

**Les levures du genre *Malassezia*:
Pathologies; identification morphologique,
physiologique et moléculaire**

Pr. Ag Fattouma MAKNI

CHU Habib Bourguiba Sfax-Tunisie

Introduction

■ *Malassezia* :

☛ Levures Lipophiles

Commensales: 90 à 100%: porteurs sains

☛ Episaprophytes strictes

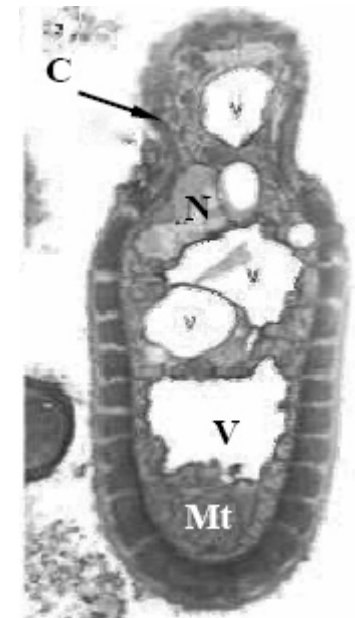
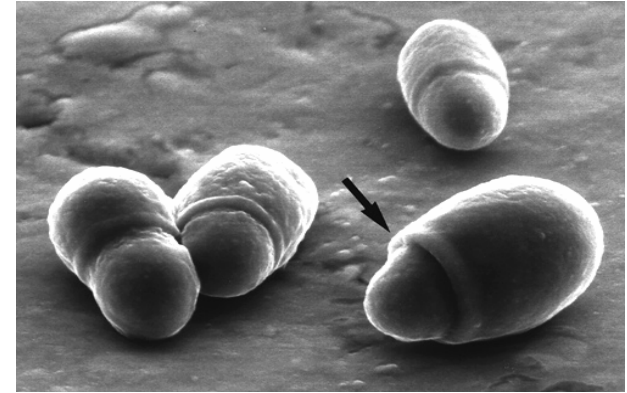
(couche cornée) des mammifères

☛ opportunistes

☛ Taxonomie: grande controverse

☛ Le genre *Malassezia* est

actuellement divisé en 14 espèces



Le genre *Malassezia* Baillon 1889

Une longue histoire...

- ◆ *Malassezia* Baillon 1889

 - M. furfur* 1889

- ◆ *Pityrosporum* Sabouraud 1904

 - P. pachydermatis* 1925

 - P. canis* 1955

 - P. ovale* 1913

 - P. orbiculare* 1951

Le genre *Malassezia* Baillon 1889

- ◆ 1990: *M.symphodialis*, *M.furfur*, *M.pachydermatis*
- ◆ 1996: *M.symphodialis*, *M.furfur*, *M.pachydermatis*,
M.slooffiae, *M.globosa*, *M.obtusa*, *M.restricta*
- ◆ 2002: *M.dermatis*
- ◆ 2003: *M.japonica*
- ◆ 2004: *M.nana* et *M.yamatoensis*
- ◆ 2007: *M. caprae* *M. equina*
- ◆ 2011: *M.cuniculi*

Le genre *Malassezia* Baillon 1889

Définition:

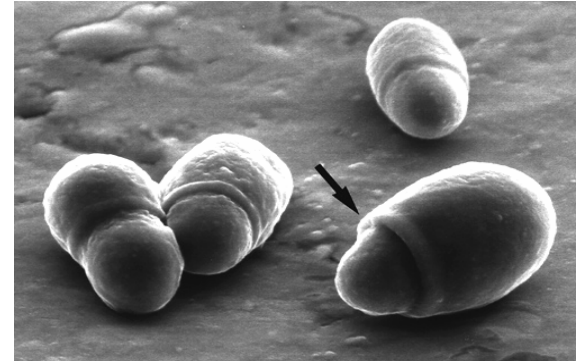
Levures basidiomycètes

Mode de bourgeonnement :
monopolaire (base \pm large)

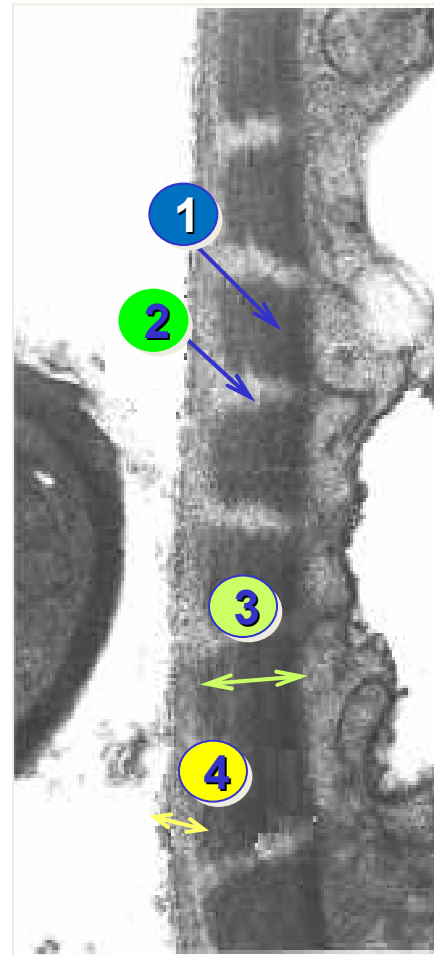
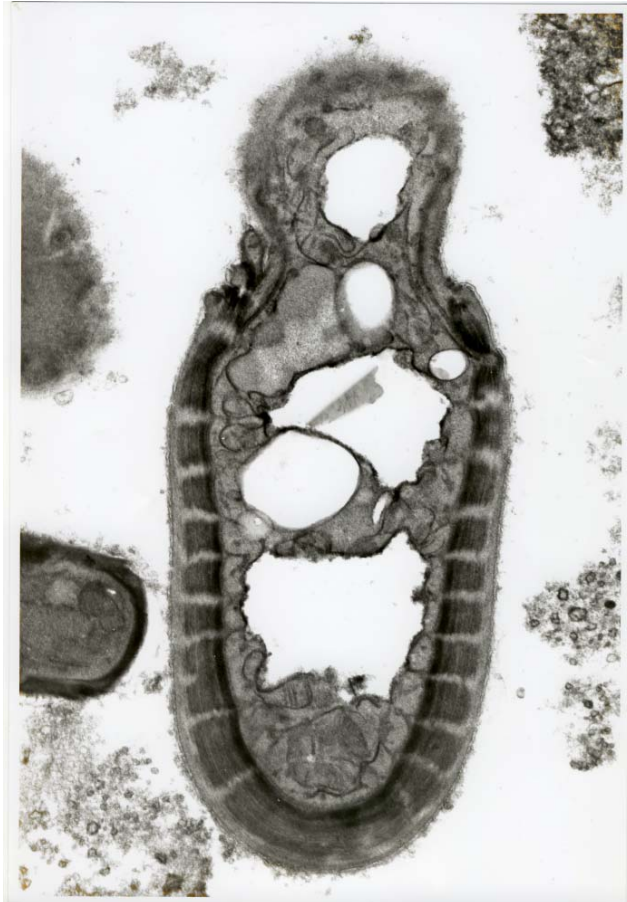
Filamentation possible

(*M. globosa*, *M. furfur*)

Ultrastructurale pariétale unique



Organisation cellulaire des levures du genre *Malassezia*



- ① Bandes sombres
- ② Bandes claires
- ③ Couche interne
- ④ Couche externe

**Structure multilamellaire
de la paroi**

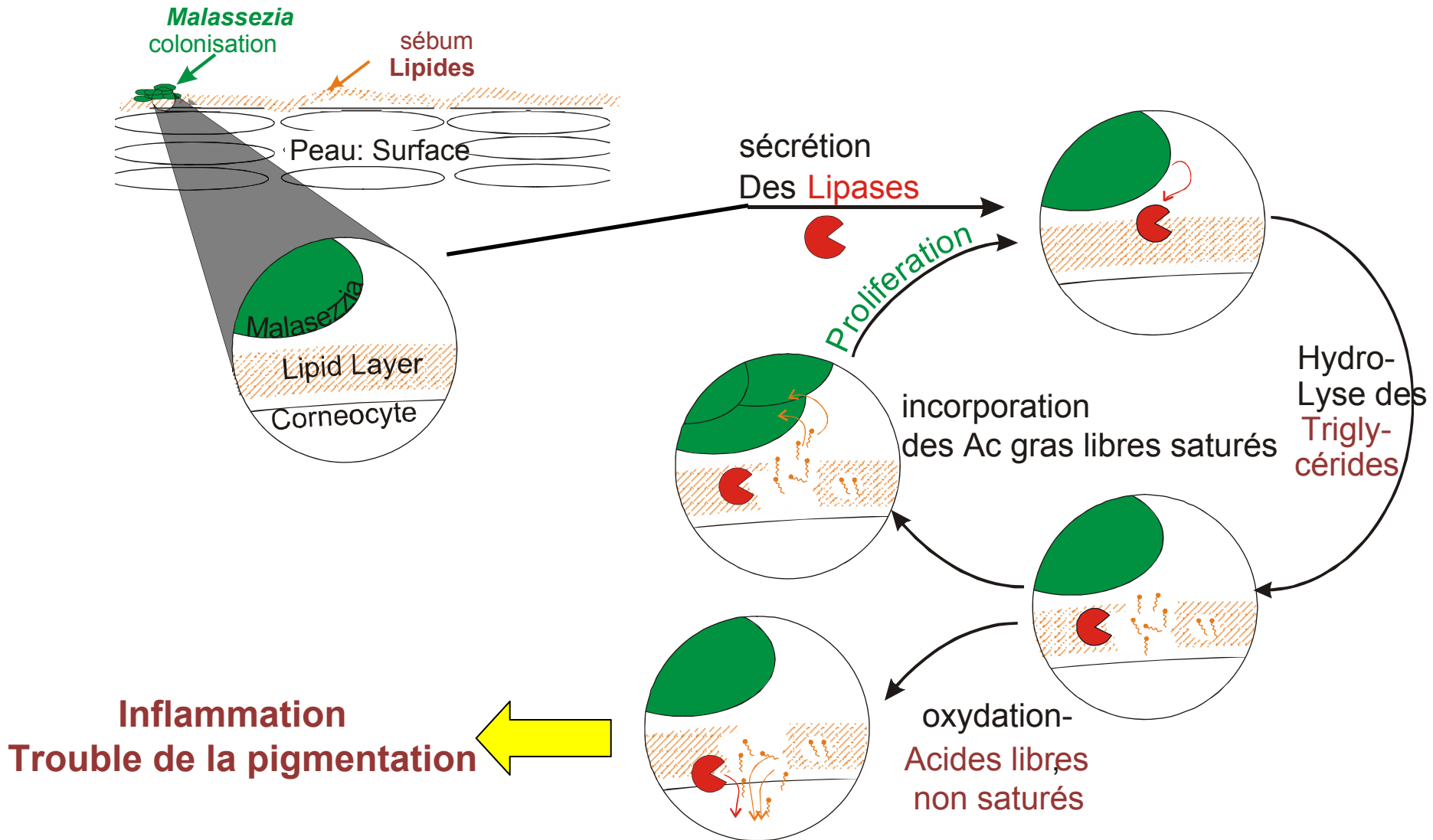
Pathogénicité des *Malassezia*

Chez l'homme :

- Pityriasis versicolor +++
- Pityriasis capitis (état pelliculaire) ++
- Dermite séborrhéique ++
- Dermite atopique +
- Folliculite ; Blépharite; onychomycose..
- Infections systémiques

Chez les animaux : Otites externes et dermatites
(*M. pachydermatis*)

Mécanisme pathologique



Malassezia

Lipase: hydrolyse des triglycérides



A. gras saturés



incorporation (paroi)



prolifération



A. gras insaturés

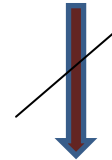


Liperoxydes

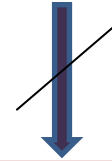


pathogénicité

Acide azélaïque



tyrosinase



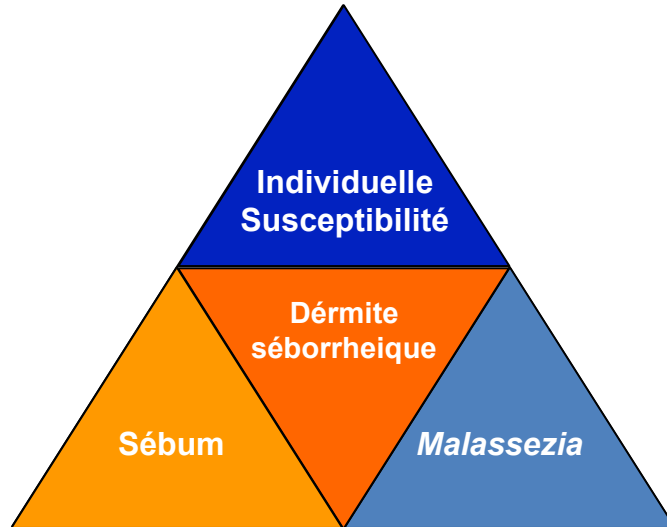
Mélanine

Pityriacitrine



Inducteur de la pigmentogénèse

Dermite séborrhéique: Mécanisme

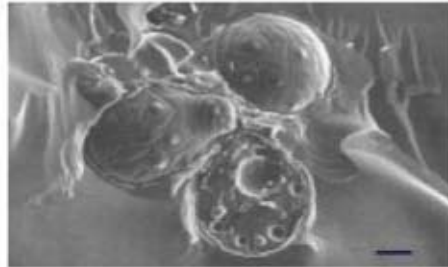


- *Malassezia*
- Secretions des glandes sébacés
- Susceptibilité individuelle

Cuir chevelu: Lipides, Protéines



Malassezia



**Lipases
Phospholipases**



**Inflammation:
pityriasis capitis**

**Prolifération:
consommation
des nutriments**

Pityriasis versicolor

Facteurs favorisants:

- Age: adolescents et adultes jeunes
- Les conditions climatiques
- L'hypersudation
- Utilisation des huiles corporelles
- Prédisposition génétique
- Administration des corticoïdes

Formes cliniques multiples:

Fréquence: régions tropicales:30 à 40%

régions tempérées 1 à 4%

- **Forme hyperchromique: macules brun chamois, recouvertes de fines squames, confluentes et extensives**
- **Forme hypochromique**
- **Forme achromique**
- **Forme érythémateuse**

Sièges: Tronc, cou, membres supérieurs

Localisation faciale: fréquente chez l'enfant



Pityriasis versicolor: forme hyperchromique



Pityriasis versicolor: forme achromique



Pityriasis versicolor: forme érythémateuse



Pityriasis versicolor: localisations rares



Pityriasis versicolor: localisations rares



Pityriasis versicolor : forme diffuse compliquée par corticoïde

Dermite séborrhéique



**Plaques érythémateuses recouvertes de petites squames:
sillons naso-géniens, sourcils....**



**D.s. du nouveau né: débute après la 2^{ème} semaine
Croûtes jaunâtres du cuir chevelu et du visage**



Dermite séborrhéique: rétro-auriculaire



Dermite séborrhéique étendue compliquant un pemphigus



Dermite séborrhéique: une forme étendue

Pityriasis capitis



Pityriasis capitis



Dermite atopique



**Désordre inflammatoire chronique:
Prurit et lésions eczématisques**

Folliculite à *Malassezia*



Papules+pustules associées à une inflammation périfolliculaire: Tronc, épaules, avant-bras.....

Blépharite à *Malassezia*



DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

 **Prélèvement**

 **Microscopie**

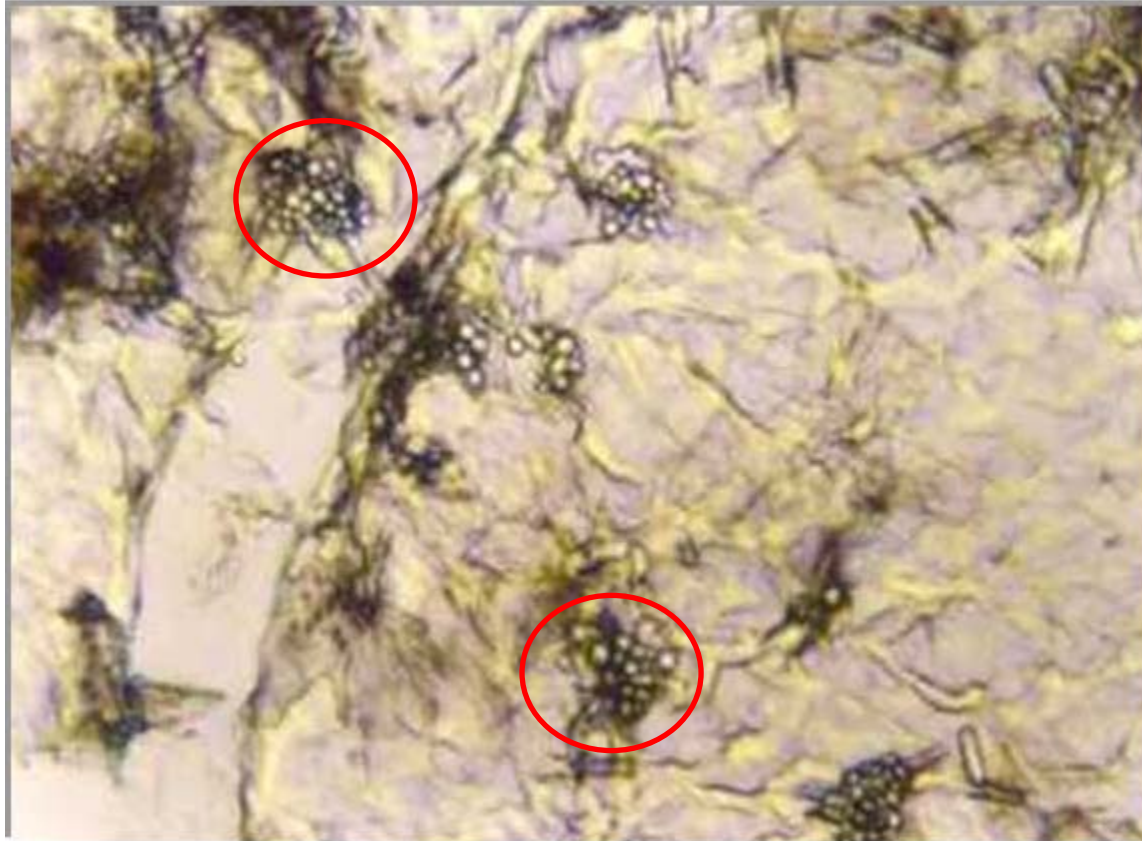
 **Culture**

 **Identification phénotypique**

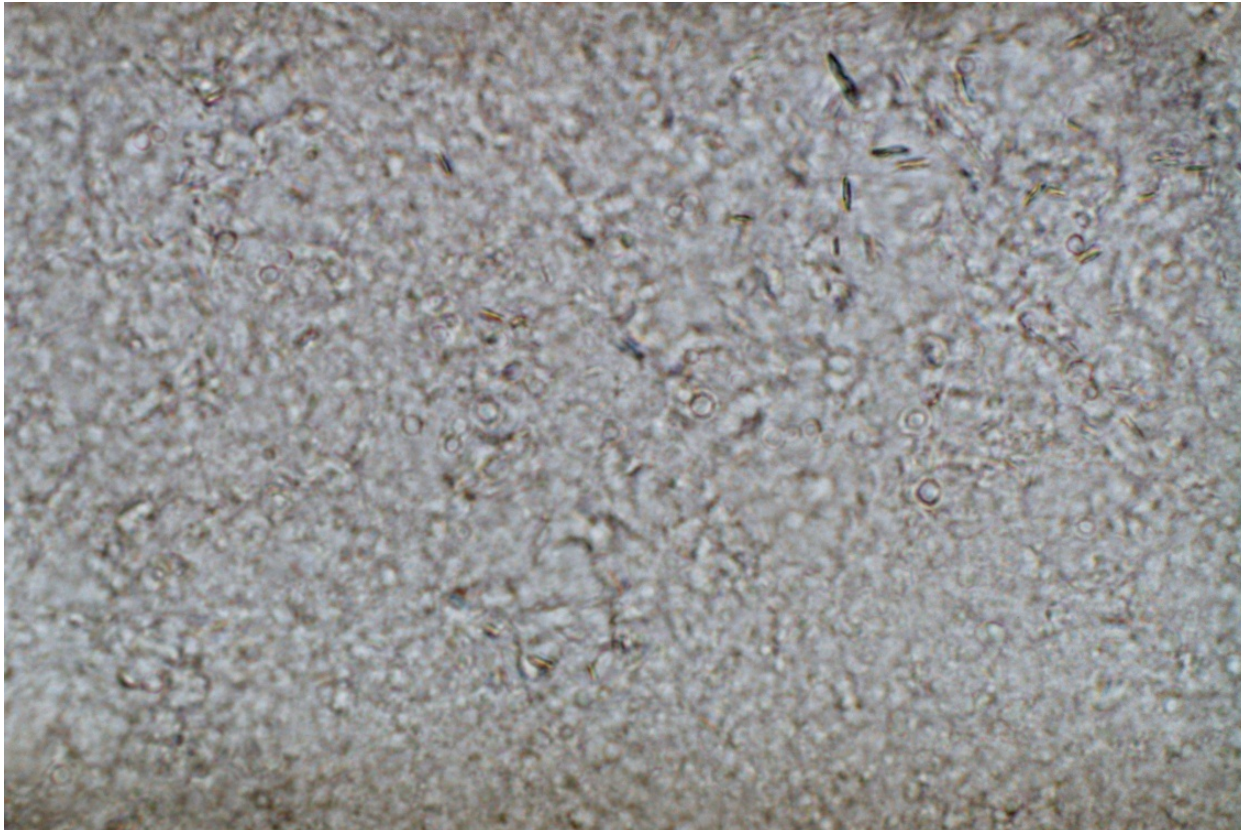
 **Identification moléculaire**

Prélèvement : Scotch test



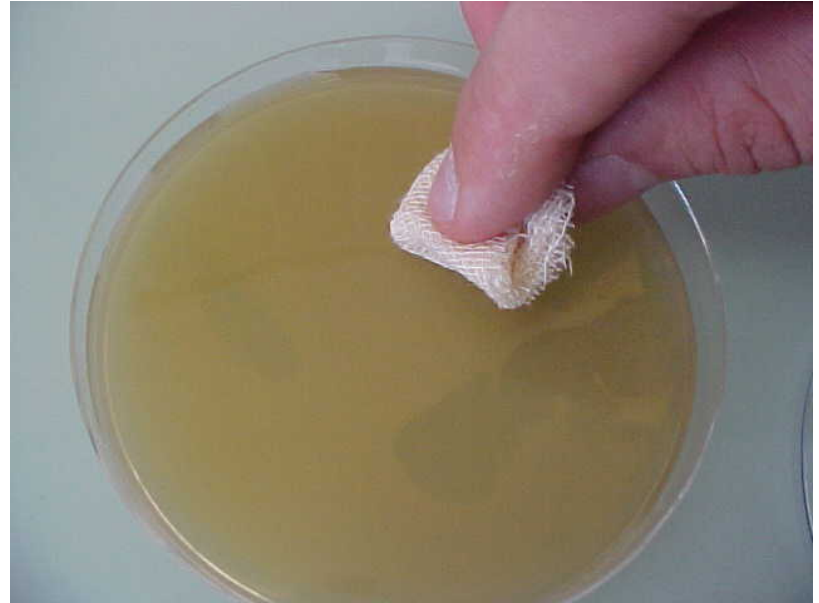


Scotch test (+) : levures associées en grappe de raisin



Examen direct d'une folliculite: nombreuses levures du genre *Malassezia*

Culture



Non indispensable pour le diagnostic
Intérêt: identification des espèces

Le milieu Sabouraud Dextrose Agar +huile d'olive:

isolement de *M furfur* et *M. pachydermatis*

Inconvénients

- la pousse des contaminants
- levures lipophiles pourraient incorporer les lipides à l'intérieur des cellules gênant leur observation microscopique

The compositions of media commonly used for the culturing of *Malassezia*

Medium	Composition (per litre of distilled water)
Dixon's agar medium	36g malt extract, 6g peptone, 20g bile 10 ml Tween, 40,2 ml glycerol, 2ml oleic acid and 12g agar
Leeming-Notman agar medium	10g peptone, 5g glucose, 0,1g yeast extract, 4g bile, 1ml glycerol, 0,5g glycerol monostearate, 0,5 ml of Tween 60, 10 ml milk and 12g agar
Ushijima's medium A (for <i>M. pachydermatis</i>)	10g trypticase peptone (BBL), 5g yeast extract (BBI), 3g glucose, 2g Na Cl, 12g KH ₂ PO ₄ (anhydrous), 15g agar, 0,1g ampicillin ant 0,25g cycloheximide; adjust pH to 5,5.
Modified CHROMagar Candida	47,5 g of CHROMagar <i>Candida</i> (=10g peptone, 22g special chromgen mixture, 0,5g chloramphenicol and 15g agar), 8g ox bile (Oxoid), 1ml glycerol monostearate and 0,5ml Tween 60.
Modofied CHROMOagar	56,3 g of CHROMagar <i>Malassezia</i> basal medium and 10 ml of tween 40.

Le milieu Dixon modifié:



- Favorise la croissance + confère des caractères morphologiques pathognomoniques
- Ce milieu permet de différentier *M. globosa* des autres espèces de *Malassezia*:
 - ↳ propriété de précipiter les acides gras insolubles libérés dans le milieu de culture



Précipitation de *M. globosa* en milieu Dixon modifié (14 J à 32°C)

BEN SALAH I., MAKNI F., CHEIKHROUHOU F., NEJI S., SELLAMI H., AYADI A.
«Les levures du genre *Malassezia*: pathologie, milieux d'isolement et d'identification» *Journal de Mycologie Médicale* 2010; (20): 53-60

Le milieu Leeming et Notman modifié (LNAm):

- **plus adapté aux études quantitatives: son taux de recouvrement élevé par rapport au Dixon modifié**
- **induction de production de mycélium in vitro**
- **Utilisé dans l'étude de la sensibilité des souches de *Malassezia* aux antifongiques**

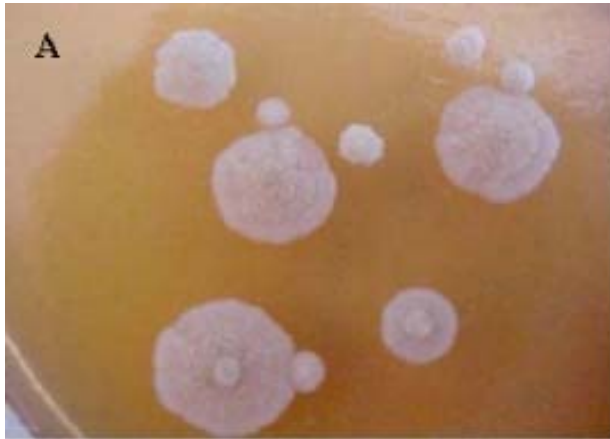
Les techniques d'identification des levures du genre *Malassezia*

Identification phénotypique

- aspect des colonies / des cellules
- présence / absence de catalase
- présence / absence de β -glucosidase = « Esculine test »
- assimilation des lipides = « Tween test » et du Crémophor el
- Tolérance thermique

Identification moléculaire

Identification morphologique: Macroscopie



M. globosa



M. globosa



M. restricta



M. slooffiae



M. sympodialis



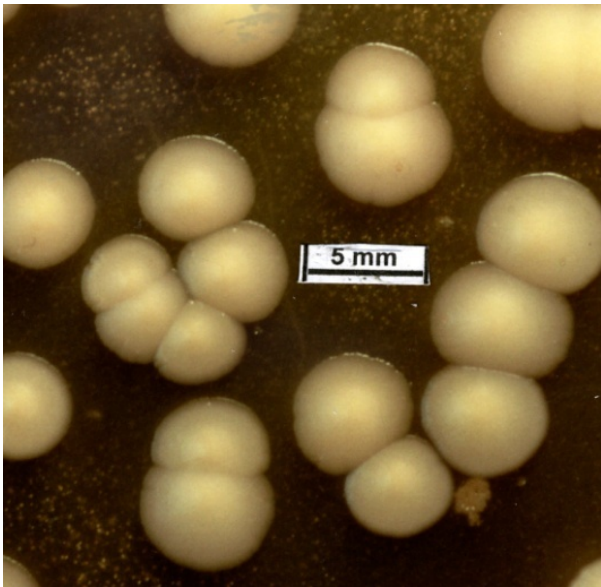
M. furfur



M. caprae



M. equina

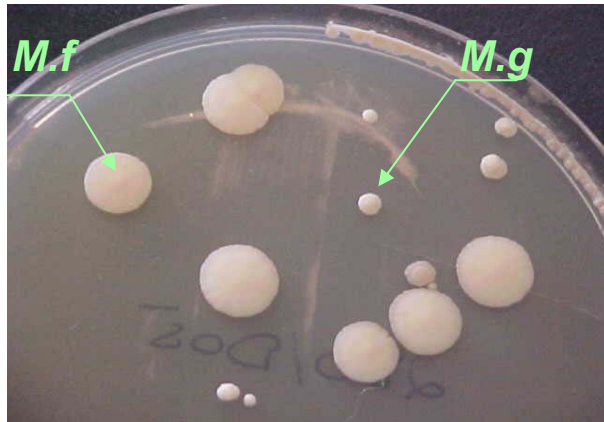


M. pachydermatis

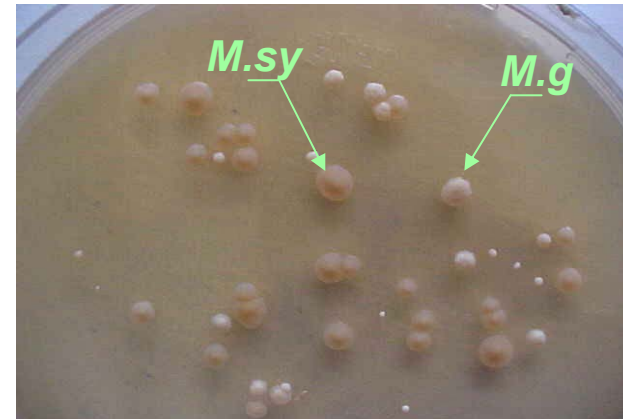


M. japonica

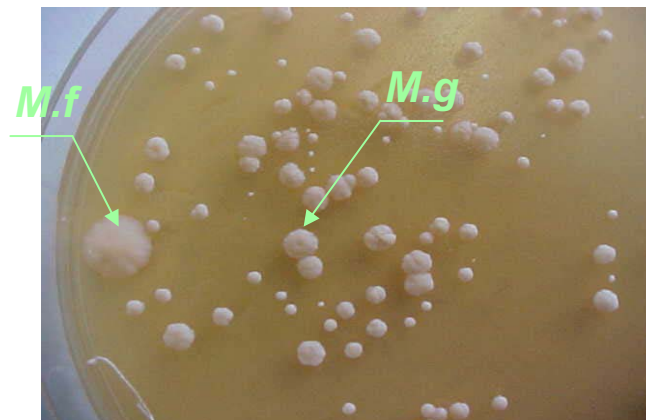
Association des colonies de *Malassezia*



Association de *M.furfur* + *M.globosa*

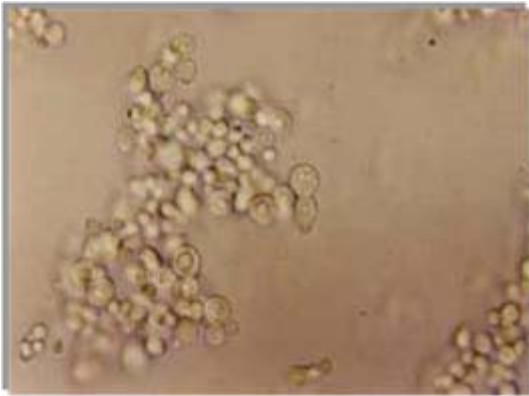


Association de *M.sympodialis* + *M.globosa*

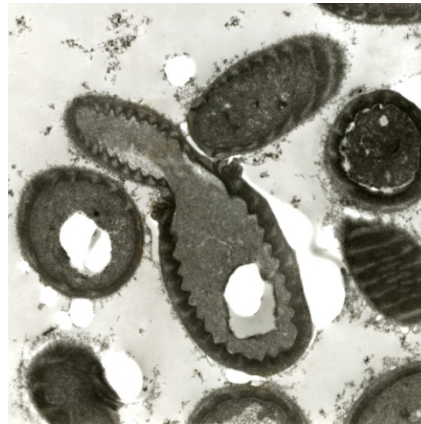


Association de *M.furfur* + *M.globosa*

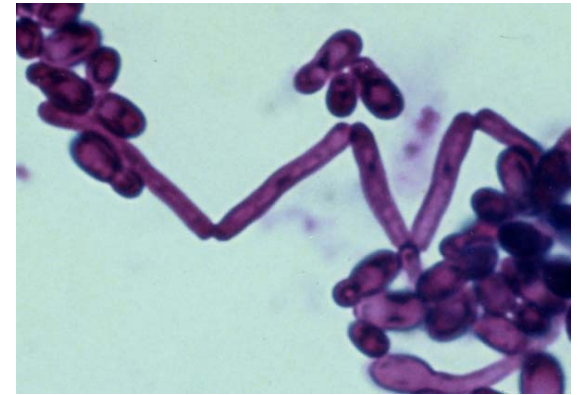
Identification morphologique: Microscopie



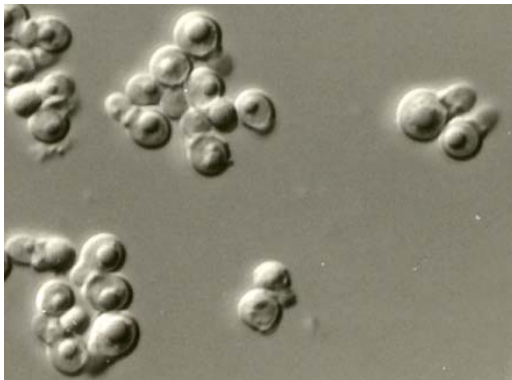
M. Globosa



M. sympodialis



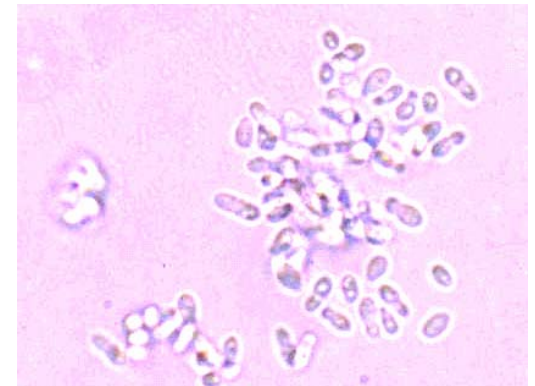
M. furfur



M. restricta



M. obtusa



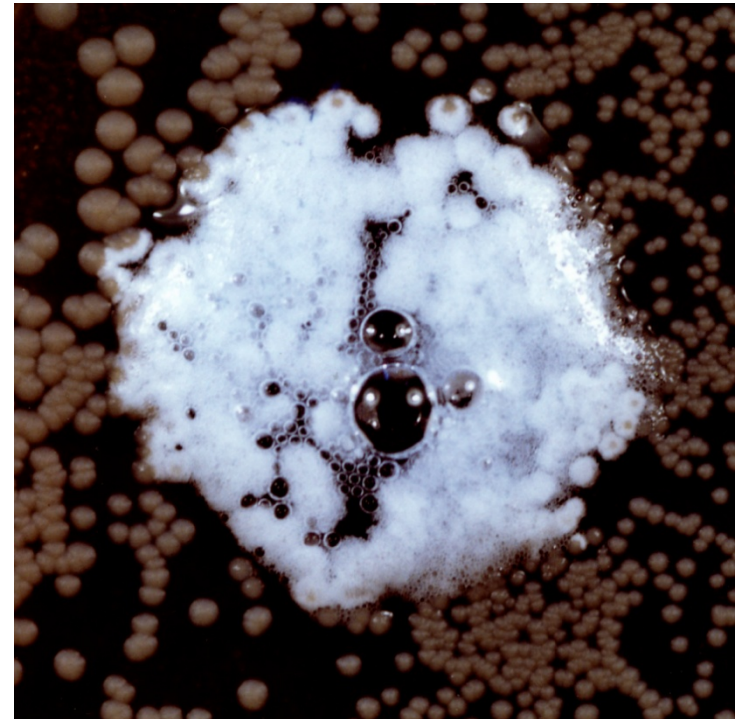
M. sloofiae

Identification biochimique et physiologique



Test de l'uréase

Test de catalase

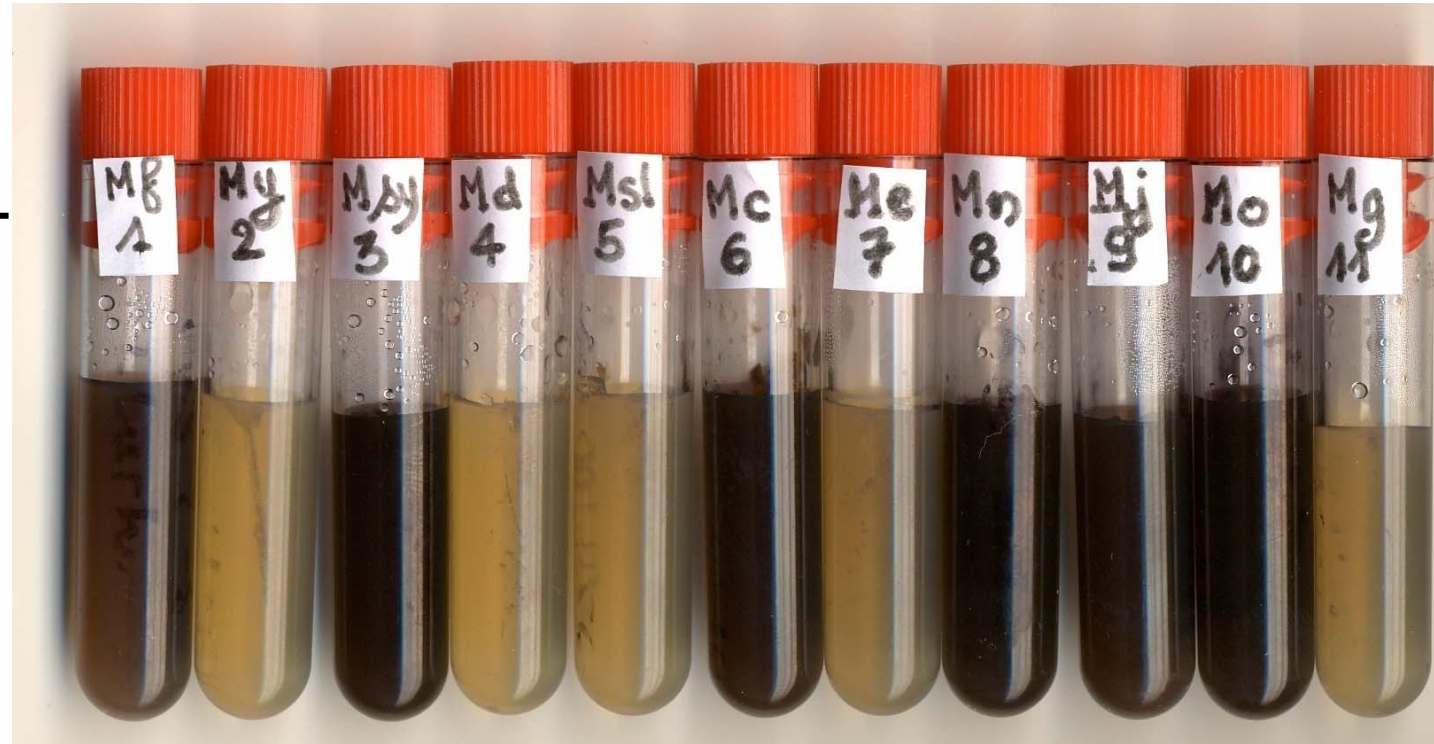


***M. restricta*: Catalase (-)**

Autres espèces: Catalase (+)

Identification biochimique des levures du genre *Malassezia*

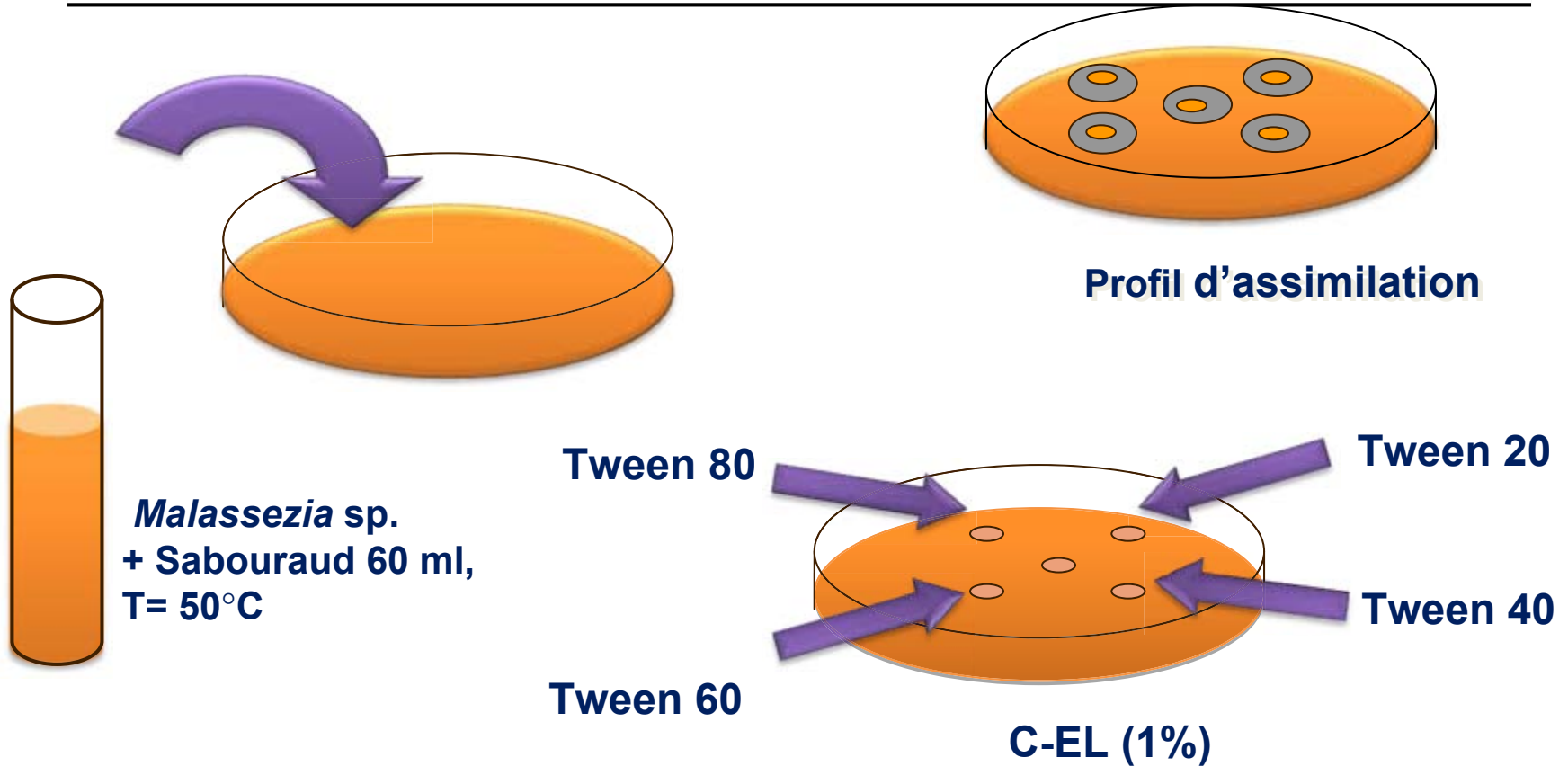
β -glucosidase



Libération des sels ferriques par clivage de l'esculine

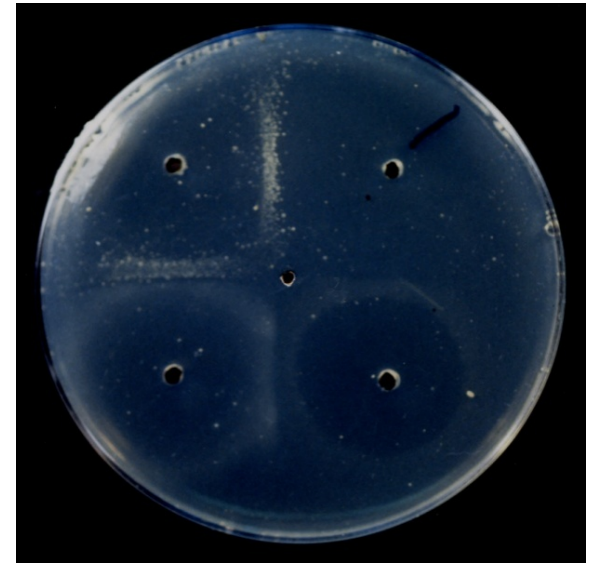
Identification physiologique des levures du genre *Malassezia*

Test d'assimilation des tweens et du crémosphor EL

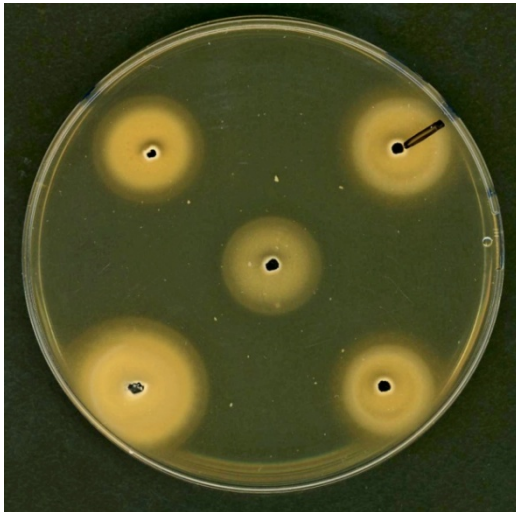




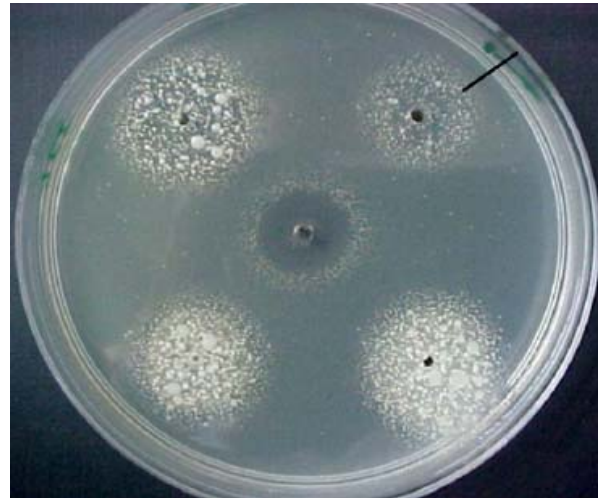
M. globosa



M. restricta



M. furfur



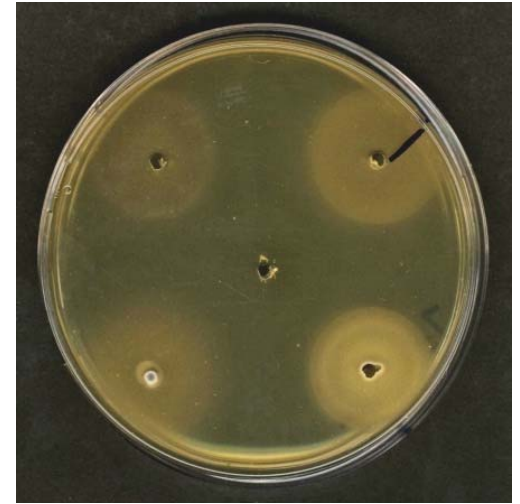
M. sympodialis



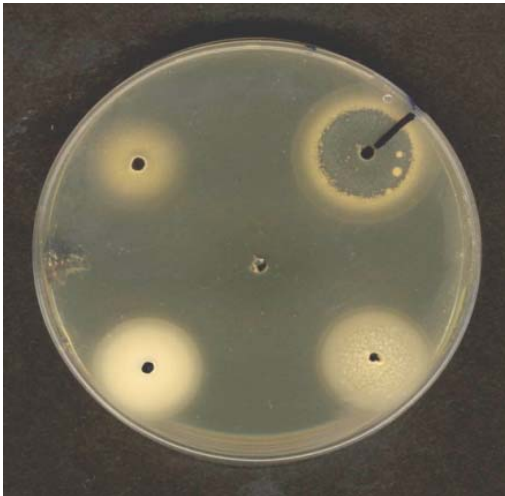
M. slooffiae



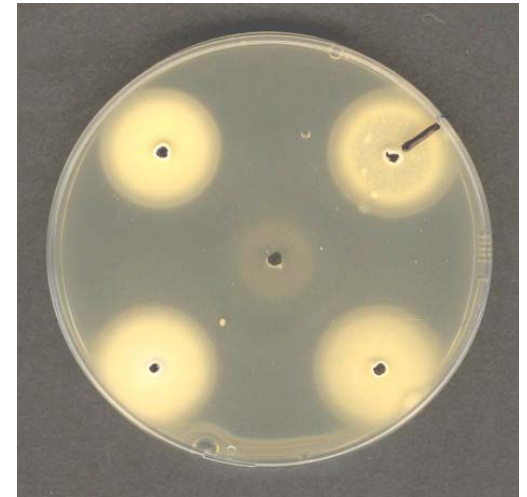
M. japonica



M. dermatis



M. nana



M. yamatoensis

Caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques des espèces du genre *Malassezia*

espèces	Morphologie	SDA (32°C)	Tween				CremophorEL	Catalase	β-glucosidase	Croissance (Dixon)		
			20	40	60	80				32° C	37°C	40°C
<i>M.furfur</i>	GEC	-	+ [-]	+ [-]	+ [-]	+ [-]	+	+ [-]	_ or ±	+	+	+
<i>M.obtusa</i>	EC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	_ or ±	-
<i>M. gobosa</i>	G	-	-	-	-	-	-	+	-	+	_ or ±	-
<i>M. slooffiae</i>	EC	-	+ or ±[-]	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>M. sympodialis</i>	E	-	_ or ±	+	+	+	-[+]	+	+	+	+	+
<i>M. restricta</i>	GE	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+ or _	-
<i>M. dermatis</i>	GE	-	+	+	+	+	± or +	+	-	+	+	+
<i>M. japonica</i>	G	-	-	±	+	-	?	+	?	+	+	-
<i>M. nana</i>	E	-	V	+	+	±	-	+	-	+	+	+ or _
<i>M. yamatoensis</i>	E	-	+	+	+	+	?	+	?	+	+	-
<i>M. equina</i>	GE	-	±	+	+	+	-	+	- [+]	+	±	-
<i>M. caprae</i>	GE	-	-	+	+	+ [-]	-	+	+ [-]	+	_ or ±	-
<i>M. cuniculi</i>	G	-	-	-	-	-	-	+	+	_ Or ±	+	+
<i>M. pachydermatis</i>	E	+ or ±	+	+	+	+	+	+ or ±	+ [-]	+	+	+

Identification moléculaire

Molecular tools established and utilized for the identification and differentiation of species of *Malassezia* and/or the detection of intraspecific genetic variation.

Molecular tools	DNA regions	<i>Malassezia</i> spp. studied	Relevant information	Selected references
Direct DNA sequencing	ITS-1	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> and <i>M. nana</i> .	Strains of <i>M. nana</i> from Japan were distinct from those from Brazil.	[16]
			All species were identified. Seven sequence types for <i>M. furfur</i> .	[50]
			Eight sequence types in <i>M. pachydermatis</i> linked to the presence of lesions and sampling sites.	[62]
			Five sequence types for <i>M. globosa</i> with one associated with extensive pityriasis versicolor.	[69]
	LSU	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> and <i>M. nana</i> .	Three different genotypes in <i>M. pachydermatis</i> related to the presence of skin lesions.	[22,62]
			Four different variants within <i>M. sympodialis</i> linked to host species.	[51]
			Eight sequence types for <i>M. pachydermatis</i> from dogs, cats and humans. Samples from humans identical genetically to those from other animals.	[58]
	chs-2	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> and <i>M. obtusa</i> .	All species identified and differentiated.	[59]
			Three genetic variants of <i>M. pachydermatis</i> from dogs linked to skin lesions.	[22,62]
			Four chs-2 genetic variants within <i>M. pachydermatis</i> of animal origin, linked to skin lesions or otitis.	[60] [61]
	ITS-2	<i>M. furfur</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> and <i>M. pachydermatis</i> .	Nucleotide differences of 15.6–17.9% between <i>M. furfur</i> and <i>M. japonica</i> .	[14]
	IGS-1		<i>M. globosa</i> and <i>M. restricta</i> grouped according to their occurrence on skin with seborrheic, atopic dermatitis and healthy skin.	[53]
Remarkable intraspecific diversity within <i>M. pachydermatis</i> .	[56]			
		Absence of intraspecific polymorphism within <i>M. nana</i> from various geographical origins.	[57]	

PCR-based restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)	ITS-1, ITS-2 and LSU	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> , <i>M. nana</i> , <i>M. japonica</i> , <i>M. yamatoensis</i> and <i>M. dermatis</i> .	<i>M. furfur</i> strains from distinct geographical regions in Europe display an absence/presence of a cleavage site in the ITS-2 region for the endonuclease <i>Ban</i> I.	[46]
			All species were identified and differentiated using the endonucleases <i>Cfo</i> I and <i>Ban</i> I.	[64]
PCR-based single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis	ITS-1 and <i>chs-2</i>	<i>M. globosa</i> , <i>M. sympodialis</i> and <i>M. pachydermatis</i> .	<i>M. pachydermatis</i> represented at least three genotypes based on PCR-SSCP analyses of <i>chs-2</i> and ITS-1.	[22]
			<i>M. sympodialis</i> displays a uniform ITS-1 PCR-SSCP profile.	[69]
Real-time PCR	ITS-1 and ITS-2	<i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> and <i>M. pachydermatis</i> .	<i>M. restricta</i> and <i>M. globosa</i> were the most prevalent species from both healthy subjects and from patients with psoriasis, atopic dermatitis, and pityriasis versicolor.	[55,72–74]
Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)	Total genomic DNA	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> and <i>M. obtusa</i> .	Polymorphic profiles for <i>M. furfur</i> linked to pityriasis versicolor or seborrhoeic dermatitis.	[39]
			Intraspecific variation in DNA patterns for <i>M. furfur</i> , <i>M. slooffiae</i> and <i>M. pachydermatis</i> and presence of specific genetic-types linked to host and/or sampling sites.	[41,81]
			Polymorphic profiles for all <i>Malassezia</i> species without clinical association.	[49]
Amplified fragment length polymorphism (AFLP)	Total genomic DNA	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> , <i>M. obtusa</i> and <i>M. dermatis</i> .	All species were identified and differentiated. Specific genotypes of <i>Malassezia furfur</i> linked to geographical origin.	[45]
Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)	SSU	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> and <i>M. obtusa</i> .	All species of <i>Malassezia</i> identified and differentiated. No intraspecific variation detected.	[49]
Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)	Chromosomal DNA	<i>M. furfur</i> , <i>M. globosa</i> , <i>M. restricta</i> , <i>M. sympodialis</i> , <i>M. pachydermatis</i> , <i>M. slooffiae</i> and <i>M. obtusa</i> .	All species of <i>Malassezia</i> identified and differentiated. Intraspecific variation detected only within <i>M. furfur</i> .	[47]

Amplification par PCR des espèces du genre *Malassezia* utilisant des amorces spécifiques à la région ITS

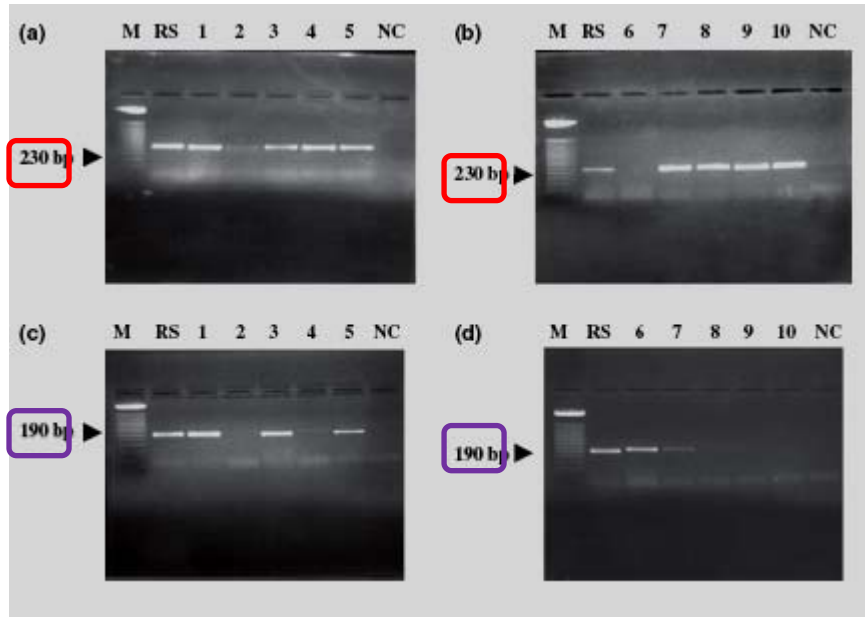


Figure 1: (a,b): *M. furfur* (230pb)
(c,d): *M. sympodialis* (190pb)

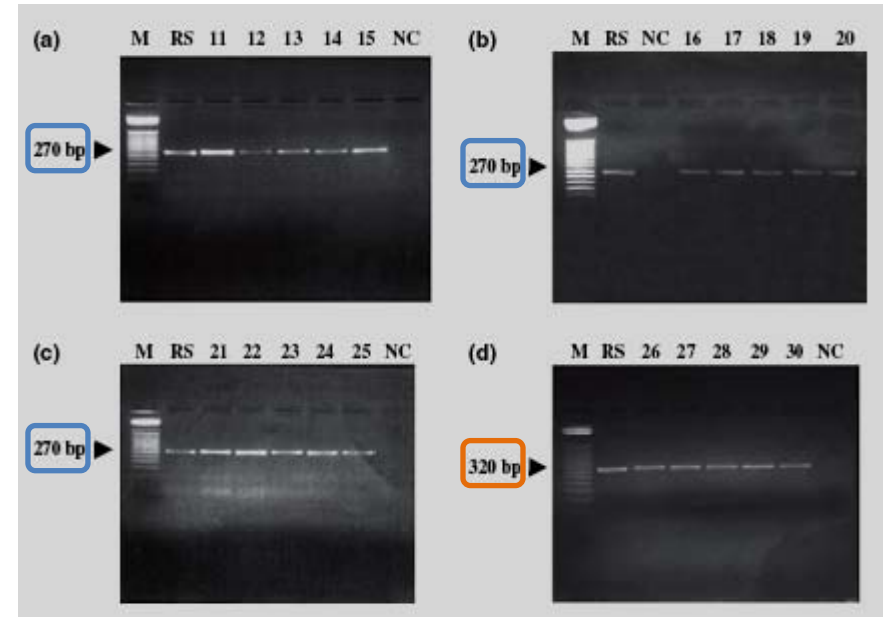


Figure 2: (a, b, c): *M. globosa* (270pb)
(d): *M. restricta* (320pb)

Traitement de Pityriasis versicolor

Décapage local:

- **Savonnage au savon de Marseille**
- **Application d'une solution détergente**
- **Application d'un gel nettoyant moussant (Mycogel)**
- **Application d'une solution d'acide salicylique à 3% dans l'alcool à 70%**

Traitements Topiques utilisés dans le Pityriasis versicolor

Nom	Forme galénique	Modalités d'application
Dérivés Imidazolés		
Bifonazole (Amycor®)*	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
	Solution à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
Clotrimazole (Trimisten®)*	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
Econazole (Pevaryl®)* (Fongicil®)* (Ecorex®)*	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
	Spray solution à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
Isoconazole (Fazol®)*	Crème à 2 p. 100	2 appl/j x15 j
Kétoconazole (Kétoderm®)*	Crème à 2 p. 100	2 appl/j x15 j
	Gel moussant à 2 p. 100	1 application
Miconazole (Daktarin®)*	Lotion à 2 p. 100	2 appl/j x15 j
Omoconazole (Fongamil®)*	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
	Solution à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
Sulconazole (Myk 1 p. 100®)*	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
	Solution à 1 p. 100	2 appl/j x15 j
Tioconazole (Trotyd100®)*	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j

Traitements topiques utilisés dans le Pityriasis versicolor

Nom	Forme galénique	Modalités d'application
Tolnaftate		
Sporiline ®	Lotion à 1 p. 100 Crème à 1 p. 100	2 appl/j x15 j 2 appl/j x15 j
Pyridones		
Ciclopiroxolamine (Mycorex®)	Crème à 1 p. 100	2 appl/j x 3 sem
Mycoster®	Solution à 1 p. 100	2 appl/j x 3 sem
Allylamines		
Terbinafine (Lamisil®)	Crème à 1 p. 100 Solution à 1 p. 100*	2 appl/j x 7 j 2 appl/j x 7 j
Disulfure de sélénium		
Selsun®	Solution à 2,5 p. 100	1 appl/j x 7 à 10 j Le 1 ^{er} et le 3 ^{ème} jour du mois pendant 6 mois
Propylène glycol	Solution à 50 p. 100	2 appl/j x 2 sem
Pyrithione de zinc	Shampooing	1 appl/j x 2 sem

Traitement de Pityriasis versicolor

TTT par voie générale:

Indications: Formes étendues et récidivantes

- Kétoconazole (Nizoral) 200mg/ j 5 à 10j
- Itraconazole (Sporanox) 200mg/ j 5 à 7j
- Fluconazole (Triflucan) 400mg **chez l'adulte en 1 prise**

Traitement de folliculite

- **Propylène glycol en solution aqueuse à 50%:
2 fois /j 3 semaines**
- **Clotrimazole ou miconazole crème 1 fois par
jour 2 à 3 semaines**
- **Kétoconazole 200mg/ j 2 à 3 semaines**

Conclusions

Levures *Malassezia* =

- **basidiomycètes présentant des caractéristiques morphologiques et physiologiques très originales**
- **pathogènes opportunistes:**
 - Homme + Nombreuses espèces animales**
- **actuellement, 14 espèces décrites**
 - (sans doute beaucoup d'autres...)**
- **identification délicate des caractères phénotypiques**
 - apport des outils de biologie moléculaire**