De multiples modèles statistiques sont donc créés en combinant plusieurs variables dépendantes ou non les unes des autres. (Shankar, 2017)

La richesse et la diversité des communautés microbiennes sont étudiées à travers 2 variables : les diversités  $\alpha$  et  $\beta$ . La diversité- $\alpha$  désigne la richesse d'une communauté au niveau local ou la diversité à l'intérieur d'une même communauté, alors que la diversité- $\beta$  désigne la diversité entre 2 communautés microbiennes distinctes. La diversité- $\alpha$  peut être calculée à partir des UTO et caractérisées par différents index (notamment l'index Shannon). La diversité- $\beta$  est calculée à l'aide de plusieurs paramètres : l'indice de dissimilitude de Bray-Curtis et la distance UniFrac.

On procède, le plus souvent, à l'analyse multivariée de la matrice des UTO en ayant recours aux méthodes d'ordinations, comme l'analyse en coordonnées principales (PCoA), qui permet de réduire les dimensions de la matrice des UTO. Une visualisation sous forme de graphiques est possible, chaque axe étant choisi afin d'avoir une visualisation tridimensionnelle : le fait que des points soient regroupés indique qu'ils ont des profils taxonomiques similaires. Il existe une autre méthode appelée positionnement multidimensionnel non métrique mais qui est moins usitée. (Ma *et al.*, 2014 ; Ferretti *et al.*, 2016)

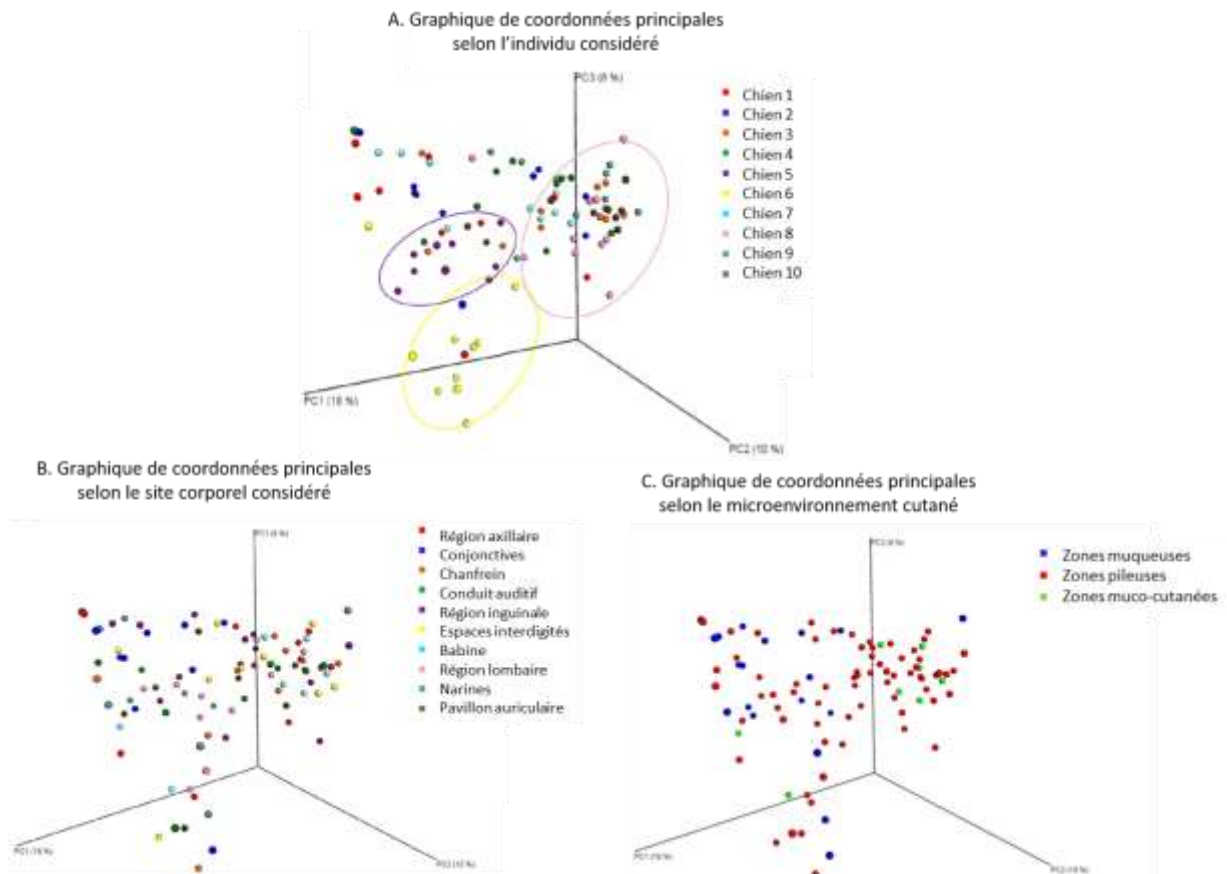


Figure 23 : Approche par la méthode des coordonnées principales de l'influence du sujet, du site corporel et du microenvironnement considérés sur le mycobiote canin (d'après Meason-Smith *et al.*, 2015)

Par exemple dans l'étude de Meason-Smith *et al.* (2015), qui s'intéresse au mycobiote canin, l'analyse en coordonnées principales permet d'appréhender le fait qu'il existe un regroupement des données en fonction du sujet considéré mais pas en fonction du site corporel prélevé.

## 7. Avantages, inconvénients et limites de chaque méthode

Une limite de ces méthodes génomiques est qu'elles ne révèlent pas si les microorganismes fongiques séquencés étaient vivants ou morts. De plus, elles ne différencient pas les différents stades de champignons (appareil végétatif, appareil reproducteur ou spores). (Shankar, 2017)

### a. Séquençage des amplicons

Etant donné la petite taille des amplicons et des gènes associés, cette méthode est plutôt rentable. Par contre, elle ne procure aucune information sur le fonctionnement du microbiome et la résolution taxonomique est limitée comparée à la méthode *Shotgun*. En outre, des amplicons chimériques (séquences de deux microorganismes distincts qui ont été assemblés par erreur) sont générés et doivent être éliminés. (Feretti *et al.*, 2016)

Afin de pallier au manque d'information sur le fonctionnement du microbiome séquencé, des outils bio-informatiques sont en train d'être créés. Par exemple, l'outil PICRUSt (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*)

permet, à partir d'informations extraites du séquençage d'amplicons de l'ADN codant pour l'ARNr 16S, de prédire quelles sont les familles de gènes présents et leur relative abondance. Ces outils doivent encore être validés expérimentalement, mais ils constituent un espoir pour le séquençage d'amplicons. Il n'existe pas d'équivalent pour l'ARNr 18S ou les ITS. (D'Argenio, 2018)

Comparé au séquençage de l'ARNr 16S chez les bactéries, le séquençage de l'ITS présente deux nouveaux défis.

Tout d'abord, les ITS entre différentes espèces fongiques peuvent présenter une variation importante en taille et en séquence. L'effet de ces variations sur les étapes de séquençage par les plateformes n'est pas véritablement connu, mais il pourrait constituer un biais. En effet, il est difficile de séquencer avec la même efficacité tous les ITS des différentes espèces fongiques présentes au sein d'un même mycobiome. L'étude de Tang *et al.* (2015) compare directement les 2 plateformes de séquençage précédemment citées. Il existe un biais faible en faveur des fragments de petite taille lorsque l'analyse est lancée via la plateforme Illumina ; alors que le biais, via la plateforme Ion Torrent, est plus important (non détection des fragments à partir de 450 pb). Une méthode de normalisation de la taille de fragments pourrait permettre de réduire le biais observé, mais aucune n'a encore été validée. (Tang *et al.*, 2015 ; Diaz *et al.*, 2017)

Ensuite, si les bases de données référençant les séquences de l'ARNr 16S sont bien documentées, il n'en est pas de même pour celles référençant les séquences des ITS ou de l'ARNr 18S. De nombreuses séquences redondantes sont assignées à un rang taxonomique incorrect ou incomplet au sein de ces bases de données. Par exemple, 20% des séquences fongiques de l'INSD (*International Nucleotide Sequence Databases*) sont associées à la mauvaise espèce fongique et parmi les 45 979 entrées dans la base UNITE, 12 096 (soit 26.31%) de ces entrées ne sont pas assignées à des rangs taxonomiques. En outre, il est prouvé que certaines séquences d'ITS référencées dans GenBank sous les termes de « champignon » ou « champignon non-cultivé » sont en fait des artéfacts de PCR du fait des amorces. Ces bases de données génèrent, ainsi, un biais important car la distribution des champignons détectés va dépendre de la base de données utilisée.

Plusieurs bases de données concernant les ITS sont disponibles avec des approches différentes (Findley, UNITE, RTL, THF), mais probablement aucune n'est complète. La base de données UNITE est la plus utilisée : elle se base sur les données de l'INSD et tente de regrouper toutes les séquences des ITS fongiques disponibles. La base de données, créée par Findley *et al.* pour leurs recherches, consiste en une approche bio-informatique permettant d'extraire toutes les séquences d'ITS valables disponibles dans Genbank, en éliminant les séquences redondantes et en évitant certains biais taxonomiques. La création de la base de données RTL (*RedSeq Targeted Loci*) a été faite par un consortium de mycologistes : chaque séquence a été évaluée par rapport à sa taille, sa qualité, son identification taxonomique par des scientifiques. La base de données THF (*Targeted Host-associated Fungi*) est créée pour l'étude du tractus intestinal : elle regroupe les séquences des ITS déjà publiés au niveau des échantillons gastro-intestinaux et donne aux espèces fongiques un nom en lien avec leur fonction. (Tang *et al.*, 2015 ; Diaz *et al.*, 2017) Il est nécessaire de noter que le temps d'analyse est directement proportionnel à la taille de la base de données.



Tableau VI : Taille et temps nécessaire pour une analyse type de 8.2 M de lectures par les différentes bases de données (d'après Tang *et al.*, 2015)

	UNITE	Findley	RTL	THF
Taille (séquences)	45 976	23 456	2 593	1 817
Temps d'analyse (heures)	18,25	12,2	4,1	3,6

b. Méthode *Shotgun*

La résolution taxonomique est meilleure, avec une identification de l'espèce et parfois même de la souche considérée, et cette méthode permet d'appréhender le fonctionnement global du microbiome (notamment son métabolisme) en séquençant l'ensemble des gènes présents. La stratégie *Shotgun* permet aussi de réduire les biais intrinsèques aux techniques d'amplification de l'ADN. Toutefois, étant donné qu'un grand nombre de lectures est nécessaire, afin d'obtenir la reconstruction de tous les génomes des microorganismes présents, il est parfois nécessaire d'amplifier l'ADN de l'échantillon et ainsi les biais inhérents à la PCR sont réintroduits.

Par contre, cette méthode est plus coûteuse que la précédente. Les algorithmes de traitement de données sont également beaucoup plus complexes que ceux requis pour le séquençage d'amplicons, car les bibliothèques sont très volumineuses et les lectures sont généralement courtes, rendant difficile l'alignement des séquences avec les bases de données. En outre, elle est moins sélective puisque tous les ADN présents sont séquencés sans discernement qu'ils soient fongiques, bactériens, viraux ou humains. (Ma *et al.*, 2014 ; Ferretti *et al.*, 2016 ; Kong *et al.*, 2017) Cette méthode n'est donc pas adaptée à l'étude des champignons au sein d'un microbiote. En effet, lorsqu'une communauté, comme le microbiote cutané, est dominée par des bactéries (ou d'autres sources d'ADN comme celle de l'hôte ou d'autres agents microbiens), le séquençage afin d'identifier les espèces fongiques se révèle être extrêmement coûteux et requiert des moyens bio-informatiques très pointus, afin de sélectionner seulement les séquences se rapportant au mycobiote. De plus, cette tâche est d'autant plus compliquée que les bases de référence concernant les génomes des espèces fongiques sont plus qu'incomplètes. (Tang *et al.*, 2015) Il s'avère plus aisé d'utiliser des bases de références regroupant uniquement les séquences des ITS.

## II. Répartition du mycobiote fongique cutané et influence de divers facteurs

Comparé au tractus intestinal, la peau est un environnement inhospitalier, contenant peu de nutriments. Pour survivre au sein de cet écosystème sec et acide, les micro-organismes doivent s'adapter et utiliser les ressources contenues dans la sueur, le sébum et la couche cornée de l'épiderme. Classiquement, le microbiote cutané peut être divisé en flore résidente et flore transitoire. La flore résidente comprend le microbiote central, relativement stable et abondant, qui peut repeupler de manière rapide la peau après une perturbation. Ce groupe est considéré comme le microbiote commensal au sens strict. Au contraire, la flore transitoire est très variable dans le temps et dépend du microenvironnement, ainsi que de contacts directs avec l'extérieur, comprenant à la fois des sources inertes (objets, meubles, habitations) mais également des organismes vivants (humains et animaux). Elle ne se maintient, à la surface de la peau, que quelques heures à quelques jours. Ces groupes peuvent, tous deux, contenir des micro-organismes commensaux et d'autres potentiellement pathogènes. (Weese, 2013)

L'étude du mycobiote des hommes, des chiens et des chats domestiques en bonne santé permet d'identifier ce qui peut être considéré comme « normal » et de comprendre comment les micro-organismes opportunistes peuvent contribuer aux infections et aux maladies cutanées. La définition d'un mycobiote central d'un hôte sain est l'objectif de la plupart des études génomiques. Leurs résultats restent difficiles à interpréter du fait de nombreux facteurs de variations. En effet, le mycobiote semble dépendre de plusieurs paramètres relatifs d'une part à l'hôte (espèce, race, sexe, âge, statut immunitaire, style de vie, traitements médicaux et pratiques hygiéniques) ; d'autre part à l'environnement extérieur, avec des contacts directs entre êtres humains, entre êtres humains et animaux et enfin entre hôtes et objets.

### A. Répartition générale et comparaison des mycobiotés cutanés humain, canin et félin

L'étude du mycobiote de nos carnivores domestiques, basée sur le séquençage de nouvelle génération, en est à ses débuts. L'intérêt porté à ce dernier est en pleine expansion, car il est de plus en plus clair qu'il pourrait influencer sur celui de l'être humain et vraisemblablement avoir un impact sur la santé des propriétaires d'animaux domestiques. (Meason-Smith *et al.*, 2015)

#### 1. Mycobiote cutané de l'homme

Chez l'homme, le genre *Malassezia* prédomine dans la majorité des sites cutanés, à l'exception des pieds. Ces derniers sont colonisés par des communautés fongiques plus diverses, regroupant notamment, les genres *Malassezia*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* et *Epicoccum* (voir figure 24). La voûte plantaire est le site corporel dont la diversité, en termes de genres fongiques, est la plus élevée (environ 80 genres), suivi par les autres sites du pied (respectivement 60 et 40 genres pour l'espace entre les orteils et les ongles des orteils). Les bras ont une diversité intermédiaire avec, approximativement, 18 à

32 genres fongiques différents, alors que les autres sites corporels sont colonisés par moins de 10 genres fongiques. En outre, les pieds sont les sites corporels dont le mycobiote possède la plus grande variabilité individuelle. (Jo *et al.*, 2017)

Findley *et al.* (2013) ont identifié onze des quatorze espèces connues de *Malassezia* chez des individus sains dans leur étude. L'espèce *M. restricta* prédomine sur la tête (canal auditif externe, pli rétro-auriculaire, glabelle) alors que l'espèce *M. globosa* prédomine sur le tronc (dos, occiput, pli inguinal). D'autres sites corporels montrent une plus grande diversité d'espèces de *Malassezia* : l'intérieur des narines, la fosse antécubitale, l'éminence hypothénar et le milieu de l'avant-bras constituent des niches pour *M. restricta*, *M. globosa* et *M. sympodialis*. D'autres organismes fongiques, au rang de l'espèce, sont isolés : *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. orthopsilosis* et *Cryptococcus flavus*, *C. dimennae* et *C. diffluens*. Ces espèces font partie de la flore commensale de l'être humain, mais peuvent être des pathogènes opportunistes en cas d'immunodéficience ou de blessure, de type brûlure. La diversité fongique dépend plus du site corporel que de l'individu à l'échelle de l'espèce. (Findley *et al.*, 2013 ; Jo *et al.*, 2017)

La peau humaine est divisée en plusieurs niches qui diffèrent par leur physiologie : il existe des zones cutanées humides, sèches et grasses qui sont identifiées dans la figure 32. La répartition des lipides cutanés varie également selon le site corporel. La répartition corporelle des différentes espèces de *Malassezia* peut s'expliquer, en partie, par la génétique, certaines d'entre elles ne possédant pas le gène codant pour l'enzyme de synthèse des acides gras (*Fatty Acid Synthase* en anglais), elles dépendent des lipides du microenvironnement. Ceci explique leur prédominance au niveau des zones cutanées grasses. En outre, les espèces de *Malassezia* ne possèdent pas les mêmes lipases et phospholipases, leur conférant une préférence pour certains lipides. L'ensemble de ces données pourrait expliquer la répartition corporelle des différentes espèces de *Malassezia*. (Jo *et al.*, 2017 ; Byrd *et al.*, 2018)

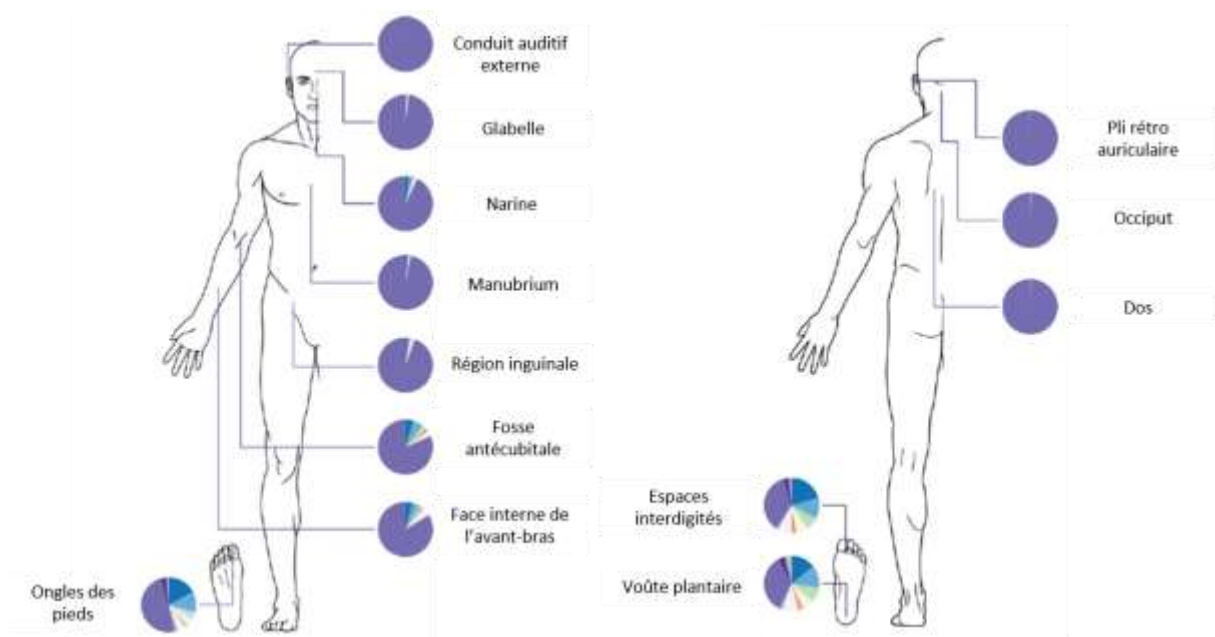




Figure 24 : Composition des communautés fongiques selon le site corporel chez l'homme adulte (entre 18 et 39 ans) (d'après Jo *et al.*, 2017)

Il est également important de considérer les biais inhérents au séquençage d'amplicons. En effet, l'utilisation de l'ITS 1, dans les études génomiques, induit un biais d'identification des champignons Basidiomycètes (comme *Malassezia*) ; l'utilisation de l'ITS2 favorise l'identification des Ascomycètes (comme *Candida*). Ainsi, il est possible que la méthode utilisée par Findley *et al.* ne soit pas suffisamment sensible pour détecter l'ensemble des Ascomycètes des échantillons. (Ward *et al.*, 2017)

## 2. Mycobiotte cutané du chien

L'étude de Meason-Smith *et al.* (2015) comprend 10 chiens sains (5 mâles et 5 femelles), chez lesquels des prélèvements sont effectués sur 10 sites cutanés, et 8 chiens atteints de dermatite atopique (DA), chez lesquels les prélèvements sont effectués sur 6 sites corporels. Le site corporel influence la diversité- $\alpha$  du mycobiote. Ainsi, les muqueuses, les narines et les conjonctives présentent un nombre réduit d'espèces fongiques. Cela peut s'expliquer par une protection plus importante de ces zones vis-à-vis de l'environnement extérieur. La diversité et la richesse fongique dépendent de l'individu considéré. La diversité- $\beta$  est plus influencée par le facteur individuel que par le site corporel, comme le montrent les graphiques de coordonnées principales de la figure 23 : il n'existe pas de regroupement si l'on considère les facteurs « microenvironnement cutané » ou « site corporel », alors qu'il existe un regroupement pour des chiens donnés. (Meason-Smith *et al.*, 2015)

Le phylum des Ascomycètes est le plus représenté sur la peau des chiens en bonne santé, suivi de près par le phylum des Basidiomycètes. La classe d'Ascomycètes la plus abondante est celle des Dothideomycètes, avec les genres *Alternaria*, *Cladosporium* et *Epicoccum*. Il faut noter que certaines UTO (Unités Taxonomique Opérationnelles) abondantes, appartenant aux Ascomycètes, ne peuvent pas être classés au rang taxonomique du genre, du fait de la déficience de bases de données de référence. Les genres appartenant aux Basidiomycètes les plus représentés sont *Cryptococcus* et *Malassezia*. De même que pour les diversités, le facteur individuel a plus d'influence sur la composition taxonomique du mycobiote que le site corporel. Ainsi, un taxon particulier peut être retrouvé sur tous les sites corporels d'un chien, mais sur aucun site d'un autre. Il s'agit d'une première différence avec le mycobiote humain qui lui, est largement dépendant du site corporel. La faible abondance de *Malassezia* à la surface cutanée des chiens, comparée à celle de l'homme, est une découverte importante ; car les études du mycobiote cutané canin, basées sur la culture fongique, montraient, à l'inverse, que le genre *Malassezia* était l'un des plus abondants. (Meason-Smith *et al.*, 2015 ; Noli, 2017)

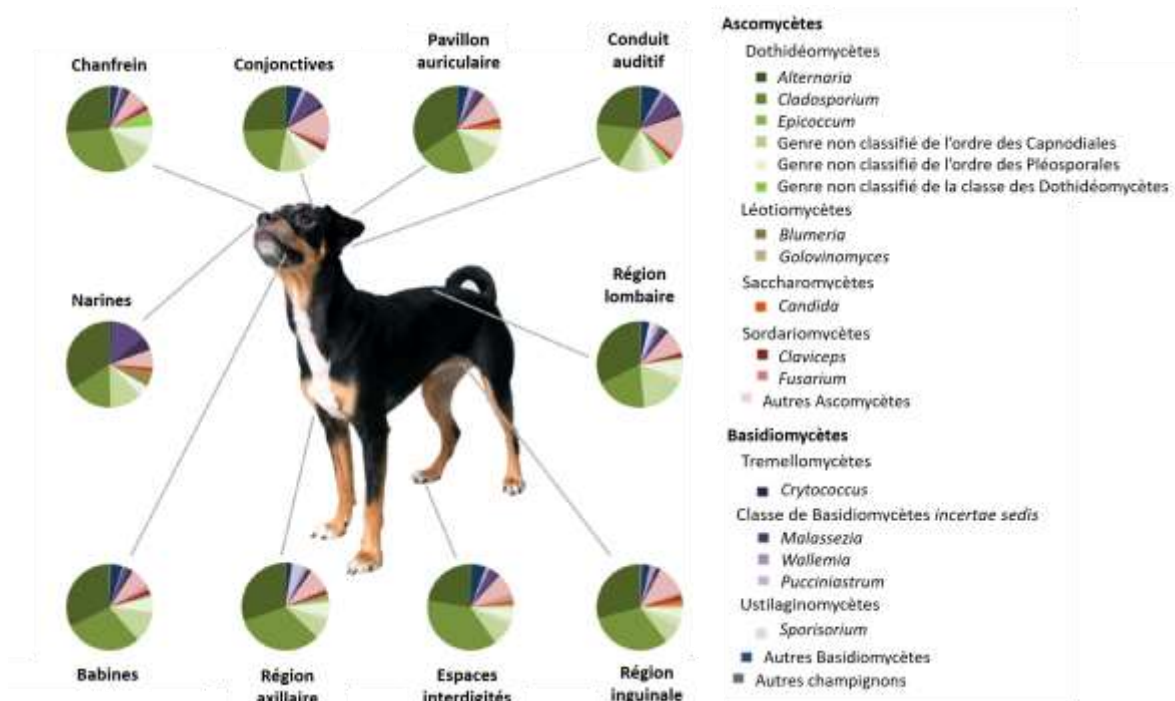


Figure 25 : Abondance relative des différents taxons fongiques selon le site corporel considéré chez des chiens sains (d'après Meason-Smith *et al.*, 2015)

Les différences physiologiques entre les peaux de l'homme et du chien pourraient, en partie, expliquer les différences de mycobiotas. La peau humaine possède des zones dont les caractéristiques sont spécifiques : zones sèches, sébacées ou humides ; alors que la peau canine est plus uniforme, la quasi-totalité de la surface corporelle étant recouverte de poils, qui comportent tous, une glande sébacée et une glande sudoripare apocrine.

D'autres éléments d'explication peuvent être évoqués, notamment les différences comportementales entre l'homme et l'animal, les habitudes hygiéniques ou, encore, la différence d'exposition environnementale. En effet, il est généralement admis que les chiens sont plus exposés aux éléments extérieurs que les humains, du fait de leur proximité avec le sol et de comportements qui leur sont propres, tels que se rouler par terre ou s'allonger à même le sol. De plus, nos carnivores domestiques sont rarement lavés, contrairement aux humains. (Meason-Smith *et al.*, 2015)

Il faut, également, noter que les trois genres dominants des Dothideomycètes de la peau canine sont responsables d'allergies environnementales chez 20 à 30 % des personnes atopiques et 6 % des personnes en bonne santé. Ces champignons peuvent aussi être considérés comme des allergènes chez les chiens atteints de DA. La cohabitation entre des enfants et des chiens porteurs de ces champignons pourrait être à l'origine d'une tolérance de ces derniers chez les enfants. Un autre mécanisme hypothétique est celui impliquant l'exposition de la femme enceinte à ces allergènes, puis la transmission verticale. (Meason-Smith *et al.*, 2015)

### 3. Mycobiote cutané du chat

L'étude de Meason-Smith *et al.* (2017) comprend un groupe de 11 chats sains, chez lesquels des prélèvements sont effectués sur 12 sites corporels, et 9 chats allergiques, chez lesquels des prélèvements sont effectués sur 6 sites corporels. La diversité- $\alpha$  est significativement variable entre individus et entre les différents sites corporels. Les conjonctives et l'appareil reproducteur ont la diversité- $\alpha$  la plus faible ; alors que la zone pré-auriculaire a la diversité- $\alpha$  la plus élevée. La diversité- $\alpha$  varie, également, significativement, avec le microenvironnement cutané : les sites muqueux ont une moindre diversité par rapport aux sites sébacés ou aux sites avec des poils. De même que pour les chiens, la diversité- $\beta$  est plus influencée par le facteur individuel que par le site corporel. (Meason-Smith *et al.*, 2017)

Comme chez les chiens, le phylum le plus abondant est celui des Ascomycètes et, dans ce phylum, la classe la plus abondante est celle des Dothideomycètes, avec les genres *Cladosporium*, *Alternaria* et *Epicoccum*. La relative abondance des trois genres fongiques les plus représentés est significativement différente entre les chats. Le genre le plus abondant des Basidiomycètes est *Cryptococcus*. *Malassezia* est présent dans 30% des échantillons des chats sains, alors que l'abondance relative n'est supérieure à 1% que pour seulement 5% des échantillons. Il faut noter qu'il existe une grande diversité de taxons entre les différents échantillons.

Comme dans l'étude portant sur l'espèce canine, 21% des séquences classées dans les Ascomycètes ne peuvent être classées au rang taxonomique du genre fongique. En outre, bien que la moyenne de séquences n'ayant pas trouvé d'assignement taxonomique soit de 6%, pour certains échantillons, il peut y avoir jusqu'à 50% de séquences non assignées. Ceci est toujours dû au manque de données dans les bases de références. De futures études devraient permettre d'assigner ces séquences à des taxons fongiques. (Meason-Smith *et al.*, 2017 ; Noli, 2017)

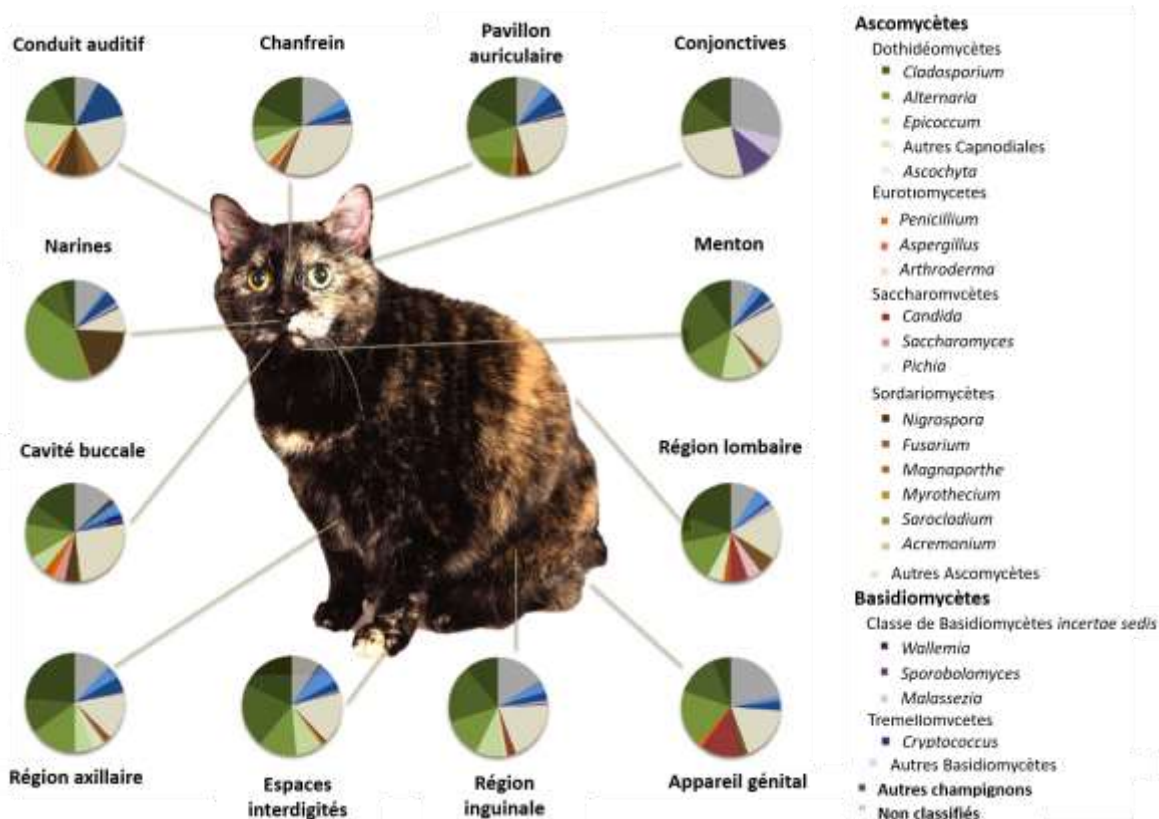


Figure 26 : Abondance relative des différents taxons fongiques selon le site corporel considéré chez des chats sains (d'après Meason-Smith *et al.*, 2017)

Cette étude montre que la colonisation fongique de la peau du chat tend à être homogène, mais variable entre les individus. Il est possible que le toilettage ait une influence sur la dissémination du mycobiote. La diversité fongique cutanée du chat (au niveau qualitatif car on ne peut l'évaluer au niveau quantitatif) semble être comparable à celle du chien, mais plus importante que celle de l'homme. (Meason-Smith *et al.*, 2017)

## B. Influence de différents facteurs

Les facteurs influençant le mycobiote cutané commencent tout juste à être étudiés chez l'homme. Il n'existe pas encore de recherches, concernant ces facteurs, pour nos carnivores domestiques mais, par analogie et comparaison avec l'homme, il est possible de formuler certaines hypothèses sur leur influence sur le mycobiote cutané du chat et du chien domestiques.

### 1. Age

Le mode d'acquisition du mycobiote à la naissance peut avoir un impact important sur la future santé de la peau, notamment avec la présence de certains taxons qui sont nécessaires au développement d'une immunité efficace. L'étude du mycobiote d'un individu en bonne santé, de son mode d'installation et de maturation, pendant l'enfance, est nécessaire afin de comprendre l'influence des communautés microbiennes sur la santé des enfants et des adultes. (Ward *et al.*, 2017)



a. Acquisition du mycobiote dans les premiers jours de vie

Le premier mois de vie, les taxons fongiques les plus abondants sur la peau de l'homme sont : *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. albicans* et *C. orthopsilosis*. Des *Malassezia* sont également détectées mais avec une abondance de 2% seulement d'après Ward *et al.* (2018). Néanmoins, ce résultat a pu être biaisé par l'utilisation de l'ITS2 dans cette étude. (Ward *et al.*, 2018) Les facteurs influençant le mycobiote de l'enfant sont : le type d'accouchement, le mycobiote maternel, l'exposition à l'environnement, les traitements reçus tels que les antibiotiques ou les antifongiques et l'âge gestationnel au moment de la délivrance. (Ward *et al.*, 2017)

Le type d'accouchement, par voie basse ou par césarienne, affecte la composition du microbiote bactérien durant les 6 premiers mois de vie.

La transmission verticale de micro-organismes fongiques, de la mère à l'enfant, est effective pour *C. albicans*. Dans une étude, 24% des nouveau-nés âgés d'une semaine étaient colonisés au niveau d'au moins un site (cavité orale, rectum ou aine) avec la souche de *C. albicans* hébergée par leur mère. Considérant que *C. albicans* est le genre fongique le plus étudié, du fait de son implication dans la pathophysiologie des vaginites, on peut se demander si cette transmission verticale ne serait pas effective pour d'autres espèces moins étudiées du mycobiote vaginal ou anal maternel. En effet, le mycobiote vaginal est constitué de *Candida* (espèce prédominante : *C. albicans*) mais aussi de *Davidiella*, *Cladosporium* et d'autres genres fongiques moins importants ; alors que le mycobiote anal maternel est constitué majoritairement de *C. albicans*, *S. cerevisiae* et *C. parapsilosis*.

En cas de césarienne, le microbiote bactérien de la peau de l'enfant est plus similaire au microbiote cutané de sa mère. Les paramètres qui diffèrent entre un accouchement par voie naturelle ou par césarienne et qui sont susceptibles d'influencer le mycobiote cutané du nouveau-né sont : l'absence d'efforts lors de l'accouchement, les antibiotiques périnataux et l'absence de passage par le canal vaginal. Dans une étude, deux espèces de *Malassezia* (*M. restricta* et *M. globosa*) ont été détectées au niveau cutané chez des nouveau-nés d'un jour. La transmission des *Malassezia* à partir de la peau des mères a été confirmée par génotypage.

Il est possible, en considérant ces différentes observations, de formuler l'hypothèse selon laquelle les enfants nés par voie naturelle auraient un mycobiote plus divers, dominé par le genre *Candida* (du fait de l'exposition au mycobiote vaginal et fécal maternel) ; alors que ceux nés par césariennes auraient un mycobiote dominé par le genre *Malassezia* (du fait de la colonisation par le mycobiote cutané maternel). L'étude de Ward *et al.* (2018), réfute le fait que la naissance par voie basse soit à l'origine d'un mycobiote similaire au mycobiote maternel vaginal ou anal. Bien que la transmission verticale de la mère à l'enfant soit prouvée pour des espèces spécifiques de champignons, d'autres sources (notamment environnementales) doivent contribuer à l'établissement de ce mycobiote. Ainsi, le type d'accouchement influence significativement certains taxons fongiques mais pas tous. (Ward *et al.*, 2017 ; Ward *et al.*, 2018)



L'âge gestationnel au moment de l'accouchement a un impact sur le microbiote bactérien du nouveau-né, mais ces différences sont aplanies à l'âge de 2 ans. Plusieurs facteurs pourraient influencer le mycobiote du nouveau-né : le statut naif du système immunitaire, la dysbiose bactérienne due à l'utilisation d'antibiotiques ou d'antifongiques en prophylaxie (en particulier le fluconazole inhibe la croissance des *Candida* au niveau cutané). (Ward *et al.*, 2017)

Etant donné que la croissance fongique est influencée par les interactions avec les différents règnes microbiens, notamment le règne bactérien, il est possible que l'abondance relative, en bactéries et le type d'accouchement, avec l'administration d'antibiotiques, aient un impact sur les communautés fongiques commensales. De plus, il n'y a pas de réelle évolution du mycobiote cutané des nouveau-nés vers un mycobiote que l'on pourrait qualifier de plus mature dans les 30 premiers jours de vie.

#### b. Changements du mycobiote à la puberté

Les enfants (entre 8 et 13 ans) possèdent des taux relativement plus faibles de *Malassezia* que les adolescents et les adultes. Ils ont, simultanément, une diversité fongique plus importante avec les genres *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Cryptococcus* et *Phoma* qui constituent une part importante de la flore cutanée (voir figure 27). En outre, la variabilité du mycobiote cutané entre les individus est plus importante chez les enfants que chez les adultes. Ainsi, le taxon fongique majoritaire au sein du mycobiote est extrêmement variable d'un enfant à l'autre.

Même si *M. restricta* est identifié chez les enfants, *M. globosa* est la seule espèce de *Malassezia* majoritaire dans tous les sites corporels, à la différence des adultes. Le fait que *M. globosa* possède une activité lipase très importante *in vitro* comparée à celle de *M. restricta* pourrait expliquer cette observation. (Jo *et al.*, 2016)

Le changement de mycobiote lors de la puberté peut être expliqué par l'augmentation de l'activité des glandes sébacées, via le système hormonal, permettant la création de niches plus favorables pour les espèces de *Malassezia* lipophiles. Ainsi, les changements de composition des lipides cutanés permettraient d'expliquer les changements de mycobiote lors de cette période. Le mécanisme de ces changements de mycobiote n'est pas encore élucidé, mais deux hypothèses dominent : soit de nouvelles souches sont acquises durant la puberté, soit l'abondance relative des différentes souches change. (Jo *et al.*, 2016 ; Jo *et al.*, 2017 ; Byrd *et al.*, 2018)

La variation des communautés fongiques entre les tranches d'âge peut être corrélée avec l'âge de prédilection de certaines infections fongiques. Par exemple, les teignes de la tête et les teignes du corps, causées par des champignons n'appartenant pas au genre *Malassezia*, touchent d'avantage les enfants, alors que les affections associées à des *Malassezia* touchent d'avantage les adultes. Cette dichotomie pourrait être liée au caractère permissif de la peau des enfants vis-à-vis de la colonisation par certains agents fongiques. (Jo *et al.*, 2016 ; Jo *et al.*, 2017 ; Byrd *et al.*, 2018)

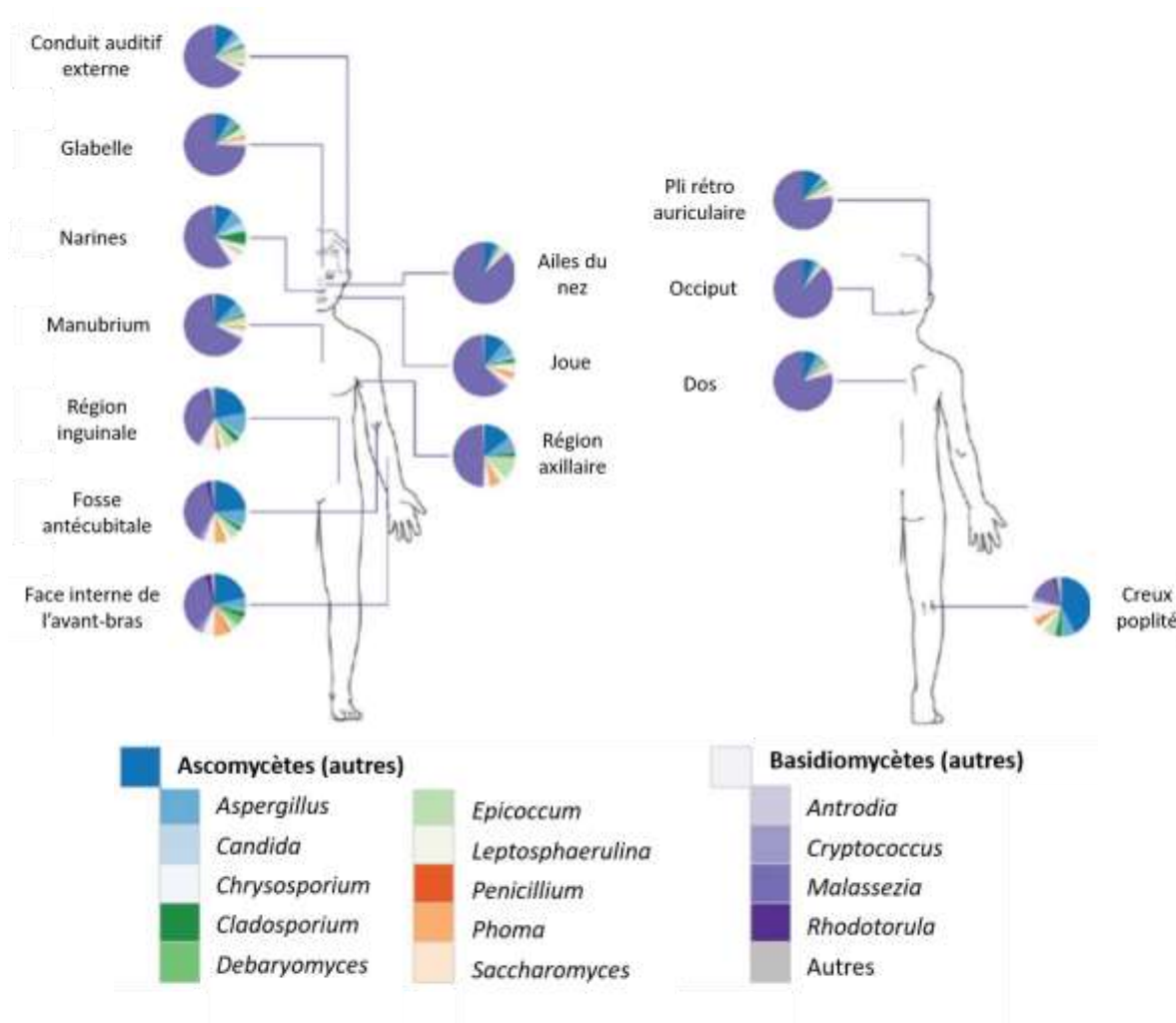


Figure 27 : Composition des communautés fongiques selon les sites corporels chez l'enfant (entre 8 et 13 ans) (d'après Jo *et al.*, 2017)

## 2. Sexe

La variabilité du mycobiote selon le sexe de l'hôte peut être liée à des différences d'ordre physiologique et anatomique : production hormonale, taux de sueur, production du sébum, pH cutané, épaisseur de la peau, présence de poils, usage de cosmétiques. (Schommer *et Gallo*, 2013)

D'après l'étude de Jo *et al.* (2016), certains taxons du mycobiote cutané diffèrent selon le sexe de l'enfant. En effet, les genres *Epicoccum* et *Cryptococcus* sont plus présents au niveau des sites sébacés des garçons, alors que le genre *Malassezia* est plus présent chez les filles, suggérant que le sexe peut affecter la composition du mycobiote. Ces prédispositions sexuelles peuvent être reliées à certaines données épidémiologiques : par exemple, *Cryptococcus neoformans*, qui est un pathogène causant des maladies graves, telles que des pneumonies ou des méningites, affecte préférentiellement les garçons. L'effectif de cette étude étant faible, ces résultats sont à interpréter avec prudence et ne constituent qu'une piste de réflexion. (Jo *et al.*, 2016)

Il peut, également, être intéressant d'étudier la répartition du genre *Malassezia* au niveau cutané (genre prédominant chez l'homme) en fonction du sexe de l'individu.

Dans l'étude d'Akaza *et al.* (2010), 40 hommes et 40 femmes adultes ont été l'objet de prélèvements cutanés sur 4 sites. L'étude est menée via une PCR en temps réel avec des amorces spécifiques des différentes espèces de *Malassezia*. L'abondance relative de *Malassezia* est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Cette observation peut être liée à la quantité de sébum relativement plus importante chez les hommes par rapport aux femmes. En outre, la répartition des espèces varie au sein d'un même genre : *M. restricta* domine sur le front et la joue, alors que *M. globosa* et *M. dermatis* dominent sur le torse et le dos des hommes ; chez les femmes, *M. globosa* et *M. sympodialis* sont prédominantes sur la poitrine et le dos.

Dans l'étude de Sugita *et al.* (2010), 405 hommes et 365 femmes ont été l'objet de prélèvements au niveau des joues et sont séparés en 13 classes d'âge. Tout comme pour l'étude d'Akaza *et al.* (2010), une méthode de PCR en temps réel avec des amorces spécifiques des différentes espèces de *Malassezia* est utilisée. De même que pour l'étude précédente, l'abondance relative de *Malassezia* est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. Le taux de *Malassezia* augmente, significativement, chez les hommes âgés de 16 à 18 ans et *M. restricta* est l'espèce prédominante quelle que soit la tranche d'âge considérée. A l'inverse, chez les femmes, il y a une augmentation du taux de *Malassezia* entre 10 et 18 ans, puis une diminution entre 19 et 29 ans et, enfin, de nouveau une augmentation entre 30 et 39 ans. Cette observation peut être liée à l'utilisation de cosmétiques qui inhiberaient la prolifération fongique chez les femmes de la tranche d'âge 19-29 ans.) De plus, *M. globosa* prédomine chez les femmes de 23 ans et plus et *M. restricta* prédomine entre 10 et 18 ans. (Leung *et al.*, 2016 ; Jo *et al.*, 2017)

Ainsi, le mycobiote est influencé par de nombreux paramètres. La plus grande difficulté de ces études est qu'il est quasiment impossible de ne faire varier qu'un paramètre à la fois : il faut donc essayer de comprendre comment les différents facteurs se combinent et influent sur le mycobiote cutané.

### 3. Hygiène

L'équipe de Sugita *et al.* (2015) bénéficie du volontariat d'une équipe de géologues japonais engagés dans une excursion de 3 mois en Antarctique. Durant cette période, les géologues ne peuvent se laver que rarement et partiellement. Des prélèvements cutanés sont réalisés, sur une période de 4 mois, sur 5 sites corporels (cuir chevelu, joue, torse, arrière des oreilles et plante des pieds). Les échantillons sont ensuite analysés via une technique de PCR avec des amorces spécifiques des différentes espèces de *Malassezia*.

Une augmentation du taux de *Malassezia* sur tous les sites corporels est observée durant la période de l'excursion, avec une augmentation plus importante sur le cuir chevelu. Ce taux revient à la normale après le retour des géologues dans leur pays (et la reprise d'habitudes hygiéniques régulières). Les chercheurs s'intéressent également à la répartition respective des deux espèces majeures de *Malassezia* chez l'homme : *M. globosa* et *M. restricta*. Sur le cuir chevelu, les deux espèces ont une abondance plus élevée durant l'excursion, *M. restricta* étant plus abondante que *M. globosa*. Par contre, on peut regretter l'absence de témoin (homme sain) dans cette étude.

Ce changement du mycobiote cutané lors de conditions d'hygiène précaires peut être dû à l'accumulation de sébum, notamment sur le cuir chevelu. En effet, les géologues ont eu plus de difficultés à se laver les cheveux que les autres parties du corps. De plus, il est connu que le cuir chevelu est un réservoir de *Malassezia*. Ainsi, la colonisation de la peau par les *Malassezia* augmente lorsque les possibilités de se doucher sont réduites durant une période de temps conséquente. (Sugita *et al.*, 2015)

#### 4. Traitements médicaux

Dans l'étude de Findley *et al.* (2013), un individu, parmi les 10 volontaires, possède un mycobiote plus diversifié. Sept mois avant l'étude, il a reçu un traitement antifongique *per os*, pendant 2 mois, à cause d'une infection fongique des ongles des pieds. Deux genres supplémentaires sont alors identifiés : *Aspergillus* et *Saccharomyces*. Bien que le séquençage ne puisse prouver un lien de cause à effet, cette observation suggère que la dysbiose, associée à l'infection fongique ou à la prise d'un antifongique, puisse persister pendant une période de 7 mois.

En outre, les données de la littérature suggèrent que certains traitements de dermatologie doivent être repensés car ils altèrent à long terme le microbiote cutané. Certains médicaments, provoquant une dysbiose cutanée, pourraient augmenter la sensibilité à certaines maladies cutanées. (Schommer *et Gallo*, 2013)

#### 5. Ethnie et style de vie

La plupart des études concernant les populations cutanées de procaryotes et d'eucaryotes se limitent à des cohortes d'individus occidentaux (vivant aux Etats-Unis pour la plupart). L'équipe de Leung (2016) s'intéresse au mycobiote de Chinois en bonne santé vivant à Hong Kong. La cohorte étudiée présente les mêmes genres fongiques dominants que les populations occidentales.

Cependant, l'environnement extérieur et le style de vie peuvent moduler le mycobiote des individus. Par exemple, *Debaryomyces*, présent dans 0,3% des échantillons, est un des genres fongiques majeurs chez les individus vivant dans les mangroves du sud de la Chine. Par ailleurs, les genres *Cordyceps* et *Auricularia*, présents dans 0,1% des échantillons, comptent des espèces considérées comme importantes dans la médecine et la cuisine traditionnelles chinoises. A l'exception de *Cordyceps*, ces genres ne sont pas décrits chez les populations occidentales. (Leung *et al.*, 2016)

#### 6. Races de chat

La colonisation de la peau des chats par les *Malassezia* serait dépendante de leur race. Dans une étude sur 73 chats, des *Malassezia* sont isolées (par une méthode de culture fongique) chez 90% des Devon Rex, 39% des Cornish Rex et 50% des chats Européens. *M. pachydermatis* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez ces trois races de chats. (Bond *et al.*, 2008) Ces résultats sont confirmés par une étude très récente basée sur la génomique.

Il est important de noter que les races Devon Rex et Cornish Rex sont des chats à poils très courts, avec une quantité de sébum plus importante que les chats Européens.

Older *et al.* dans leur étude « *The effect of breed and environment on the cutaneous microbiota of cats* » parue dans le 30<sup>ème</sup> proceeding du NAVDF (*North American Veterinary Dermatology Forum*) en avril 2017, démontrent que la race des chats affecte le mycobiote cutané, notamment la relative abondance des *Malassezia* chez 5 races de chats (Bengale, Cornish Rex, Devon Rex, Sibérien et Sphynx) : les Bengales, les Cornish Rex et les Sibériens ont une abondance relative de *Malassezia* plus importante. (Noli, 2017)

## 7. Statut immunitaire

L'étude de personnes souffrant d'immunodéficiences primaires permet d'appréhender le rôle du statut immunitaire de l'hôte dans la composition du mycobiote cutané. Les patients atteints de syndrome d'immunodéficiences primaires souffrent souvent d'infections bactériennes et fongiques récurrentes. Par exemple, chez les patients porteurs d'une mutation de la voie d'activation STAT3, à l'origine d'un syndrome hyper-IgE, le mycobiote cutané est plus divers : la population de *Malassezia* est réduite, alors que celles de micro-organismes pathogènes opportunistes (*Aspergillus* et *Candida*) sont augmentées, par rapport à celles d'individus sains. Ainsi, la barrière cutanée serait plus permissive en cas d'immunodéficiences et la peau constituerait un réservoir pour les micro-organismes fongiques à l'origine d'infections cutanées. Il est donc difficile de définir un mycobiote « normal », certains micro-organismes commensaux de la peau semblant pouvoir devenir pathogènes. (Rizzetto *et al.*, 2014 ; Jo *et al.*, 2017 ; Byrd *et al.*, 2018)

L'immunodéficiences peuvent aussi être acquises, chez les personnes porteuses du virus d'immunodéficiences humaine ou sous traitement immunosuppresseur. Il n'existe pas d'études des mycobiotiques de ces personnes. Par contre, les infections cutanées qu'ils déclarent sont dues, majoritairement, aux pathogènes opportunistes : *Candida*, *Aspergillus* et *Cryptococcus*. Toutefois, certains micro-organismes, qui ne colonisent habituellement pas la peau, peuvent également intervenir, comme *Trichosporon sp.*, *Fusarium sp.*, et *Emmonsia sp.* (Jo *et al.*, 2017)

## 8. Environnement extérieur

Le microbiote cutané des hommes et des carnivores domestiques est influencé par de nombreux facteurs environnementaux tels que le contact entre individus de la même espèce, entre espèces différentes, ou avec des objets ou l'environnement.

### a. Contact humain-environnement extérieur

La plupart des individus de nos sociétés urbanisées passent la majorité de leur temps à l'intérieur. L'intérieur des habitations forme un écosystème regroupant de nombreux micro-organismes et constitue la source de contact prédominante entre les humains et les micro-organismes environnementaux. Le mycobiote de l'intérieur des habitations est largement influencé par les champignons venant de l'extérieur. En effet, la taille réduite des micro-organismes fongiques leur permet facilement de se disperser passivement sur de grandes distances via l'air, l'eau ou les êtres vivants. De plus, les champignons, via la

sporulation et le nombre important de propagules secs produits, favorisent cette dispersion. L'objectif de Tong *et al.* (2017) est de déterminer, par l'étude des mycobiotés d'habitants Hongkongais et des surfaces intérieures de leurs habitations, s'il existe une transmission entre les surfaces des meubles et la peau des individus et dans quelles mesures elle se manifeste.

Il existe une grande ressemblance entre le mycobiote cutané humain et celui des surfaces intérieures. En outre, l'abondance de *Malassezia* est significativement plus importante sur les surfaces qui sont touchées le plus fréquemment. D'autres taxons, tels qu'*Aspergillus* et *Cladosporium*, sont retrouvés en abondance dans l'air ambiant. Les habitations proches géographiquement ont tendance à avoir un plus grand nombre de taxons bactériens en commun, ce qui n'est pas observé pour les champignons. La localisation géographique des habitations est le seul facteur influençant la composition du mycobiote de l'air ambiant.

Grâce à l'approche « *Bayesian SourceTracker* », la proportion de micro-organismes échangés entre les mycobiotés de l'air ambiant, des surfaces et de la peau est évaluée. La transmission, depuis la peau jusqu'aux surfaces, est la plus importante (40%), suivie de peu par la transmission inverse (30%). Ceci indique que les surfaces des habitations sont colonisées par un mycobiote reflétant celui de leurs occupants. Les transmissions faisant intervenir l'air sont faibles et, même, nulles entre l'air et la peau. La plupart des genres fongiques sont identifiés au niveau des 2 échantillons considérés (source et destination), suggérant des échanges bidirectionnels (bien qu'un nombre restreint ne soit identifiés qu'à un seul endroit source : la peau pour *Cladosporium* et *Candida* par exemple). (Tong *et al.*, 2017)

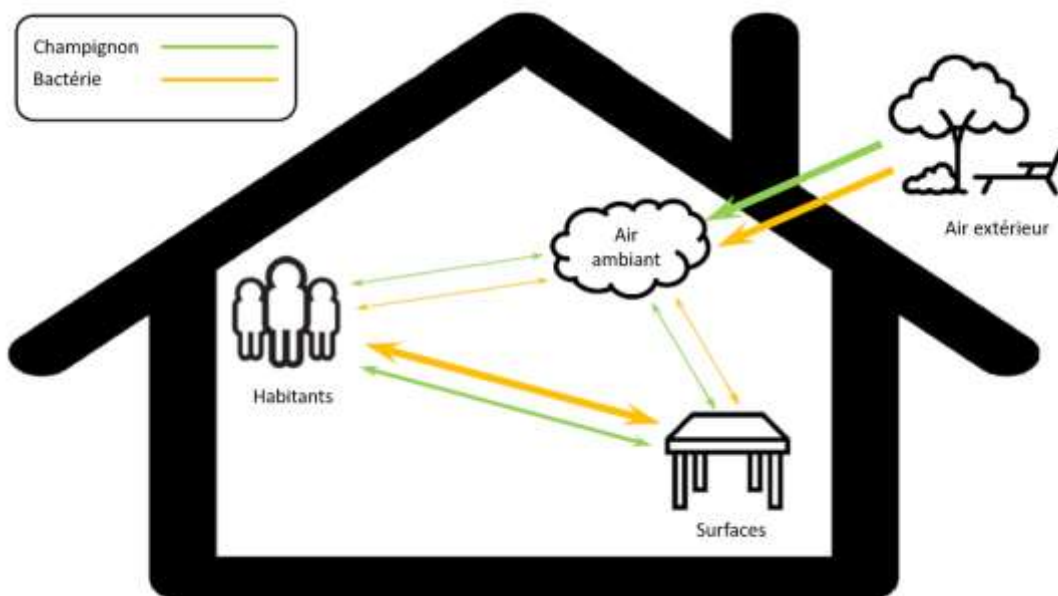


Figure 28 : Représentation schématique des transmissions de micro-organismes fongiques entre l'être humain, les surfaces et l'air ambiant (d'après Tong *et al.*, 2017)  
L'épaisseur des lignes est proportionnelle au pouvoir de dispersion des microbes.

#### b. Contact carnivores domestiques – environnement extérieur

Le type d'environnement extérieur pourrait affecter la diversité- $\beta$  des mycobiotés cutanés canins, expliquant le degré élevé de variabilité interindividuelle. Par exemple, les chiens de maisons différentes ont à un environnement extérieur très différent selon le nombre et la nature des arbres, des plantes, de l'herbe et des points d'eau naturels ou artificiels. En outre, les surfaces intérieures d'habitations différentes n'hébergent pas les mêmes mycobiotés, et leur contact peut donc aussi avoir une influence. Il est remarquable que le site corporel humain ayant la diversité- $\alpha$  la plus élevée soit les pieds, site le plus en contact avec le sol. (Meason-Smith *et al.*, 2015)

Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle l'exposition à l'environnement extérieur serait responsable de la prédominance des genres fongiques environnementaux au niveau cutané chez le chien est remise en cause. En effet, les mêmes genres sont présents en forte abondance au niveau cutané chez les chats ; or, plus de la moitié sont des chats d'intérieur, qui n'ont aucun contact avec l'environnement extérieur. De nouvelles études semblent nécessaires afin d'évaluer si l'environnement extérieur influence le mycobioté de nos animaux domestiques et dans quelle mesure. (Meason-Smith *et al.*, 2017) Older *et al.* dans leur étude « *The effect of breed and environment on the cutaneous microbiota of cats* » s'intéressent à cette influence en étudiant des chats domestiques qui ont accès à l'extérieur et d'autres qui ne sortent pas. Ils remarquent une différence de composition du mycobioté cutané entre ces deux cohortes avec, notamment, un taux de *Fusarium sp.* plus important au niveau des narines des chats qui sortent.

#### c. Contacts humain – humain et humain – carnivores domestiques

L'étude de Song *et al.* (2013) suggère que les membres d'une famille ont un microbiote cutané bactérien plus proche que ne l'ont des individus qui n'habitent pas ensemble. Le fait de partager un environnement commun serait un facteur d'homogénéisation des communautés microbiennes cutanées des individus, via les contacts interindividuels intenses, avec les mêmes surfaces et le même air ambiant. De plus, le fait que les habitants soient propriétaires de chiens, d'une part, augmente la similarité de leurs mycobiotés et, d'autre part, la similarité de leur microbiote cutané bactérien avec celui de leur chien est plus élevée que celle avec un chien ne leur appartenant pas. Cela ne concerne que les habitants adultes et non les enfants ou les personnes âgées, ce qui pourrait s'expliquer par un contact plus intense des adultes avec les chiens. De plus, ces adultes propriétaires de chiens présentent une plus grande diversité de microbiote au niveau du front et des mains que les adultes ne possédant pas d'animal. Par contre, l'appartenance des microbes partagés entre l'homme et le chien au microbiote cutané humain, plutôt qu'à la flore transitoire résultant d'un contact direct, reste indéterminée. (Song *et al.*, 2013) Une étude de cette envergure concernant le mycobioté n'est, pour l'instant, pas disponible. Toutefois, il est possible de baser notre réflexion sur plusieurs points secondaires dans certaines études parues récemment.

A la différence du microbiote bactérien, le fait de cohabiter ne semble pas affecter le mycobioté des individus, dans l'étude de Leung *et al.* (2016). Ainsi, la peau semble collecter les micro-organismes fongiques des différentes surfaces de l'intérieur des habitations, mais

la transmission entre les individus qui y vivent ne semble pas effective. Cela suggère que les variations interindividuelles peuvent être dues à une exposition différente entre les individus d'une même maisonnée. (Leung *et al.*, 2016) La cohabitation avec des animaux pourrait avoir une influence sur le mycobiote. D'autres études seraient nécessaires pour conclure à une corrélation entre la cohabitation et la présence de mycobiotés similaires entre les êtres humains et les animaux d'une même maisonnée. (Meason-Smith *et al.*, 2015)

## 9. Temps

Dans l'étude de Findley *et al.* (2013), utilisant le séquençage d'amplicons, pour l'étude de la stabilité temporelle du mycobiote, six volontaires sont, de nouveau, prélevés 1 à 3 mois après le premier échantillonnage. Les sites avec une prédominance de *Malassezia* restent inchangés avec les mêmes espèces prédominantes. Les sites podaux ont toujours une plus grande diversité fongique. Par contre, leur mycobiote est moins stable dans le temps, reflétant potentiellement une exposition à l'environnement plus intense et une flore transitoire plus abondante.

Oh *et al.* (2016) utilisent une méthode métagénomique appliquée à des individus prélevés plusieurs fois de suite, afin d'étudier la diversité et la stabilité temporelle des communautés microbiennes cutanées. Leur étude révèle que le microbiote est stable sur un intervalle de temps variant entre 1 mois et 2 ans, malgré l'exposition constante de la peau à des facteurs extrinsèques. Toutefois, l'indice de similarité (index  $\theta$  Yue-Clayton) indique que cette similarité est plus faible sur des intervalles de temps longs (1-2 ans) que sur des intervalles courts (1-2 mois). La nature et le degré de cette stabilité varient selon les individus. Certains individus ont un mycobiote qualifié de « hautement variable » car leurs communautés microbiennes ont tendance à fluctuer, même au niveau des sites corporels les plus stables (sites sébacés). Les communautés fongiques des sites sébacés sont les plus stables, alors que les sites podaux sont les moins stables. Ceci peut s'expliquer par une combinaison de facteurs physiques et comportementaux tels que le port de chaussures, l'hygiène personnelle ou, encore, l'épaisseur de la couche cornée plantaire. La stabilité au cours du temps est corrélée de manière négative à la diversité des communautés microbiennes : les sites avec une diversité fongique importante sont moins stables que ceux avec une diversité faible.

Oh *et al.* (2016) essaient de déterminer si certaines espèces ou communautés précises sont instables dans une niche cutanée ou si la variabilité du microbiote est liée à plusieurs flux d'espèces dans une même communauté. Par exemple, si une espèce n'est pas bien adaptée à sa niche écologique, son abondance relative peut varier au cours du temps à cause du phénomène de compétition. Ils démontrent que la stabilité temporelle du microbiote cutané est permise par la maintenance de certaines souches, plutôt que par l'acquisition de nouveaux microbes issus de l'environnement ou d'autres individus. Toutefois, si un changement de microbiote a lieu, les espèces sont largement remplacées par des espèces identiques, ce qui permet de préserver les caractéristiques des niches cutanées. La variabilité est plus importante pour les espèces d'abondance intermédiaire : les espèces présentes en grande quantité et les espèces rares (mais non transitoires) permettent la stabilité du microbiote cutané. En outre, ces espèces rares sont spécifiques d'individus, constituant une véritable signature individuelle. (Oh *et al.*, 2016)



### III. Des relations étroites entre organismes vivants

La nature stable du microbiote cutané humain et la persistance de certains micro-organismes, constituant le microbiote central, suggèrent une fonction importante des commensaux dans la santé cutanée. Plusieurs études suggèrent l'existence d'une certaine homéostasie entre les organismes commensaux et leur hôte. La perturbation de cette homéostasie aboutirait à l'émergence de maladies cutanées. L'étude des interactions entre les commensaux et l'hôte apparaît ainsi, comme primordiale. (Barnard *et al.*, 2017 ; Jo *et al.*, 2017)

Les mécanismes de cette homéostasie restent largement méconnus et leur observation est compliquée par la diversité du microbiote entre les individus, bien qu'il reste stable au cours du temps. Les interactions au sein du système cutané ne restent pas cantonnées à celles entre l'hôte et son microbiote, il existe également des interactions au sein du microbiote, entre les micro-organismes appartenant à des règnes différents et entre les espèces d'un même règne. La compétition entre espèces et entre souches, au sein d'une même espèce, apparaît comme importante pour le développement et la maintenance d'un microbiote chez l'individu sain. (Schommer *et al.*, 2013)

Les interactions des microbes, entre eux ou avec l'hôte, peuvent être divisées en trois catégories : positives, négatives ou neutres (sans impact pour l'une ou l'autre des parties). Le rôle de l'immunité de l'hôte est de sélectionner les microbes avec lesquels existent des interactions positives. Le commensalisme définit une interaction qui ne bénéficie qu'à une des parties, l'autre n'étant pas affectée par la relation. Le mutualisme définit une interaction dont les deux parties tirent un bénéfice. (Schommer *et al.*, 2013)

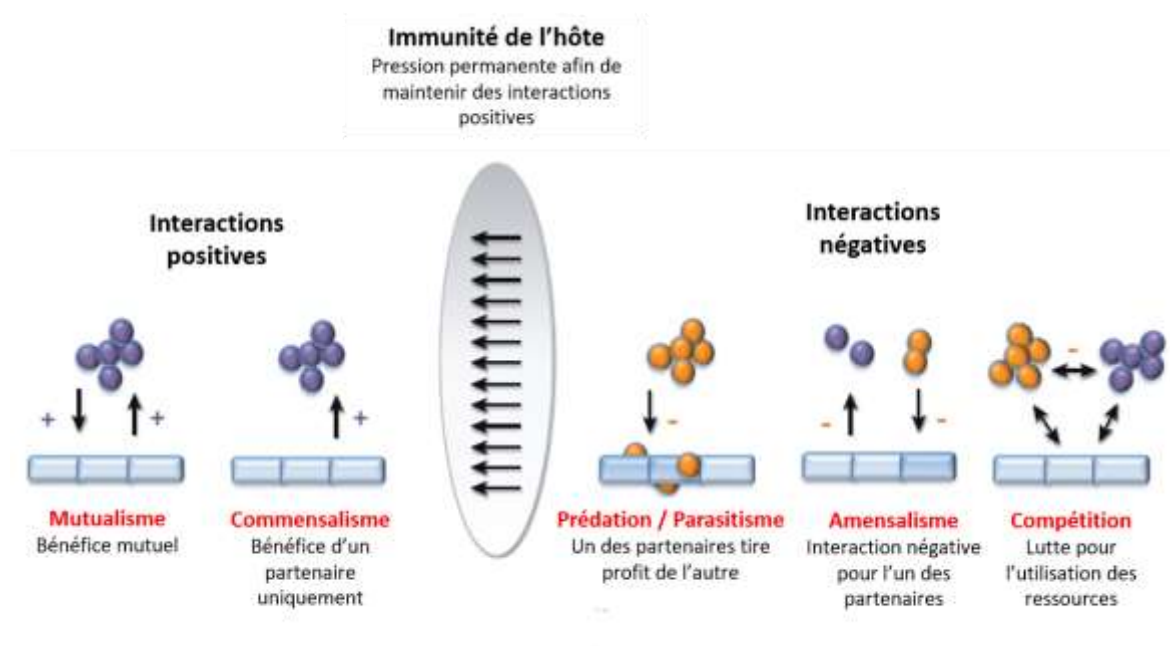


Figure 29 : Schéma des différentes interactions à la surface de la peau (d'après Schommer *et al.*, 2013)

## **A. Relation hôte - champignon**

La relation mutualiste entre l'homme et son mycobiote est issue d'une co-évolution d'un demi-milliard d'années. Le système immunitaire cutané permet la protection contre les agents fongiques pathogènes, mais aussi la tolérance des agents fongiques commensaux. Afin d'assurer cette double fonction, le système immunitaire cutané est hautement spécialisé et rigoureusement contrôlé. (Zielinski, 2014)

### **1. Définition d'une niche naturelle sans nuisance envers l'hôte**

La peau est divisée en régions définies par plusieurs facteurs : le pH, la température, l'humidité, le taux de sueur et le contenu lipidique. Chaque site représente une niche écologique unique qui favorise la croissance d'un ensemble de micro-organismes, qui lui sont spécifiques. L'hôte fournit donc aux microbes des nutriments et une niche écologique stable. (Barnard et Li, 2017)

La manière dont l'hôte tire profit de sa flore cutanée reste en cours d'exploration. Le microbiote cutané serait en compétition avec les agents pathogènes pour l'utilisation des ressources, formant ainsi une résistance à la colonisation de la peau par ces derniers. Cette résistance à la colonisation, grâce aux agents microbiens commensaux, est bien décrite concernant le microbiote du tractus intestinal. De nouvelles études sont nécessaires pour déterminer si la présence de certaines souches fongiques permet une résistance à la colonisation par d'autres souches de la même espèce ou d'espèces différentes. (Belkaid et Segre, 2014 ; Byrd *et al.*, 2018)

La possession d'un microbiote évoluant rapidement permet à l'hôte de s'adapter à son environnement. (Schommer et Gallo, 2013) Le microbiote cutané aurait, également, un effet bénéfique sur la cicatrisation cutanée, la protection contre les pathogènes et le développement de réponses immunitaires adaptées via des mécanismes encore incomplètement élucidés. (Rizzetto *et al.*, 2014)

### **2. Tolérance et éducation du système immunitaire : du commensalisme au mutualisme**

Les facteurs permettant à un organisme fongique commensal d'être toléré par son hôte et de modeler son système immunitaire sont en cours d'investigations.

Les espèces de *Malassezia* (genre prédominant au niveau cutané chez l'homme) produisent de l'acide azélaïque, qui possède des propriétés antimicrobiennes, via le métabolisme des acides gras. (Barnard et Li, 2017) Par contre, leur rôle de modulateur du système immunitaire cutané reste inconnu. (Underhill et Pearlman, 2015) C'est pourquoi, nous prendrons, dans ce paragraphe, l'exemple de *Candida albicans*, un champignon commensal de la peau pouvant devenir pathogène opportuniste lorsque les défenses de l'hôte sont perturbées.

a. Tolérance des commensaux

Les PRR (notamment la Dectine 1, la Dectine 2 et la DC-SIGN) permettent la reconnaissance des agents fongiques pathogènes, mais aussi des agents commensaux, transitoires ou opportunistes. Cette reconnaissance permet, à la fois, le maintien du lien symbiotique entre l'hôte et les micro-organismes fongiques commensaux et une balance homéostatique entre les réponses immunes pro-inflammatoires et tolérogènes. Les rôles du système immunitaire de l'hôte sont primordiaux : il permet à la fois une résistance, permettant de limiter la charge microbienne, et une tolérance, permettant de limiter les dommages en cas de réponse immune incontrôlée grâce aux lymphocytes T régulateurs (LTreg). (Rizzetto *et al.*, 2014)

Le rôle tolérogène des cellules dendritiques permet d'expliquer la tolérance par l'hôte des micro-organismes commensaux abrités par la couche cornée, alors que les agents pathogènes qui forment une brèche cutanée et activent les cellules dendritiques dermiques sont éliminés par le système immunitaire. (Rizzetto *et al.*, 2014) Par exemple, d'après l'étude de Bonifazi *et al.* (2009), les cellules dendritiques cutanées présentent une certaine plasticité au contact de *C. albicans*. Les cellules dendritiques inflammatoires initieraient des réponses immunitaires de type Th17 ou Th2, au contact des levures, via le facteur MyD88, alors que les cellules dendritiques tolérogènes initieraient des réponses immunitaires Th1 ou la différenciation des LTreg (via l'induction de l'enzyme 2,3 indoleamine dioxygénase) au contact des hyphes. Le facteur STAT3 contribue aussi à la plasticité des cellules dendritiques et à leur spécialisation fonctionnelle. (Bonifazi *et al.*, 2009 ; Zielinski, 2014) Ainsi, *C. albicans* agit sur les signaux immunitaires décidant du rôle inflammatoire ou du rôle tolérogène des cellules dendritiques. (Ifrim *et al.*, 2013)

**Légende**

GM-CD : Cellule dendritique obtenue par stimulation avec le facteur GM-CSF/IL-4

FL-CD : Cellule dendritique obtenue par stimulation avec le facteur FLT3-L

MyD88 : Facteur-88 de différenciation myéloïde

TRIF : Adaptateur contenant le domaine récepteur Toll/IL-1 induisant la synthèse de l'IFN- $\beta$

p38 : Kinase p38

STAT3 : Facteur de transcription STAT3

NF- $\kappa$ B : Facteur nucléaire  $\kappa$ B

IDO : Enzyme 2,3 indoleamine dioxygénase

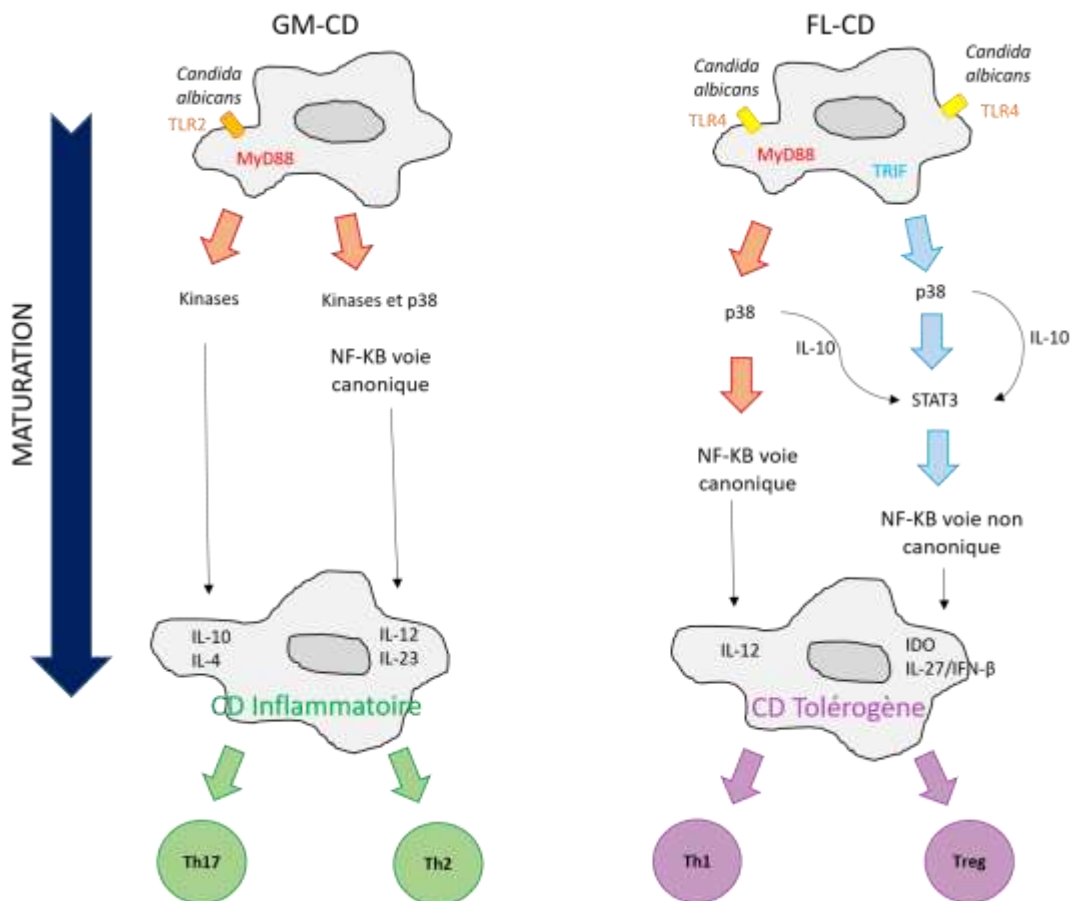


Figure 30 : Schéma des voies de signalisations possibles liées à la plasticité des cellules dendritiques au contact de *C. albicans* (d'après Bonifazi *et al.*, 2009)

b. Education du système immunitaire

Le rôle d'éducation du système immunitaire de l'hôte par les micro-organismes commensaux est formalisé à travers « l'hypothèse hygiénique », qui suggère qu'une exposition initiale à divers micro-organismes commensaux permettrait d'éduquer le système immunitaire de l'hôte, afin de tolérer une grande variété d'antigènes environnementaux. Par contre, une exposition réduite à ces micro-organismes serait la cause principale des maladies inflammatoires chroniques et des désordres auto-immuns. Ainsi, si l'exposition aux commensaux est insuffisante dès le plus jeune âge, les cellules immunitaires de l'hôte ne seraient pas suffisamment éduquées, menant à des réponses immunes incontrôlées. Les micro-organismes commensaux seraient des adjuvants endogènes du système immunitaire de leur hôte. (Song *et al.*, 2013 ; Rizzetto *et al.*, 2014)

Il a été démontré que *Candida albicans*, comme certaines bactéries du microbiote cutané, était capable d'éduquer le système immunitaire adaptatif de son hôte. En présence de ce champignon, les cellules de Langerhans stimulent la prolifération des LTreg cutanés, mais aussi des LTeff. Ce processus d'induction est médié par la présentation d'antigènes et par l'IL-15. (Rizzetto *et al.*, 2014)

En outre, *C. albicans* (sous forme de levure ou d'hyphe) et, en particulier, le  $\beta$ -1,3-glycane de sa paroi interne, permet d'activer les cellules mononucléées du sang périphérique conduisant, lors d'une seconde stimulation par des ligands des TLR ou des

bactéries commensales, à la production de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) ou à l'inhibition de cytokines anti-inflammatoires (IL-6), *in vitro*. Cette activation des cellules immunitaires requiert la participation du récepteur Dectine-1 et de la voie d'activation Raf-1. En définitive, *C. albicans* est capable de promouvoir une réponse pro-inflammatoire des cellules immunitaires lors du contact avec des bactéries et contribue ainsi à la défense cutanée de l'hôte. (Ifrim *et al.*, 2013)

Les micro-organismes commensaux auraient évolué avec une capacité de contrôle immunitaire spécifique à la niche dans laquelle ils évoluent. La compartimentation et la spécialisation des réponses permettraient de limiter les réponses inflammatoires systémiques non voulues. Enfin, le système immunitaire cutané ne doit pas être sous le seul contrôle des organismes commensaux : les organismes transitoires pourraient également jouer un rôle important dans son activation. (Belkaid *et Segre*, 2014)

Ainsi, l'acquisition d'un microbiote complexe permet le développement d'une immunité adaptative efficace et le microbiote est à son tour capable de moduler le système immunitaire afin de se maintenir. Les changements importants du microbiote semblent influencer directement le système immunitaire et être à l'origine du développement des désordres inflammatoires chroniques ou auto-immuns, de plus en plus observés dans les pays industrialisés. (Belkaid *et Segre*, 2014)

### 3. Homéostasie cutanée et dysbiose

Plusieurs facteurs peuvent perturber la composition du microbiote physiologique. Cette dysbiose affecte le dialogue entre les microbes et leur hôte et peut induire une maladie cutanée. Les facteurs de l'hôte (âge, sexe, prise de médicaments, style de vie et hygiène) ont un rôle essentiel dans le maintien de cette homéostasie. Un microbiote riche et varié serait plus avantageux car s'adaptant plus facilement. (Schommer *et Gallo*, 2013)

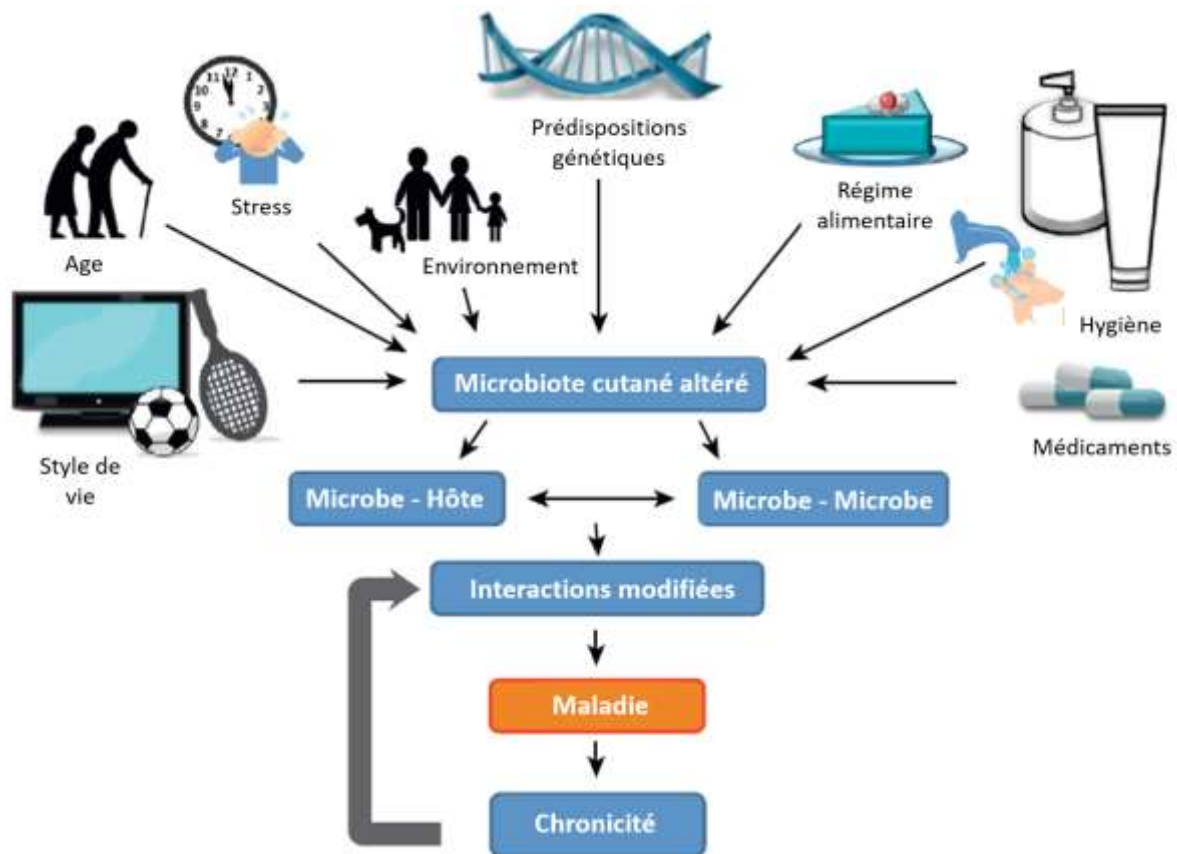


Figure 31 : Schéma de plusieurs paramètres influençant l'homéostasie cutanée (d'après Schommer et Gallo, 2013)

Chez l'homme, de nombreux désordres cutanés inflammatoires sont associés à une dysbiose du microbiote. Les levures *Malassezia* sont liées à de nombreuses maladies cutanées comme le pityriasis versicolor, les folliculites, la dermatite séborrhéique, le psoriasis et la dermatite atopique. (Rizzetto *et al.*, 2014) *M. globosa* est l'espèce prédominante au niveau des lésions de pityriasis versicolor et *M. restricta* prédomine au niveau des lésions de dermatite séborrhéique. (Zhang *et al.*, 2011) Ainsi, les *Malassezia* qui font partie intégrante du mycobiote cutané peuvent devenir pathogènes opportunistes en cas de déficit immunitaire de l'hôte, de perturbation du cycle de croissance du champignon ou de déficit de la barrière cutanée. (Jo *et al.*, 2017)

La dermatite atopique (DA) est une maladie inflammatoire cutanée, chronique, multifactorielle, caractérisée par du prurit et des lésions d'eczéma. La pathophysiologie de cette maladie inclut une perturbation de la barrière cutanée, ainsi qu'une réponse de type Th2 du système immunitaire. Le mycobiote cutané pourrait participer à l'exacerbation des réactions allergiques via la libération d'antigènes, la sécrétion de composés modulant la réponse inflammatoire ou la production d'enzymes endommageant les cellules de l'hôte. Les *Malassezia* seraient un facteur d'exacerbation de la dermatite atopique. Zhang *et al.* (2011) observent que la diversité des genres fongiques, autres que *Malassezia*, augmente en cas de dermatite atopique. Les espèces *Candida albicans*, *Cryptococcus diffluens* et *Cryptococcus liquefaciens*, ainsi que les champignons filamenteux *Cladosporium sp.* et *Toxicocladosporium irritans* sont détectés régulièrement chez les individus atteints de DA, alors qu'ils ne le sont que de manière occasionnelle chez les individus sains. (Zhang *et al.*, 2011 ; Huffnagle *et Noverr*, 2013 ; Schommer *et Gallo*, 2013 ; Rizzetto *et al.*, 2014)

Les individus présentant un squamosis du cuir chevelu ont un mycobiote différent de celui des individus sains : les champignons appartenant à la classe des Basidiomycètes sont plus abondants, avec une augmentation de la proportion du genre *Filobasidium* qui atteint 94% du total des Basidiomycètes. Les Ascomycètes restent prépondérants, aussi bien chez les individus atteints que chez les individus sains, avec une augmentation de la proportion de *Penicillium*. (Huffnagle et Noverr, 2013) En outre, les espèces *M. restricta* et *M. globosa* seraient, aussi, associées à cette maladie. (Schommer et Gallo, 2013)

**Tableau VII : Proportions relatives de 3 catégories de micro-organismes fongiques en fonction du statut « sain » vs « atteint de dermatite atopique » chez l'homme (d'après Zhang et al., 2013)**

	<i>Malassezia</i>	Levures (autres que <i>Malassezia</i> )	Champignons filamenteux
Homme atteint de dermatite atopique	68,7%	19,9%	12,3%
Homme sain	79,2%	12,8%	8,1%

De même, chez nos carnivores domestiques, une dysbiose du mycobiote peut être concomitante d'une maladie cutanée, l'exemple le plus étudié étant la DA canine par analogie avec celle de l'homme.

Le mycobiote de chiens atteints de DA est significativement moins riche que celui de chiens sains. Cette différence avec l'homme pourrait s'expliquer par la diversité moindre du mycobiote humain (dominé par le genre *Malassezia*), par rapport à celle du mycobiote du chien. Ainsi, une perturbation de ce mycobiote conduirait à la diminution de l'espèce majoritaire, permettant une colonisation de la peau par d'autres micro-organismes fongiques ; alors que la perturbation d'un mycobiote naturellement plus divers, comme celui du chien, conduirait à l'augmentation de l'abondance d'un seul ou d'un nombre restreint de micro-organismes fongiques, qui deviendraient majoritaires. Chez ces chiens atteints de DA, des différences entre les sites corporels (narine, région axillaire et espaces interdigités) sont observées. Il existe également une différence de composition du mycobiote : 12 taxons fongiques sont plus abondants chez les chiens sains, alors que 7 autres taxons fongiques sont plus abondants chez les chiens atteints de DA. Les genres plus abondants chez les chiens atteints sont : *Sporobolomyces*, *Hydnum*, *Irpex*, *Periconia*, *Cochliobolus* et *Microascales*. En outre, ces chiens ont, dans leurs oreilles, un mycobiote de diversité réduite et dominé par un genre, *Malassezia* ou *Sporobolomyces*.

Les chats peuvent être atteints d'une dermatite allergique dénommée « dermatite par hypersensibilité non induite par les piqûres de puces ou par l'alimentation ». Les diversités  $\alpha$  et  $\beta$  du mycobiote sont similaires entre les chats allergiques et les chats sains. Par contre, l'abondance relative de 9 taxons fongiques s'avère différente entre ces 2 groupes incluant le genre *Epicoccum* et l'ordre des Capnodiales. Les Agaricomycètes et les Sordariomycètes sont plus abondants dans le mycobiote des chats allergiques. Le fait que le statut allergique des chats n'ait pas d'influence sur la diversité du mycobiote, contrairement à ce qui est observé chez les chiens, peut s'expliquer de plusieurs façons. En premier lieu, la présentation phénotypique et la distribution de ces deux maladies ne sont pas équivalentes dans ces espèces. Ensuite, la régulation immunitaire peut être différente ; enfin, et surtout, on n'observe pas de perturbation de la barrière cutanée chez les chats allergiques. (Meason Smith et al., 2017)

D'avantage d'études du lien entre une dysbiose cutanée et l'initiation ou la progression de maladies cutanées sont nécessaires. Compte tenu de leur prédominance et de leur prévalence chez l'individu sain, ces micro-organismes sont-ils représentatifs du statut pathologique ou sont-ils des constituants commensaux du microbiote cutané, spectateurs innocents des maladies cutanées, considérés comme coupables par association ?

## **B. Relation bactérie - champignon**

Les microbiotes cutanés humain, canin et félin sont dominés par les bactéries, alors que le règne des champignons est de moindre abondance (voir figure 32). Cette observation est, toutefois, à nuancer car les bases de données de référence des génomes fongiques sont largement incomplètes et les études sur le mycobiote beaucoup plus rares que celles sur le microbiote bactérien. (Byrd *et al.*, 2018, Jo *et al.*, 2017)

Environ 1200 espèces bactériennes sont présentes sur la peau de l'homme. Le microbiote bactérien de l'homme sain est dominé par les genres *Propionibacterium*, *Corynebacterium* et *Staphylococcus*, avec des espèces bactériennes transitoires supplémentaires qui participent à la variation interindividuelle. (Findley *et al.*, 2013 ; Noli, 2017) Chez les chiens et les chats, la répartition des bactéries dépend de la physiologie des sites corporels, avec une richesse du microbiote plus importante au niveau des zones avec des poils. Les phylums les plus abondants chez les chiens sont les Protéobactéries, suivies par les Firmicutes, les Actinobactéries, les Bacteroidetes et les Cyanobactéries. Ces mêmes phylums sont les plus abondants chez les chats, mais dans un ordre de prévalence différent (Protéobactéries, suivies des Bacteroidetes, puis des Firmicutes et des Actinobactéries) Chez les chiens, la famille *Oxalobacteriaceae* est la plus abondante, tous sites corporels confondus, avec, notamment, le genre *Ralstonia*, qui est une bactérie environnementale. Chez les chats, les familles *Porphyromonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Pastereurellaceae* et *Pseudomonadaceae* sont les plus abondantes. (Rodrigues Hoffmann *et al.*, 2014 ; Older *et al.*, 2017)

L'étude des dynamiques entre les différents règnes est essentielle pour la compréhension du développement et du maintien des mycobiotes chez un hôte sain, ainsi que pour celle des interactions pouvant exacerber les maladies cutanées ou faciliter la transition des micro-organismes du stade commensal au stade opportuniste puis pathogène. (Oh *et al.*, 2016) C'est pour cela que la plupart des études se sont intéressées aux relations entre des bactéries et *Candida albicans*, une levure présente au sein du mycobiote cutané, qui peut également causer des infections sévères. Dans ce contexte, les communautés mixtes, champignons-bactéries, ont une résistance et une virulence différentes de celles des communautés formées exclusivement de champignons. (Schommer *et Gallo*, 2013) La présence de micro-organismes fongiques au sein des écosystèmes mixtes permettrait une plus grande stabilité. Les interactions entre les différents micro-organismes pouvant varier, dans le temps et dans l'espace, elles dépendent, à la fois, de facteurs biotiques (présence ou absence d'autres micro-organismes) et de facteurs abiotiques (oxygène, température, pH, source de nutriments). (Tipton *et al.*, 2018)



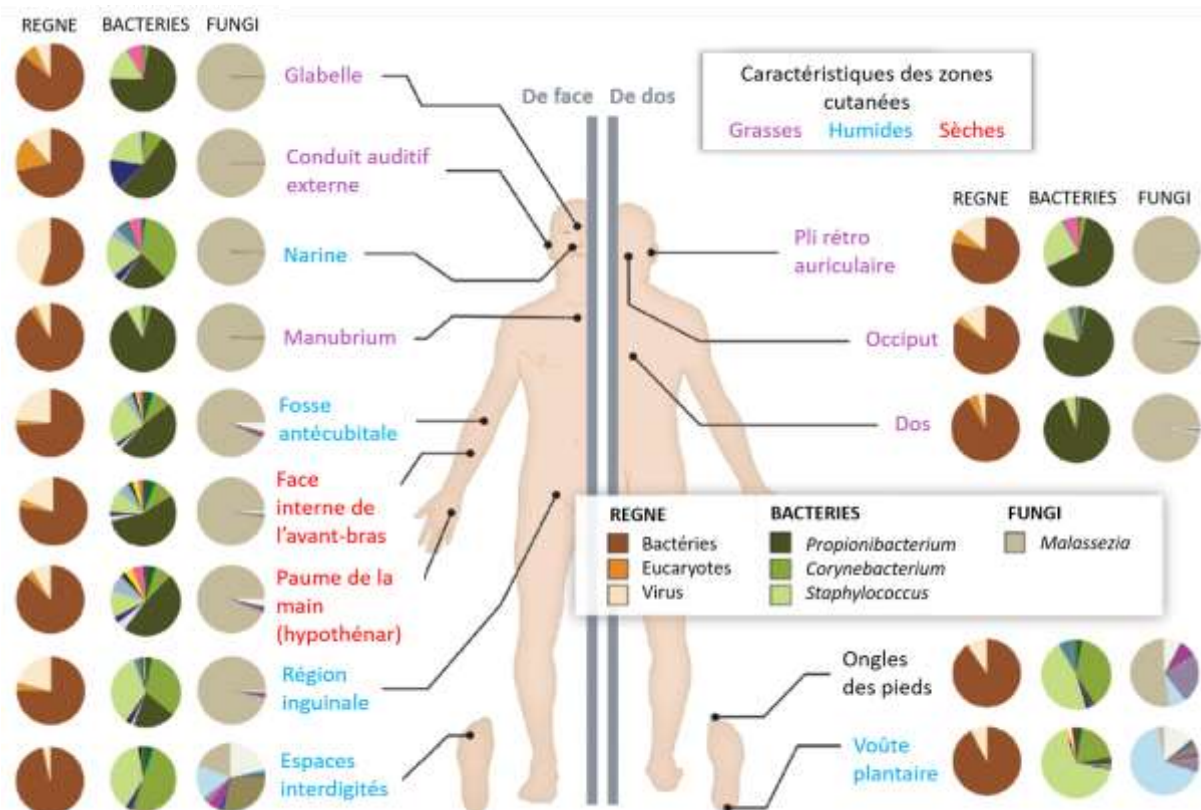


Figure 32 : Répartition des règnes microbiens cutanés chez l'homme (d'après Belkaid et Segre, 2014)

Chez l'homme, l'abondance des bactéries et des champignons des sites corporels n'est pas corrélée de façon linéaire, mais les sites corporels peuvent être regroupés comme suit : les bras ont une grande diversité bactérienne et une faible diversité fongique, les pieds ont une grande diversité fongique et une faible diversité bactérienne, et les autres sites corporels ont, à la fois, une faible diversité fongique et bactérienne. (Findley *et al.*, 2013 ; Leung *et al.*, 2016) La physiologie des sites corporels influence la répartition des bactéries. On distingue des sites sébacés, des sites humides et des sites secs. Cette ségrégation ne s'applique pas aux champignons qui se regroupent plus par localisation : les champignons colonisant les bras, les pieds, la tête ou le corps forment des groupes discrets sur les analyses en coordonnées principales. (Findley *et al.*, 2013 ; Byrd *et al.*, 2018)

La communication entre micro-organismes serait basée sur le système de « quorum sensing ». (Schommer *et Gallo*, 2013) Il correspond à la capacité des bactéries et des champignons à communiquer et à se coordonner, via la sécrétion de molécules de signalisation. Le « quorum sensing » a été décrit, pour la première fois, chez les eucaryotes avec l'exemple de *Candida albicans* et l'identification du farnésol, un composant permettant d'inhiber la formation d'hyphes, de résister à certains médicaments et intervenant dans le maintien de l'intégrité de la paroi fongique. (Martinez *et Fries*, 2010)

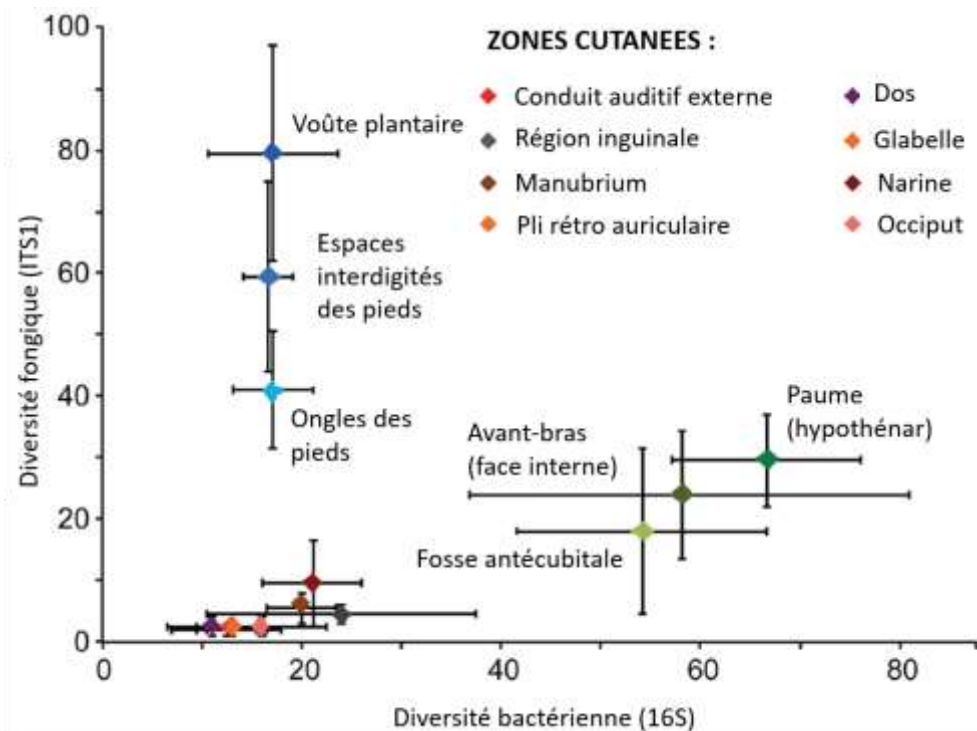


Figure 33 : Représentation graphique de la diversité du microbiote cutané en fonction des sites corporels et des règnes fongique ou bactérien (d'après Findley *et al.*, 2013)

Une analyse de co-occurrence, basée sur la corrélation de Spearman (mesure de dépendance statistique non paramétrique entre deux variables) entre l'abondance relative des bactéries et des champignons au niveau des sites podaux, permet d'évaluer les associations bactérie-champignon éventuelles. Par exemple, les Actinobactéries sont corrélées négativement avec les Ascomycètes et les Basidiomycètes, alors que les Firmicutes et les Proteobactéries sont corrélées positivement avec ces taxons fongiques. (Findley *et al.*, 2013)

Dans l'étude de Leung *et al.* (2016), SparCC est utilisé afin d'étudier les relations de co-abondance ou de co-exclusion entre les différents micro-organismes cutanés à partir des UTO (Unités Taxonomiques Fonctionnelles) fongiques et bactériennes disponibles. Les *Malassezia*, indépendamment du site corporel considéré, présentent une corrélation de co-abondance avec elles-mêmes. Cette relation est également retrouvée entre les bactéries, où les interactions entre micro-organismes du même genre tendent à être plus positives que négatives. De plus, les UTO de *Malassezia* présentent une possible co-abondance avec *Corynebacterium*, *Prevotella* et *Propionibacterium*; et une possible co-exclusion avec *Pseudomonas* et *Actinobacter*, *Streptococcus*, *Enhydrobacter* selon les sites corporels. Les UTO de *Candida* présentent une relation de co-abondance avec *Pseudomonas* et *Enhydrobacter* et une relation de co-exclusion avec *Corynebacterium* et *Staphylococcus*. Selon le site corporel, *Candida* et *Enhydrobacter* présentent, soit une relation de co-abondance, soit une relation de co-exclusion. En outre, les UTO de *Malassezia* et *Candida* ne présentent pas seulement des relations avec les UTO bactériens ou fongiques majeurs, mais aussi avec des UTO plus rares qui permettraient une meilleure compréhension du microbiome. Néanmoins, ces relations liant les micro-organismes sont, éventuellement, spécifiques de l'hôte ou d'un site corporel donné. (Leung *et al.*, 2016)

Il existe différents types d'interactions entre les bactéries et les champignons. Par exemple, *Candida albicans* et *Staphylococcus aureus* sont capables de coloniser le même milieu et de former des biofilms mixtes, les protégeant contre les antifongiques et les antibiotiques. De même, *Candida albicans* et *Staphylococcus epidermidis* peuvent former des biofilms lors d'infections, ces derniers étant, également, plus résistants aux antimicrobiens. A l'inverse, *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'inhiber la croissance de *Candida albicans* au niveau des brûlures. Cette espèce bactérienne est, également, capable de coloniser la surface cutanée en cas de dermatophytose. Ces exemples laissent à penser qu'il existe un lien particulier entre les associations microbiennes et le statut, pathologique ou sain, d'un individu. (Schommer et Gallo, 2013 ; Jo et al., 2017)

Néanmoins, ces analyses de co-occurrence devraient être couplées avec une méthode de culture fongique afin de s'assurer des interactions effectives entre micro-organismes, comme suggéré dans l'étude de Tipton et al. (2018). En effet, bien que la coexistence soit nécessaire pour qu'il y ait une interaction microbienne, elle est loin d'être suffisante et l'approche actuelle ne permet pas d'appréhender les dynamiques entre les différentes espèces microbiennes. De plus, ces études de culture fongique couplées avec les études génomiques permettent de cultiver des micro-organismes fongiques et bactériens, qui étaient considérés comme non cultivables *in vitro*. Enfin, des études génomiques, basées sur la méthode *Shotgun*, semblent nécessaires pour pallier aux limites du séquençage d'amplicons et des analyses statistiques. (Leung et al., 2016 ; Tipton et al., 2018)

### **C. Relation champignon - champignon**

L'observation de la formation de biofilms par des micro-organismes non pathogènes, au niveau des ulcères de jambes des individus diabétiques, a mené au concept de « pathogroupes » : isolées, certaines espèces ne sont pas dangereuses alors que rassemblées, elles ont un potentiel de virulence identique à celui d'un micro-organisme pathogène. (Barnard et Li, 2017)

Les biofilms microbiens sont des communautés de micro-organismes fixées sur un substrat biologique ou non, par une matrice protectrice qu'ils produisent. La formation d'un biofilm confère plusieurs avantages aux micro-organismes : survivre dans un environnement hostile, résister à des pressions physiques et chimiques et favoriser la coopération métabolique. Une grande variété de micro-organismes fongiques sont capables de coloniser les surfaces et de former des biofilms : *Candida sp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium sp.*, *Pneumocystis sp.*, *Trichosporon asahii*, *Blastoschizomyces capitatus*, *Malassezia pachydermatis*, *S. cerevisiae* et *Coccidioides immitis*. La persistance de certaines infections fongiques, sur le matériel médical comme les cathéters, est permise par la formation de biofilms. *Candida albicans*, un champignon commensal de la peau chez l'homme, est un pathogène opportuniste capable de former des biofilms constitués de levures, d'hyphes et de pseudo hyphes intégrés dans une matrice contenant des protéines, de la chitine, de l'ADN et des  $\beta$ -1,3-glycanes. Or, ces biofilms sont résistants à la plupart des antimicrobiens et aux mécanismes de défense immunitaire. (Martinez et Fries, 2010)

Etant donné la complexité des microbiotes cutanés de l'homme, du chien et du chat, explorer les interactions entre les microbes et entre les microbes et l'hôte, en plus de la caractérisation taxonomique, semble primordial. Pour ce faire, de nouvelles études basées sur la métatranscriptomique, la métabotéomique et le fonctionnement métabolique du microbiote sont nécessaires.

## Partie 3 : Du commensalisme à la pathogénicité opportuniste : exemple de *Malassezia*

Dans certaines conditions, les micro-organismes, commensaux ou mutualistes, peuvent devenir pathogènes. Le cas des *Malassezia* en est un exemple probant. En effet, ces levures sont isolées à la surface de la peau, de manière physiologique, à la fois de l'homme et de nos carnivores domestiques. Par contre, en cas d'altération de la barrière cutanée, les *Malassezia* prolifèrent et acquièrent un pouvoir pathogène, lors de diverses affections cutanées telles que la dermatite séborrhéique, la dermatite atopique, le psoriasis, les folliculites ou le pityriasis versicolor chez l'homme, la dermatite à *Malassezia* primaire ou la dermatite atopique (DA) chez le chien.

### I. La pathogénicité de *Malassezia* lors de dermatite à *Malassezia* primaire

#### A. Généralités sur les *Malassezia*

Le genre *Malassezia* comprend 14 espèces de levures commensales qui colonisent les couches superficielles de l'épiderme. *Malassezia pachydermatis* est la seule espèce qui s'affranchit de supplémentation lipidique lors de sa culture *in vitro*. Elle est régulièrement isolée de la peau, des conduits auditifs externes, des surfaces muqueuses (orale et anale), des sacs anaux et du vagin, des chiens et des chats sains. D'autre part, il existe 6 espèces dépendantes de lipides : *M. furfur*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae* et *M. sympodialis* ; qui sont également isolées de la peau et des conduits auditifs de nos carnivores domestiques. (Miller *et al.*, 2013b ; Teramoto *et al.*, 2015)

#### B. Diversité de l'espèce *M. pachydermatis*

Les *M. pachydermatis*, isolées de la peau, sont étudiées par de nombreuses équipes de recherche. Les différentes souches sont regroupées selon des spécificités de séquences du gène de l'ARNr. Chaque étude a choisi une région de ce gène selon différents critères et a tenté de démontrer un lien entre les génotypes et le caractère pathogène des différentes souches de *M. pachydermatis*.



Figure 34 : Représentation schématique du gène de l'ARNr fongique (d'après Sugita *et al.*, 2005)

Historiquement, l'équipe de Guillot *et al.*, en 1997, avait divisé l'espèce *M. pachydermatis* en 7 types (Ia-Ig), en considérant l'analyse de séquences partielles de la région D2 du gène codant pour l'ARNr. Seuls les types Ia, Id et le étaient isolés de chiens, alors que seuls les types Ia et le l'étaient de chats. Il n'existait pas de corrélation entre l'isolement d'un type particulier de *M. pachydermatis* et le statut, sain ou atteint d'une

dermatose, de l'hôte. Cette étude a montré que la peau d'un animal est colonisée par plus d'un type de *M. pachydermatis*. (Sugita *et al.*, 2005)

Sugita *et al.* ont défini une nouvelle classification avec une séparation en 3 groupes (1, 2 et 3) et 10 sous-groupes. Ils se sont basés sur l'analyse des séquences d'ADN de la région IGS 1 (*Intergenic Spacer 1* en anglais), qui comparée à la région ITS ou aux régions D1/D2 de l'ARNr 26S, possède une plus grande diversité intra-espèce, permettant une meilleur discrimination entre les groupes de *M. pachydermatis*. Ainsi, chaque groupe ne possède que 41,7 à 55,4% de similarité de séquences avec les autres. Les types Ia, Id et Ie, définis par Guillot *et al.*, correspondent, respectivement, aux groupes 3, 2 et 1. (Sugita *et al.*, 2005) Les pourcentages de chaque groupe de *Malassezia pachydermatis* isolé de la peau de chiens sains sont répartis comme explicité dans le tableau VIII. (Kobayashi *et al.*, 2011)

**Tableau VIII : Pourcentages des groupes de *Malassezia pachydermatis* isolés de chiens sains ou atteints de dermatite atopique (d'après Kobayashi *et al.*, 2011)**

	1A	1B	1C	1D	2A	2B	3A	3B	3C	3D
<b>Chiens sains</b>	6	27	11	≈	6	6	11	≈	3	24
<b>Chiens atteints de DA</b>	≈	9	≈	≈	≈	≈	≈	≈	≈	91

Légende : ≈ non communiqué

Teramoto *et al.* ont caractérisé les *M. pachydermatis* isolées en se basant sur l'analyse des régions ITS1 et IGS1. Ils n'ont pas trouvé de corrélation entre les génotypes et le pouvoir pathogène des souches. Buommino *et al.* ont regroupé les souches de *M. pachydermatis* en 4 génotypes en se basant sur l'analyse des régions ITS1 et ITS2 de l'ARNr. Simultanément, ils ont étudié les facteurs de virulence de *M. pachydermatis* et ont conclu à l'existence d'une relation entre les génotypes et les facteurs de virulence. (Teramoto *et al.*, 2015 ; Buommino *et al.*, 2016)

*M. pachydermatis* aurait une relation symbiotique avec *Staphylococcus* grâce à la production de facteurs de croissance et à des altérations du microenvironnement bénéficiant aux deux espèces. Ceci expliquerait que des chiens avec de nombreuses *Malassezia* cutanées aient, également, un nombre accru de *S. intermedius* et *pseudintermedius*, pouvant même conduire fréquemment à des pyodermites à *Staphylococcus*. (Miller *et al.*, 2013b)

### **C. Facteurs prédisposants de la dermatite à *Malassezia***

Généralement, une prolifération de *Malassezia* est secondaire à une dermatose (dermatite atopique, trouble de la kératinisation, pyodermite bactérienne, dysendocrinie en particulier hypothyroïdie). Néanmoins, dans environ 20% des cas, la prolifération est primaire, il s'agit alors d'une dermatite à *Malassezia*. Les mécanismes sont encore méconnus (principalement des phénomènes d'irritation ou d'hypersensibilité). (Miller *et al.*, 2013b)

En cas de perturbation de la barrière cutanée, physique, chimique ou immunologique, *Malassezia* peut devenir pathogène. Il existe chez l'homme des cas rares de fongémie, pouvant être mortelle, attribuée à *M. pachydermatis*, dont les carnivores domestiques constituent des hôtes naturels. Le mécanisme par lequel *Malassezia pachydermatis* provoque une inflammation, et les facteurs à l'origine de sa prolifération ainsi que du passage du statut d'organisme commensal au statut pathogène restent encore incomplètement élucidés. (Buommino *et al.*, 2016)

Certaines races canines semblent prédisposées : West Highland White Terrier, Basset Hound, Cocker Américain, Shih Tzu, Setter Anglais, Caniche, Boxer, Cavalier King Charles, Terrier Australien, Berger Allemand et Teckel. Elles ont significativement plus de risque de développer une dermatite à *Malassezia*. (Miller *et al.*, 2013b)

Certains facteurs sont supposés prédisposer à l'apparition d'une dermatite à *Malassezia* chez le chien : un taux d'humidité important et une localisation anatomique spécifique (plis de peau, conduits auriculaires externes). Un accès facilité aux nutriments et aux facteurs de croissance pour les *M. pachydermatis* pourrait aussi constituer un facteur prédisposant, lors de trouble hormonal avec une altération de la quantité et de la qualité du sébum ou lors de la colonisation cutanée par des *Staphylococcus* symbiotiques commensaux, par exemple. Une corticothérapie au long court favoriserait, également, la survenue de cette affection. (Miller *et al.*, 2013b)

#### **D. Facteurs de virulence de *M. pachydermatis***

Le passage du statut commensal au statut pathogène de *Malassezia* est, vraisemblablement, lié à des facteurs de l'hôte, notamment la perturbation de son système immunitaire, le déséquilibre du microbiote cutané local ou la présence d'un microenvironnement particulier ; mais aussi à des facteurs de virulence de la souche de *M. pachydermatis*.

Le premier facteur de virulence est la capacité d'adhésion des *Malassezia* aux cellules épithéliales. Des protéines et des glycoprotéines permettent l'adhérence des levures aux cornéocytes canins. Les plus étudiées sont les adhésines exprimées par *M. pachydermatis*.

La dermatite à *Malassezia* résulterait des réactions inflammatoires, innées ou spécifiques, dues aux antigènes et autres molécules produites par les levures (voir figure 35). Les facteurs de virulence de *M. pachydermatis* incluent de nombreuses enzymes : des protéases, des lipases, des phospholipases, des lipoxygénases, des phosphatases, des phosphohydrolases, des glycosidases, des galactosidases, des leucine-arylamidases, des uréases et du zymosane. Ces molécules, par leur action de protéolyse, de lipolyse, d'altération locale du pH cutané, de libération d'eicosanoïdes et de l'activation du complément, contribuent à l'inflammation et au prurit lors de dermatite. (Miller *et al.*, 2013b)

*M. pachydermatis* produit, également, de la mélanine qui est considérée comme un facteur de virulence à part entière. En effet, la mélanine protège les levures contre de nombreux facteurs de stress environnementaux, notamment les UV et les agents oxydatifs, mais aussi contre le système immunitaire de l'hôte. (Brilhante *et al.*, 2018)



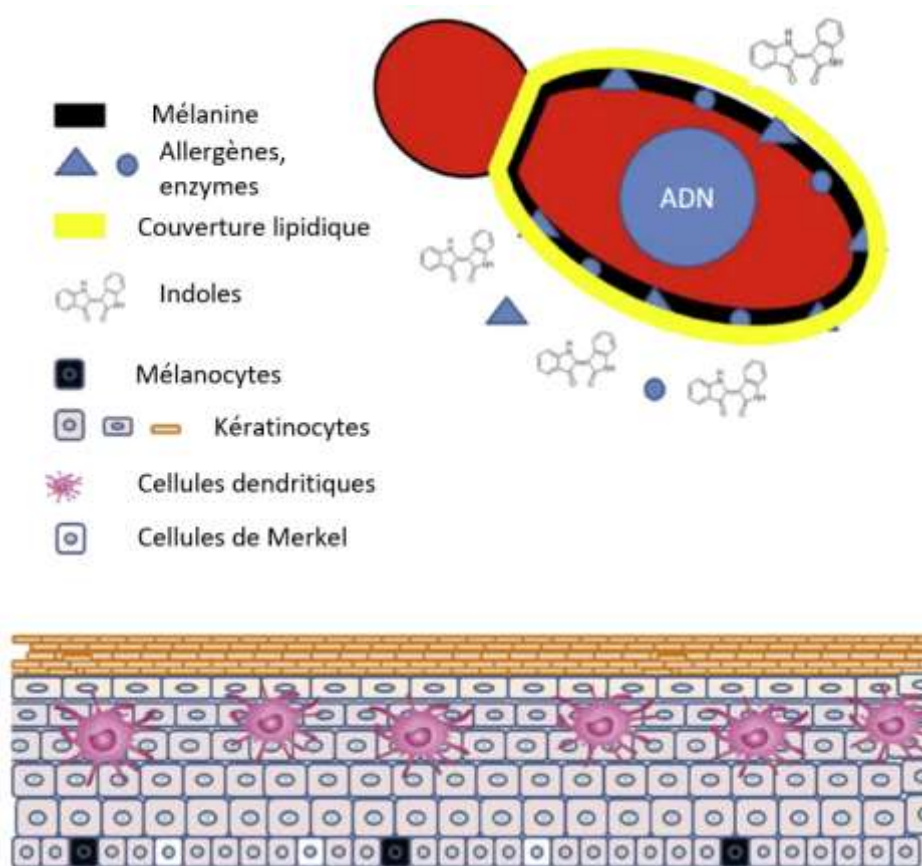


Figure 35 : Modèle des interactions entre *Malassezia* et l'épiderme humain (d'après Gaitanis *et al.*, 2013)

Les enzymes sécrétées et les allergènes peuvent sensibiliser les individus susceptibles de l'être, alors que les produits métaboliques (indoles) modifient l'action des mélanocytes et des cellules dendritiques.

*Malassezia* produit des phospholipases qui favorisent la libération d'acide arachidonique, intervenant dans l'inflammation cutanée. Ces enzymes ont également un rôle important dans la croissance des levures. En effet, elles permettent la lyse des lipides exogènes (en particulier des acides gras) et les produits obtenus sont directement intégrés à la paroi des levures, permettant leur croissance. Les phospholipases auraient donc un rôle dans la colonisation des tissus lors d'otites chroniques ou de dermatites chez le chien. Elles sont généralement divisées en 5 classes : A, A2, B, C et D selon le type de liaison ester qu'elles ciblent. Les études s'accordent sur le fait que les souches de *M. pachydermatis*, isolées de la peau lésée ou des conduits auriculaires externes des chiens atteints d'otites, ont une production accrue de phospholipases par rapport à celles de chiens sains. Ceci supporte l'hypothèse que la pathogénicité de la levure est étroitement associée à la production des phospholipases. Dans l'étude de Buommino *et al.*, il s'agirait de la phospholipase A2 ; alors que dans celle de Teramoto *et al.*, il s'agirait de la phospholipase D. Néanmoins, les inhibiteurs des phospholipases utilisés afin d'identifier la classe des enzymes ne sont pas suffisants pour inhiber totalement l'activité de *M. pachydermatis*, laissant envisager des mécanismes pathogéniques complexes faisant intervenir plusieurs classes de phospholipases. (Teramoto *et al.*, 2015 ; Buommino *et al.*, 2016)



Dans l'étude de Figueredo *et al.* (2012), 95,2% des souches isolées de *M. pachydermatis* sont capables de former un biofilm *in vitro*. Un biofilm se définit comme une communauté de micro-organismes, attachée à une surface biotique ou abiotique. L'architecture des biofilms formés par *M. pachydermatis*, étudiée par microscopie électronique à balayage, est hétérogène en termes de distribution des levures et de matrice extracellulaire. Deux souches de *M. pachydermatis* dans l'étude de Figueredo *et al.* (2012) isolées de chiens sains présentent une organisation en biofilms avec des levures isolées et une absence de matrice extracellulaire (voir figure 36) ; les autres souches, isolées de chiens avec ou sans lésions cutanées, présentent une organisation en biofilm avec un regroupement de blastoconidies organisées en une ou plusieurs couches avec une quantité variable de matrice extracellulaire (voir figure 37).

Alors que les phospholipases interviennent majoritairement dans la première phase de colonisation de la peau de l'hôte, la production d'un biofilm possède plutôt un rôle dans la chronicité de l'infection. En effet, le biofilm procure un environnement protecteur pour *M. pachydermatis*, la protégeant de la réponse immunitaire de l'hôte et réduisant également l'efficacité des antifongiques. Bien que l'existence ou l'absence d'un biofilm ne soit pas associée au statut, sain ou lésé, de la peau chez les chiens, elle peut agir en synergie avec la production de la phospholipase A2 et, ainsi, induire ou exacerber les lésions cutanées. En effet, il est rapporté que les *Malassezia*, isolées de la peau enflammée de carnivores domestiques, produisent une quantité de biofilm directement proportionnelle à l'activité des phospholipases : parmi les 95,2% des souches de *M. pachydermatis* formant un biofilm dans l'étude de Figueredo *et al.* (2012), 55,9% produisent également des phospholipases et les souches isolées de chiens avec des lésions cutanées ont des taux plus élevés de formation de biofilms. (Figueredo *et al.*, 2012 ; Buommino *et al.*, 2016)

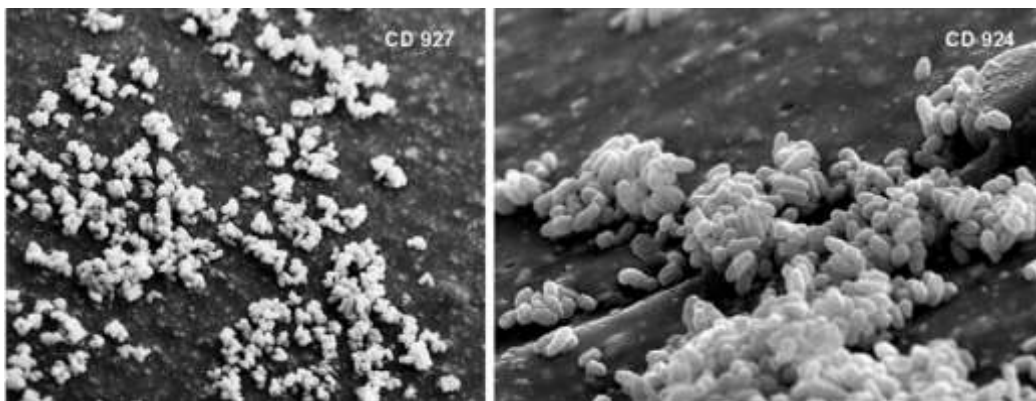


Figure 36 : Microscopie électronique à balayage montrant l'architecture des biofilms de souches de *M. pachydermatis* isolées chez des chiens sans lésion cutanée (d'après Figueredo *et al.*, 2012)

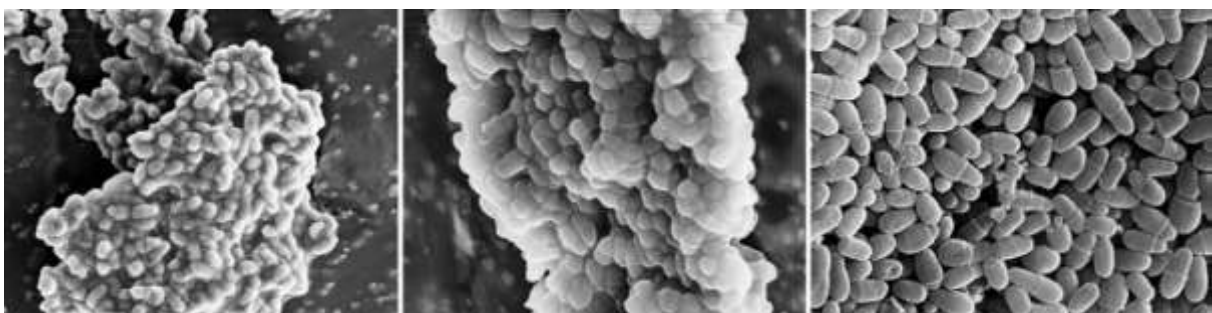


Figure 37 : Microscopie électronique à balayage montrant l'architecture des biofilms de souches de *M. pachydermatis* isolées chez des chiens avec ou sans lésions cutanées (d'après Figueredo *et al.*, 2012)

Alors que les études antérieures ont échoué à démontrer une corrélation entre le génotype et la pathogénicité de *M. pachydermatis*, Buommino *et al.* (2016) montrent que le génotype 1 est le seul qui regroupe des souches produisant les deux facteurs de virulence (biofilm et phospholipase A2). L'étude génétique des différentes souches de *M. pachydermatis* apparaît donc comme primordiale car elle permettrait de connaître le degré de virulence des levures. Néanmoins, des études supplémentaires *in vivo* semblent nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

### **E. Réaction immunitaire et hypersensibilité**

La réponse immunitaire à la prolifération de *Malassezia* est double : humorale et cellulaire. Quatorze antigènes de *Malassezia* sont identifiés par Western Blot. Les chiens atteints de dermatite à *Malassezia* ont des anticorps dirigés contre plus d'antigènes que les chiens sains et des taux sériques d'immunoglobulines A et G relativement plus élevés, bien que cette réponse ne soit pas totalement protectrice. En effet, les immunoglobulines G sont capables d'agir en tant qu'opsonines afin de faciliter la phagocytose des antigènes de *Malassezia*, mais elles peuvent aussi activer le système du complément (via les voies classique et alterne). La réponse immunitaire la plus efficace reste la réponse cellulaire chez les individus atteints de dermatite à *Malassezia*. (Kim *et al.*, 2010 ; Miller *et al.*, 2013b)

Cette affection est caractérisée sur le plan histopathologique par une exocytose importante de lymphocytes CD3+ et une accumulation dermique de mastocytes, ce qui suggère un mécanisme de sensibilisation. Des tests cutanés d'intradermo-réaction, réalisés avec des antigènes de *Malassezia*, sont positifs chez 30% des chiens atteints de dermatite à *Malassezia* avec ou sans la présence d'une DA concomitante. (Miller *et al.*, 2013b)

### **F. Aspect clinique de la dermatite à *Malassezia***

Chez les chiens, la dermatite à *Malassezia* peut être localisée ou généralisée. Elle affecte, principalement, les lèvres, les zones axillaires, la face ventrale du cou, la face médiale des cuisses, les espaces interdigités, la zone périanale et les plis cutanés. Plus de 70% des chiens atteints de dermatite à *Malassezia* souffrent d'une affection cutanée concomitante. Les *Malassezia* sont aussi un facteur secondaire d'otites externes érythémato-cérumineuses.

Cette affection se manifeste par une dermatite modérément à sévèrement prurigineuse, avec une alopecie localisée à généralisée. Elle est érythémateuse, séborrhéique et squameuse en cas de généralisation. En cas de chronicité, les lésions secondaires de lichénification (vulgairement appelée « peau d'éléphant »), d'hyperpigmentation et de squamosis sont présentes. Une odeur rance caractéristique se dégage des régions colonisées par *Malassezia*. *Malassezia* peut être à l'origine d'un périonyxis avec une coloration, brune à rouge, de la base des griffes. (Miller *et al.*, 2013b ; Hnilica *et Patterson*, 2017)

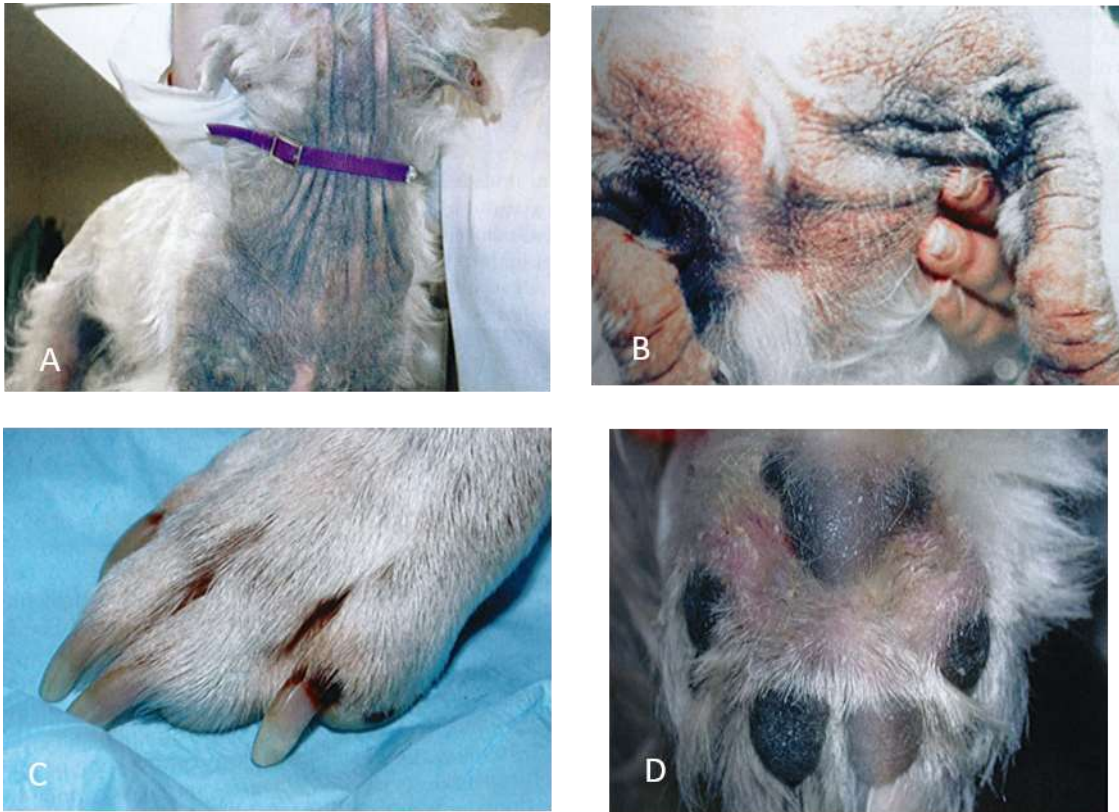


Figure 38 : Lésions de dermatite à *Malassezia* chez le chien (d'après Miller *et al.*, 2013b)

- A = Alopécie extensive avec un érythème, une lichénification et une hyperpigmentation au niveau du cou chez un West Highland White Terrier atteint de dermatite à *Malassezia*
- B = Erythème, alopécie et hyperpigmentation au niveau des zones axillaires et de la face dorsale des membres antérieurs chez un West Highland White Terrier atteint de dermatite à *Malassezia*
- C = Infection à *M. pachydermatis* au niveau des griffes d'un chien
- D = Erythème, œdème et squames au niveau des zones interdigités chez un Shih Tzu atteint de dermatite à *Malassezia*

La dermatite à *Malassezia* est plus rare chez les chats que chez les chiens. La prolifération des *Malassezia* est souvent secondaire à une affection sous-jacente (allergie cutanée, immunodéficience féline, diabète sucré, néoplasie). En particulier, la dermatite à *Malassezia* peut apparaître chez les chats atteints de thymome ou présentant une alopécie paranéoplasique. Elle se manifeste par un érythème, une séborrhée et une alopécie localisés ou généralisés. Elle peut être associée à une acné chronique du menton ou à des otites externes. (Miller *et al.*, 2013b ; Hnilica *et Patterson*, 2017)

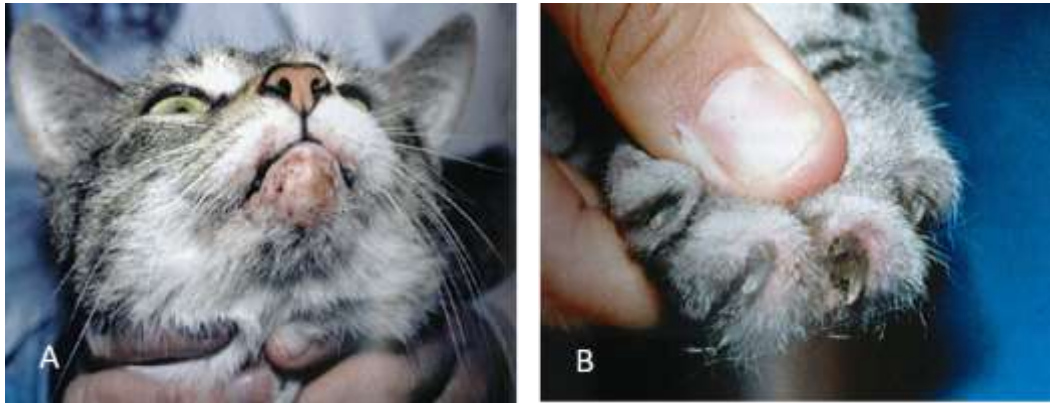


Figure 39 : Lésions de dermatite à *Malassezia* chez le chat (d'après Miller *et al.*, 2013b)

A = Acné due à *Malassezia pachydermatis* chez un chat

B = Périonyxis due à *Malassezia pachydermatis* chez un chat

## G. Diagnostic et traitement

Le diagnostic différentiel de la dermatite à *Malassezia* est large et inclut : les allergies, les dermatites de contact, les proliférations bactériennes de surface, les dermatophytoses, la démodécie, et le lymphome épithéliotrope. Le diagnostic peut être compliqué du fait de l'association de cette affection à d'autres dermatoses. (Miller *et al.*, 2013b ; Hnilica *et Patterson*, 2017)

Les examens complémentaires permettant de mettre en évidence *Malassezia* sont, par ordre de priorité : un examen cytologique, un examen histopathologique, une culture fongique et un test allergique permettant de conclure à une sensibilisation à *Malassezia*.

A l'examen cytologique, *Malassezia pachydermatis* a un diamètre variant entre 3 et 8  $\mu\text{m}$  et présente une forme caractéristique de bouteille avec un bourgeonnement unipolaire à base large. La valeur diagnostique de cet examen reste difficile à appréhender. En effet, une étude sur des chiens sains a montré que la plupart des individus présentent moins de dix *Malassezia* par échantillon de 1,25 cm<sup>2</sup>, mais cette valeur dépend du site corporel et de la race de chien. Ainsi, il n'existe pas de valeur seuil de micro-organismes à partir de laquelle il est possible d'établir le diagnostic de dermatite à *Malassezia*. Un essai thérapeutique concluant reste toujours nécessaire afin de confirmer le diagnostic.

L'examen histopathologique, par biopsies cutanées, montre une dermatite superficielle, périvasculaire à interstitielle, avec une hyperplasie irrégulière, une spongiose diffuse de l'épiderme et une exocytose de lymphocytes au sein de l'épiderme et des infundibulums folliculaires. Une parakératose est également présente, ainsi qu'un infiltrat inflammatoire dermique, dominé par des lymphocytes, des histiocytes et des plasmocytes. Les levures sont observables à la surface cutanée ou au niveau de l'infundibulum dans 70% des cas. Dans 14% des cas, on observe des micro-abcès éosinophiliques épidermiques et dans 47% des cas, des mastocytes sont alignés juste en dessous de la jonction dermo-épidermique. Des signes d'infection bactérienne concomitante sont fréquemment observés. Un test d'immunofluorescence révèle la présence d'immunoglobulines dans les espaces intercornéocytaires (10% des cas) ou au niveau de la jonction dermo-épidermique.

La culture de *Malassezia pachydermatis in vitro* est aisée (mise à part pour certaines souches) car il n'est pas nécessaire de compléter les milieux en lipides exogènes.

Néanmoins, du fait du statut commensal de cette levure, son isolement ne possède qu'une faible valeur diagnostique. Des cultures quantitatives pourraient être mises en place mais comme pour l'examen cytologique aucune valeur seuil n'a été déterminée.

En dernier lieu, un argument en faveur d'une dermatite à *Malassezia* peut être apporté par un essai thérapeutique. Chez certains chiens atteints de dermatite à *Malassezia*, les examens complémentaires précédemment cités révèlent la présence de levures en quantité négligeable, alors qu'il y a une réponse complète à la mise en place du traitement. (Miller *et al.*, 2013b ; Hnilica *et Patterson*, 2017)

Le traitement consiste en l'application de topiques antifongiques ou en l'administration d'antifongiques par voie systémique suivant la gravité des lésions, l'animal et la volonté des propriétaires. Le pronostic reste généralement bon. (Hnilica *et Patterson*, 2017)

Les dérivés azolés sont largement utilisés et ont prouvé leur efficacité. Néanmoins, les études *in vitro* montrent des sensibilités variables de *Malassezia* à ces agents antifongiques, comme décrit dans le tableau IX regroupant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différents antifongiques. Le kétoconazole, l'itraconazole, la terbinafine et le voriconazole ont les CMI les plus faibles. De plus, le kétoconazole et l'amphotéricine B sont les antifongiques permettant la plus grande réduction de l'activité métabolique des biofilms de *M. pachydermatis*, qui est un facteur important de virulence. Par contre, l'amphotéricine B n'est pas utilisée chez le chien compte tenu de sa voie d'administration intraveineuse et de sa néphrotoxicité. Dans l'étude de Brillhante *et al.* 2018, des valeurs seuils épidémiologiques (*Epidemiological cut-off values, ECV*, en anglais) permettent de séparer les souches de *M. pachydermatis* en une population de type sauvage et une population ayant acquis des mécanismes de résistance aux antifongiques. Les souches de *M. pachydermatis* présentant des mécanismes de résistance au fluconazole en ont également pour d'autres dérivés azolés, indiquant des mécanismes de résistance croisée. (Brilhante *et al.*, 2018)

**Tableau IX : CMI, ECV et nombres de souches de type non sauvages de *M. pachydermatis* des différents dérivés azolés dans l'étude de Brillhante *et al.* (2018)**

	Kétoconazole	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Terbinafine	Amphotéricine B
<b>CMI (µg/mL)</b>	0.25-16	2-64	0.03-8	0.03-4	0.03-0.25	1-16
<b>ECV (µg/mL)</b>	>32		>0.03	>0.25		
<b>Nombre de souches non sauvages</b>	10/25		11/25	13/25		

## II. Le statut pathogène de *Malassezia* lors de dermatite atopique (DA)

La dermatite atopique (DA) est une affection cutanée inflammatoire et prurigineuse, multifactorielle, à prédisposition génétique. Affectant aussi bien l'homme que le chien, sa pathogenèse reste incomplètement élucidée. La prévalence de la DA a triplé chez l'homme ces 30 dernières années, dans les pays industrialisés, en faisant un sujet d'actualité médicale et scientifique. La prévalence de la DA canine reste inconnue car son évaluation est soumise à de nombreux biais.

Actuellement, 3 théories concernant la pathogenèse de la DA sont débattues. La première, qualifiée de « *inside-outside* », implique des mutations génétiques à l'origine d'un dysfonctionnement du système immunitaire aboutissant à une réponse immunitaire polarisée LTh2 et une augmentation du taux d'IgE au contact d'allergènes inoffensifs. La deuxième théorie, plus récente et qualifiée de « *outside-inside* », propose que la pénétration d'allergènes, facilitée par une perturbation de la barrière cutanée chez les individus atteints de DA, induirait l'inflammation. Ces deux premières théories ne sont pas nécessairement exclusives mutuellement et se combinent afin de former la troisième théorie qualifiée de « *outside-inside-outside* ». Selon celle-ci, une perturbation de la barrière cutanée permet la pénétration d'allergènes et de micro-organismes qui stimulent de façon excessive l'immunité cutanée locale, cette stimulation déclenchant une réaction inflammatoire qui aggrave la perturbation de la barrière cutanée. (Elias *et al.*, 2008 ; Wolf *et Wolf*, 2012)

Les *Malassezia* peuvent contribuer de plusieurs manières à cette pathogenèse : soit en qualité d'allergènes, par un mécanisme primaire d'hypersensibilité encore incomplètement élucidé, soit par l'exacerbation des signes cliniques lors de prolifération de surface secondaire à la DA.

### A. Perturbation de la barrière cutanée lors de DA

L'étude de la perturbation de la barrière cutanée semble primordiale autant pour la médecine humaine que pour la médecine vétérinaire afin de mieux appréhender son rôle lors de dermatite atopique. Toutefois, il n'est pas évident de déterminer si cette perturbation est primaire ou secondaire à l'inflammation lors de DA. Il existe de nombreuses similitudes la concernant entre l'homme et le chien.

#### 1. Evaluation de l'imperméabilité de la barrière cutanée par la mesure de la Perte Insensible en Eau (PIE)

L'approche non invasive la plus usitée afin d'évaluer la fonction de barrière de l'épiderme est la mesure du TEWL (*TransEpidermal Water Loss* en anglais) ou de la PIE (Perte Insensible en Eau). Chez l'homme et le chien atteints de DA, en présence d'une peau lésionnelle ou d'une peau cliniquement indemne, ce paramètre est augmenté, ce qui est en faveur d'une altération primitive de la barrière cutanée. (Shimada *et al.*, 2009 ; Hightower *et al.*, 2009 ; Cornegliani *et al.*, 2011) En médecine humaine, plusieurs études ont montré que l'augmentation de la PIE est proportionnelle à la gravité des signes cliniques, chez des



individus atteints de DA. En médecine vétérinaire, les études ne s'accordent pas sur ce point. Zajac *et al.* (2014) démontrent une corrélation entre la mesure de la PIE et la gravité des signes cliniques au niveau de 5 zones corporelles, chez des chiens atteints de DA ; alors que l'étude rétrospective de Marsella, en 2012, avait échoué à prouver une telle corrélation. De plus, la mesure de la PIE canine possède des limites et une répétabilité parfois remise en question, du fait des variations mesurées entre différents sites corporels, entre différentes races et dans le temps.

## 2. Diminution du taux de céramides et de lipides épidermiques

Chez les chiens atteints de DA, l'augmentation de la PIE est associée à une diminution du taux de céramides de la couche cornée de l'épiderme. Chez l'homme atteint de DA, cette réduction est également observée et est considérée comme résultant d'une perturbation du métabolisme des lipides épidermiques, aboutissant à une altération de l'extrusion des corps lamellaires. Une étude montre que les taux de CER[EOS] et de CER[EOP] sont significativement plus faibles chez les chiens atteints de DA au niveau des zones corporelles sans lésion que chez les chiens sains. Par contre, le taux de cholestérol est relativement plus élevé chez les chiens atteints de DA. Ces résultats seraient compatibles avec une déficience primaire en céramides, puisque les zones sans lésion des individus atteints de DA sont des zones de moindre inflammation. La recherche de causes génétiques de cette déficience semble nécessaire afin de conclure à l'existence d'un défaut primaire ou secondaire. (Van Smeden *et al.*, 2014 ; Santoro *et al.*, 2015)

L'organisation lipidique des couches les plus externes de l'épiderme est également altérée en cas de DA. La continuité et l'épaisseur des lamelles lipidiques intercellulaires sont diminuées chez des chiens atteints de DA au niveau des zones sans lésion. L'organisation lamellaire et l'organisation latérale sont modifiées chez les individus atteints de DA : le pourcentage d'organisation hexagonale est notamment augmenté. (Van smeden *et al.*, 2014 ; Santoro *et al.*, 2015)

Une étude montre que la concentration en shingosine-1-phosphate est diminuée dans la peau de chiens atteints de DA comparée à celle de chiens sains. Ce sphingolipide est un composant important de la couche cornée qui possède à la fois un rôle structurel et un rôle de signalisation. (Bäumer *et al.*, 2011)

## 3. Altération de l'expression de la filaggrine

La filaggrine est une protéine qui permet l'agrégation des filaments de kératine et, ainsi, la formation d'une matrice filamenteuse au sein des cornéocytes. Des études en médecine humaine montrent que les mutations du gène de la filaggrine sont un facteur de prédisposition important de la DA. (Barker *et al.*, 2007 ; Morar *et al.*, 2007) Chez les chiens atteints de DA, l'expression de cette protéine est diminuée voir indétectable par des méthodes d'immunofluorescence utilisant des anticorps dirigés contre sa région C-terminale. Ces anomalies d'expression sont variables suivant la race. (Santoro *et al.*, 2015 ; Asahina *et Maeda*, 2017)

#### 4. Altération des jonctions serrées épidermiques

Les jonctions serrées, initialement décrites dans l'épithélium intestinal, forment une barrière imperméable à l'interface de la couche granuleuse et de la couche cornée. Elles sont, en partie, formées de protéines telles que les claudines et les occludines. Elles ferment les espaces interkératinocytaires et régulent le passage des molécules intercellulaires. Chez l'homme atteint de DA, ces jonctions sont altérées du fait de la réduction de l'expression de la claudine-1. Dans un premier modèle de la DA canine, l'expression de la claudine-1 est réduite dans l'épiderme. Dans un second modèle, ce sont les expressions de la protéine ZO-1 et de l'occludine qui le sont. Bien qu'il n'existe pas d'étude *in vivo* des protéines des jonctions serrées chez des chiens atteints de DA, ces modèles expérimentaux sont en faveur d'un dysfonctionnement de ces jonctions, de manière similaire à la DA humaine. (Asahina *et Maeda*, 2017)

#### 5. Modification de l'expression des PAM

Les peptides antimicrobiens (PAM) ont un rôle clé dans la protection de la peau et la modulation des réponses immunitaires, innée et adaptative. Le lien entre les PAM et les infections cutanées secondaires à la DA a été largement étudié en médecine humaine, mais débute dans l'espèce canine.

Chez l'homme atteint de DA, l'expression de plusieurs PAM est modifiée en zone lésionnelle : la hBD2, la hBD3, la RNase7 et la psoriasine sont surexprimées en comparaison d'un individu sain, alors que la dermcidine est sous-exprimée. Par contre, l'expression de ces PAM, en zone non lésionnelle, chez des individus atteints de DA, est similaire à celle chez des individus sains. D'après Leonard *et al.* (2012), les chiens atteints de DA présentent une expression augmentée de la cBD1 et une expression diminuée de la cBD103, mais ces résultats sont remis en cause par plusieurs autres études. Ainsi, de nouvelles études semblent nécessaires afin de comprendre le lien complexe entre les PAM, le microbiote cutané et la DA ; lien qui doit également dépendre de la race de chien, du génotype et du phénotype clinique. (Leonard *et al.*, 2012b ; Santoro *et al.*, 2015 ; Asahina *et Maeda*, 2017)

En définitive, de nombreuses anomalies, qualitatives et quantitatives, des protéines et des lipides de la couche cornée sont à l'origine d'un déficit de la fonction de barrière de l'épiderme et sont associées à l'apparition de lésions de DA. Ce défaut de la barrière cutanée pourrait expliquer la pénétration excessive d'allergènes à travers la peau, entre autres ceux de *Malassezia*. Néanmoins, toutes ces anomalies ne sont pas systématiquement retrouvées chez les individus atteints de DA et des anomalies similaires peuvent être présentes chez des individus ne souffrant pas de DA. Ainsi, la DA doit être considérée comme une maladie multifactorielle plutôt que comme une entité unique.

### **B. Réponse immunologique inappropriée**

De nombreuses réponses immunologiques inappropriées sont décrites chez les individus atteints de DA. La plupart des articles scientifiques suggèrent qu'elles sont secondaires à la perte de fonction protectrice de la barrière cutanée.



La quantité totale d'IgE chez les chiens atteints de DA et les chiens sains est similaire. La majorité des individus atteints de DA (70-80%) présentent des taux d'IgE spécifiques d'allergènes plus élevés. Par contre, certains chiens atteints de DA ne présentent pas de taux d'IgE spécifiques plus élevés ; alors que certains chiens sains présentent un taux plus élevé d'IgE spécifiques d'un allergène. Ainsi, l'augmentation des IgE chez les individus atteints de DA est à évaluer avec prudence car ils n'ont pas de rôle dans le déclenchement de la DA. (Miller *et al.*, 2013c)

La production de cytokines par les LTh1 et les LTh2 est très étudiée chez les individus atteints de DA. Chez l'homme, une présentation bimodale est prouvée. Les lésions de DA aiguës sont caractérisées par la présence de LTh2 CD4+, d'éosinophiles et la libération d'IL-4 et d'IL-13 ; alors que les lésions chroniques sont caractérisées par la présence de LTh1 et de cytokines de type Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  et IL-18). Toutefois, les études ne s'accordent pas toutes sur la définition des lésions aiguës et chroniques, introduisant un biais dans cette évaluation des profils cytokiniques. Les chimiokines jouent également un rôle important avec notamment la TARC (*Thymus and Activation-Regulated Chemokine* en anglais) dont le taux est directement corrélé à la sévérité de la maladie chez l'homme. Dans l'espèce canine, les études ne s'accordent pas toutes. Les cytokines de type Th2 sont prépondérantes dans les lésions de DA, mais cela n'exclut pas l'action de cytokines de type Th1. Un modèle est proposé par analogie avec l'homme : les cytokines de type Th2 interviendraient durant la phase d'initiation de la maladie et les cytokines de type Th1 permettraient la persistance de l'inflammation. (Miller *et al.*, 2013c)

Les allergènes mis en cause lors de DA sont variés. Ils sont majoritairement de 4 types : environnementaux, alimentaires, bactériens (*Staphylococcus*) et fongiques (*Malassezia*). Des auto-antigènes ont été mis en évidence chez les patients humains. Chez le chien, leur existence n'a pas été prouvée. (Olivry *et al.*, 2008) La pénétration des allergènes a lieu par voie transcutanée autant chez le chien que chez l'homme.

Toutes ces observations seraient en faveur d'une réaction d'hypersensibilité aux allergènes environnementaux qui pénètrent à travers une barrière cutanée altérée. Un dérèglement de la réponse lymphocytaire T serait à l'origine d'une synthèse accrue d'IgE (et probablement d'IgG), d'une prolifération initiale de LTh2 et d'une réaction retardée d'hypersensibilité de type IV prédominante avec une prolifération de LTh1.

Toutefois, les profils cytokiniques des lésions de DA, humaine et canine, seraient bien plus complexes que cette vision simplifiée, avec l'intervention de LTh22, LTh9 et LTh17, rendant l'étude de la seule balance Th1/Th2 obsolète. (Asahina *et Maeda*, 2017)

### **C. Rôles pathogènes de *Malassezia* lors de DA**

Les *Malassezia* peuvent contribuer de différentes manières à la pathogenèse de la DA, en agissant sur la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative. Elles peuvent également exacerber les mécanismes pro-inflammatoires lors de prolifération de *Malassezia* secondaire à une DA.

Un modèle de l'action de *Malassezia* lors de DA humaine est proposé par Glatz *et al.* (2015).

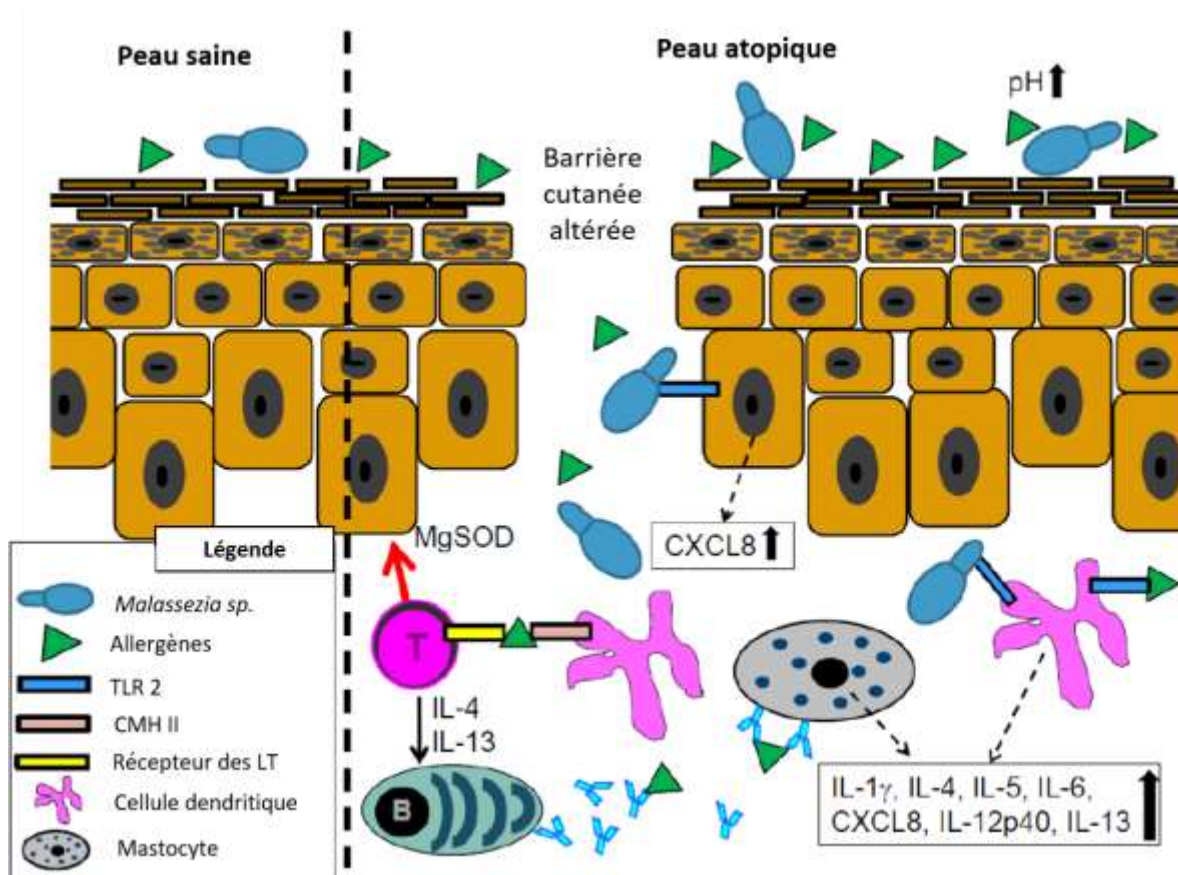


Figure 40 : Mécanismes par lesquels *Malassezia sp.* concourt à l'inflammation chez un individu atteint de DA (d'après Glatz *et al.*, 2015)

La flèche rouge désigne une auto-réaction des LT via la MgSOD (Superoxyde Dismutase au Manganèse).

Un lien entre les lésions de DA et la quantité de *Malassezia* est suggéré, chez le chien, par une méthode de culture semi-quantitative. La fréquence d'isolement des levures est élevée au niveau des espaces interdigités (70,7%), des oreilles (63,4%), des griffes (35,7%), de la bouche (33,3%), des conjonctives et des zones axillaires (23,8%), de l'anus (19%) et des glandes périanales (9,5%), sites qui correspondent aux localisations préférentielles des lésions de DA. (Nardoni *et al.*, 2007) Par contre, l'équipe de Meason-Smith, via des méthodes génomiques, ne parvient pas à détecter de différence significative d'abondance de *Malassezia* entre des chiens sains et des chiens atteints de DA. (Meason-Smith *et al.*, 2015) Ainsi, la prolifération de cette levure ne serait pas forcément nécessaire à son rôle pathogène.

Des injections intradermiques d'extraits de *Malassezia* provoquent des réactions positives chez des chiens atteints de DA, suggérant que les protéines des *Malassezia* pourraient agir en tant qu'allergènes. D'autres observations sont en faveur de cette hypothèse. Notamment, le fait que les chiens atteints de DA possèdent globalement des taux d'IgE anti-*Malassezia* plus importants que les chiens sains et que les taux sériques d'IgA

et d'IgG anti-*Malassezia* soient également plus élevés chez les chiens atteints de DA, reflétant une sensibilisation. (Kim *et al.*, 2010 ; Santoro *et al.*, 2015)

Chez l'homme, neuf allergènes de *Malassezia furfur* sont identifiés avec des poids moléculaires de 37 ; 21 ; 20 ; 35 ; 18,2 ; 17,2 ; 16,2 ; 19,2 et 14 kDa respectivement. Chez les chiens atteints de DA, Chen *et al.* (2002) démontrent que les allergènes sont des protéines de *Malassezia pachydermatis* de poids moléculaires de 45, 52, 56 et 63 kDa. Comme ces protéines sont reconnues chez plus de 50% des chiens atteints de DA mais chez une minorité de chiens sains, elles sont qualifiées d'allergènes majeurs. D'autres protéines de poids moléculaires de 26, 48 et 60 kDa sont qualifiées d'allergènes mineurs. Les allergènes de poids moléculaires 45 et 48 kDa semblent être les plus pertinents, car ils sont reconnus chez la plupart des chiens atteints de DA mais chez un faible nombre de chiens sains. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer exactement la nature des protéines isolées dans cette étude. (Chen *et al.*, 2002). En outre, une étude similaire, basée sur la réponse immunitaire en IgG à des extraits de *Malassezia pachydermatis*, menée par Kim *et al.* (2010), a permis l'identification d'une protéine, dont le poids moléculaire est de 98 kDa, reconnue par un nombre de chiens atteints de DA significativement supérieur. (Kim *et al.*, 2010)

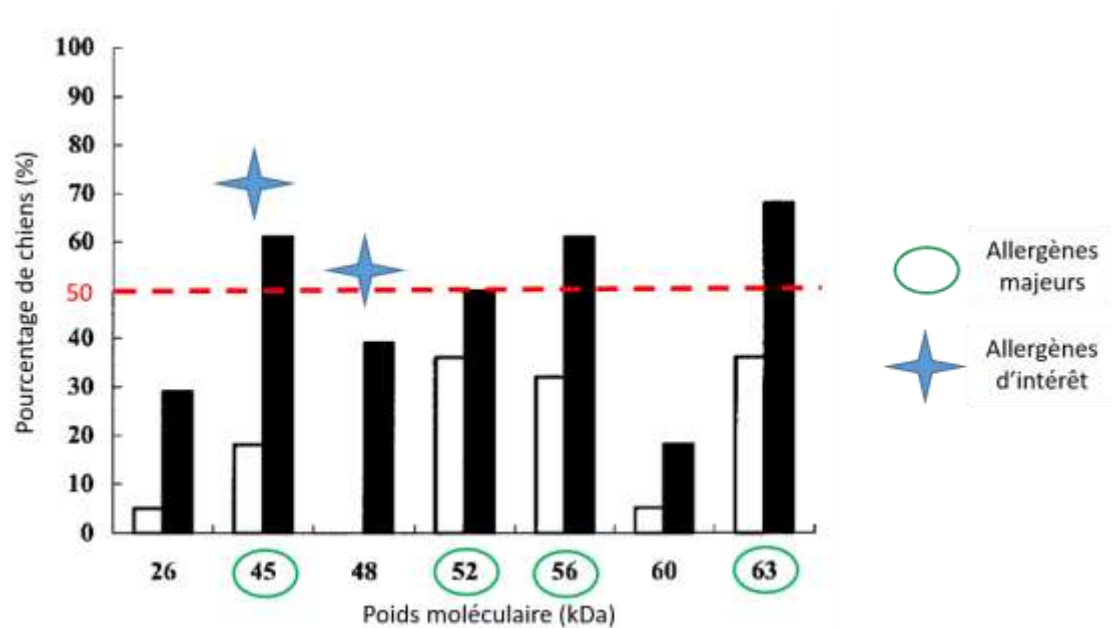


Figure 41 : Graphique représentant le pourcentage de chiens de deux groupes (sains en blanc et atteints de dermatite atopique en noir) montrant un lien entre les IgE et les protéines provenant des extraits de *M. pachydermatis* (d'après Chen *et al.*, 2002)

Le dérèglement de la réponse lymphocytaire T est un composant important de la théorie physiopathologique de la DA. Chez l'homme, une réponse lymphocytaire blastogénique accrue est démontrée au contact d'extraits de *M. furfur* chez les individus atteints de DA. L'effet de *Malassezia* sur la réponse immunitaire cellulaire reste incomplètement élucidé dans l'espèce canine. Une seule étude montre une réponse lymphocytaire blastogénique accrue au contact d'extraits de *M. pachydermatis* chez les chiens atteints de DA avec des preuves cytologiques de dermatite à *Malassezia* concomitante, comparée à celle chez des chiens sains ou atteints d'otites externes à *Malassezia*. (Morris *et al.*, 2002)

Historiquement, il est établi que les hommes et les chiens atteints de DA présentent des infections cutanées bactériennes secondaires récurrentes, mais également des infections cutanées fongiques secondaires (notamment à *Malassezia*). La relation entre les infections cutanées et l'exacerbation des signes cliniques de la DA est complexe et incomplètement élucidée. De nombreuses études en médecine humaine ont montré une corrélation entre les infections cutanées et la sévérité de la DA, suggérant un effet direct des micro-organismes sur le système immunitaire. Cela est bien moins étudié chez nos carnivores domestiques. (Petry *et al.*, 2012 ; Santoro *et al.*, 2015)

*Malassezia* serait à l'origine de l'induction d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire chez l'homme qui participerait à maintenir l'inflammation lors de DA. La première hypothèse repose sur le fait que la perturbation de la barrière cutanée lors de DA faciliterait le contact entre *Malassezia* et les cellules de l'épiderme et du derme (kératinocytes, cellules de Langerhans, cellules dendritiques, cellules NK, fibroblastes). La deuxième hypothèse fait référence à des protéines de *Malassezia* qui seraient immunogènes. Ces protéines seraient libérées par l'intermédiaire de nano vésicules et stimuleraient la libération de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 et IL-12 par les cellules dendritiques et les mastocytes. Certains auteurs suggèrent que la communication entre *Malassezia* et les cellules immunitaires de l'hôte seraient médiée par les TLR. (Glatz *et al.*, 2015)

L'étude de Kobayashi *et al.* (2011) montre que le groupe de *Malassezia pachydermatis* prépondérant, isolé à 91% chez les chiens atteints de DA, est le groupe 3D. Il s'agit du groupe possédant la production de phospholipase A2, facteur de virulence prépondérant dont le rôle est décrit dans la partie 3-I, la plus élevée. (Kobayashi *et al.*, 2011) Les facteurs de virulence de *Malassezia* sont également mis en cause lors de prolifération de *Malassezia* secondaire à une DA.

#### **D. Présentation et diagnostic cliniques de la DA canine**

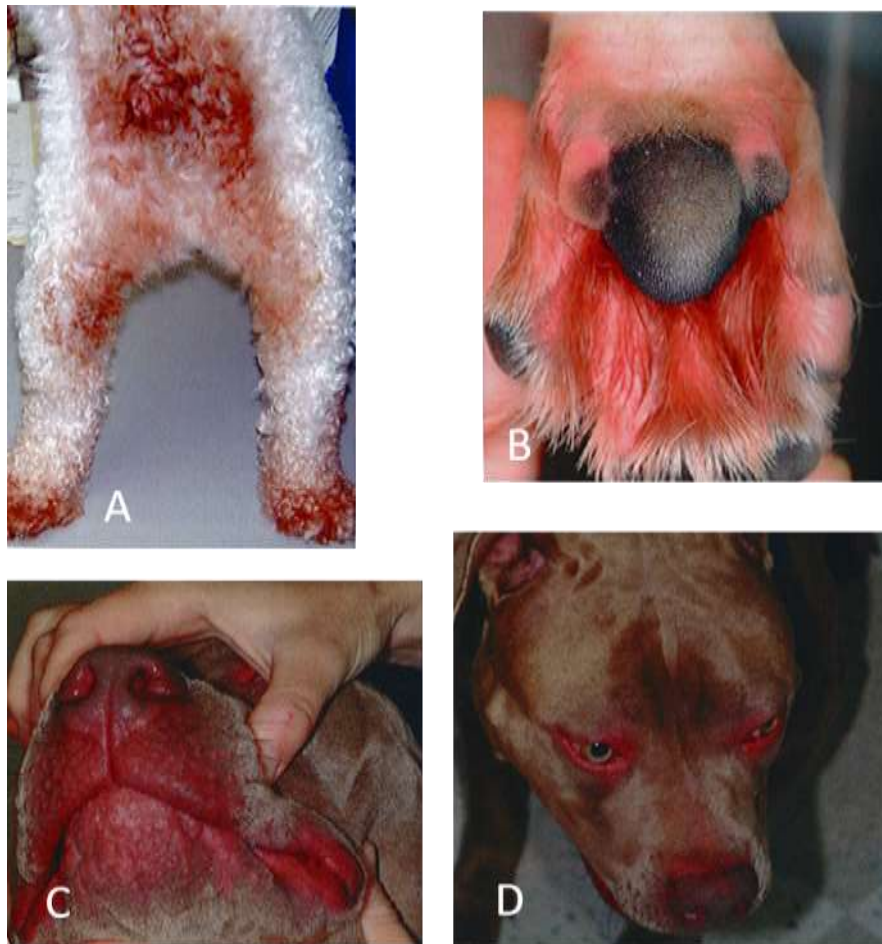
L'âge d'apparition des symptômes se situe entre 1 et 3 ans. Cependant, des cas sont décrits chez des animaux plus jeunes ou plus âgés. De nombreux facteurs modulent cet âge d'apparition, notamment la race de chien et le milieu de vie. En effet, des chiens sensibles, en présence de pollens et sous des climats tempérés, ont un risque élevé de développer une DA. Les signes cliniques peuvent être saisonniers dans un premier temps, puis être présents toute l'année au fur et à mesure de l'évolution de l'affection. (Miller *et al.*, 2013c)

Les races prédisposées à la DA sont : le Beauceron, le Boston Terrier, le Boxer, le Cairn Terrier, le Shar-Pei, le Cocker Spaniel, le Dalmatien, le Bouledogue Anglais, le Setter Anglais, le Fox Terrier, l'Irish Terrier, le Labrador, le Berger des Pyrénées, le Lhasa Apso, le Schnauzer nain, le Carlin, le Scottish Terrier, le Sealyham Terrier, le West Highland White Terrier et le Yorkshire Terrier. Il n'existe par contre pas de prédisposition de sexe. (Miller *et al.*, 2013c)

Les lésions cutanées affectent, principalement, les régions ventrales dépourvues de poils : régions axillaires, inguinales et interdigitées. Elles sont également localisées au museau, aux zones périoculaires, aux pavillons auriculaires et aux coudes.

La DA est, avant tout, une dermatose prurigineuse. Les lésions primaires (papules) sont rares car elles apparaissent seulement lors des premières expositions de l'animal aux

allergènes. Lors des expositions suivantes, la lésion primaire la plus souvent observée est un érythème. La DA canine est une maladie dynamique : non seulement de gravité variable selon les individus mais aussi au cours de la vie d'un même individu. D'autres signes cliniques peuvent être observés : une conjunctivite, des otites, des remaniements du fait du caractère prurigineux de l'affection (coloration des poils, lichénification, hyperpigmentation, squamosis, excoriations et croûtes). Les chiens atteints de DA sont susceptibles de développer des infections secondaires (bactériennes et fongiques). La séborrhée, rapportée chez les chiens atteints de DA, est due, en partie, aux infections secondaires, notamment à la dermatite à *Malassezia*. (Miller *et al.*, 2013c)



**Figure 42 : Lésions de dermatite atopique chez le chien (d'après Miller *et al.*, 2013c)**

**A = Lésions de DA en régions ventrales, inguinales et interdigitées visualisables par une coloration des poils du fait de léchage chez un chien**

**B = Lésions de DA en régions interdigitées chez un chien**

**C = Lésions de DA au niveau du museau chez un chien**

**D = Lésions de DA péri oculaires chez un chien**

Le diagnostic de la DA est clinique. Il est basé sur l'anamnèse, les commémoratifs, les signes cliniques et surtout l'exclusion des autres causes de prurit. Des critères de diagnostic sont proposés tant en médecine humaine que vétérinaire. Historiquement, Willemse a mis en place des critères majeurs et mineurs de diagnostic de la DA canine, adaptés de l'allergologie humaine. D'autres critères ont été proposés par Prélaud *et al.*. Actuellement les critères reconnus, internationalement, sont ceux de Favrot *et al.* détaillés dans le tableau

X. Certains critères reprennent ceux précédemment utilisés, mais ces groupes de critères ont une meilleure spécificité et sensibilité. En pratique courante, Favrot *et al.* proposent d'utiliser le premier groupe de critères (au minimum 5 critères positifs afin de suspecter une DA). (Favrot *et al.*, 2010 ; Miller *et al.*, 2013c)

**Tableau X : Ensemble de critères de diagnostic de la DA canine (d'après Favrot *et al.*, 2010)**

Premier groupe	Second groupe
1. Apparition des signes cliniques avant 3 ans	1. Apparition des signes cliniques avant 3 ans
2. Vit principalement à l'intérieur	2. Vit principalement à l'intérieur
3. Prurit corticosensible	3. Prurit non lésionnel initial
4. Dermatite à <i>Malassezia</i> chronique ou récidivante	4. Atteinte des membres antérieurs
5. Atteinte des membres antérieurs	5. Atteinte des pavillons auriculaires
6. Atteinte des pavillons auriculaires	6. Absence d'atteinte du bord des pavillons auriculaires
7. Absence d'atteinte du bord des pavillons auriculaires	7. Absence d'atteinte de la zone dorso-lombaire
8. Absence d'atteinte de la zone dorso-lombaire	

**Tableau XI : Spécificité et sensibilité des groupes de critères provenant des différentes études (d'après Favrot *et al.*, 2010)**

			Sensibilité	Spécificité
Critères de Willemse			49,3%	80,2%
Critères de Prélaud			74,3%	68,4%
Critères de Favrot	5 critères positifs	Groupe 1	85,4%	79,1%
		Groupe 2	77,2%	83%
	6 critères positifs	Groupe 1	58,2%	88,5%
		Groupe 2	42%	93,7%

Malgré l'existence de ces critères, il peut être nécessaire de mettre en place un diagnostic d'exclusion. Comme le premier signe clinique de DA est un prurit et que les complications secondaires sont fréquentes, le diagnostic différentiel inclut toutes les dermatoses prurigineuses : les hypersensibilités (dermatite par allergie aux piqûres de puces (DAPP), dermatite de contact), la dermatite à *Malassezia* primaire, la prolifération bactérienne de surface et les ectoparasitoses (gale sarcoptique, démodécie, thrombiculose). Les examens complémentaires (examen direct et cytologique) doivent être réalisés en routine, afin de diagnostiquer les infections secondaires, pouvant péjorer le pronostic et devant être prises en compte au moment du traitement. (Miller *et al.*, 2013c)

Les tests allergologiques ne sont pas diagnostiques, mais ils renseignent sur les allergènes, éventuellement en cause, pour la mise en place d'une immunothérapie spécifique. Il en existe 2 types : les tests cutanés intradermiques *in vivo* et les tests sérologiques mettant en évidence des IgE spécifiques de l'allergène *in vitro* par la méthode RAST (*Radio Allergo Sorbent Test*) ou ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). (Miller *et al.*, 2013c ; Oldenhoff *et al.*, 2014)



## **E. Approche thérapeutique de la DA canine et des proliférations de *Malassezia* secondaires**

En 2010, l'ITFCAD (*International Task Force on Canine Atopic Dermatitis* en anglais) publie le premier consensus sur la prise en charge thérapeutique de la DA canine. Depuis lors, une révision a eu lieu en 2015, afin de prendre en compte l'évolution des traitements et de la maladie.

Le traitement de la DA est complexe et requiert la combinaison de plusieurs outils thérapeutiques, afin d'optimiser les chances de la réguler. Il est à adapter à chaque patient en fonction du stade de l'affection, de sa gravité et de la distribution des lésions. Le traitement spécifique nécessiterait l'éviction des allergènes, ce qui est peu réalisable en pratique. (Olivry *et al.*, 2015)

En cas de lésions aiguës de DA, un traitement à base de shampoings doux, afin d'améliorer la protection cutanée, et de molécules antiprurigineuses (glucocorticoïdes topiques voir systémiques ou oclacitinib) doit être mis en place. Les shampoings avec une formulation émoullissante sont à privilégier (Douxo Calm® et Allermyl®) et leur fréquence est à adapter au patient. Lors de traitements de longue durée, au niveau d'une zone précise, l'atrophie cutanée est un effet indésirable des glucocorticoïdes topiques. De la prednisolone, de la prednisone ou de la méthylprednisolone *per os* (PO) peuvent être prescrites à la posologie de 0,5 mg/kg/j, en une ou deux prises, pendant une courte période. En cas de traitement de longue durée, les effets délétères classiques de la corticothérapie se manifestent. Les injections de glucocorticoïdes à longue durée d'action sont contre-indiquées. L'oclacitinib peut être prescrit à la posologie de 0,4 à 0,6 mg/kg deux fois par jour (BID) pendant 14 jours, avec une réévaluation de l'animal, puis elle peut être réduite à 0,4 à 0,6 mg/kg SID. L'utilisation d'antihistaminiques ne possède pas d'efficacité prouvée : le seul bénéfice clinique proviendrait de leur effet sédatif. (Olivry *et al.*, 2015)

En cas de lésions chroniques de DA, il faut privilégier une utilisation plus fréquente de shampoings, une supplémentation en acides gras essentiels, l'utilisation de molécules antiprurigineuses (ciclosporine PO ou oclacitinib PO). L'effet bénéfique des acides gras essentiels (en particulier des oméga-6) n'est visible qu'au bout de 2 mois de supplémentation. Il est donc nécessaire de combiner cette dernière avec d'autres approches thérapeutiques. Les glucocorticoïdes et l'oclacitinib ont un délai d'action plus court que la ciclosporine, mais cette dernière peut être combinée avec l'administration de prednisolone PO les trois premières semaines de traitement afin de réduire ce délai. La posologie initiale de la ciclosporine est de 5 mg/kg une fois par jour (SID) jusqu'au contrôle des lésions (environ 4-6 semaines), ensuite, la posologie ou la fréquence d'administration peuvent être diminuées en fonction du patient. (Olivry *et al.*, 2015)

L'application d'un spray à base d'acéponate d'hydrocortisone, deux fois par semaine, localement sur les zones cutanées indemnes, chez des chiens atteints de DA, peut différer l'apparition de nouvelles lésions au niveau de ces zones, sans risque d'atrophie cutanée. (Olivry *et al.*, 2015)

L'immunothérapie consiste en l'injection à doses croissantes d'allergènes spécifiques, chez un individu allergique, afin de réduire les signes cliniques par une exposition continue à

ces allergènes. Cette méthode est considérée comme sans danger et, plus ou moins, efficace. Elle peut induire de rares effets secondaires (prurit, urticaire, angioedème, anxiété, hyperactivité, anaphylaxie). Comme la réponse clinique est différée dans le temps, l'immunothérapie doit être faite au moins pendant 1 an, pour évaluer son efficacité et des traitements adjuvants restent nécessaires au début du traitement. (Colombo *et al.*, 2007 ; Olivry *et al.*, 2015 ; Aberg *et al.*, 2017)

L'efficacité de l'immunothérapie à l'aide d'extraits de *Malassezia* uniquement, chez des chiens atteints de DA avec une hypersensibilité aux *Malassezia*, est étudiée par Aberg *et al.* (2017) dans une étude rétrospective : 56% des chiens présentent une réponse satisfaisante à l'immunothérapie, avec une réduction de plus de 50% des traitements adjuvants (antifongiques et anti-inflammatoires), et d'après les propriétaires, ils présentent également une réduction du prurit de plus de 50%. Ces résultats sont concordants avec les études sur l'immunothérapie contre d'autres allergènes environnementaux. Néanmoins, la plupart des chiens atteints de DA sont sensibles à plusieurs allergènes environnementaux, bactériens et fongiques. De nouvelles études sont ainsi nécessaires, afin d'évaluer dans quelle mesure l'ajout d'extraits de *Malassezia* à leur protocole d'immunothérapie serait bénéfique. (Aberg *et al.*, 2017)

Outre la gestion thérapeutique de la DA canine, le clinicien doit également traiter les infections concomitantes et notamment les proliférations de *Malassezia* secondaires à la DA. Dans leur étude, Colombo *et al.* (2007) montrent que les chiens atteints de DA traités par immunothérapie requièrent des traitements additionnels. Sur une période de 9 mois, 74% des chiens sont traités pour une prolifération bactérienne de surface, 67% pour une dermatite à *Malassezia*, 30% pour des otites avec prolifération bactériennes ou fongiques et 30% avec des glucocorticoïdes afin de gérer le prurit. (Colombo *et al.*, 2007) Les chiens sont souvent mis sous traitements antifongiques systémiques au long court ou avec des posologies élevées. Les molécules le plus souvent utilisées sont des dérivés azolés, notamment le kétoconazole et l'itraconazole.

Dans leur étude, Cafarchia *et al.* (2012) ont évalué la sensibilité *in vitro* de *M. pachydermatis*, isolé chez des chiens sains ou atteints de DA, à différents dérivés azolés en calculant les CMI correspondantes. L'itraconazole, le kétoconazole et le posaconazole ont une meilleure activité sur les souches de *M. pachydermatis* que le miconazole, la terbinafine et le fluconazole. Les CMI sont généralement plus élevées chez les individus atteints de DA avec des lésions cutanées que chez les chiens sains. En effet, les chiens atteints de DA sont exposés de manière prolongée aux traitements antifongiques et peuvent donc développer des résistances. De plus, les souches résistantes au fluconazole, chez les chiens atteints de DA, ont également une résistance ou une sensibilité intermédiaire aux autres dérivés azolés, ce qui serait en faveur de résistances croisées entre les dérivés azolés. (Cafarchia *et al.*, 2012) Des résultats similaires sont avancés par l'équipe de Watanabe *et al.* (2013) concernant la population canine de l'Est de l'Asie. Ainsi, la mise en place d'un traitement antifongique, chez les chiens atteints de DA, requiert une évaluation attentive du choix de la molécule et de la voie d'administration, en particulier en cas de non réponse à un précédent traitement ou d'infections cutanées récurrentes.



## CONCLUSION

Là où les méthodes de culture fongique échouaient à traduire la diversité et la composition relative du mycobiote, les avancées dans le domaine de la métagénomique le permettent. Deux approches différentes s'opposent : la métagénomique ciblée via le séquençage d'amplicons et la métagénomique globale via la méthode *Shotgun*. Bien que cette dernière soit plus informative en termes de résolution taxonomique et de caractérisation du fonctionnement du mycobiote, sa mise en place requiert encore trop de moyens techniques et financiers.

L'objectif de notre étude bibliographique était de répertorier les micro-organismes fongiques appartenant aux mycobiotés des individus humains, félins et canins, en bonne santé, en vue, dans un second temps, d'améliorer notre compréhension des changements de ces mycobiotés lors de maladies cutanées. Chez l'homme, le mycobiote cutané, de la majorité des sites corporels, est dominé par le genre *Malassezia*, à l'exception des pieds qui sont colonisés par des communautés fongiques plus diverses. Au contraire de celui de l'être humain, le mycobiote cutané de nos carnivores domestiques présente une composition similaire entre les différents sites corporels mais une variabilité interindividuelle et une diversité importantes, les genres les plus abondants étant *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Cryptococcus* et *Malassezia*. Ces derniers, à l'exception de *Malassezia*, sont omniprésents dans l'environnement et pourraient constituer des membres transitoires de la flore cutanée, qui ne peuvent être distingués des micro-organismes commensaux par les méthodes d'étude génomique. Enfin, la composition du mycobiote cutané semble influencée par de nombreux facteurs.

Notre travail montre que la peau est un organe dynamique qui régule sa propre colonisation par les micro-organismes fongiques. En érigeant une barrière, à la fois physique, chimique et immunitaire, la peau se protège des agents pathogènes. En outre, les membres du mycobiote cutané entretiendraient, plus qu'une relation commensale, une relation mutualiste, avec leur hôte puisqu'elle confère à ce dernier une véritable protection contre les pathogènes. Par le biais de mécanismes encore incomplètement élucidés, les micro-organismes commensaux interviendraient dans l'éducation du système immunitaire de l'hôte, dans la sécrétion de substances antimicrobiennes et dans un phénomène de compétition avec les agents pathogènes.

Les exemples de *Malassezia*, lors de dermatite à *Malassezia* primaire ou lors de dermatite atopique chez le chien, montrent que certains agents commensaux peuvent, sous certaines conditions, devenir pathogènes opportunistes. La question de savoir si le mycobiote cutané est un ami ou un ennemi reste en suspens !



# BIBLIOGRAPHIE

ABERG L, VARJONEN K, AHMAN S (2017). Results of allergen-specific immunotherapy in atopic dogs with *Malassezia* hypersensitivity: a retrospective study of 16 cases. *Vet Dermatol*, 28, pp. 633–e157.

AGEITOS JM, SANCHEZ-PEREZ A, CALO-MATA P, VILLA TG (2017). Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol*, 133, pp. 117-138.

AKIYAMA M (2017). Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *J Dermatol Sci*, 88, pp. 3-9.

ANGELBECK-SCHULZE M, MISCHKE R, HEWICKER-TRAUTWEIN M, NAIM HY, BÄUMER W (2014). Canine epidermal lipid sampling by skin scrub revealed variations between different body sites and normal and atopic dogs. *BMC Vet Res*, 10(152), pp. 1-10.

AKAZA N, AKAMATSU H, SASAKI Y, TAKEOKA S, KISHI M, MIZUTANI H, SANO A, HIROKAWA K, NAKATA S, MATSUNAGA K (2010). Cutaneous *Malassezia* microbiota of healthy subjects differ by sex, body part and season. *J Dermatol*, 37, pp. 786-792.

ASAHINA R, MAEDA S (2017). A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Vet Dermatol*, 28, pp. 16-e5.

BARKER JNWN, PALMER CNA, ZHAO Y, LIAO H, HULL PR, LEE SP, ALLEN MH, MEGGITT SJ, REYNOLDS NJ, TREMBATH RC, MCLEAN WHI (2007). Null Mutations in the Filaggrin Gene (FLG) Determine Major Susceptibility to Early-Onset Atopic Dermatitis that Persists into Adulthood. *J Invest Dermatol*, 127, pp. 564-567.

BARNARD E, LI H (2017). Shaping of cutaneous function by encounters with commensals. *The J Physiol*, 595(2), pp. 437-450.

BARONI A, BUOMMINO E, DE GREGORIO V, RUOCCO E, RUOCCO V, WOLF R (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 30, pp. 257-262.

BÄUMER W, ROSSBACH K, MISCHKE R, REINES I, LANGBEIN-DETSCH I, LÜTH A, KLEUSER B (2011). Decreased Concentration and Enhanced Metabolism of Sphingosine-1-Phosphate in Lesional Skin of Dogs with Atopic Dermatitis : Disturbed Sphingosine-1-Phosphate Homeostasis in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 131, pp. 266-268.

BELKAID Y, SEGRE JA (2014). Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*, 346(6212), pp. 954-959.

- BOND R, STEVENS K, PERRINS N, AHMAN S (2008). Carriage of *Malassezia* spp. yeasts in Cornish Rex, Devon Rex and Domestic short-haired cats: a cross-sectional survey. *Vet Dermatol*, 19(5), pp. 299-304.
- BONIFAZI P, ZELANTE T, D'ANGELO C, DE LUCA C, MORETTI S, BOZZA S, PERRUCCIO K, IANNITTI RG, GIOVANNINI G, VOLPI C, FALLARINO F, PUCCHETTI P, ROMANI L (2009). Balancing inflammation and tolerance *in vivo* through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*. *Mucosal Immunol*, 2(4), pp. 362-374.
- BOYANOWSKI KJ, IHRKE PJ, MORIELLO KA, KASS PH (2000). Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific coastal USA. *Vet Dermatol*, 11, pp. 143-150.
- BRANDWEIN M, BENTWICH Z, STEINBERG D (2017). Endogenous Antimicrobial Peptide Expression in Response to Bacterial Epidermal Colonization. *Front Immunol*, 8 (1637), pp. 1-7.
- BRILHANTE RSN, ROCHA MGD, GUEDES GMM, OLIVEIRA JS, ARAUJO GDS, ESPANA JDA, SALES JA, AGUIAR L, PAIVA MAN, CORDEIRO RA, PEREIRA-NETO WA, PINHEIRO AQ, CASTELO-BRANCO DSCM, ROCHA MFG (2018). *Malassezia pachydermatis* from animals: Planktonic and biofilm antifungal susceptibility and its virulence arsenal. *Vet Microbiol*, 220, pp. 47–52.
- BROWN GD (2011). Innate antifungal immunity : the key role of phagocytes. *Annu Rev Immunol*, 29, pp.1-21.
- BUOMMINO E, NOCERA FP, PARISA A, RIZZO A, DONNARUMMA G, MALLARDO K, FIORITO F, BARONI A, DE MARTINO L (2016). Correlation between genetic variability and virulence factors in clinical strains of *Malassezia pachydermatis* of animal origin. *New Microbiol*, 39 (3), pp. 216-223.
- BYRD AL, BELKAID Y, SEGRE JA (2018). The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 16(3) pp. 143-155.
- CAFARCHIA C, FIGUEREDO LA, IATTA R, MONTAGNA MT, OTRANTO D (2012). *In vitro* antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet Microbiol*, 155, pp. 395–398.
- CAMPBELL JJ, COYNER KS, RANKIN SC, LAWIS TP, SCHICK AE, SHUMAKER AK (2010). Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. *Vet Dermatol*, 21, pp.619-625.
- CHEN T-A, HALLIWELL REW, PEMBERTON AD, HILL PB (2002). Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Vet Dermatol*, 13, pp. 141-150.
- COLOMBO S, HILL PB, SHAW DJ, THODAY KL (2007). Requirement for additional treatment for dogs with atopic dermatitis undergoing allergen-specific immunotherapy. *Vet Rec*, 160, pp. 861-864.

CORNEGLIANI L, VERCELLI A, SALA E, MARSELLA R (2011). Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative preliminary study. *Vet Dermatol*, 23, 41–e10.

D'ARGENIO V (2018). Human Microbiome Acquisition and Bioinformatic Challenges in Metagenomic Studies. *Int J Mo. Sci*, 19(383), pp. 1-12.

DIAZ PI, HONG B, DUPUY AK, STRAUSBAUGH LD (2017). Mining the oral mycobiome: Methods, components, and meaning. *Virulence*, 8(3), pp. 313-323.

DRAKE DR, BROGDEN KA, DAWSON DV, WERTZ PW (2008). Antimicrobial lipids at the skin surface. *J Lipid Res*, 49, pp. 1-8.

ELIAS PM, GRUBER RG, CRUMRINE D, MENON G, WILLIAMS ML, WAKEFIELD JS, HOLLERAN WM, UCHIDA Y (2014). Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE). *Biochim Biophys Acta*, 1841, pp. 314-318.

ELIAS PM, HATANO Y, WILLIAMS ML (2008). Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 121(6), pp. 1337-1343.

FAVROT C, STEFFAN J, SEEWALD W, PICCO F (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol*, 21, pp. 23–31.

FEINGOLD KR, ELIAS PM (2014). Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta*, 1841, pp. 280-294.

FERETTI P, FARINA S, CRISTOFOLINI M, GIROLOMONI G, TETT A, SEGATA N (2016). Experimental metagenomics and ribosomal profiling of the human skin microbiome. *Exp Dermatol*, 26, pp. 211-219.

FIGUEREDO LA, CAFARCHIE C, DESANTIS S, OTRANTO D (2012). Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet Microbiol*, 160, pp. 126–131.

FINDLEY K, OH J, YANG J, CONLANS, DEMING C, MEYER JA, SCHOENFELD D, NOMICOS E, PARK M, NISC Comparative Sequencing Program, KONG HH, SEGRE JA (2013). Human Skin Fungal Diversity. *Nature*, 498(7454), pp. 1-16.

FISCHER CL, BLANCHETTE DR, BROGDEN KA, DAWSON DV, DRAKE DR, HILL JR, WERTZ PW (2014). The roles of cutaneous lipids in host defense. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), pp. 319-322.

GAITANIS G, VELEGRAKI A, MAYSER P, BASSUKAS ID (2013). Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts : Facts and controversies. *Clin Dermatol*, 31, pp. 455–463.

GALLO RL, HOOPER V (2012). Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol*, 12(7), pp. 503–516.

Genomic Standards Consortium. Genomic Standards Consortium, URL : <http://gensc.org/> [consulté le 14 mars 2018]

GLATZ M, BOSSHARD PP, HOETZENECKER W, SCMIDT-GRENDELMEIER P (2015). The Role of *Malassezia* spp. in Atopic Dermatitis. *J Clin Med*, 4(6), pp. 1217–1228.

GUENICHE A, KNAUDT B, SCHUCK E, VOLZ T, BASTIEN P, MARTIN R, RÖCKEN M, BRETON L, BIEDERMANN T (2008). Effects of nonpathogenic gram-negative bacterium *Vitreoscilla filiformis* lysate on atopic dermatitis : a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Br J Dermatol*, 159, pp.1357-1363.

HAMAD M (2011). Innate and adaptive antifungal immune responses: partners on an equal footing. *Mycoses*, 55, pp. 205-217.

HIGHTOWER K, MARSELLA R, FLYNN-LURIE A (2009). Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 21, pp. 89-96.

HNILICA KA, PATTERSON AP. Chapter 4 : Fungal Skin Diseases. *Small Animal Dermatology – A Color Atlas and Therapeutic Guide*. St. Louis, Mo : Elsevier, 2017, 94-101.

HUFFNAGLE GB, NOVERR MC (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol*, 21(7), pp. 334-341.

IFRIM DC, JOOSTEN LAB, KULLBERG B-J, JACOBS L, JANSEN T, WILLIAMS DL, GOWS NAR, VAN DER MEER JWM, NETEA MG, QUINTIN J (2013). Candida albicans Primes TLR Cytokine Responses through a Dectin-1/Raf-1–Mediated Pathway. *Journal of Immunol*, 190(8), pp. 4129-4135.

JO J-H, KENNEDY EA, KONG HH (2017). Topographical and physiological differences of the skin mycobiome in health and disease. *Virulence*, 8(3), pp. 324-333.

JO J-H, DEMING C, KENNEDY EA, CONLAN S, POLLEY EC, NG W-I, NISC Comparative Sequencing Program, SEGRE JA, KONG HH (2016). Diverse human skin fungal communities in children converge in adulthood. *J Invest Dermatol*, 136(12), pp. 2356-2363.

KANEKO T, MAKIMURA K, ABE M, SHIOTA R, NAKAMURA Y, KANO R, HASEGAWA A, SUGITA T, SHIBUYA S, WATANABE S, YAMAGUCHI H, ABE S, OKAMURA N (2007). Revised Culture-Based System for Identification of *Malassezia* Species. *J Clin Microbiol*, 45(11), pp. 3737-3742.

KHOSRAVI AR (1996). Fungal flora of the hair coat of stray cats in Iran. *Mycoses*, 39, pp. 241-243.

- KIM HJ, KIM ET, LIM CY, PARK C, KANG BT, KIM JW, YOO JH, PARK HM (2010). The immunoglobulin G response to *Malassezia pachydermatis* extracts in atopic and non-atopic dogs. *Can Vet J*, 51, pp. 869–872.
- KOBAYASHI T, KANO R, NAGATA M, HASEGAWA A, KAMATA H (2011). Genotyping of *Malassezia pachydermatis* isolates from canine healthy skin and atopic dermatitis by internal spacer 1 (IGS1) region analysis. *Vet Dermatol*, 22, pp. 401-405.
- KONG HH, ANDERSSON B, CLAVEL T, COMMON JE, JACKSON SA, OLSON ND, SEGRE JA, TRIDL-HOFFMANN C (2017). Performing skin microbiome research : A method to the madness. *J Invest Dermatol*, 137(3), pp. 561-568.
- KOSCIUCZUK EM, LISOWSKI P, JARCZAK J, STRALKOWSKA N, JOZWIK A, HORBANCZUK J, KRYZEWSKI J, ZWIERZCHOWSKI L, BAGNICKA E (2012). Cathelicidins: family of antimicrobial peptides. A review. *Mol Biol Rep*, 39, pp. 10957-10970.
- KURTZMAN CP, FELL JW, BOEKHOUT T, ROBERT V (2010). Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. *The Yeasts, A Taxonomic Study*, pp. 87-110.
- LEIBUNDGUT-LANDERMANN S, WÜTHRICH M, HOHL TM (2012). Immunity to Fungi. *Curr Opin Immunol*, 24(4), pp. 449-458.
- LEONARD BC, MARKS SL, OUTERBRIDGE CA, AFFOLTER VK, KANANURAK A, YOUNG A, MOORE PF, BANNASCH DL, BEVINS CL (2012a). Activity, Expression and Genetic Variation of Canine  $\beta$ -Defensin 103: A Multifunctional Antimicrobial Peptide in the Skin of Domestic Dogs. *J Innate Immun*, 4, pp. 248–259.
- LEONARD BC, AFFOLTER VK, BEVINS CL (2012b). Antimicrobial peptides: agents of border protection for companion animals. *Vet Dermatol*. 2012, 23(3), pp. 177-e36.
- LEONARD BC, CHU H, JOHNS JL, GALLO RL, MOORE PF, MARKS SL, BEVINS CL (2011). Expression and Activity of a Novel Cathelicidin from Domestic Cats. *PLoS One*, 6(4), pp. 1-9.
- LEUNG MHY, CHAN KCK, LEE PKH (2016). Skin fungal community and its correlation with bacterial community of urban Chinese individuals. *Microbiome*, 4(1), pp. 1-15.
- LOVASZI M, SZEGEDI A, ZOUBOULIS CC, TÖROCSIK D (2018). Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermatoendocrinol*, 9(1), pp. 1-10.
- MA J, PRINCE A, AAGAAARD KM (2014). Use of Whole Genome Shotgun Metagenomics : A Practical Guide for the Microbiome-Minded Physician Scientist. *Semin Reprod Med*, 32(5), pp. 1-9.
- MARSELLA R (2012). Are transepidermal water loss and clinical signs correlated in canine atopic dermatitis? A compilation of studies. *Vet Dermatol*, 23, pp. 238-e49.

MARTINEZ LR, FRIES BC (2010). Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep*, 4(4), pp. 266-275.

MEASON-SMITH C, DIESEL A, PATTERSON AP, OLDER CE, JOHNSON TJ, MANSELL JM, SUCHODOLSKI JS, RODRIGES HOFFMANN A (2017). Characterization of the cutaneous mycobiota in healthy and allergic cats using next generation sequencing. *Vet Dermatol*, 28, pp. 71-e17.

MEASON-SMITH C, DIESEL A, PATTERSON AP, OLDER CE, MANSELL JM, SUCHODOLSKI JS, HOFFMANN AR (2015). What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiol Ecol*, 91, pp. 1-12.

MILLER WH, GRIFFIN CE, CAMPBELL KL, *et al.* Chapter 1: Structure and function of skin. In: MillerWH (ed.). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. St. Louis, Mo: Elsevier, 2013a, 1–56.

MILLER WH, GRIFFIN CE, CAMPBELL KL, *et al.* Chapter 5: Fungal and Algal Skin Diseases. In: MillerWH (ed.). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. St. Louis, Mo: Elsevier, 2013b, 1–56. Chapter 5: Fungal and Algal Skin Diseases.

MILLER WH, GRIFFIN CE, CAMPBELL KL, *et al.* Chapter 8: Hypersensitivity disorders. In: MillerWH (ed.). *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*. St. Louis, Mo: Elsevier, 2013c, 365-388.

MORAR N, COOKSON WOCM, HARPER JI, MOFFATT MF (2007). Filaggrin Mutations in Children with Severe Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 127, pp. 1667-1672.

MORRIS DO, CLAYTON DJ, DROBATZ KJ, FELSBURG PJ (2002). Response to *Malassezia pachydermatis* by peripheral blood mononuclear cells from clinically normal and atopic dogs. *Am J Vet Res*, 63(3), pp. 358-362.

MUSZER M, NOSZCZYNSKA M, KASPERKIEWICZ K, SKURNIK M (2015). Human microbiome : When a friend becomes an enemy. *Arch Immunol Ther Exp*, 63(4), pp. 287-298.

NARDONI S, DINI M, TACCINI F, MANCIANTI F (2007). Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Vet Microbiol*, 122, pp. 172–177.

NIH. NIH Human Microbiome Project – Home, URL : <https://hmpdacc.org/> [consulté le 6 mars 2018]

NIYONSABA F, KIATSURAYANON C, CHIEOSILAPAYHAM P, OGAWA H (2017). Friends or Foes? Host defense (antimicrobial) peptides and proteins in human skin diseases. *Exp Dermatol*, 26, pp. 989-998.



NOLI C (2017). The microbiome of dogs and cats — what do we know in 2017 ?. *Rev Vét Clin*, 52, pp. 93-98.

OH J, BYRD AL, PARK M, NISC Comparative Sequencing Program, KONG HH, SEGRE JA (2016). Temporal Stability of the Human Skin Microbiome. *Cell*, 165(4), pp. 854-866.

OLDENHOFF WE, FRANK GR, DEBOER DJ (2014). Comparison of the results of intradermal test reactivity and serum allergen-specific IgE measurement for *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Vet Dermatol*, 25, pp. 507–e85.

OLDER CE, DIESEL A, PATTERSON AP, MEASON-SMITH C, JOHNSON TJ, MANSELL J, SUCHODOLSKI JS, RODRIGUES HOFFMAN A (2017). The feline skin microbiota: The bacteria inhabiting the skin of healthy and allergic cats. *PLoS One*, 12(6), pp. 1-18.

OLIVRY T, DEBOER DJ, FAVROT C, JACKSON HA, MUELLER RS, NUTTALL T, PRELAUD P for the International Committee on Allergic Diseases of Animals (2015). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Vet Res*, 11 (210), pp. 1-15.

OLIVRY T, DEBOER DJ, FAVROT C, JACKSON HA, MUELLER RS, NUTTALL T, PRELAUD P for the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2010). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol*, 21, pp. 233–248.

OLIVRY T, DUNSTON SM, PLUCHINO K, PORTER K, HAMMERBERG B (2008). Lack of detection of circulating skin-specific IgE autoantibodies in dogs with moderate or severe atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 122, pp. 182-187.

PATEL A, LLOYD DH, LAMPORT AI (2005). Survey of dermatophytes on clinically normal cats in the southeast of England. *J Small Anim Pract*, 46(9), pp.436-439.

PAULINO LC, TSENG C-H, STROBER BE, BLASER MJ (2006). Molecular Analysis of Fungal Microbiota in Samples from Healthy Human Skin and Psoriatic Lesions. *J Clin Microbiol*, 44(8), pp. 2933-2941.

PETRY V, BESSA GR, POZIOMCZYCK CS, OLIVEIRA CF, WEBER MB, BONAMIGO RR, D'AZEVEDO PA (2012). Bacterial skin colonization and infections in patients with atopic dermatitis. *An Bras Dermatol*, 87(5), pp. 729-734.

PROKSCH E, JENSEN JM. The skin as an organ of protection. In Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, et al., editors : *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*, ed 7 vol 1, New York, 2008, Mc Graw-Hill, pp 383-395.

RIZZETTO L, DE FILIPPO C, CAVALIERI D (2014). Richness and diversity of mammalian fungal communities shape innate and adaptive immunity in health and disease. *Eur J Immunol*, 44(11), pp. 3166-3181.

RODRIGUES HOFFMANN A, PATTERSON AP, DIESEL A, LAWHON SD, LY HJ, ELKINS STEPHENSON C, MANSELL J, STEINER JM, DOWD SE, OLIVRY T, SUCHODOLSKI JS (2014). The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs. *PLoS One*, 9(1), pp. 1-12.

SANG Y, ORTEGA MT, RUNE K, XIAU W, ZHANG G, SOULAGES JL, LUSHINGTON GH, FANG J, WILLIAMS TD, BLECHA F, MELGAREJO T (2007). Canine cathelicidin (K9CATH): Gene cloning, expression, and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide. *Dev Comp Immunol*, 31(12), pp. 1278-1296.

SANTORO D, MARSELLA R, PUCHEU-HASTON CM, EISENSCHENK M NC, NUTALL T, BIZIKOVA P (2015). Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host–micro-organism interaction. *Vet Dermatol*, 26, pp. 84-e25.

SANTORO D, MADDUX CW (2014). Canine antimicrobial peptides are effective against resistant bacteria and yeasts. *Vet Dermatol*, 25, pp.35-e12.

SCHAUBER J, GALLO RL (2007). Expanding the Roles of Antimicrobial Peptides in Skin: Alarming and Arming Keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 127, pp. 510-512.

SCHNEIDER MR (2016). Lipid droplets and associated proteins in sebocytes. *Exp Cell Res*, 340, pp. 205-208.

SCHOCH CL, SEIFERT KA, HUHNDORF S, ROBERT V, SPOUGE JL, LEVESQUE CA, CHEN W, FUNGAL BARCODING CONSORTIUM (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(16), pp. 6241-6246.

SCHOMMER NN, GALLO RL (2013). Structure and function of the human skin microbiome. *Trends Microbiol*, 21(12), pp. 660-668.

SHANKAR J (2017). Insights into study design and statistical analyses in translational microbiome studies. *Ann Transl Med*, 5(12), pp. 1-11.

SHIMADA K, YOON J-S, YOSHIHARA T, IWASAKI T, NISHIFUJI K (2009). Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*, 20, pp. 541-546.

SIERRA P, GUILLOT J, JACOB H, BUSSIERAS S, CHERMETTE R (2000). Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiencyvirus or feline leukemia virus. *Am J Vet Res*, 61(2), pp.158-161.

SNARR BD, QURESHI ST, SHEPPARD DC (2017). Immune Recognition of Fungal Polysaccharides. *J Fungi*, 3(47), pp. 1- 29.

SUGITA T, YAMAKAZI T, YAMADA S, TAKEOKA H, CHO O, TANAKA T, OHNO G, WATANABE K, MAKIMURA K, OHSHIMA H, ISHIOKA N, MUKAI C (2015). Temporal changes in the skin

*Malassezia* microbiota of members of the Japanese Antarctic Research Expedition (JARE): A case study in Antarctica as a pseudo-space environment. *Med Mycol*, 53, pp. 717-724.

SUGITA T, TAKEO K, HAMA K, VIRTUDAZO E, TAKASHIMA M, NISHIKAWA A, KUCSERA J, DOROG J, KOMORI S, NAKAGAKI K, VOLLEKOVA A, SLAVIKOVA E, FARKA V (2005). DNA sequence diversity of intergenic spacer 1 region in the non-lipid-dependent species *Malassezia pachydermatis* isolated from animals. *Med Mycol*, 43, pp. 21-26.

SONG SJ, LAUBER C, COSTELLO EK, LOZUPONE CA, HUMPHREY G, BERG-LYONS D, CAPORASO JG, KNIGHTS D, CLEMENTE JC, NAKIELNY S, GORDON JI, FIERER N, KNIGHT R (2013). Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *eLife*, 2, pp. 1-22.

SUGITA T, SUZUKI M, GOTO S, NISHIKAWA A, HIRUMA M, YAMAZAKI T, MAKIMURA K (2010). Quantitative analysis of the cutaneous *Malassezia* microbiota in 770 healthy Japanese by age and gender using a real-time PCR assay. *Med Mycol*, 48, pp. 229-233.

TANG J, ILIEV ID, BROWN J, UNDERHILL DM, FUNARI VA (2015). Mycobiome: Approaches to Analysis of Intestinal Fungi. *J Immunol Methods*, 421, pp 112-121.

TAY SS, ROEDIGER B, TONG PL, TIKOO S, WENINGER W (2013). The Skin-Resident Immune Network. *Curr Derm Rep*, 3, pp. 13-22.

TERAMOTO H, KUMEDA Y, YOKOIGAWA K, HOSOMI K, KOZAKI S, MUKAMOTO M, KOHDA T (2015). Genotyping and characterisation of the secretory lipolytic enzymes of *Malassezia pachydermatis* isolates collected from dogs. *Vet Rec Open*, 2(2), pp. 1-8.

TILLE PM. Part V : Mycology, Chapter 59 : Overview of Fungal Identification Methods and Strategies. *Bailey's and Scott's Diagnostic Microbiology 13th Edition (2014)*. St Louis, Elsevier, pp. 712-731.

TIPTON L, MÜLLER CL, KURTZ ZD, HUANG L, KLEERUP E, MORRIS A, BONNEAU R, GHEDIN E (2018). Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. *Microbiome*, 6(12), pp. 1-14.

TONG X, LEUNG MHY, WILKINS D, LEE PKH (2017). City-scale distribution and dispersal routes of mycobiome in residences. *Microbiome*, 5(131), pp. 1-13.

TRAVKOVA OG, MOEHWALD H, BREZESINSKI G (2017). The interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Adv Colloid Interface Sci*, 247, pp. 527-532.

TURNBAUGH PJ, LEY RE, HAMADY M, FRASER-LIGGETT C, KNIGHT R, GORDON JI (2007). The human microbiome project : exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature*, 449 (7164), pp. 804-810.

UNDERHILL DM, PEARLMAN E (2015). Immune Interactions with Pathogenic and Commensal Fungi: A Two-Way Street. *Immunity*, 43, pp. 845-858.

- USYK M, ZOLNIK CP, PATEL H, LEVI MH, BURK RD (2017). Novel ITS1 Fungal Primers for Characterization of the Mycobiome. *mSphere*, 2(6), pp. 1-11.
- VAN SMEDEN J, JANSSENS M, GOORIS GS, BOUWSTRA JA (2014). The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*, 1841, pp.295-313.
- VERMA A, WÜTHRICH M, DEEPE G, KLEIN B (2015). Adaptive Immunity to Fungi. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5, pp. 1-25.
- VERNEUIL M, DURAND B, MARCON C, GUILLOT J (2014). Conjunctival and cutaneous fungal flora in clinically normal dogs in Southern France. *J Mycol Med*, 24, pp.25-28.
- VOLK AV, BELYAVIN CE, VARJONEN K, CADIERGUES M-C, STEVENS KB, BOND R (2010). *Malassezia pachydermatis* and *M nana* predominate amongst the cutaneous mycobiota of Sphynx cats. *J Feline Med Surg*, 12, pp. 917-922.
- VOLZ T, SKABYTSKA Y, GUENOVA E, CHEN K-M, FRICK J-S, KIRSCHNING CJ, KAESLER S, RÖCKEN M, BIEDERMANN T (2014). Nonpathogenic Bacteria Alleviating Atopic Dermatitis Inflammation Induce IL-10-Producing Dendritic Cells and Regulatory Tr1 Cells. *J Invest Dermatol*, 134, pp.96-104.
- WARD TL, DOMINGUEZ-BELLO MG, HELSEL T, AL-GHALITH G, KNIGHTS D, GALE CA (2018). Development of the Human Mycobiome over the First Month of Life and across Body Sites. *mSystems*, 3(3), pp. 1-12.
- WARD TL, KNIGHTS D, GALE CA (2017). Infant fungal communities: current knowledge and research opportunities. *BMC Med*, 15(30), pp. 1-10.
- WATANABE S, KOIKE A, KANO R, NAGATA M, CHEN C, HWANG C-Y, HASEGAWA A, KAMATA H (2013). *In Vitro* Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* Isolates from Canine Skin with Atopic Dermatitis to Ketoconazole and Itraconazole in East Asia. *J Vet Med Sci*, 76(4), pp. 579–581.
- WEESE JS (2013). The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Vet Dermatol*, 24, pp. 137-e31.
- WILLIAMS, A.E. Immunology of the skin. In : *Immunology : Mucosal and Body Surface Defences* (2012). Wiley-Blackwell, pp. 196-216 et 256-277.
- WINGATE KV, TORRES SM, SILVERSTEIN KA, HENDRICKSON JA, RUTHERFORD MS (2008). Expression of endogenous antimicrobial peptides in normal canine skin. *Vet Dermatol*, 20, pp.19-26.
- WOLF R, WOLF D (2012). Abnormal epidermal barrier in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Dermatol*, 30, pp. 329-334.

YANG J, ZHAO L, XU M, XIONG N (2017). Establishment and function of tissue-resident innate lymphoid cells in the skin. *Protein Cell*, 8(7), pp. 489-500.

YONN J-S, NISHIFUJI K, ISHIOROSHI S, IDE K, IWASAKI T (2013). Skin lipid profiling in normal and seborrhoeic shih tzu dogs. *Vet Dermatol*, 24, pp. 84-e22.

ZAJAC M, SZCZEPANIK MP, WILKOTEK PM, ADAMEK LR, POMORSKI ZJH, SITKOWSKI W, GOLYNSKI MG (2014). Assessment of the relationship between transepidermal water loss (TEWL) and severity of clinical signs (CADESI-03) in atopic dogs. *Vet Dermatol*, 25, pp. 503-e83.

ZHANG E, TANAKA T, TAJIMA M, TSUBOI R, NISHIKAWA A, SUGITA T (2011). Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. *Microbiol Immunol*, 55, pp. 625-632.

ZHU M, LIU P, NIU Z (2017). A perspective on general direction and challenges facing antimicrobial peptides. *Chinese Chem Letters*, 28, pp. 703-708.

ZIELINSKI CE (2014). Microbe driven T-helper cell differentiation: lessons from *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Exp Dermatol*, 23, pp. 795-798.

ZIPFEL PF, SKERKA C (2012). Complement, *Candida*, and cytokines: The role of C5a in host response to fungi. *Eur J Immunol*, 42, pp. 822-825.





**MIACHON Sophie**

**LE MICROBIOTE FONGIQUE CUTANE DE L'HOMME, DU CHIEN ET DU CHAT : ACTUALITES ET COMPARAISON**

Thèse d'Etat de Doctorat Vétérinaire : Lyon, le 7 décembre 2018

**RESUME** : La peau est un organe dynamique qui possède de multiples fonctions. A la fois barrière physique, chimique et immunologique contre les agents fongiques pathogènes, elle constitue un véritable milieu de vie pour de nombreux micro-organismes commensaux. Ces derniers entretiennent avec leur hôte une relation mutualiste, dont tous les tenants et les aboutissants ne sont pas encore connus. Lors de dysbiose cutanée, ils pourraient par contre acquérir le statut de pathogènes opportunistes, menaçant leur hôte.

Les méthodes d'étude de culture fongique étant obsolètes, elles ont récemment été remplacées par des méthodes génomiques : le séquençage d'amplicons et la métagénomique globale ou méthode *Shotgun*. Ce travail répertorie les micro-organismes fongiques qui composent les microbiotes fongiques cutanés humain, canin et félin. Chez l'homme, les sites corporels sont dominés par le genre *Malassezia* à l'exception des pieds. A l'inverse, le microbiote fongique de nos carnivores domestiques présente une diversité et une variabilité interindividuelle importantes, avec une prédominance de genres fongiques omniprésents dans l'environnement : *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Cryptococcus*. Ces derniers pourraient constituer des membres transitoires de la flore cutanée, indiscernables des micro-organismes commensaux par les méthodes d'étude génomique.

**MOTS CLES :**

- Dermatologie
- Microflore
- Champignons
- Chien
- Chat domestique

**JURY :**

Président : Monsieur le Professeur Jean-François NICOLAS  
1er Assesseur : Monsieur le Professeur Didier PIN  
2ème Assesseur : Monsieur le Professeur Gilles BOURDOISEAU

**DATE DE SOUTENANCE : 7 décembre 2018**