

UNIVERSITE MOHAMMED V - SOUISSI  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2013

THESE N°: 51

ETUDE MOLECULAIRE ET PROFIL DE RESISTANCE  
PHENOTYPIQUE AUX ANTIFONGIQUES SYSTEMIQUES  
DE 85 SOUCHES DE CANDIDA ISOLEES DANS LES SERVICES  
A RISQUE DU CHU DE RABAT

THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le :.....*

PAR

Mlle. Nissrine BELMAATI  
*Née le 11 novembre 1988 à Rabat*

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : Résistance – Antifongigramme – PCR – E-TEST – Réanimation.

JURY

Mme. N. HAJJAJ HASSOUNI  
Professeur de Rhumatologie

PRESIDENT

Mr. B. E. LMIMOUNI  
Professeur de Parasitologie

RAPPORTEUR

Mr. I. LAHLOU AMINE  
Professeur de Microbiologie

Mr. A. BELMEKKI  
Professeur d'Hématologie

Mr. M. RABHI  
Professeur de Médecine Interne

JUGES

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سبحانك لا علم لنا إلا ما علمتنا  
إنك أنت العليم الحكيم

بِسْمِ اللَّهِ  
الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

سورة البقرة: الآية: 31





**UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI**  
**FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT**

**DOYENS HONORAIRES :**

- 1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ**  
1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI  
2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



**ADMINISTRATION :**

- Doyen par intérim : Professeur Ali BENOMAR  
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines  
Professeur Mohammed JIDDANE  
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération  
Professeur Ali BENOMAR  
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie  
Professeur Yahia CHERRAH  
Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

**PROFESSEURS :**

Mars, Avril et Septembre 1980

1.

Mai et Octobre 1981

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 2. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih | Chirurgie Cardio-Vasculaire |
| 3. Pr. TAOBANE Hamid*       | Chirurgie Thoracique        |

Mai et Novembre 1982

- |                                 |                        |
|---------------------------------|------------------------|
| 4. Pr. ABROUQ Ali*              | Oto-Rhino-Laryngologie |
| 5. Pr. BENSOUHA Mohamed         | Anatomie               |
| 6. Pr. BENOSMAN Abdellatif      | Chirurgie Thoracique   |
| 7. Pr. LAHBABI Naïma ép. AMRANI | Physiologie            |

Novembre 1983

- |                                  |                |
|----------------------------------|----------------|
| 8. Pr. BELLAKHDAR Fouad          | Neurochirurgie |
| 9. Pr. HAJJAJ Najia ép. HASSOUNI | Rhumatologie   |

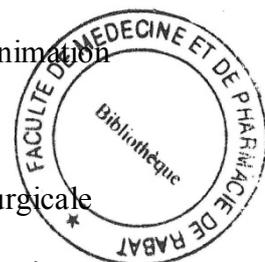
Décembre 1984

- |                                      |                  |
|--------------------------------------|------------------|
| 10. Pr. BOUCETTA Mohamed*            | Neurochirurgie   |
| 11. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil | Radiothérapie    |
| 12. Pr. MAAOUNI Abdelaziz            | Médecine Interne |

13. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi  
 14. Pr. SETTAF Abdellatif  
Novembre et Décembre 1985  
 15. Pr. BENJELLOUN Halima  
 16. Pr. BENSALID Younes  
 17. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa  
 18. Pr. IRAQI Ghali  
 19.

Anesthésie -Réanimation  
 Chirurgie

Cardiologie  
 Pathologie Chirurgicale  
 Neurologie  
 Pneumo-phtisiologie



Janvier, Février et Décembre 1987

20. Pr. AJANA Ali  
 21. Pr. CHAHED OUAZZANI Houria ép.TAOBANE  
 22. Pr. EL FASSY FIIHRI Mohamed Taoufiq  
 23. Pr. EL HAITEM Naïma  
 24. Pr. EL YAACOUBI Moradh  
 25. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah  
 26. Pr. LACHKAR Hassan  
 27. Pr. YAHYAOUI Mohamed

Radiologie  
 Gastro-Entérologie  
 Pneumo-phtisiologie  
 Cardiologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Gastro-Entérologie  
 Médecine Interne  
 Neurologie

Décembre 1988

28. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib  
 29. Pr. DAFIRI Rachida  
 30. Pr. HERMAS Mohamed  
 31. Pr. TOLOUNE Farida\*

Chirurgie Pédiatrique  
 Radiologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

32. Pr. ADNAOUI Mohamed  
 33. Pr. AOUNI Mohamed  
 34. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali  
 35. Pr. CHAD Bouziane  
 36. Pr. CHKOFF Rachid  
 37. Pr. HACHIM Mohammed\*  
 38. Pr. KHARBACH Aïcha  
 39. Pr. MANSOURI Fatima  
 40. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda  
 41. Pr. TAZI Saoud Anas

Médecine Interne  
 Médecine Interne  
 Cardiologie  
 Pathologie Chirurgicale  
 Pathologie Chirurgicale  
 Médecine-Interne  
 Gynécologie -Obstétrique  
 Anatomie-Pathologique  
 Neurologie  
 Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

42. Pr. AL HAMANY Zaïtounia  
 43. Pr. AZZOUZI Abderrahim  
 44. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM  
 45. Pr. BELKOUCHI Abdelkader  
 46. Pr. BENABDELLAH Chahrazad  
 47. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif  
 48. Pr. BENSOUDA Yahia

Anatomie-Pathologique  
 Anesthésie Réanimation  
 Néphrologie  
 Chirurgie Générale  
 Hématologie  
 Chirurgie Générale  
 Pharmacie galénique

49. Pr. BERRAHO Amina
50. Pr. BEZZAD Rachid
51. Pr. CHABRAOUI Layachi
52. Pr. CHERRAH Yahia
53. Pr. CHOKAIRI Omar
54. Pr. JANATI Idrissi Mohamed\*
55. Pr. KHATTAB Mohamed
56. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH
57. Pr. TAOUFIK Jamal

Ophtalmologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Biochimie et Chimie  
 Pharmacologie  
 Histologie Embryologie  
 Chirurgie Générale  
 Pédiatrie  
 Pharmacologie  
 Chimie thérapeutique



#### Décembre 1992

58. Pr. AHALLAT Mohamed
59. Pr. BENSOUADA Adil
60. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
61. Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza
62. Pr. CHRAIBI Chafiq
63. Pr. DAOUDI Rajae
64. Pr. DEHAYNI Mohamed\*
65. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
66. Pr. FELLAT Rokaya
67. Pr. GHAFIR Driss\*
68. Pr. JIDDANE Mohamed
69. Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
70. Pr. TAGHY Ahmed
71. Pr. ZOUHDI Mimoun

Chirurgie Générale  
 Anesthésie Réanimation  
 Radiologie  
 Gastro-Entérologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Ophtalmologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Neurochirurgie  
 Cardiologie  
 Médecine Interne  
 Anatomie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Chirurgie Générale  
 Microbiologie

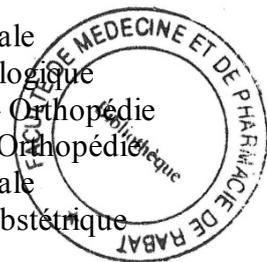
#### Mars 1994

72. Pr. AGNAOU Lahcen
73. Pr. BENCHERIFA Fatiha
74. Pr. BENJAAFAR Noureddine
75. Pr. BENJELLOUN Samir
76. Pr. BEN RAIS Nozha
77. Pr. CAOUI Malika
78. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
79. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT
80. Pr. EL AOUAD Rajae
81. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
82. Pr. EL HASSANI My Rachid
83. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur
84. Pr. ERROUGANI Abdelkader
85. Pr. ESSAKALI Malika
86. Pr. ETTAYEBI Fouad
87. Pr. HADRI Larbi\*
88. Pr. HASSAM Badredine

Ophtalmologie  
 Ophtalmologie  
 Radiothérapie  
 Chirurgie Générale  
 Biophysique  
 Biophysique  
 Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
 Gynécologie Obstétrique  
 Immunologie  
 Traumatologie-Orthopédie  
 Radiologie  
 Médecine Interne  
 Chirurgie Générale  
 Immunologie  
 Chirurgie Pédiatrique  
 Médecine Interne  
 Dermatologie

89. Pr. IFRINE Lahssan
90. Pr. JELTHI Ahmed
91. Pr. MAHFOUD Mustapha
92. Pr. MOUDENE Ahmed\*
93. Pr. OULBACHA Said
94. Pr. RHRAB Brahim
95. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR
- 96.

Chirurgie Générale  
 Anatomie Pathologique  
 Traumatologie – Orthopédie  
 Traumatologie- Orthopédie  
 Chirurgie Générale  
 Gynécologie –Obstétrique  
 Dermatologie



#### Mars 1994

97. Pr. ABBAR Mohamed\*
98. Pr. ABDELHAK M'barek
99. Pr. BELAIDI Halima
100. Pr. BRAHMI Rida Slimane
101. Pr. BENTAHILA Abdelali
102. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
103. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
104. Pr. CHAMI Ilham
105. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae
106. Pr. EL ABBADI Najia
107. Pr. HANINE Ahmed\*
108. Pr. JALIL Abdelouahed
109. Pr. LAKHDAR Amina
110. Pr. MOUANE Nezha

Urologie  
 Chirurgie – Pédiatrique  
 Neurologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Pédiatrie  
 Gynécologie – Obstétrique  
 Traumatologie – Orthopédie  
 Radiologie  
 Ophtalmologie  
 Neurochirurgie  
 Radiologie  
 Chirurgie Générale  
 Gynécologie Obstétrique  
 Pédiatrie

#### Mars 1995

111. Pr. ABOUQUAL Redouane
112. Pr. AMRAOUI Mohamed
113. Pr. BAIDADA Abdelaziz
114. Pr. BARGACH Samir
115. Pr. BEDDOUCHE Amoqrane\*
116. Pr. CHAARI Jilali\*
117. Pr. DIMOU M'barek\*
118. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine\*
119. Pr. EL MESNAOUI Abbes
120. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
121. Pr. FERHATI Driss
122. Pr. HASSOUNI Fadil
123. Pr. HDA Abdelhamid\*
124. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
125. Pr. IBRAHIMY Wafaa
126. Pr. MANSOURI Aziz
127. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
128. Pr. SEFIANI Abdelaziz

Réanimation Médicale  
 Chirurgie Générale  
 Gynécologie Obstétrique  
 Gynécologie Obstétrique  
 Urologie  
 Médecine Interne  
 Anesthésie Réanimation  
 Anesthésie Réanimation  
 Chirurgie Générale  
 Oto-Rhino-Laryngologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène  
 Cardiologie  
 Urologie  
 Ophtalmologie  
 Radiothérapie  
 Ophtalmologie  
 Génétique

129. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale

Décembre 1996

- 130. Pr. AMIL Touriya\*
- 131. Pr. BELKACEM Rachid
- 132. Pr. BOULANOVAR Abdelkrim
- 133. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
- 134. Pr. GAOUZI Ahmed
- 135. Pr. MAHFOUDI M'barek\*
- 136. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
- 137. Pr. MOHAMMADI Mohamed
- 138. Pr. MOULINE Soumaya
- 139. Pr. OUADGHIRI Mohamed
- 140. Pr. OUZEDDOUN Naima
- 141. Pr. ZBIR EL Mehdi\*

Radiologie  
Chirurgie Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale\*  
Pédiatrie  
Radiologie  
Chirurgie Générale  
Médecine Interne  
Pneumo-phtisiologie  
Traumatologie-Orthopédie  
Néphrologie  
Cardiologie



Novembre 1997

- 142. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
- 143. Pr. BEN AMAR Abdesselem
- 144. Pr. BEN SLIMANE Lounis
- 145. Pr. BIROUK Nazha
- 146. Pr. CHAOUIR Souad\*
- 147. Pr. DERRAZ Said
- 148. Pr. ERREIMI Naima
- 149. Pr. FELLAT Nadia
- 150. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
- 151. Pr. HAIMEUR Charki\*
- 152. Pr. KADDOURI Nouredine
- 153. Pr. KOUTANI Abdellatif
- 154. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
- 155. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
- 156. Pr. NAZI M'barek\*
- 157. Pr. OUAHABI Hamid\*
- 158. Pr. TAOUFIQ Jallal
- 159. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Gynécologie-Obstétrique  
Chirurgie Générale  
Urologie  
Neurologie  
Radiologie  
Neurochirurgie  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Radiologie  
Anesthésie Réanimation  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Neurologie  
Psychiatrie  
Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

- 160. Pr. AFIFI RAJAA
- 161. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali\*
- 162. Pr. ALOUANE Mohammed\*
- 163. Pr. BENOMAR ALI
- 164. Pr. BOUGTAB Abdesslam
- 165. Pr. ER RIHANI Hassan
- 166. Pr. EZZAITOUNI Fatima
- 167. Pr. LAZRAK Khalid \*

Gastro-Entérologie  
Pneumo-phtisiologie  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Neurologie  
Chirurgie Générale  
Oncologie Médicale  
Néphrologie  
Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

168. Pr. BENKIRANE Majid\*  
169. Pr. KHATOURI ALI\*  
170. Pr. LABRAIMI Ahmed\*

Janvier 2000

171. Pr. ABID Ahmed\*  
172. Pr. AIT OUMAR Hassan  
173. Pr. BENCHERIF My Zahid  
174. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd  
175. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine  
176. Pr. CHAOUI Zineb  
177. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer  
178. Pr. ECHARRAB El Mahjoub  
179. Pr. EL FTOUH Mustapha  
180. Pr. EL MOSTARCHID Brahim\*  
181. Pr. EL OTMANY Azzedine  
182. Pr. HAMMANI Lahcen  
183. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim  
184. Pr. ISMAILI Hassane\*  
185. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss  
186. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim\*  
187. Pr. TACHINANTE Rajae  
188. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

Novembre 2000

189. Pr. AIDI Saadia  
190. Pr. AIT OURHROUI Mohamed  
191. Pr. AJANA Fatima Zohra  
192. Pr. BENAMR Said  
193. Pr. BENCHEKROUN Nabiha  
194. Pr. CHERTI Mohammed  
195. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
196. Pr. EL HASSANI Amine  
197. Pr. EL IDGHIRI Hassan  
198. Pr. EL KHADER Khalid  
199. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
200. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
201. Pr. HSSAIDA Rachid\*  
202. Pr. LAHLOU Abdou  
203. Pr. MAFTAH Mohamed\*  
204. Pr. MAHASSINI Najat  
205. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
206. Pr. NASSIH Mohamed\*

Hématologie  
Cardiologie  
Anatomie Pathologique



Pneumophtisiologie\*  
Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie  
Ophtalmologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Pneumo-phtisiologie  
Neurochirurgie  
Chirurgie Générale  
Radiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Traumatologie Orthopédie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie-Réanimation  
Anesthésie-Réanimation  
Médecine Interne

Neurologie  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Chirurgie Générale  
Ophtalmologie  
Cardiologie  
Anesthésie-Réanimation  
Pédiatrie  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Urologie  
Rhumatologie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Anesthésie-Réanimation  
Traumatologie Orthopédie  
Neurochirurgie  
Anatomie Pathologique  
Pédiatrie  
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale

207. Pr. ROUIMI Abdelhadi  
Décembre 2001  
 208. Pr. ABABOU Adil  
 209. Pr. BALKHI Hicham\*  
 210. Pr. BELMEKKI Mohammed  
 211. Pr. BENABDELJLIL Maria  
 212. Pr. BENAMAR Loubna  
 213. Pr. BENAMOR Jouda  
 214. Pr. BENELBARHDADI Imane  
 215. Pr. BENNANI Rajae  
 216. Pr. BENOACHANE Thami  
 217. Pr. BENYOUSSEF Khalil  
 218. Pr. BERRADA Rachid  
 219. Pr. BEZZA Ahmed\*  
 220. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
 221. Pr. BOUHOUCHE Rachida  
 222. Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
 223. Pr. CHAT Latifa  
 224. Pr. CHELLAOUI Mounia  
 225. Pr. DAALI Mustapha\*  
 226. Pr. DRISSI Sidi Mourad\*  
 227. Pr. EL HAJOUJI Ghziel Samira  
 228. Pr. EL HIJRI Ahmed  
 229. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
 230. Pr. EL MADHI Tarik  
 231. Pr. EL MOUSSAIF Hamid  
 232. Pr. EL OUNANI Mohamed  
 233. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil  
 234. Pr. ETTAIR Said  
 235. Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
 236. Pr. GOURINDA Hassan  
 237. Pr. HRORA Abdelmalek  
 238. Pr. KABBAJ Saad  
 239. Pr. KABIRI El Hassane\*  
 240. Pr. LAMRANI Moulay Omar  
 241. Pr. LEKEHAL Brahim  
 242. Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
 243. Pr. MEDARHRI Jalil  
 244. Pr. MIKDAME Mohammed\*  
 245. Pr. MOHSINE Raouf  
 246. Pr. NOUINI Yassine  
 247. Pr. SABBAH Farid  
 248. Pr. SEFIANI Yasser

Neurologie

Anesthésie-Réanimation  
 Anesthésie-Réanimation  
 Ophtalmologie  
 Neurologie  
 Néphrologie  
 Pneumo-phtisiologie  
 Gastro-Entérologie  
 Cardiologie  
 Pédiatrie  
 Dermatologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Rhumatologie  
 Anatomie  
 Cardiologie  
 Radiologie  
 Radiologie  
 Radiologie  
 Chirurgie Générale  
 Radiologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Anesthésie-Réanimation  
 Neuro-Chirurgie  
 Chirurgie-Pédiatrique  
 Ophtalmologie  
 Chirurgie Générale  
 Radiologie  
 Pédiatrie  
 Neuro-Chirurgie  
 Chirurgie-Pédiatrique  
 Chirurgie Générale  
 Anesthésie-Réanimation  
 Chirurgie Thoracique  
 Traumatologie Orthopédie  
 Chirurgie Vasculaire Périphérique  
 Médecine Interne  
 Chirurgie Générale  
 Hématologie Clinique  
 Chirurgie Générale  
 Urologie  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Vasculaire Périphérique



249. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

Décembre 2002

250. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
251. Pr. AMEUR Ahmed \*  
252. Pr. AMRI Rachida  
253. Pr. AOURARH Aziz\*  
254. Pr. BAMOU Youssef \*  
255. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*  
256. Pr. BENBOUAZZA Karima  
257. Pr. BENZEKRI Laila  
258. Pr. BENZZOUBEIR Nadia\*  
259. Pr. BERNOUSSI Zakiya  
260. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya  
261. Pr. CHOHO Abdelkrim \*  
262. Pr. CHKIRATE Bouchra  
263. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
264. Pr. EL ALJ Haj Ahmed  
265. Pr. EL BARNOUSSI Leila  
266. Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
267. Pr. EL MANSARI Omar\*  
268. Pr. ES-SADEL Abdelhamid  
269. Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
270. Pr. HADDOUR Leila  
271. Pr. HAJJI Zakia  
272. Pr. IKEN Ali  
273. Pr. ISMAEL Farid  
274. Pr. JAAFAR Abdeloihab\*  
275. Pr. KRIOUILE Yamina  
276. Pr. LAGHMARI Mina  
277. Pr. MABROUK Hfid\*  
278. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
279. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid\*  
280. Pr. MOUSTAINE My Rachid  
281. Pr. NAITLHO Abdelhamid\*  
282. Pr. OUJILAL Abdelilah  
283. Pr. RACHID Khalid \*  
284. Pr. RAISS Mohamed  
285. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
286. Pr. RHOU Hakima  
287. Pr. SIAH Samir \*  
288. Pr. THIMOU Amal  
289. Pr. ZENTAR Aziz\*

Pédiatrie

- Anatomie Pathologique  
Urologie  
Cardiologie  
Gastro-Entérologie  
Biochimie-Chimie  
Endocrinologie et Maladies Métaboliques  
Rhumatologie  
Dermatologie  
Gastro-Entérologie  
Anatomie Pathologique  
Psychiatrie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Chirurgie Pédiatrique  
Urologie  
Gynécologie Obstétrique  
Dermatologie  
Chirurgie Générale  
Chirurgie Générale  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Ophtalmologie  
Urologie  
Traumatologie Orthopédie  
Traumatologie Orthopédie  
Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Traumatologie Orthopédie  
Gynécologie Obstétrique  
Cardiologie  
Traumatologie Orthopédie  
Médecine Interne  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Traumatologie Orthopédie  
Chirurgie Générale  
Pneumophtisiologie  
Néphrologie  
Anesthésie Réanimation  
Pédiatrie  
Chirurgie Générale



## **PROFESSEURS AGREGES :**

### **Janvier 2004**

290. Pr. ABDELLAH El Hassan
291. Pr. AMRANI Mariam
292. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
293. Pr. BENKIRANE Ahmed\*
294. Pr. BOUGHALEM Mohamed\*
295. Pr. BOULAADAS Malik
296. Pr. BOURAZZA Ahmed\*
297. Pr. CHAGAR Belkacem\*
298. Pr. CHERRADI Nadia
299. Pr. EL FENNI Jamal\*
300. Pr. EL HANCHI ZAKI
301. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
302. Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*
303. Pr. HACHI Hafid
304. Pr. JABOUIRIK Fatima
305. Pr. KARMANE Abdelouahed
306. Pr. KHABOUZE Samira
307. Pr. KHARMAZ Mohamed
308. Pr. LEZREK Mohammed\*
309. Pr. MOUGHIL Said
310. Pr. SASSENOU ISMAIL\*
311. Pr. TARIB Abdelilah\*
312. Pr. TIJAMI Fouad
313. Pr. ZARZUR Jamila

### **Janvier 2005**

314. Pr. ABBASSI Abdellah
315. Pr. AL KANDRY Sif Eddine\*
316. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
317. Pr. ALLALI Fadoua
318. Pr. AMAZOUZI Abdellah
319. Pr. AZIZ Noureddine\*
320. Pr. BAHIRI Rachid
321. Pr. BARKAT Amina
322. Pr. BENHALIMA Hanane
323. Pr. BENHARBIT Mohamed
324. Pr. BENYASS Aatif
325. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
326. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
327. Pr. DOUDOUH Abderrahim\*
328. Pr. EL HAMZAOUI Sakina
329. Pr. HAJJI Leila

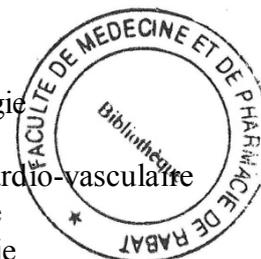


Ophtalmologie  
Anatomie Pathologique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Gastro-Entérologie  
Anesthésie Réanimation  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale  
Neurologie  
Traumatologie Orthopédie  
Anatomie Pathologique  
Radiologie  
Gynécologie Obstétrique  
Pédiatrie  
Cardiologie  
Chirurgie Générale  
Pédiatrie  
Ophtalmologie  
Gynécologie Obstétrique  
Traumatologie Orthopédie  
Urologie  
Chirurgie Cardio-Vasculaire  
Gastro-Entérologie  
Pharmacie Clinique  
Chirurgie Générale  
Cardiologie

Chirurgie Réparatrice et Plastique  
Chirurgie Générale  
Microbiologie  
Rhumatologie  
Ophtalmologie  
Radiologie  
Rhumatologie  
Pédiatrie  
Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale  
Ophtalmologie  
Cardiologie  
Ophtalmologie  
Ophtalmologie  
Biophysique  
Microbiologie  
Cardiologie

330. Pr. HESSISSEN Leila  
 331. Pr. JIDAL Mohamed\*  
 332. Pr. KARIM Abdelouahed  
 333. Pr. KENDOUSI Mohamed\*  
 334. Pr. LAAROUSSI Mohamed  
 335. Pr. LYAGOUBI Mohammed  
 336. Pr. NIAMANE Radouane\*  
 337. Pr. RAGALA Abdelhak  
 338. Pr. SBIHI Souad  
 339. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam  
 340. Pr. ZERAIDI Najia

Pédiatrie  
 Radiologie  
 Ophtalmologie  
 Cardiologie  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Parasitologie  
 Rhumatologie  
 Gynécologie Obstétrique  
 Histo-Embryologie Cytogénétique  
 Ophtalmologie  
 Gynécologie Obstétrique



#### **AVRIL 2006**

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen\*  
 425. Pr. AKJOUJ Said\*  
 427. Pr. BELMEKKI Abdelkader\*  
 428. Pr. BENCHEIKH Razika  
 429. Pr. BIYI Abdelhamid\*  
 430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine  
 431. Pr. BOULAHYA Abdellatif\*  
 432. Pr. CHEIKHAOUI Younes  
 433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas  
 434. Pr. DOGHMI Nawal  
 435. Pr. ESSAMRI Wafaa  
 436. Pr. FELLAT Ibteissam  
 437. Pr. FAROUDY Mamoun  
 438. Pr. GHADOUANE Mohammed\*  
 439. Pr. HARMOUCHE Hicham  
 440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed\*  
 441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine  
 442. Pr. JROUNDI Laila  
 443. Pr. KARMOUNI Tariq  
 444. Pr. KILI Amina  
 445. Pr. KISRA Hassan  
 446. Pr. KISRA Mounir  
 447. Pr. KHARCHAFI Aziz\*  
 448. Pr. LAATIRIS Abdelkader\*  
 449. Pr. LMIMOUNI Badreddine\*  
 450. Pr. MANSOURI Hamid\*  
 451. Pr. NAZIH Naoual  
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak  
 453. Pr. SAFI Soumaya\*  
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra  
 455. Pr. SEFIANI Sana

Rhumatologie  
 Radiologie  
 Hématologie  
 O.R.L  
 Biophysique  
 Chirurgie - Pédiatrique  
 Chirurgie Cardio - Vasculaire  
 Chirurgie Cardio - Vasculaire  
 Gynécologie Obstétrique  
 Cardiologie  
 Gastro-entérologie  
 Cardiologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Urologie  
 Médecine Interne  
 Anesthésie Réanimation  
 Microbiologie  
 Radiologie  
 Urologie  
 Pédiatrie  
 Psychiatrie  
 Chirurgie - Pédiatrique  
 Médecine Interne  
 Pharmacie Galénique  
 Parasitologie  
 Radiothérapie  
 O.R.L  
 Psychiatrie  
 Endocrinologie  
 Psychiatrie  
 Anatomie Pathologique

456. Pr. SOUALHI Mouna  
 457. Pr. TELLAL Saida\*  
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

**Octobre 2007**

458.  
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid  
 461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar \*  
 462. Pr. BAITE Abdelouahed \*  
 463. Pr. TOUATI Zakia  
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra \*  
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine \*  
 466. Pr. SELKANE Chakir \*  
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef \*  
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi \*  
 469. Pr. EL ABSI Mohamed  
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader \*  
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad \*  
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq \*  
 473. Pr. GHARIB Nouredine  
 474. Pr. TABERKANET Mustafa \*  
 475. Pr. ISMAILI Nadia  
 476. Pr. MASRAR Azlarab  
 477. Pr. RABHI Monsef \*  
 478. Pr. MRABET Mustapha \*  
 479. Pr. SEKHSOKH Yessine \*  
 480. Pr. SEFFAR Myriame  
 481. Pr. LOUZI Lhousain \*  
 482. Pr. MRANI Saad \*  
 483. Pr. GANA Rachid  
 484. Pr. ICHOU Mohamed \*  
 485. Pr. TACHFOUTI Samira  
 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
 487. Pr. MELLAL Zakaria  
 488. Pr. AMMAR Haddou \*  
 489. Pr. AOUI Sarra  
 490. Pr. TLIGUI Houssain  
 491. Pr. MOUTAJ Redouane \*  
 492. Pr. ACHACHI Leila  
 493. Pr. MARC Karima  
 494. Pr. BENZIANE Hamid \*  
 495. Pr. CHERKAOUI Naoual \*  
 496. Pr. EL OMARI Fatima

- Pneumo – Phtisiologie  
 Biochimie  
 Pneumo – Phtisiologie



- Anesthésie réanimation  
 Anesthésier réanimation  
 Anesthésie réanimation  
 Anesthésie réanimation  
 Cardiologie  
 Biochimie  
 Biochimie  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie plastique  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Dermatologie  
 Hématologie biologique  
 Médecine interne  
 Médecine préventive santé publique et hygiène  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Virologie  
 Neuro chirurgie  
 Oncologie médicale  
 Ophtalmologie  
 Ophtalmologie  
 Ophtalmologie  
 ORL  
 Parasitologie  
 Parasitologie  
 Parasitologie  
 Pneumo phtisiologie  
 Pneumo phtisiologie  
 Pharmacie clinique  
 Pharmacie galénique  
 Psychiatrie

497. Pr. MAHI Mohamed \*  
 498. Pr. RADOUANE Bouchaib \*  
 499. Pr. KEBDANI Tayeb  
 500. Pr. SIFAT Hassan \*  
 501. Pr. HADADI Khalid \*  
 502. Pr. ABIDI Khalid  
 503. Pr. MADANI Naoufel  
 504. Pr. TANANE Mansour \*  
 505. Pr. AMHAJJI Larbi \*

### Décembre 2008

Pr TAHIRI My El Hassan\*  
 Pr ZOUBIR Mohamed\*

### Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes  
 Pr. AZENDOUR Hicham \*  
 Pr. BELYAMANI Lahcen \*  
 Pr. BOUHSAIN Sanae \*  
 Pr. OUKERRAJ Latifa  
 Pr. LAMSAOURI Jamal \*  
 Pr. MARMADE Lahcen  
 Pr. AMAHZOUNE Brahim \*  
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim \*  
 Pr. BOUNAIM Ahmed \*  
 Pr. EL MALKI Hadj Omar  
 Pr. MSSROURI Rahal  
 Pr. CHTATA Hassan Toufik \*  
 Pr. BOUI Mohammed \*  
 Pr. KABBAJ Nawal  
 Pr. FATHI Khalid  
 Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
 Pr. CHAKOUR Mohammed \*  
 Pr. DOGHMI Kamal \*  
 Pr. ABOUZAHIR Ali\*  
 Pr. ENNIBI Khalid \*  
 Pr. EL OUENNASS Mostapha  
 Pr. ZOUHAIR Said\*  
 Pr. L'KASSIMI Hachemi\*  
 Pr. AKHADDAR Ali \*  
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia  
 Pr. AGADR Aomar \*  
 Pr. KARBOUBI Lamya  
 Pr. MESKINI Toufik

Radiologie  
 Radiologie  
 Radiothérapie  
 Radiothérapie  
 Radiothérapie \*  
 Réanimation médicale  
 Réanimation médicale  
 Traumatologie orthopédie  
 Traumatologie orthopédie



Chirurgie Générale  
 Anesthésie Réanimation

Anatomie  
 Anesthésie Réanimation  
 Anesthésie Réanimation  
 Biochimie  
 Cardiologie  
 Chimie Thérapeutique  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Vasculaire Périphérique  
 Dermatologie  
 Gastro-entérologie  
 Gynécologie obstétrique  
 Hématologie biologique  
 Hématologie biologique  
 Hématologie clinique  
 Médecine interne  
 Médecine interne  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Neuro-chirurgie  
 Neurologie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie

Pr. KABIRI Meryem  
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*  
Pr. BASSOU Driss \*  
Pr. ALLALI Nazik  
Pr. NASSAR Ittimade  
Pr. HASSIKOU Hasna \*  
Pr. AMINE Bouchra  
Pr. BOUSSOUGA Mostapha \*  
Pr. KADI Said \*

### **Octobre 2010**

Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
Pr. ERRABIH Ikram  
Pr. CHERRADI Ghizlan  
Pr. MOSADIK Ahlam  
Pr. ALILOU Mustapha  
Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
Pr. DARBI Abdellatif\*  
Pr. EL HAFIDI Naima  
Pr. MALIH Mohamed\*  
Pr. BOUSSIF Mohamed\*  
Pr. EL MAZOUZ Samir  
Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
Pr. EL SAYEGH Hachem  
Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
Pr. RAISSOUNI Zakaria\*  
Pr. BOUAITY Brahim\*  
Pr. LEZREK Mounir  
Pr. NAZIH Mouna\*  
Pr. LAMALMI Najat  
Pr. ZOUAIDIA Fouad  
Pr. BELAGUID Abdelaziz  
Pr. DAMI Abdellah\*  
Pr. CHADLI Mariama\*

### **Mai 2012**

Pr. Abdelouahed AMRANI  
Pr. Mounir ER-RAJI  
Pr. Mouna EL ALAOUI MHAMDI  
Pr. Ahmed JAHID  
Pr. ABOUELALAA Khalil\*  
Pr. DRISSI Mohamed\*  
Pr. RAISSOUNI Maha\*  
Pr. EL KHATTABI Abdessadek\*

Pédiatrie  
Pneumo-phtisiologie  
Radiologie  
Radiologie  
Radiologie  
Rhumatologie  
Rhumatologie  
Traumatologie orthopédique  
Traumatologie orthopédique



Médecine interne  
Gastro entérologie  
Cardiologie  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie réanimation  
Radiologie  
Radiologie  
Pédiatrie  
Pédiatrie  
Médecine aérologique  
Chirurgie plastique et réparatrice  
Chirurgie pédiatrique  
Urologie  
Chirurgie générale  
Traumatologie Orthopédie  
ORL  
Ophtalmologie  
Hématologie  
Anatomie pathologique  
Anatomie pathologique  
Physiologie  
Biochimie chimie  
Microbiologie

Chirurgie Pédiatrique  
Chirurgie Pédiatrique  
Chirurgie Générale  
Anatomie Pathologique  
Anesthésie Réanimation  
Anesthésie Réanimation  
Cardiologie  
Médecine Interne

Pr. MEHSSANI Jamal\*  
Pr. BELAIZI Mohamed\*  
Pr. EL OUAZZANI Hanane\*  
Pr. BENCHEBBA Drissi\*



**ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES**  
*PROFESSEURS*

- |  |  |
|--|--|
| 1. Pr. ABOUDRAR Saadia                         | Psychiatrie                            |
| 2. Pr. ALAMI OUHABI Naima                      | Psychiatrie                            |
| 3. Pr. ALAOUI KATIM                            | Pneumophysiologie                      |
| 4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma              | Traumatologie Orthopédique             |
| 5. Pr. ANSAR M'hammed                          | Physiologie                            |
| 6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz                     | Biochimie                              |
| 7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed                         | Pharmacologie                          |
| 8. Pr. BOURJOUANE Mohamed                      | Histologie-Embryologie                 |
| 9. Pr. CHAHED OUAZZANI Lalla Chadia            | Chimie Organique et Pharmacie Chimique |
| 10. Pr. DAKKA Taoufiq                          | Applications Pharmaceutiques           |
| 11. Pr. DRAOUI Mustapha                        | Génétique Humaine                      |
| 12. Pr. EL GUESSABI Lahcen                     | Microbiologie                          |
| 13. Pr. ETTAIB Abdelkader                      | Biochimie                              |
| 14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbas                 | Physiologie                            |
| 15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed                      | Chimie Analytique                      |
| 16. Pr. IBRAHIMI Azeddine                      | Pharmacognosie                         |
| 17. Pr. KABBAJ Ouafae                          | Zootéchnie                             |
| 18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine                   | Pharmacologie                          |
| 19. Pr. REDHA Ahlam                            | Chimie Organique                       |
| 20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE M <sup>ed</sup> | Biotechnologie                         |
| 21. Pr. TOUATI Driss                           | Biochimie                              |
| 22. Pr. ZAHIDI Ahmed                           | Biologie                               |
| 23. Pr. ZELLOU Amina                           | Biochimie                              |
|  | Chimie Organique                       |
|  | Pharmacognosie                         |
|  | Pharmacologie                          |
|  | Chimie Organique                       |

\* *Enseignants Militaires*



*Dédicaces*



## *Louange à DIEU*

*Que la prière et le salut soient sur le prophète, que ce présent mémoire présente mon aviné. Je dédie ce travail:*

*A mes chers parents:*

*Belmaati Boubker et Maaninou Afaf*

*Il y a tant de choses à en sécher toute l'encre de ce monde mais aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et mon profond amour. Je ne vais jamais oublier vos sacrifices pour moi...*

*Votre générosité sans limite, vos sacrifices, votre présence et vos conseils qui m'ont beaucoup servi dans mes études et dans ma vie en général, Vous récoltez dans ce travail le fruit de vos efforts, votre présence faisait naître en moi l'espoir nécessaire pour aller de l'avant.*

*Que Dieu vous garde et vous procure santé, longue vie et bonheur éternel.*

*Vous êtes des parentes exceptionnelles je vous aime*

*A Ma Fille chérie :*

*Camélia*

*Depuis le premier jour de ta naissance, Depuis ton premier sourire, Tu es devenu mon rayon de soleil, Tu m'inspires tant d'amour Que je ne saurais dire...*

*Tous ces merveilleux instants partagés Ensemble en toute simplicité...Ta tendresse, ta fougue, tes éclats de rires, me comblent de joie...Mon cœur explose de fierté, de bonheur et d'amour à chaque étape accomplie.*

*Ma fille chérie, Je ne te dirai jamais assez combien je t'aime.*

*Ce travail t'est spécialement dédié.*

*A mes grands-parents :*

*Elarbi MAANINOU et Saïda ELMOUMNI*

*Belmaati Elmafadal et Chakroun Zhour*

*En témoignage de mon respect et mon amour.*

*A mon frère*

*Belmaati Jad*

*Tu possèdes dans ma vie une place originale, l'estime la chaleur et l'amour qui nous unissent.*

*Je suis très heureuse de pouvoir te présenter par ce travail le témoignage de mon profond amour et les liens de fraternité qui nous unissent. Je te souhaite une vie pleine de joie et de réussite mon petit frère adoré Et sache que je serai toujours là pour toi.*

*A Mon oncle et Mes cousin(e)s :*

*Chakib Maaninou, wael et lina*

*Je vous exprime ma reconnaissance et mon respect, Que ce travail soit l'expression de mon grand attachement. Je vous souhaite une vie pleine de bonheur.*

*A mes tantes :*

*Bouchera, Moumna*

*En témoignage du sentiment profond que je vous porte.*

*Je vous souhaite une longue vie pleine de bonheur.*

*A ma cousine et son mari :*

*Jihane cherkaoui et Nabil squalli*

*Puisse ce travail témoigné de ma profonde affection et de ma sincère estime.*

*A ma petite-nièce :*

*Yara squalli*

*Avec tout mon amour je te dédie ma princesse adorée ce travail.*

*A tous les membres de la famille BELMAATI et MAANINOU :*

*Petits et grands, et A toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

*A mes amies et collègues pharmacien(ne)s :*

*Merci pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble en quête de savoir.*

*Que vous souhaitez de mieux que le bonheur et le succès tout au long de votre vie.*



# *Remerciements*



*A notre Maître et Président de Thèse*

*Mme. Le Professeur N.HAJJAJ HASSOUNI*

*Professeur de Rhumatologie*

*Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce travail.*

*Nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre compétence, votre sérieux et votre richesse d'enseignement.*

*Veillez trouver, chère maître, dans ce modeste travail, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.*

*A notre maître et Rapporteur de thèse*

*Mr. Le Professeur B.E.LMIMOUNI*

*Professeur de Parasitologie*

*Vous avez bien voulu nous confier ce travail riche d'intérêt et nous guider à chaque étape de sa réalisation.*

*Vous nous avez toujours réservé le meilleur accueil, malgré vos obligations professionnelles.*

*Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre profonde gratitude tout en vous témoignant notre respect.*

*A notre maître et juge de thèse*

*Mr. Le Professeur I.LAHLOU AMINE*

*Professeur de Microbiologie*

*Nous sommes très sensibles par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.*

*Je vous suis très reconnaissant de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail.*

*Veillez trouver, cher maître, à travers ce modeste travail la manifestation de notre plus haute estime et de nos sentiments les plus respectueux,*

*A Notre Maître et Juge de Thèse*

*Mr. Le professeur. A.BELMEKKI*

*Professeur d'Hématologie*

*Vous avez accepté en toute simplicité de juger ce travail et c'est pour nous un grand honneur de vous voir siéger parmi notre jury de thèse.*

*Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à notre travail sans nous connaître.*

*Veillez trouver, cher maître, à travers ce modeste travail*

*La manifestation de notre plus haute estime et de nos sentiments les plus respectueux,*

*A Notre Maître et Juge de Thèse*

*Mr. Le professeur. M.RABHI*

*Professeur de Médecine interne*

*Nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre compétence, votre sérieux et votre richesse d'enseignement.*

*Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté d'être parmi nous malgré votre emploi du temps bien chargé.*

*Veillez trouver, cher maître, dans ce modeste travail, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.*



# *Sommaire*

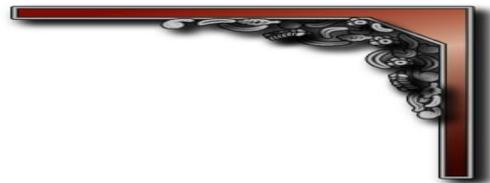


<b>I. INTRODUCTION</b> .....	2
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b> .....	5
II.1 Lieu et période d'étude : .....	5
II.2 Critères d'inclusion : .....	5
II.3 Méthodologie : .....	5
3.1 Prélèvement : .....	5
3.2 Culture et identification : .....	5
3.3 Lecture des résultats: .....	6
3.4 Antifongigramme : profil de résistance phénotypique .....	9
3.5 Etude moléculaire .....	12
<b>III.RESULTATS</b> .....	14
III. 1 Répartition des espèces isolées : .....	15
III. 2 Répartition des espèces selon le site de prélèvement: .....	17
III.3 Sensibilité in vitro des espèces isolées vis-à-vis les antifongiques étudiés : .....	19
3.1 Sensibilité selon l'antifongique .....	21
3.2 Sensibilité selon les espèces : .....	26
III.4 Etude moléculaire : .....	31
<b>IV. DISCUSSION</b> .....	38
IV.1 Rappels sur les levures du genre <i>Candida</i> : .....	38
1.1 Description : .....	38
1.2 Les caractéristiques des principales espèces de <i>Candida</i> : .....	39
IV.2 Moyens d'étude de la sensibilité in vitro aux antifongiques : .....	41

2.1 Méthodes par dilution : .....	44
2.2 Méthode par diffusion : .....	58
2.3 Méthode par dilution-affusion : Il s'agit de la méthode de l'E-test® : .....	63
IV.3 Epidémiologie des résistances : .....	64
IV.4 Mécanisme de résistances : .....	75
4.1. Les antifongiques : .....	75
4.1.1 Les fluoropyrimidines : .....	76
4.1.2 Les polyènes : .....	78
4.1.3 Les azolés : .....	81
4.1.4 Les Echinocandines : .....	87
4.2 Biosynthèse et fonctions de l'ergostérol : .....	91
IV.5 Les traitements et les référentiels : .....	93
5.1 Les différents types de traitement .....	93
5.2 Recommandations thérapeutiques.....	101
IV.6 Etude de la sensibilité aux antifongiques dans notre étude:.....	104
6.1 Selon l'espèce : .....	104
6.2 Selon l'antifongique : .....	105
<b>V. CONCLUSION</b> .....	109

## **RESUME**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



# *Introduction*



## I. INTRODUCTION

Avec l'augmentation des situations d'immunodéficience, les infections fongiques sont devenues aujourd'hui à travers le monde une cause importante de mortalité. Ces infections sont déterminées par deux types de micro-organismes, les champignons filamenteux et les levures. Parmi ces dernières, les levures appartenant au genre *Candida* sont de loin les plus représentées et à l'origine de tableaux cliniques extrêmement variés, allant des candidoses superficielles aux candidoses profondes ou systémiques<sup>[44,45]</sup>. Par ailleurs, l'augmentation de la fréquence des infections à levures durant ces trois dernières décennies s'est également accompagnée d'une augmentation de l'incidence de certaines espèces auparavant peu représentées. Ainsi, si *Candida albicans* reste de loin l'espèce la plus fréquente, *Candida glabrata* est devenu aujourd'hui, selon les études et la forme clinique de l'infection, la deuxième ou troisième espèce la plus fréquemment retrouvée<sup>[35,49,66]</sup>.

Le traitement des infections fongiques repose à l'heure actuelle sur l'utilisation de quatre types de molécules, agissant sur trois mécanismes cellulaires. La 5-fluorocytosine, un analogue des bases pyrimidiques, inhibe la croissance fongique en perturbant la synthèse protéique et la réplication de l'ADN. Les antifongiques polygéniques et azolés agissent au niveau de l'ergostérol, principal composant de la membrane plasmique des champignons, ou de sa voie de biosynthèse. Enfin, les echinocandines perturbent la synthèse de la paroi fongique en inhibant une enzyme responsable de la synthèse de certains polysaccharides pariétaux.

L'utilisation intensive de ces molécules a malheureusement conduit à une augmentation de l'incidence des résistances aux antifongiques<sup>[1,15]</sup>. C'est notamment le cas de la 5-fluorocytosine qui n'est plus administrée en monothérapie. De même, l'utilisation préférentielle des azolés s'accompagne d'une fréquence élevée de la résistance à ces antifongiques. En revanche, bien que les cas de résistance aux polyènes soient de plus en plus fréquemment décrits chez les levures du genre *Candida*, la résistance à ces antifongiques est plus rare. Concernant les echinocandines, leur utilisation récente ne permet pas aujourd'hui de dire si la résistance à ces molécules est un phénomène fréquent ou non, bien que des cas de résistance aient déjà été identifiés<sup>[35]</sup>.

A la lumière de ces éléments, il s'est avéré intéressant de mettre en place une étude de surveillance des résistances aux antifongiques au sein du laboratoire de parasitologie de l'hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat (HMIMV). Cette étude permettra de mieux cerner le profil de sensibilité des souches de *Candida* aux différents antifongiques systémiques, surtout que ces données en Afrique et plus précisément au Maroc ne sont pas disponibles.

Ainsi les objectifs de notre étude sont :

- ✦ D'établir le profil de résistance phénotypique aux antifongiques systémiques des souches de *Candida* isolées dans les services à risque du CHU de Rabat.
- ✦ D'établir le profil de résistance moléculaire aux antifongiques systémiques des souches de *Candida* isolées dans les services à risque du CHU de Rabat, afin de déterminer les gènes de résistance circulant dans notre pays.

Ces objectifs nous permettront de générer des informations épidémiologiques concernant la prescription de ces antifongiques et la meilleure prise en charge des infections fongiques invasives.



*Matériels  
et méthodes*



## II. MATERIELS ET METHODES

### II.1 Lieu et période d'étude :

Il s'agit d'une étude prospective qui s'est déroulée au sein du service de parasitologie et mycologie de l'HMIM V sur une durée de 6 mois (Octobre 2012-Mars 2013).

### II.2 Critères d'inclusion :

Toutes les souches de *Candida* isolées dans les services de réanimation du CHU de Rabat à partir d'une hémoculture ou d'un site corporel périphérique.

### II.3 Méthodologie :

#### 3.1 Prélèvement :

**Hémoculture :** le sang estensemencé directement sur un milieu de culture Mycosis. Le volume du sang est de 10 ml.

**Sites périphériques :** sont utilisés pour la détermination de l'index de colonisation. Les prélèvements à pratiquer sont : l'écouvillonnage anal, endo-buccal, nasal, vaginal, auriculaire, axillaire et le prélèvement urinaire.

#### 3.2 Culture et identification :

**Hémoculture :** la culture se fait dans des flacons Mycosis-IC/F servant pour l'hémoculture aérobie. Ils sont principalement utilisés avec les appareils BACTEC. L'échantillon sanguin à analyser estensemencé dans un ou plusieurs flacons qui sont placés ensuite dans l'appareil BACTEC 9050® de la série à fluorescence pour incubation et lecture périodique. Chaque flacon contient un senseur chimique qui peut détecter l'augmentation de la teneur en CO<sub>2</sub> produit par la croissance des microorganismes. Le senseur est lu par l'appareil toutes les 10 minutes avec recherche d'augmentation de sa fluorescence qui est proportionnelle à la quantité du CO<sub>2</sub> présent. Une lecture positive se traduisant par un signal sonore, indique une présence possible de microorganismes viables dans le flacon.

A partir du flacon positif, l'échantillon est ensuiteensemencé sur milieu chromogène Candiselect 4™. Il s'agit d'un milieu de primo-isolement permettant l'isolement et

l'identification directe de *C.albicans*, espèce de *Candida* la plus fréquemment isolée, ainsi que l'identification présomptive de *C.tropicalis*, *C.glabrata* et *C.krusei*. La lecture est effectuée après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

**Sites périphériques :** l'ensemencement des écouvillons ayant servi aux prélèvements se fait sur milieu chromogène Candiselect 4<sup>TM</sup>. La lecture est effectuée après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

### 3.3 Lecture des résultats:

L'identification de *Candida albicans* se fait directement à la couleur de la colonie, pour les autres levures, des examens complémentaires sont nécessaires pour identifier l'espèce en cause. Elle se fait comme suit :

- \*Colonies de couleur rose à violet → ***C.albicans***
- \*Colonies turquoise, brillantes, plates à contours réguliers – morphotype lisse (S)  
→ ***C.glabrata*** → RTT *Glabrata*
- \*Colonies turquoise très intenses, bombées, à contours réguliers – morphotype lisse (S)  
→ ***C.tropicalis***
- \*Colonies turquoise, d'aspect sec, à contours irréguliers – morphotype rugueux (R)  
→ ***C.krusei*** → *Krusei Color*
- \*Colonies blanches → **autres espèces de levures** → galerie biochimique d'identification.



Colonies de *Candida albicans*

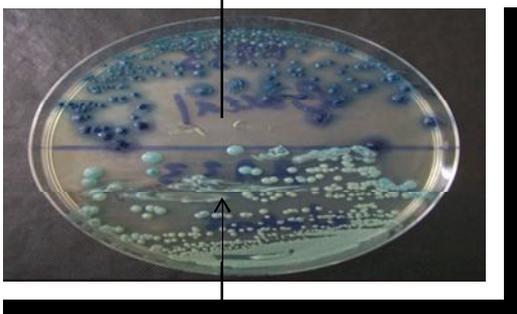


Colonies de *Candida glabrata*



Colonies de *Candida* sp

*Candida tropicalis*



*Candida glabrata*

**Figure 1** : Aspect et couleur des colonies de quelques espèces *Candida* sur milieu chromogène.

**Source** : laboratoire parasitologie/ mycologie HMIMV



**Figure 2 :** Ensemencement et incubation des milieux de culture.

**Source :** laboratoire parasitologie/ mycologie HMIMV

### 3.4 Antifongigramme : profil de résistance phénotypique

L'antifongigramme qui étudie la sensibilité in vitro des levures aux antifongiques a pour but de déterminer la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de diverses molécules. Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation<sup>[12,41]</sup>.

Dans notre étude, sur les espèces isolées, un antifongigramme selon la technique du E-Test® sur milieu Casitone est réalisé afin d'évaluer le taux de résistance des espèces *Candida* isolées aux médicaments antifongiques par interprétation des valeurs des CMI obtenues.

**Intérêt clinique** : Les bandelettes d'antifongigramme permettent de déterminer la sensibilité des levures du genre *Candida* aux agents antifongiques par une méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode suit une procédure standardisée publiée par le CLSI/NCCLS.

**Présentation** : Les bandelettes fabriquées à partir de papier absorbant de qualité supérieure sont imprégnées d'antifongiques à des concentrations croissantes. Ces bandelettes sont clairement identifiées par un symbole comportant 3 lettres. Les bandelettes AB Biodisk sont présentées en blister de 100 bandelettes conditionnées en containers étanches contenant un déshydratant.

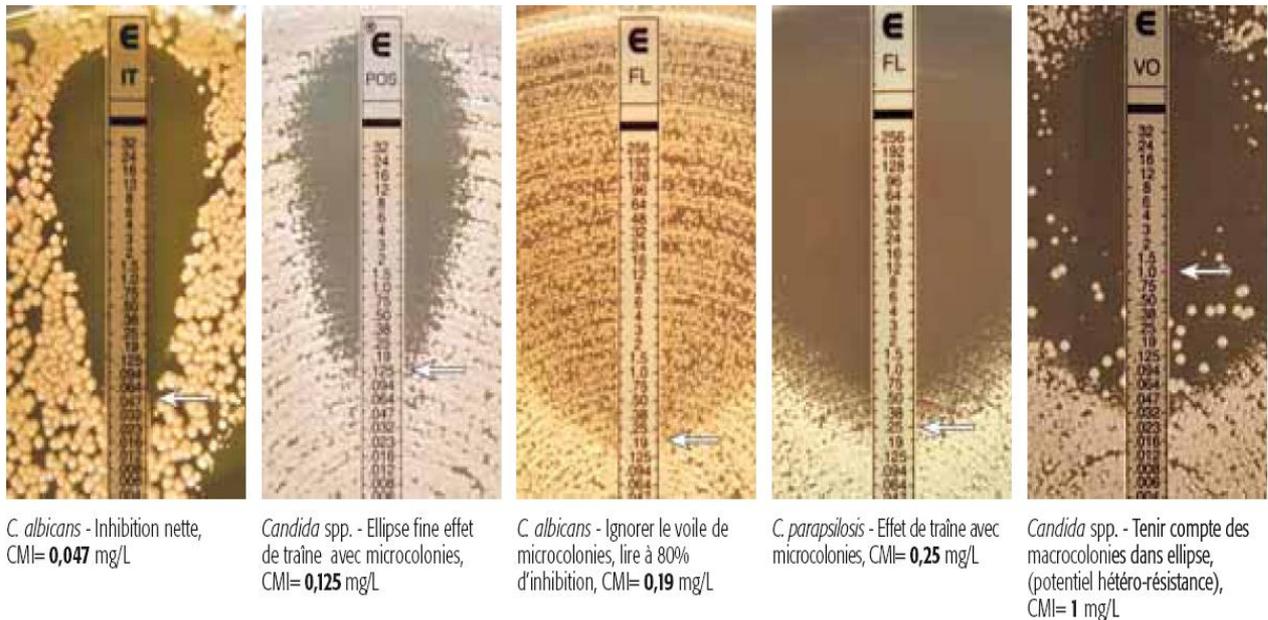
**Mode opératoire** : La préparation de l'inoculum (densité de 0,5 McFarland) se fait en émulsionnant dans un bouillon adapté (3mL de NaCl) un nombre adéquat de colonies bien isolées à partir d'une culture pure de 24 heures. Ensuite l'ensemencement se fait à l'aide d'un écouvillon stérile. Toute la surface de la gélose est écouvillonnée dans les trois directions. Les bandelettes sont appliquées ensuite à la surface de la gélose en s'assurant que l'échelle de CMI soit positionnée correctement (vers soi). L'incubation des boîtes s'effectue à 37°C.

**Lecture et interprétation** : Les ellipses d'inhibition sont mesurées après 24 heures d'incubation. Pour cela, on place la boîte sur un fond noir non réfléchissant et on effectue la lecture sous une lampe. Si la culture est insuffisante après 24 heures d'incubation, la boîte est ré-incubée 24 heures supplémentaire avant d'effectuer la lecture définitive à 48 heures.

Les ellipses d'inhibition, sont mesurés jusqu'aux colonies de tailles normales. En effet, il est possible d'observer sur les bords des zones d'inhibition, une inhibition partielle de la culture avec la présence de colonies de petite et de moyenne taille. Ces colonies ne correspondent pas à des mutants résistants et ne doivent pas être prises en compte pour la mesure des diamètres des zones d'inhibition. Les isolats ont été catégorisés en sensibles, sensibles dose-dépendants et résistants selon les données du fabricant (Tableau 1).

**Tableau 1:** Valeurs des CMI par la méthode E-test (**Données du fabricant**)

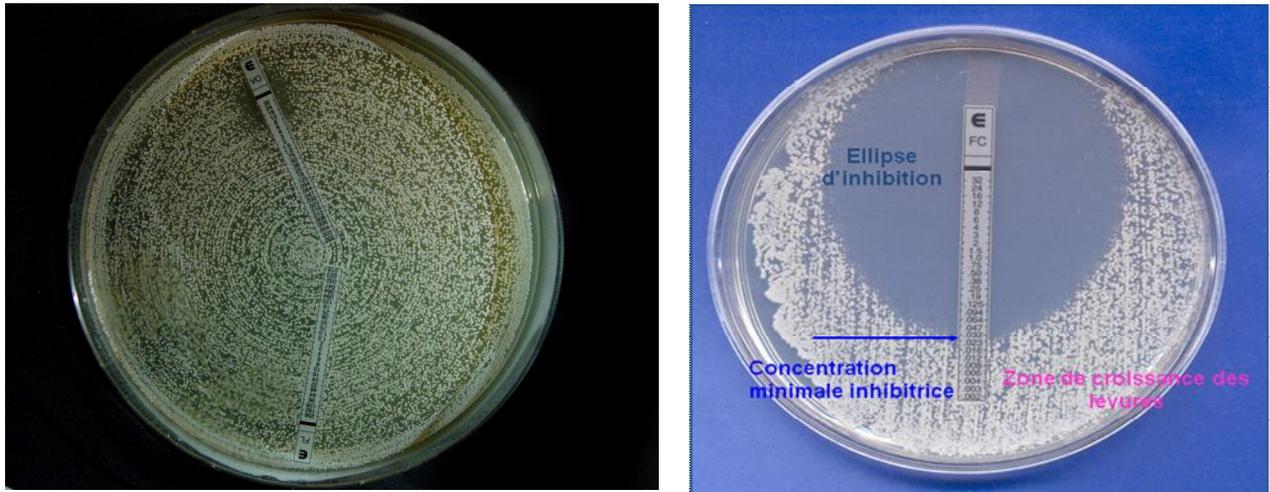
Antifongique	Sensible	SDD	Intermédiaire	Résistant
<b>Fluconazole</b>	≤8	16 – 32	-	≥64
<b>Voriconazole</b>	≤0,125	0,25 - 0,5	-	≥1
<b>Flucytosine</b>	≤4	-	8 – 16	≥32
<b>Amphotéricine B</b>	≤0,5			≥2



**Figure 3 :** Fiche de lecture des résultats du E-test pour les azolés. [bioMérieux, Fiche de lecture]



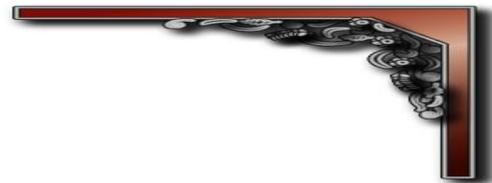
**Figure 4:** différentes étapes du mode opératoire du E-test.  
**Source :** laboratoire parasitologie/ mycologie HMIMV



**Figure 5 : Résultats des CMI. Source : Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, HMIM V, Rabat**

### 3.5 Etude moléculaire

Une identification génotypique des souches a été réalisée par PCR en analysant la séquence ITS (Internal Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal (amorces ITS1 et ITS4) et par séquençage au service de Parasitologie – Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire de Nancy. Les paires de primer utilisés sont : CA-INT-L (5'ATAAGGGAAGTCGGCAAATAGATCCGTAA -3') et CA-INT-R (5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGAT AGTAGAT-3'). Concernant les gènes impliqués dans la résistance aux antifongiques, l'ARN a été extrait par le mini-kit RNA Easy (Qiagen). Une digestion finale par DNase a éliminé l'ADN résiduel. De l'ADN complémentaire (ADNc) a été synthétisé par transcription inverse de l'ARN avec des oligonucléotides aléatoires (non spécifiques). La quantité d'ADNc a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel sur un système Stratagene Mx4000® utilisant des sondes TaqMan®. L'efficacité de chaque PCR a été calculée. La quantification relative de l'ADNc a été réalisée par rapport à un isolat sensible. Le seuil de surexpression relative pour chaque gène a été déterminé d'après les données observées dans le groupe des isolats S.



## *Résultats*

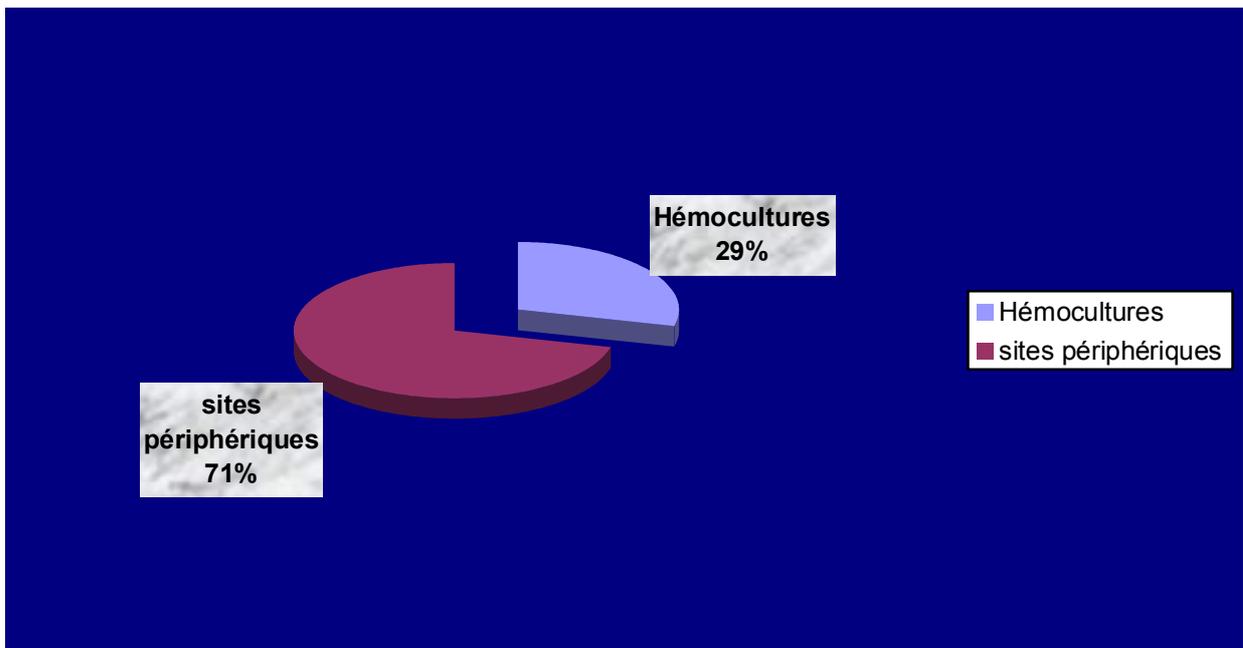


### III.RESULTATS

Durant la période d'étude, 85 souches de *Candida* sp sont isolées des services de réanimation du CHU de Rabat (5 services : HIS et HMIM V), dont 25 souches à partir des hémocultures, alors que 60 souches proviennent des différents sites périphériques.

**Tableau 2:** Types des prélèvements et leurs pourcentages

Type de prélèvement	Nombre	Pourcentage (%)
Hémocultures	25	29
Sites périphériques	60	71
Total	85	100



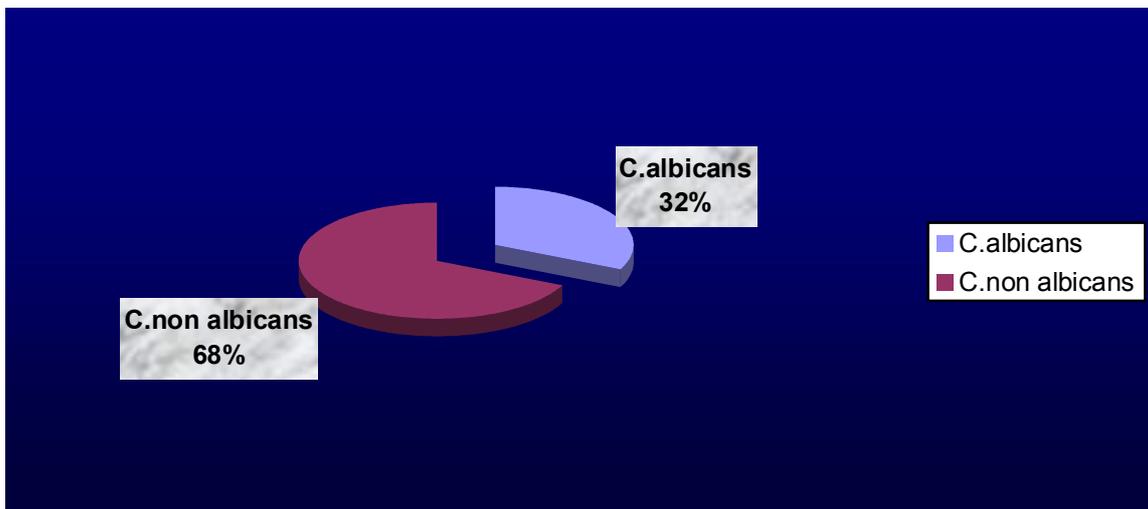
**Figure 6:** Graphique de la répartition des différents prélèvements réalisés durant cette étude.

### III. 1 Répartition des espèces isolées :

La répartition des espèces montre une prédominance de *Candida non albicans* (58 souches) part rapport à *candida albicans* (27 souches).

**Tableau 3:** Proportion des espèces *C.albicans* et *C. nonalbicans*

Espèces	Nombre	Pourcentage %
<i>C.albicans</i>	27	32
<i>C.non albicans</i>	58	68
<b>Totale</b>	<b>85</b>	<b>100</b>

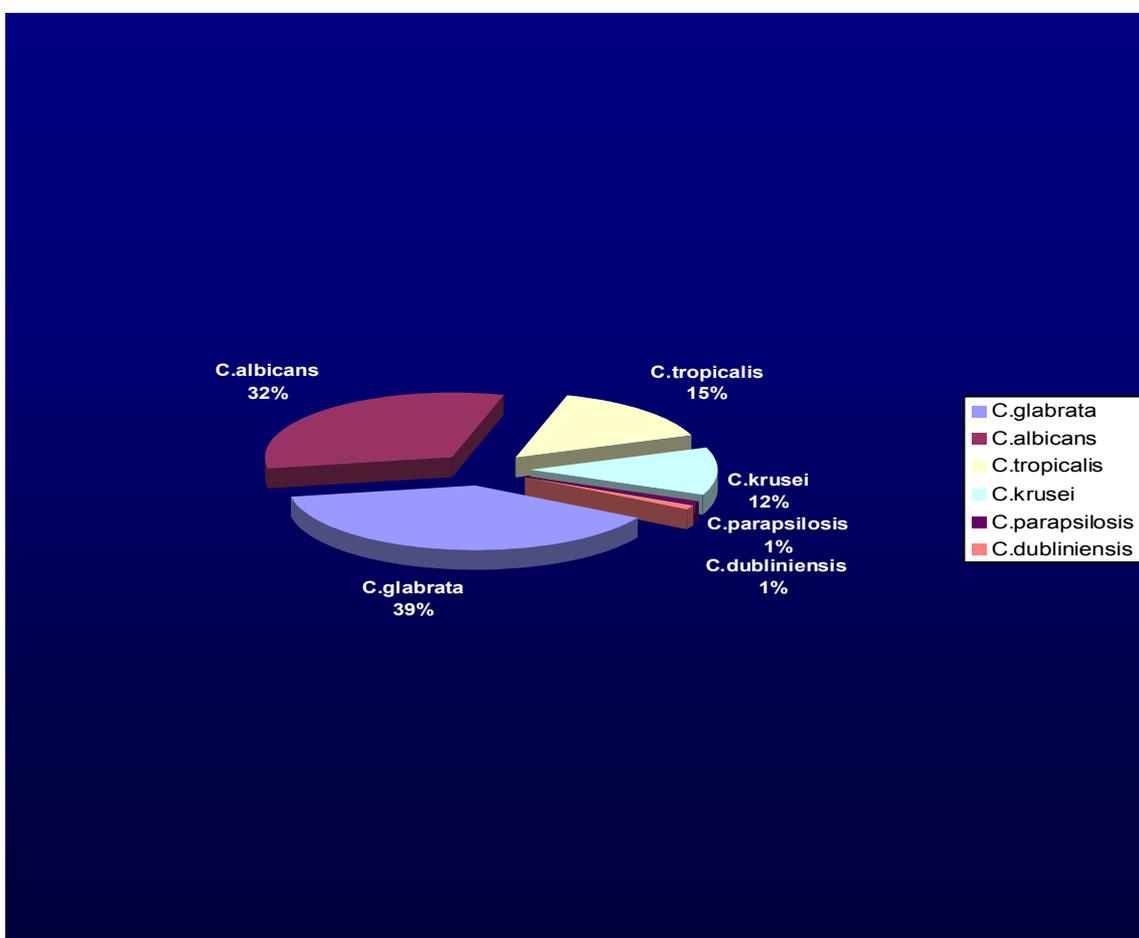


**Figure 7:** Graphique des proportions du *Candida albicans* et *non albicans*

Notre collection de souche nous a permis d'isoler 6 espèces différentes de *Candida*, dont la prédominance revient à *Candida glabrata* avec 33 souches, suivie de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, puis *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* et finalement *Candida dubliniensis*. La répartition des souches isolées est illustrée dans le tableau 4 :

**Tableau 4:** Proportion des différentes espèces de *Candida* isolées

Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<i>C.glabrata</i>	33	39
<i>C.albicans</i>	27	32
<i>C.tropicalis</i>	13	15
<i>C.krusei</i>	10	12
<i>C.parapsilosis</i>	1	1
<i>C.dublinsiensis</i>	1	1
<b>Totale</b>	<b>85</b>	<b>100</b>



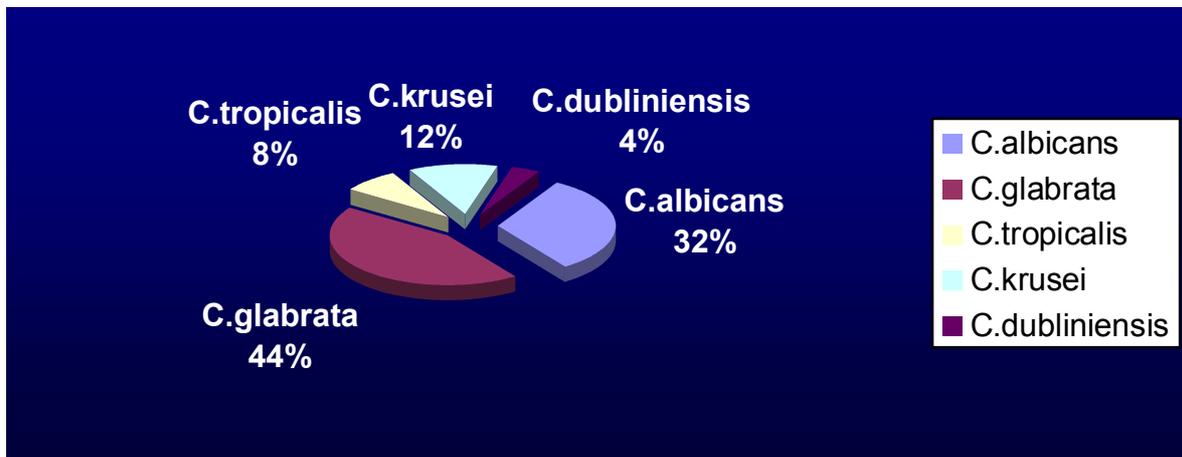
**Figure 8:** Graphique de la distribution des différentes espèces de *Candida*

### III. 2 Répartition des espèces selon le site de prélèvement:

**Hémocultures :** L'hémoculture a servi pour l'isolement de 5 espèces différentes de *Candida* avec une prédominance de *Candida glabrata* (11 souches sur 25 prélèvements) suivie de *Candida albicans* puis les autres espèces du genre *Candida*. La répartition des espèces du genre *Candida* isolées à partir des hémocultures est résumée dans le tableau 5.

**Tableau 5:** Proportion des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des hémocultures

Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<i>C.albicans</i>	8	32
<i>C.glabrata</i>	11	44
<i>C.tropicalis</i>	2	8
<i>C.krusei</i>	3	12
<i>C.dublinsiensis</i>	1	4
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>100</b>

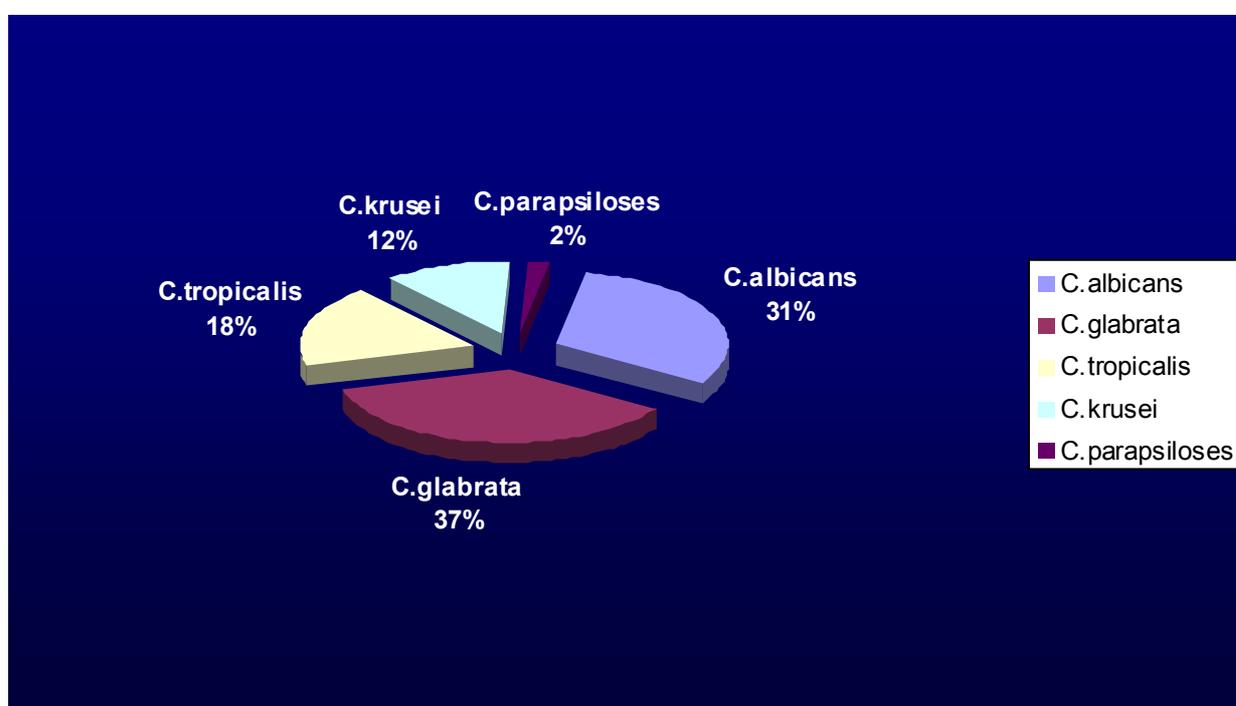


**Figure 9:** Graphique de la distribution des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des hémocultures

**Sites périphériques :** A côté des hémocultures, des sites corporels périphériques ont servi à l'isolement de plusieurs espèces de *Candida*. Sur les prélèvements positifs, 5 espèces ont été isolées dont l'espèce la plus représentée est toujours *C.glabrata* (tableau 6).

**Tableau 6** : Proportion des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des sites périphériques

Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<i>C.albicans</i>	19	31
<i>C.glabrata</i>	22	37
<i>C.tropicalis</i>	11	18
<i>C.krusei</i>	7	12
<i>C.parapsilosis</i>	1	2
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>



**Figure 10** : Distribution des espèces de *Candida* isolées à partir des sites périphériques.

### III.3 Sensibilité in vitro des espèces isolées vis-à-vis les antifongiques étudiés :

Les ellipses d'inhibition observées autour des bandelettes des antifongiques sont mesurées avec précision. Sur la base des ellipses d'inhibition, la catégorisation clinique des souches est effectuée et résumée dans le tableau suivant :

**Tableau 7:** Catégorisation clinique des souches de *Candida* isolées sur la base des ellipses d'inhibition.

Antifongiques	FCZ	VCZ	Am B	5-FC
Souches				
S1	R	R	R	S
S2	R	R	R	S
S3	S	S	S	R
S4	R	R	S	S
S5	S	S	S	S
S6	R	S	S	S
S7	S	S	S	S
S8	R	R	R	R
S9	R	R	R	R
S10	S	S	S	R
S11	R	R	S	S
S12	R	R	R	R
S13	S	S	S	R
S14	R	R	S	R
S15	R	S	S	S
S16	S	S	S	S
S17	R	S	S	R
S18	R	R	S	R
S19	R	R	S	R
S20	R	S	S	S
S21	S	S	S	R
S22	S	S	S	S
S23	S	S	S	S
S24	S	S	S	S
S25	S	S	S	S
S26	R	R	S	S
S27	R	R	S	S
S28	R	R	S	S

S29	S	S	S	S
S30	S	S	S	S
S31	S	S	S	S
S32	S	S	S	S
S33	R	S	S	R
S34	R	S	S	S
S35	S	S	S	S
S36	S	S	S	R
S37	R	R	R	R
S38	R	R	R	R
S39	S	S	S	S
S40	R	R	R	R
S41	R	R	S	R
S42	S	S	S	S
S43	R	R	S	R
S44	R	S	S	R
S45	R	R	S	S
S46	R	R	S	R
S47	R	R	S	R
S48	R	S	S	R
S49	S	S	S	R
S50	R	S	S	S
S51	R	S	S	S
S52	S	S	S	R
S53	S	S	S	S
S54	S	S	S	S
S55	R	S	S	S
S56	R	S	S	S
S57	S	S	S	S
S58	R	S	S	S
S59	R	S	S	S
S60	R	S	S	S
S61	R	S	S	S
S62	S	S	S	S
S63	S	S	S	S
S64	S	S	S	S
S65	S	S	S	S
S66	R	S	S	S
S67	R	S	S	S
S68	S	S	S	S
S69	R	S	S	S

<b>S70</b>	R	S	S	S
<b>S71</b>	R	S	S	S
<b>S72</b>	S	S	S	S
<b>S73</b>	R	S	S	S
<b>S74</b>	S	S	S	S
<b>S75</b>	R	S	S	S
<b>S76</b>	R	S	S	S
<b>S77</b>	S	S	S	S
<b>S78</b>	S	S	S	S
<b>S79</b>	S	S	S	S
<b>S80</b>	R	S	S	S
<b>S81</b>	R	S	S	S
<b>S82</b>	S	S	S	S
<b>S83</b>	S	S	S	S
<b>S84</b>	S	S	S	S
<b>S85</b>	S	S	S	S

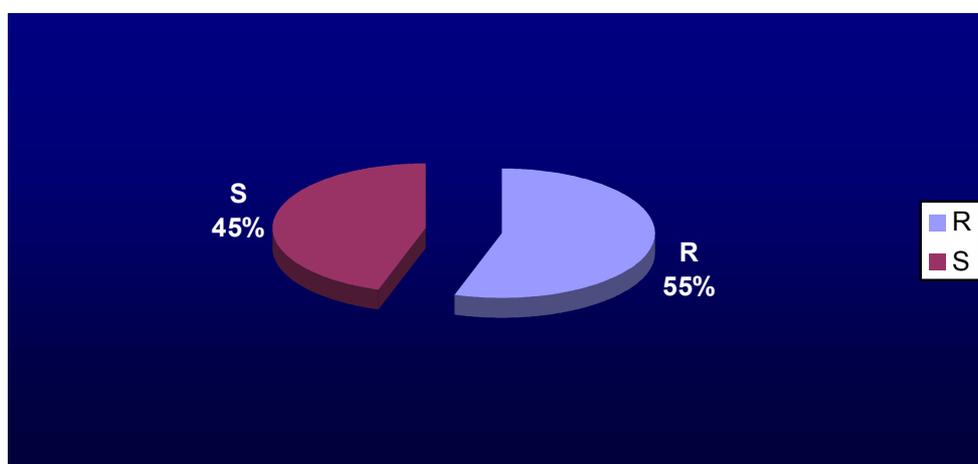
Les espèces isolées montrent des sensibilités différentes vis-à-vis des 4 antifongiques testés. Les résultats de la sensibilité des souches de *Candida* isolées aux agents antifongiques sont présentés pour chaque molécule antifongique, puis pour chaque espèce.

### 3.1 Sensibilité selon l'antifongique

**Sensibilité au fluconazole :** L'étude de la sensibilité *in vitro* au fluconazole a démontrée des taux élevés de résistance de l'ordre de 55% (tableau 8), considéré ainsi comme le taux de résistance le plus élevé noté dans cette étude.

**Tableau 8:** Sensibilité des souches de *Candida* isolées vis à vis du fluconazole

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
<b>R</b>	<b>47</b>	<b>55</b>
<b>S</b>	<b>38</b>	<b>45</b>
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>100</b>

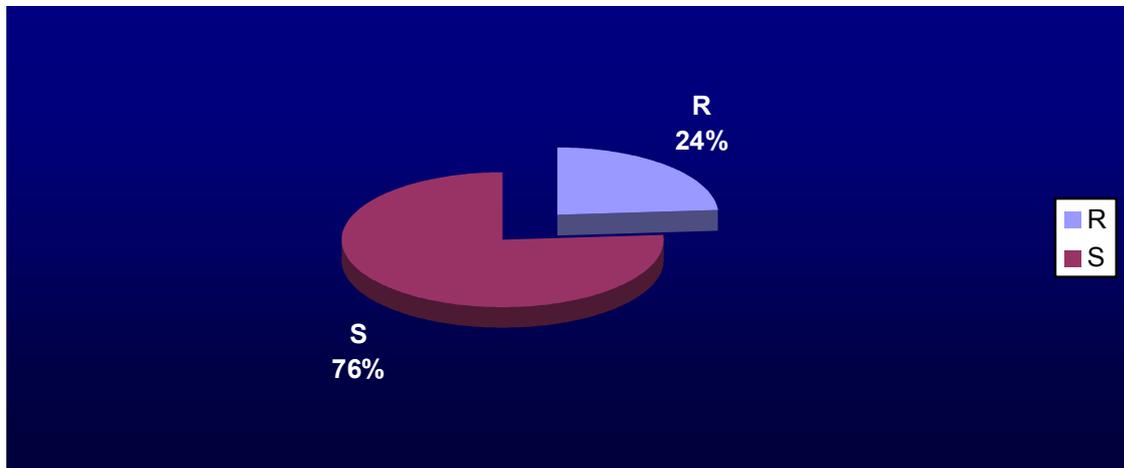


**Figure 11:** Proportions des souches résistantes et sensibles vis-à-vis du fluconazole.

**Sensibilité au voriconazole :** L'évaluation de la sensibilité *in vitro* du voriconazole illustre une fréquence de souches de sensibilité élevée égale à 76%, alors que 24% des souches isolées sont résistantes au voriconazole (tableau 9).

**Tableau 9:** Sensibilité des souches de *Candida* isolées vis à vis du voriconazole

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
R	20	24
S	65	76
Total	85	100

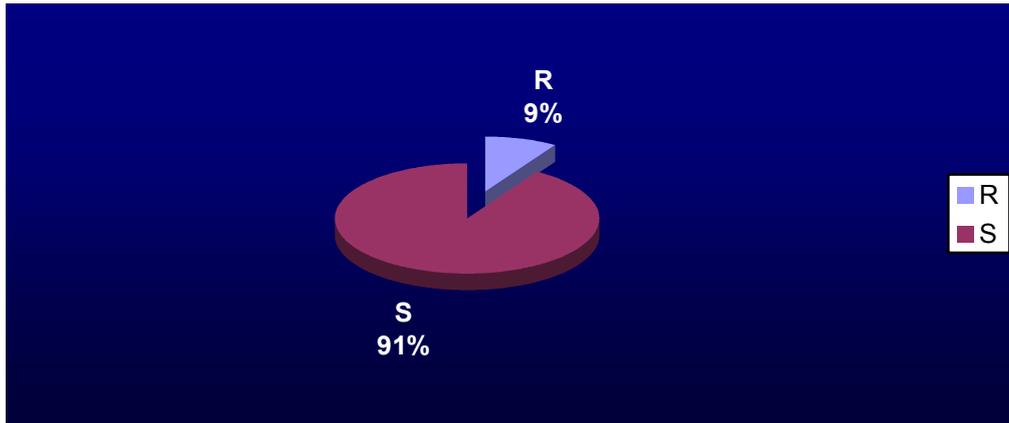


**Figure 12:** Proportions des souches résistantes et sensibles vis-à-vis du Voriconazole

**Sensibilité à l'amphotéricine B :** L'étude de la sensibilité *in vitro* à l'amphotéricine B montre un taux faible de résistance de l'ordre de 9%, alors que 91% des souches de *Candida* isolées sont sensibles à cet agent antifongique (tableau 10).

**Tableau 10** : Sensibilité des souches de *Candida* isolées vis à vis de l'amphotéricine B

Catégorie	Nombre	Pourcentage (%)
<b>R</b>	<b>8</b>	<b>9</b>
<b>S</b>	<b>77</b>	<b>91</b>
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>100</b>

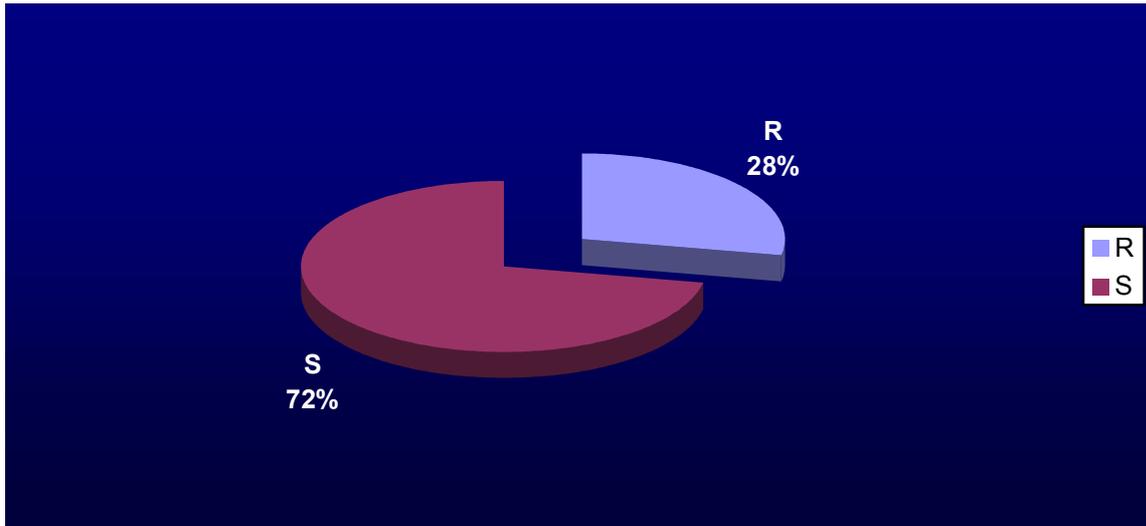


**Figure 13:** Proportions des souches résistantes et sensibles vis-à-vis de l'amphotéricine B

**Sensibilité à la 5-Flucytosine :** L'étude de la sensibilité *in vitro* à la 5-flucytosine indique que 28% des souches testées sont résistantes, alors que 72% des souches sont sensibles à la 5FC (tableau 11).

**Tableau 11:** Sensibilité des souches de *Candida* isolées vis à vis de la 5-flucytosine

Catégorie	Nombre	Pourcentage
<b>R</b>	<b>24</b>	<b>28</b>
<b>S</b>	<b>61</b>	<b>72</b>
<b>Total</b>	<b>85</b>	<b>100</b>

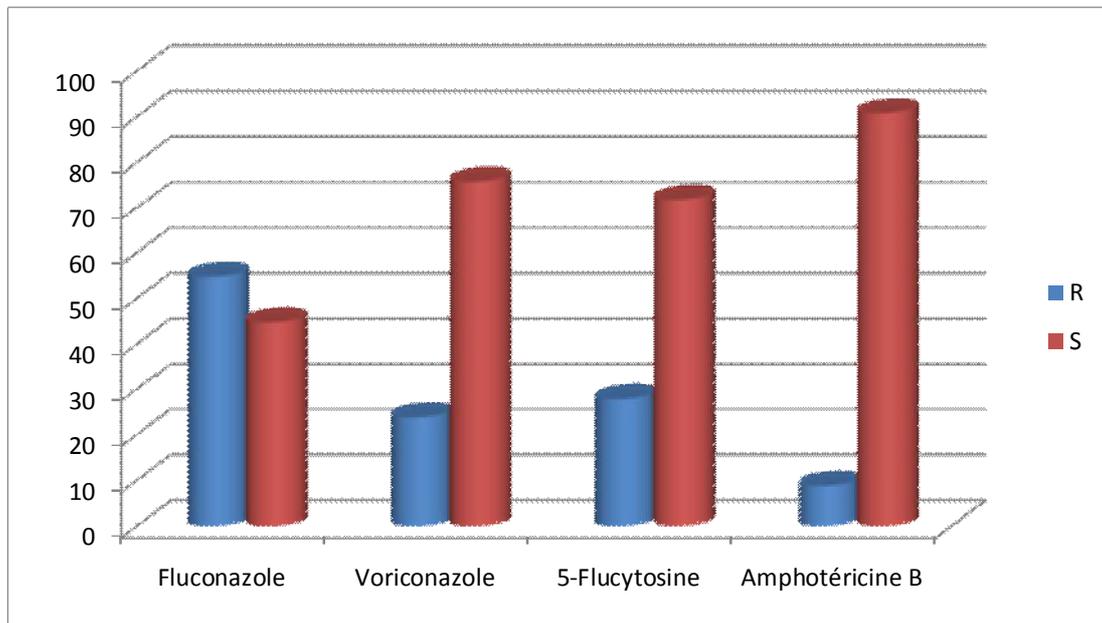


**Figure 14 :** Proportions des souches résistantes et sensibles vis-à-vis de la 5-flucytosine

**Sensibilité des souches isolées vis-à-vis de tous les antifongiques testés :** L'étude de la sensibilité *in vitro* des souches de *Candida* isolées des services de réanimation vis-à-vis des antifongiques disponibles permet d'évaluer la fréquence de résistance pour chaque molécule afin de comparer leurs activités. Le tableau 12 résume la répartition des différentes catégories vis-à-vis des 4 antifongiques.

**Tableau 12:** Sensibilité en % des souches de *Candida* isolées vis à vis des antifongiques

	Fluconazole	Voriconazole	5-FC	Amphotéricine B
<b>R</b>	<b>55</b>	<b>24</b>	<b>28</b>	<b>9</b>
<b>S</b>	<b>45</b>	<b>76</b>	<b>72</b>	<b>91</b>
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>



**Figure 15:** Proportions des souches résistantes et sensibles vis-à-vis des 4 antifongiques

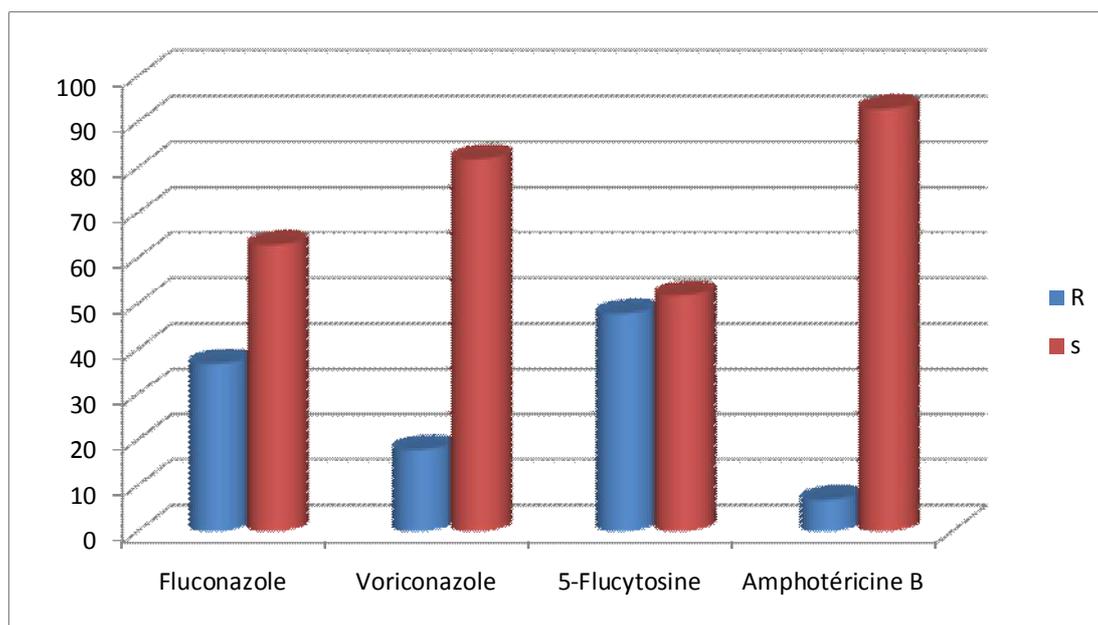
### 3.2 Sensibilité selon les espèces :

Les résultats de la catégorisation clinique des souches sont présentés selon l'espèce de *Candida* testée.

***Candida albicans*** : L'espèce *Candida albicans* est retrouvée dans 27 isolats parmi les 85 souches de *Candida*, cette espèce présente des sensibilités variables vis-à-vis des antifongiques testés, la catégorisation clinique est résumée dans le tableau suivant:

**Tableau 13:** Sensibilité des souches de *Candida albicans* vis à vis des 4 antifongiques

	Fluconazole	Voriconazole	5-FC	Amphotéricine B
<b>R</b>	<b>10 (37%)</b>	<b>5(18%)</b>	<b>13(48%)</b>	<b>2(7%)</b>
<b>S</b>	<b>17 (63%)</b>	<b>22(82%)</b>	<b>14(52%)</b>	<b>25(93%)</b>
<b>Total</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>27</b>	<b>27</b>

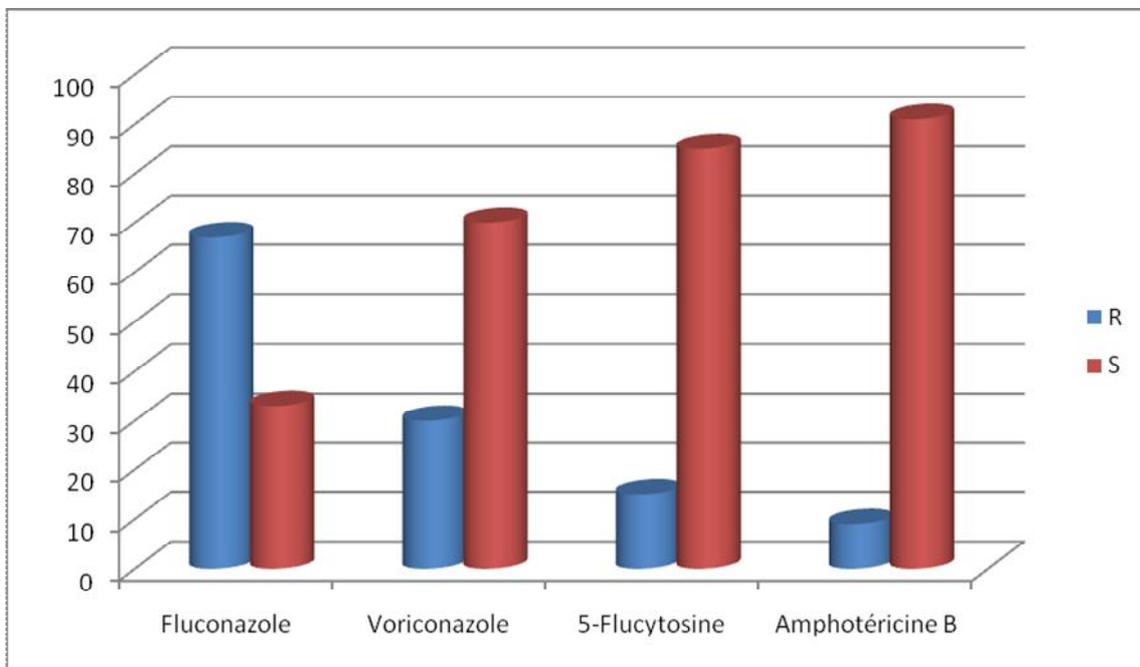


**Figure 16:** Proportions des souches de *Candida albicans* résistantes et sensibles vis-à-vis des 4 antifongiques.

***Candida glabrata*** : Cette espèce occupe la première place en fréquence dans la répartition des espèces du genre *Candida*, elle est retrouvée dans 33 isolats sur les 85 souches de *Candida* spp. La sensibilité de cette espèce vis-à-vis des antifongiques est présentée dans le tableau 14.

**Tableau 14:** Sensibilité des souches de *Candida glabrata* vis à vis des 4 antifongiques

	Fluconazole	Voriconazole	5-FC	Amphotéricine B
R	22(67%)	10(30%)	5(15%)	3(9%)
S	11(33%)	23(70%)	28(85%)	30(91%)
Total	33	33	33	33

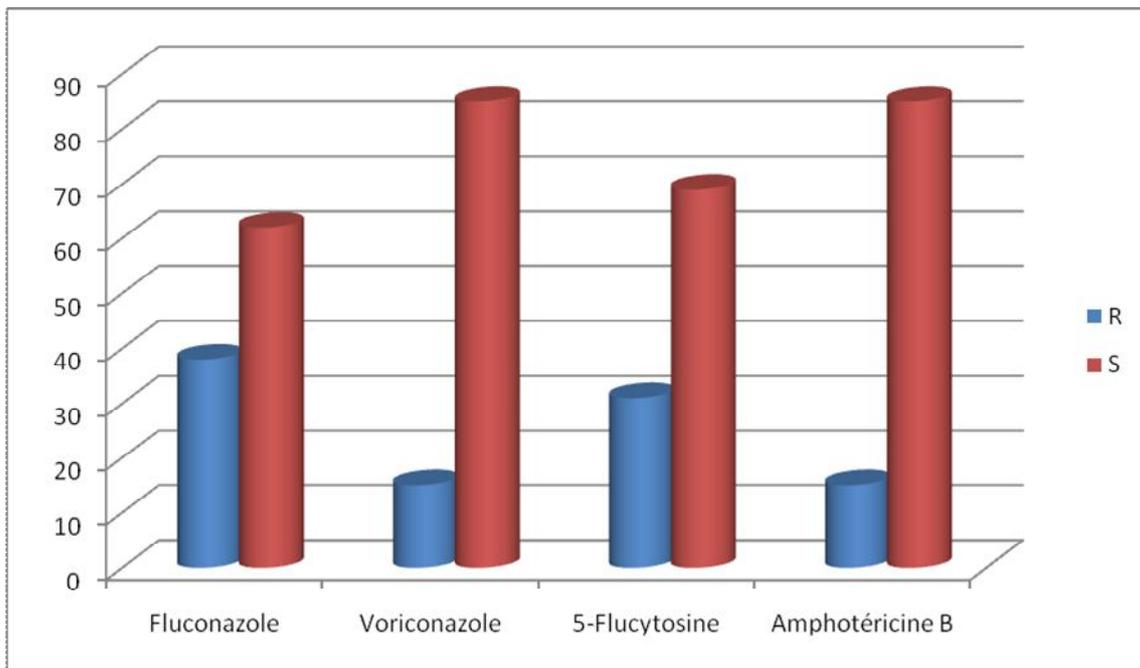


**Figure 17:** Proportions des souches de *Candida glabrata* résistantes et sensibles vis-à-vis des 4 antifongiques utilisés

*Candida tropicalis* : L'étude du profil de sensibilité *in vitro* des souches de *C. tropicalis* aux antifongiques montre les résultats résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 15:** Sensibilité des souches de *Candida tropicalis* vis à vis des 4 antifongiques

	fluconazole	Voriconazole	5-FC	Amphotéricine B
R	5(38%)	2(15%)	4(31%)	2(15%)
S	8(62%)	11(85%)	9(69%)	11(85%)
Total	13	13	13	13

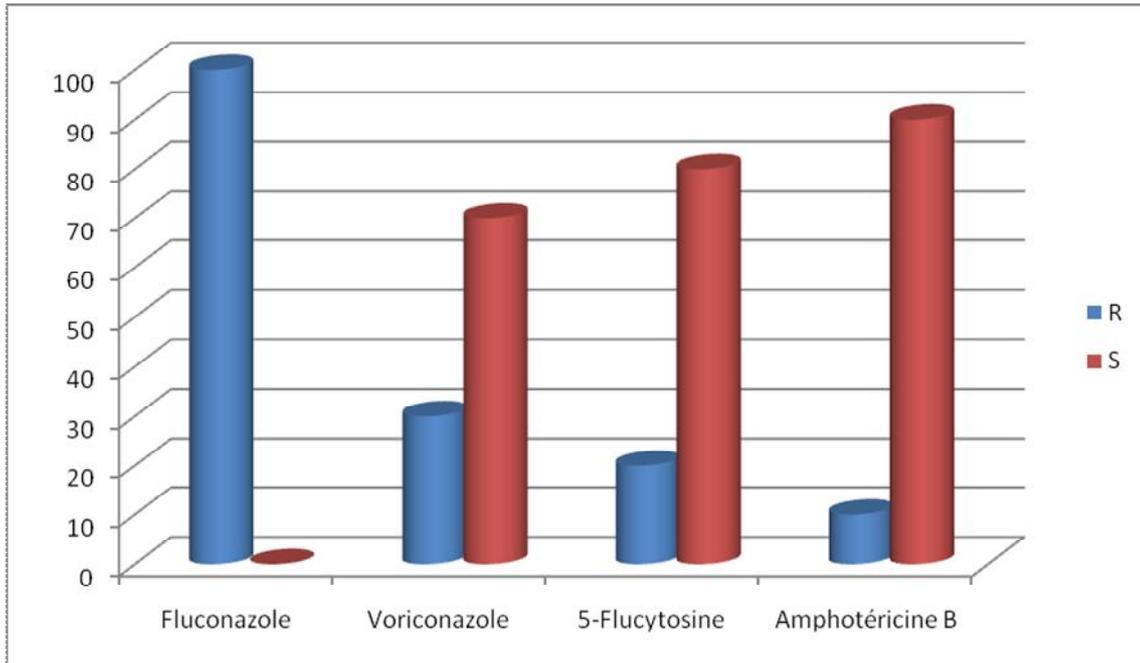


**Figure 18:** Proportions des souches de *Candida tropicalis* résistantes et sensibles vis-à-vis des 4 antifongiques utilisés

*Candida krusei* : L'étude de la sensibilité *in vitro* des souches de *C. krusei* aux agents antifongiques permet la catégorisation clinique des souches de cette espèce en souches résistantes ou sensibles (tableau 16) :

**Tableau 16:** Sensibilité des souches de *Candida krusei* vis à vis des 4 antifongiques

	fluconazole	Voriconazole	5-FC	Amphotéricine B
<b>R</b>	<b>10 (100%)</b>	<b>3(30%)</b>	<b>2(20%)</b>	<b>1(10%)</b>
<b>S</b>	<b>0(0%)</b>	<b>7(70%)</b>	<b>8(80%)</b>	<b>9(90%)</b>
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>10</b>



**Figure 19:** Graphique des proportions des souches de *Candida krusei* résistantes et sensibles vis-à-vis des 4 antifongiques

Concernant les souches de *Candida parapsilosis* et *Candida dubliniensis*, tous les isolats sont sensibles aux différents antifongiques testés.

### III.4 Etude moléculaire :

Tests génotypiques des souches de *Candida sp.* : La PCR et le séquençage ont confirmé la présence de 85 souches de *Candida sp.* Il n'y a donc aucune discordance entre les tests moléculaires et les résultats obtenus par les tests phénotypique. Le tableau 17 compare les résultats obtenus par les tests phénotypiques, la PCR et le séquençage des souches identifiées comme étant du genre *Candida*.

**Tableau 17** : comparaison des résultats entre les tests phénotypiques et les méthodes moléculaires

Souches	Test phénotypique	PCR ITS 1 / 4	Séquençage
1	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida dubliniensis</i>
2	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
3	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
4	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
5	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
6	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
7	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
8	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
9	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>

10	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
11	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
12	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
13	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
14	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
15	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
16	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
17	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
18	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
19	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
20	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
21	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
22	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
23	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>

24	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
25	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
26	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
27	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
28	+	Bande <i>albicans</i> + Bande <i>dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
29	+	Bande <i>parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
30	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
31	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
32	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
33	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
34	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
35	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
36	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
37	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
38	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
39	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
40	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
41	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
42	+	Bande <i>Tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
43	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
44	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
45	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
46	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>

47	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
48	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
49	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
50	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
51	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
52	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
53	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
54	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
55	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
56	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
57	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
58	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
59	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
60	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
61	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
62	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
63	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
64	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
65	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
66	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
67	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
68	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
69	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
70	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
71	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
72	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
73	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
74	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>

75	+	Bande <i>glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
76	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
77	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
78	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
79	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
80	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
81	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
82	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
83	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
84	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>
85	+	Bande <i>krusei</i>	<i>Candida krusei</i>

Concernant les gènes de résistance, nous ne rapportons que les résultats concernant les souches de *Candida glabrata* et les gènes impliqués dans la résistance au fluconazole, gènes qui codent la 14 $\alpha$ déméthylase ou des ABC transporteurs, impliqués dans la résistance aux azolés par des mécanismes de surproduction de cible ou d'efflux. Pour rappel, cette espèce présente un taux de résistance de l'ordre de 67% (22/33). L'expression des gènes des 33 isolats de *Candida glabrata* a été quantifiée. Dans le tableau 18 figurent les pourcentages d'isolats surexprimant les gènes ERG11, CDR1, CDR2 et SNQ2 en fonction du profil de sensibilité au fluconazole.

**Tableau 18** : % des isolats surexprimant les gènes de résistance

<b>Surexpression</b>	<b>S (N=11)</b>	<b>R (N=22)</b>
<b>ERG11</b>	0%	33%
<b>CDR1</b>	0%	40%
<b>CDR2</b>	40%	68%
<b>SNQ2</b>	33%	62%

La fréquence des isolats de *C.glabrata* surexprimant des gènes codant des molécules potentiellement impliquées dans la résistance au fluconazole est plus élevée chez les isolats R. Cependant, une surexpression se retrouve parfois chez des isolats S.



## *Discussion*



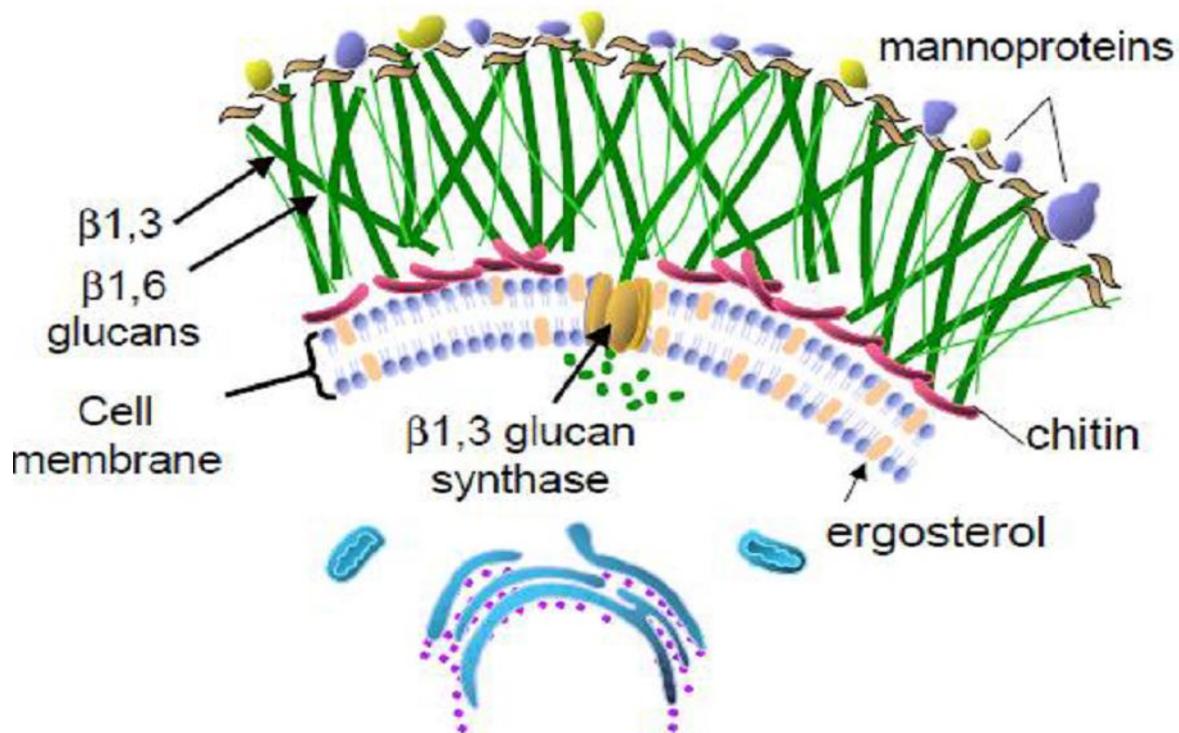
## IV. DISCUSSION

### IV.1 Rappels sur les levures du genre *Candida* :

#### 1.1 Description :

Les levures sont des organismes eucaryotes unicellulaires sans chlorophylle, pigment assimilateur retrouvé chez les plantes. Elles sont médicalement représentées par les genres *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Saccharomyces*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* et *Trichosporon*.

D'un point de vue cellulaire, elles possèdent un noyau entouré d'une membrane nucléaire, un réticulum endoplasmique et des mitochondries [1,6, 64, 76]. La membrane fongique est riche en lipides dont l'ergostérol, et la paroi est composée de protéines, de phospholipide, de chitine et de sucres dont les principaux sont les mannanes et les glucanes (Figure 20).



**Figure 20** : Les différents constituants de la paroi fongique.  
**Source**: Diamond R., Atlas of fungal Infections, Ed.1999

Ces levures sont hétérotrophes, c'est-à-dire qu'elles nécessitent une source de carbone provenant de matières organiques en décomposition ou du parasitisme pour se développer et survivre. La nutrition des levures par absorption est assurée par un réseau de filaments (thalle ou mycélium). La morphologie de ce thalle reproducteur est à l'origine de la classification des champignons microscopiques. En effet, la formation de spores sexuées caractérise le genre des champignons parfaits (zygomycètes, basidiomycètes, ascomycètes et chytridiomycètes) tandis que les champignons imparfaits (deutéromycètes) sont définis par la formation de spores asexuées. Chez les levures, le thalle est constitué d'éléments unicellulaires appelés blastopores qui se reproduisent par bourgeonnement et créent des pseudo-filaments.

Concernant le genre *Candida* : Les levures apparaissent macroscopiquement sous forme de colonies blanches à crémeuses de 1 à 3 mm. Suivant l'espèce en question, leur texture peut être pâteuse, lisse, brillante, sèche, ridée ou terne [8, 62, 70].

Les caractères microscopiques diffèrent selon l'espèce. Toutes produisent des blastoconidies, rondes ou allongées, et la plupart des pseudo-hyphes qui peuvent être longs, incurvés ou ramifiés. Certaines espèces présentent des formes de résistances appelées chlamydospores.

## 1.2 Les caractéristiques des principales espèces de *Candida* :

Le genre *Candida* est ubiquitaire : on le retrouve comme agent commensal de la peau, du tractus digestif et urinaire. Il comporte plus de 200 espèces, seules 10% sont connues pour être responsables d'infections chez l'Homme. Il regroupe des levures non pigmentées, non capsulées, à bourgeonnement multilatéral, productrices ou non de filaments [70].

*Candida albicans* est de loin la plus fréquente, et les autres espèces les plus représentées sont regroupées sous les termes de *Candida non-albicans*: *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.kefyr*, *C.dublinsiensis* et *C.krusei*.

***Candida albicans*** : C'est l'espèce la plus fréquemment incriminée dans les infections et les colonisations à *Candida sp*, 32% des souches retrouvées dans notre étude sont de cette espèce. Elle est commensale du tube digestif et des muqueuses humaines. Sa présence sur la peau est systématiquement pathogène. Cette espèce est responsable d'atteintes cutanéomuqueuses, d'infections profondes (pyélonéphrite, péritonite) et d'infections invasives (Candidémie,

Candidose hépatosplénique et Méningite) La neutropénie et la pré-exposition au Fluconazole apparaissent comme des facteurs de risques de candidémies à *C. non albicans* plutôt que *C. albicans*. Concernant les cancers, les patients présentant des tumeurs solides sont plus à risque que ceux souffrant de pathologies onco-hématologiques dans la survenue de candidémie à cette espèce.

***Candida glabrata*** : En deuxième position en Europe et aux Etats-Unis en termes de fréquence après *C. albicans*, on retrouve cette espèce au niveau du tube digestif et des muqueuses humaines. Elle est responsable de candidémies, d'infections du tractus urinaire et de candidoses profondes. L'âge avancé, la transplantation d'organes solides ainsi que la prophylaxie par Fluconazole sont des facteurs de prédisposition pour les candidémies à *C. glabrata*. Sa principale caractéristique est d'être de « sensibilité dose-dépendante » au Fluconazole, lui conférant donc une résistance relative à cet antifongique, notre étude démontre une résistance de l'ordre de 67% vis-à-vis du Fluconazole et aussi que l'espèce *C. glabrata* est la plus prédominante 39% de l'ensemble des espèces retrouvées. D'un point de vue biologique, on note une absence de filamentation pour cette espèce.

***Candida tropicalis*** : La neutropénie étant un facteur prédisposant de candidémie à *C. tropicalis*, on retrouve cette levure principalement chez les populations de patients ayant des tumeurs solides, des pathologies onco-hématologiques ou chez les greffés de cellules souches hématopoïétiques. De plus, *C. tropicalis* présente une virulence importante. Cette espèce est très sensible au Fluconazole et l'utilisation prophylactique de cet antifongique entraîne une diminution des candidémies à *C. tropicalis*. Mais d'après notre étude on remarque une augmentation de résistance vis-à-vis à cet antifongique arrivant à 38%.

***Candida krusei*** : Les candidémies à *C. krusei* sont redoutables, avec une mortalité très élevée (mortalité brute de 80% et mortalité attribuable de 40%). Les facteurs prédisposants sont : l'utilisation prophylactique du fluconazole, la neutropénie, les pathologies onco-hématologiques et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. La caractérisation de cette espèce est très importante car *C. krusei* est naturellement résistant au fluconazole, confirmé par notre étude, mais selon d'autres études *C. krusei* peut montrer des résistances à

d'autres antifongiques tels que l'amphotéricine B, contrairement à nos résultats retrouvés qui prouvent une bonne sensibilité à cet antifongique. Les différentes caractéristiques des espèces non-*albicans* prédisposent certains terrains à développer des candidémies.

***Candida parapsilosis*** : est préférentiellement retrouvé sur la peau. Il est responsable d'infections cutanées, mais aussi d'infections profondes qui peuvent être d'origine endogènes ou exogènes. Le portage manuel du personnel soignant est fréquent, la transmission horizontale est donc aisée et certaines épidémies en milieu hospitalier ont déjà été décrites. Cette espèce est connue pour son habilité à former des biofilms sur les dispositifs implantables. De plus, elle peut se développer dans les poches de solutés contenant du glucose. De par ces caractères, *C. parapsilosis* cause des infections principalement d'origine iatrogène, en particulier chez les prématurés, les nouveau-nés et les enfants. D'autres facteurs intrinsèques ou extrinsèques sont impliqués dans le développement d'infections à cet agent pathogène, notamment la chirurgie récente. De plus, cette espèce est souvent moins sensible aux échinocandines, de par l'existence d'un polymorphisme sur le gène *FKSI*, codant pour une des deux sous-unités de la  $\beta$  (1-3) glucane synthase, cible de cette classe antifongique. Néanmoins, parmi toutes les espèces de *Candida*, les candidémies à *C. parapsilosis* affichent le taux de mortalité le plus faible, de l'ordre de 30%. *C. parapsilosis* appartient au complexe *C. parapsilosis*, qui contient 3 espèces différentes, avec en terme de fréquence : *C. parapsilosis* (91,3%); *C. orthopsilosis* (6,1%) et *C. metapsilosis* (1,8%). Ces espèces ont pu être définies sur la base d'études moléculaires, ou par des techniques de migration électrophorétique capillaire.

#### **IV.2 Moyens d'étude de la sensibilité in vitro aux antifongiques :**

**Antifongigramme** : L'antifongigramme permet de déterminer la sensibilité d'une souche de mycète à plusieurs antifongiques par mesure *in vitro* des CMI de chaque molécule vis-à-vis de la souche. Son intérêt réside, comme pour l'antibiogramme, dans le fait de pouvoir prédire, avec une bonne probabilité, un succès ou un échec thérapeutique.

Trois problèmes limitent les recours à l'antifongigramme :

- Des techniques standards ne sont définies par le CLSI et l'EUCAST que pour un nombre limité d'espèces : les levures et les champignons filamenteux produisant des conidies. Il a été établi que les CMI pour des fragments d'hyphes sont supérieures à celles obtenues avec un inoculum constitué de conidies. Ces techniques ne s'appliquent pas aux dermatophytes. Les arthrospores de *Trichophyton rubrum* induites expérimentalement *in vitro* sont plus résistantes aux antifongiques que les hyphes.
- Les critères de catégorisation clinique définis par le CLSI ou l'EUCAST ne concernent que quelques couples antibiotique – espèce de mycète et la valeur prédictive de l'antifongigramme est faible dans les autres cas.
- Enfin, la technique de microdilution ne peut être utilisée en routine car elle est lourde à mettre en œuvre. Des techniques alternatives sont utilisées par les laboratoires de mycologie.

L'automate VITEK 2 (bioMérieux) permet l'identification des levures et la détermination de leur sensibilité à l'amphotéricine B, au fluconazole, au voriconazole et à la flucytosine (carte AST-YS01). Pour chaque souche, l'inhibition de la croissance en présence de différentes concentrations d'antibiotiques est mesurée et rapportée à la CMI par des algorithmes protégés par la propriété industrielle. La réponse est obtenue, en moyenne, en 15,5 heures pour *Candida* sp mais en 34 heures pour *Cryptococcus neoformans*. Le pourcentage d'erreurs très majeures par rapport à la technique de référence de l'EUCAST (souches résistantes rendues sensibles) est de 2,6 % ; ces erreurs concernent le fluconazole et des souches de croissance lente.

Trek Diagnostic Systems (East Grinstead, Royaume-Uni) commercialise des microplaques (Sensitre Yeast One Y010), contenant, sous forme lyophilisée, différentes concentrations d'amphotéricine B, de fluconazole, de voriconazole, d'itraconazole, de posaconazole, de flucytosine, de micafungine, de caspofungine et d'anidulafungine permettant la mesure des CMI pour des levures non exigeantes et à croissance rapide. Après ensemencement et incubation, la croissance est repérée par le changement de couleur d'un indicateur

d'oxydoréduction, l'alar blue, ou par une émission de fluorescence. La technique est semi automatisable comme pour la détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, des techniques de diffusion ont été développées. Le CLSI a publié deux standards pour les levures (M 44-A2, 2009) et pour les champignons filamenteux non dermatophytes (M 51-A, 2010). Le milieu pour les levures est une gélose de Mueller-Hinton supplémentée par 2 % de glucose. La gélose est ensemencée par écouvillonnage d'une suspension d'opacité équivalente à 0,5 dans la gamme de MacFarland [33,36,41,111].

L'incubation est de 18 à 24 h (48 h pour *Cryptococcus*) à 35°-37°C. Des disques de fluconazole, de voriconazole, d'itraconazole, d'amphotéricine B et de caspofungine sont commercialisés par plusieurs industriels. L'adjonction de bleu de méthylène (0,5 mg/L) au milieu peut aider à la lecture des diamètres des zones d'inhibition. Le tableau ci dessous fournit des critères d'interprétation.

**Tableau 19:** Diamètres critiques (mm) pour la catégorisation clinique

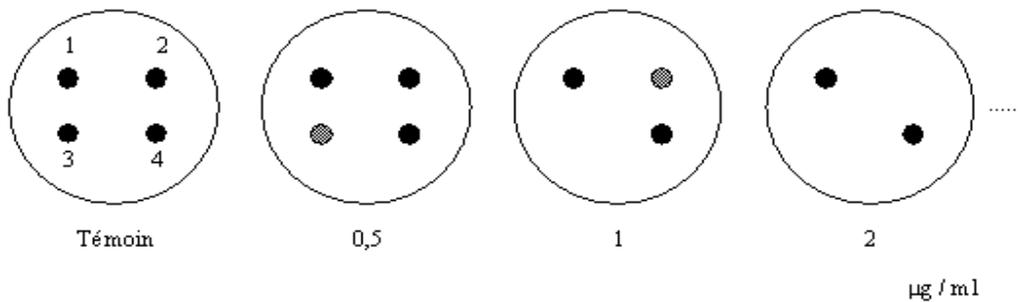
	<i>Candida</i>			Filamenteux		
	S	S-DD	R	S	S-DD	R
<b>Fluconazole</b>	≥19	15-18	≤14			
	([c] sanguines > 400 mg/dose)					
<b>Voriconazole</b>	≥17	14-16	≤13	≥17	14-16	≤13
	([c] plasmatiques > 0,5 mg/L)					
<b>Itraconazole</b>				≥17	14-16	≤13
<b>Posaconazole</b>						
<b>Caspofungine</b>				≥17	14-16	≤13
<b>Amphotericine B</b>				≥15	13-14	≤13

S = Sensible ; R = Résistant ; S-DD = Sensibilité Dose Dépendante

## 2.1 Méthodes par dilution :

Les méthodes de dilution sont effectuées en milieu liquide ou en milieu solide. Elles consistent à mettre un inoculum standardisé au contact de concentrations croissantes d'antifongiques selon une progression géométrique de raison 2.

**En milieu solide :** La méthode la plus utilisée est la méthode de Steers. Pour un antifongique donné, une gamme de concentration est réalisée puis incorporée à un milieu solide en surfusion, et coulée en boîte de Pétri. Une boîte de Pétri permet de tester jusqu'à 30 souches différentes. L'ensemencement des souches à tester est fait à l'aide de l'appareil de Steers, qui est un multi-ensemencieur permettant de repiquer en une fois 36 souches sur le même milieu. Après incubation, la CMI de chaque souche est déterminée par l'inhibition de la croissance sur le milieu contenant la plus faible concentration d'antifongique.



**Figure 21 :** Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

Dans l'exemple présenté ci-dessus (Figure 21), le nombre de souches est limité à quatre.

- La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antifongique incorporé à la gélose est de 1 µg/mL.
- La CMI de la souche 2 est de 2 µg/mL.
- Les déterminations des CMI des souches 1 et 4 nécessiteraient de tester des concentrations plus fortes en antifongique.

Le milieu casitone a permis d'améliorer la lecture pour les azolés. Il existe une bonne corrélation avec les micro-méthodes en milieu liquide.

**En milieu semi-solide :** Il en existe plusieurs. Des galeries possédant en général plusieurs puits avec deux concentrations différentes d'un antifongique sont utilisées.

- **ATB-Fungus®** (Bio-Mérieux) : C'est un test commercialisé qui permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et de *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques dans des conditions très proches de la technique de référence de micro-dilution.

La galerie ATB-Fungus comporte 16 paires de cupules. La première paire, sans antifongique, sert de témoin de croissance. Les 15 suivantes contiennent cinq ou six antifongiques (selon le modèle) à plusieurs concentrations permettant de déterminer des CMI et/ou des catégories cliniques. Pour déterminer cette CMI, on va rechercher et quantifier dans chaque cupule une croissance par lecture visuelle.

Il existe la galerie ATB-Fungus3® et le modèle précédent ATB-Fungus2®. La différence entre les deux réside en la présence d'un cinquième agent antifongique dans la galerie ATB-fungus3® qui est le voriconazole.



**Figure 22 :** Galerie ATB Fungus2®, bioMérieux SA Marchand S., (2004-2005)

**Tableau 20** : Antifongiques des deux modèles de la galerie ATB-Fungus.

Agent antifongique	ATB-Fungus2®	Nbr de cupules	ATB-Fungus3®	Nbre de cupules
<b>5flucocytosine</b>	0.5 - 64 µg/ml	8	4 - 2 16mg/L	
<b>Amphotéricine B</b>	0.5 - 16 µg/ml	6	0.5 - 6 16mg/L	
<b>Fluconazole</b>	0.25 - 128 µg/ml	10	1 - 8 128mg/L	
<b>Itraconazole</b>	0.125 - 4 µg/ml	6	0.125 - 6 4mg/L	
<b>Voriconazole</b>	-	-	0.06 - 8 8mg/L	

**Mode opératoire** : A partir d'une culture fraîche de levures, on prépare une suspension de 2 McFarland. 20 µl de cette suspension est ensuite transféré à un milieu de croissance spécifique (ATB-Fungus medium). Après homogénéisation, chaque puits de la galerie est inoculé avec 135 µl de l'inoculum homogénéisé ( $4 \times 10^3$  levures/cupule). Après 24h d'incubation à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , la croissance dans les puits est lue visuellement par deux techniciens indépendants.

**Lecture des résultats** : Pour faciliter la lecture, la galerie est placée sur un fond noir. Pour chaque antifongique, la lecture commence par la concentration la plus faible, ensuite un score de croissance est noté pour chacune des cupules comparativement aux cupules témoins. L'absence de croissance dans l'une ou l'autre, ou les 2 cupules témoins invalide la galerie.

Absence de réduction de croissance → score = 4

Légère réduction de croissance → score = 3

Réduction marquée de croissance → score = 2

Très faible croissance → score = 1

Absence de croissance → score = 0

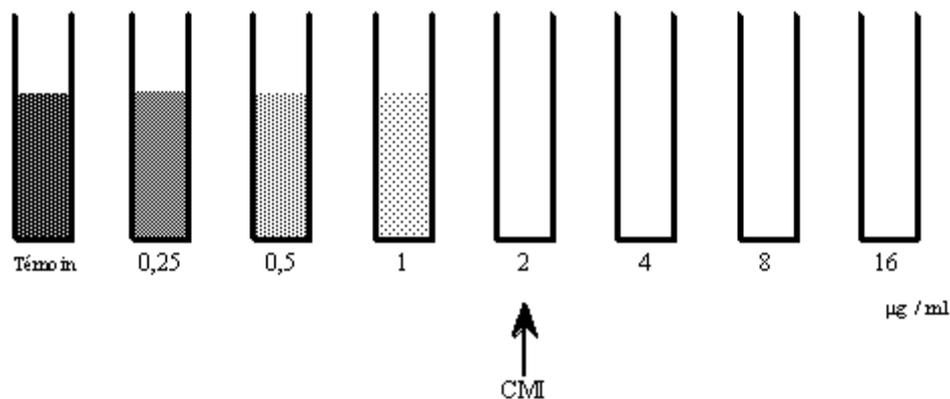
Pour ce qui est de l'amphotéricine B, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 0, donc une inhibition complète. Pour le

fluconazole, la flucytosine, l'itraconazole et le voriconazole, du fait du phénomène de croissance résiduelle, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 2,1 ou 0.

**Avantages :** La méthode est rapide, reproductible et automatisable. Les CMI sont précises (plusieurs concentrations).

**Inconvénients :** Pour cette méthode, la lecture de la quantification de la croissance est relativement difficile au début et peut varier selon les personnes donc le résultat dépend de notre jugement. Ce résultat est parfois peu clair du fait d'une mauvaise préparation ou d'une incubation inadéquate. Le temps d'incubation est de 24 heures pour toutes les espèces, sauf pour *C.glabrata* (48 heures). Après 48 heures, les cupules de la galerie sont parfois sèches et ininterprétables.

**En milieu liquide :** En milieu liquide, l'inoculum est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthode de microdilution) contenant l'antifongique. Après incubation, la CMI est indiquée par le tube ou la cupule qui contient la plus faible concentration d'antifongique et où aucune croissance n'est visible. Dans la figure ci-dessous, la CMI de la souche testée est de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).



**Figure 23 :** Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

Dans la pratique courante, les méthodes de dilution sont de mise en œuvre délicate et/ou onéreuse et elles sont réservées à des laboratoires spécialisés.

**Méthodes de référence :** 2 techniques de références sont disponibles

**1- Standard américain : Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) :**

L'absence de reproductibilité des concentrations minimales inhibitrices entre les laboratoires a imposé la nécessité d'obtenir des méthodes standardisées et reproductibles. Beaucoup d'effort ont été entrepris pour obtenir des méthodes rapides, fiables et de routine au sein des laboratoires. Les buts princéps étaient d'obtenir des résultats reproductibles et définir des souches contrôle, de constituer une référence pour l'évaluation des autres méthodes, d'évoluer vers des méthodes de pratique courante et construire pour le mycologue une trousse de routine.

Ainsi, en 1982, une première section chargée de la standardisation des tests de sensibilité des levures aux antifongiques a été créée aux Etats-Unis au sein du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Suite aux études initiées, depuis 1982, par le Subcommittee on Antifungal Susceptibility Tests (sous comité sur les essais de sensibilité aux antifongiques), le NCCLS a publié en 1997 une méthode de référence officielle de macrodilution en bouillon (Approved Standard M27-A) et ses variantes de microdilution pour tester *in vitro* les activités des composés antifongiques contre *Candida.sp* .et *C.neoformans*. La méthode M27-A est une macrométhode longue et laborieuse réalisée en tube avec une détermination visuelle des CMI.

Pour pallier à la lourdeur de la mise en œuvre de cette technique, le NCCLS a proposé une microméthode adaptée pour une utilisation en microplaques avec lecture spectrophotométrique des CMI. Elle est bien corrélée avec la macrométhode mais elle reste une technique lourde non utilisée en routine. Ainsi, la publication de la méthode M27-A a été suivie en 1998 du Proposed Standard M38-A, qui décrit des méthodes de macrodilution et de microdilution en bouillon pour des essais de sensibilité des champignons filamenteux (*Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus oryzae*....)

**Tableau 21** : Paramètres de mise en œuvre des méthodes M27 et M38 de microdilution du CLSI.

	M27-A	M38-A
<b>Format</b>	Microdilution en milieu liquide, volume final : 1MI	Microdilution
<b>Organismes</b>	<i>Candida sp.</i> <i>Cryptococcus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Rhizopus sp.</i> <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Pseudallescheria boydii</i>
<b>Milieu</b>	RPMI 1640 + 0.165M MOPS (pH=7.0)	RPMI 1640 + 0.165M MOPS (pH=7.0)
<b>Taille de l'inoculum</b>	0.5 – 2.5 x 10 <sup>3</sup> organismes/mL	0,4 – 5 x 10 <sup>4</sup> conidies/MI
<b>Température d'incubation</b>	35°C	35°C
<b>Durée d'incubation</b>	48h ( <i>Candida sp.</i> ) 72h ( <i>Cryptococcus néofor-</i> <i>mans</i> )	24h <i>Rhizopus</i> 48h <i>Aspergillus, Fusarium,</i> <i>S.schenckii</i> 72h <i>P.boydii</i>
<b>Point final</b>	CMI - 0: amphotéricine B CMI - 2: azolés, 5fluorocytosine, caspofungine, anidumafungine, micafungine	CMI - 0 : amphotéricine B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, ravcuconazole CMI - 2 et MEC : caspofun- gine, anidumafungine, mica- fungine

CMI (mg/L) = Concentration Minimale Inhibitrice : Plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum/témoin.

- CMI - 0 : inhibition complète de la croissance.
- CMI - 2 : inhibition de 50%/témoin.

CME (mg/L) = Concentration Minimale Efficace : Plus petite concentration d'antifongique pour laquelle on observe des hyphes courtes, trapues et compactes/témoin.

## **2- Standard européen : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) :**

Un test de dilution en bouillon pour tester la sensibilité des levures normalisé par le Comité Européen sur les Essais de Sensibilité aux Antifongiques (EUCAST), Sous-Comité sur les Essais de Sensibilité aux Antifongiques (AFST), est également disponible et initialement documenté en 1999. Le test est similaire à la méthode de dilution en bouillon du CLSI, sauf que le milieu RPMI 1640 est supplémenté de 2% de glucose, la densité d'inoculum est de  $1-5 \times 10^5$  cellule/mL, et les résultats sont lus à 24h au lieu de 48h pour le CLSI. Une évaluation multicentrique de la méthode de l'EUCAST a montré qu'elle donne des résultats reproductibles et des études comparatives suggèrent une bonne corrélation (taux d'accord 92%) entre la méthode du CLSI et celle de l'EUCAST.

Des paramètres optimaux pour les tests de sensibilité d'*Aspergillus sp* aux antifongiques ont également été proposés par EUCAST-AFST. Il s'agit notamment de l'utilisation de RPMI 1640 supplémenté à 2% de glucose comme le milieu d'essai, d'un inoculum d'une densité de  $1-2,5 \times 10^5$  conidies/mL, d'une température d'incubation de 35°C pendant 48h, et une lecture visuelle des CMI à CMI-0. Un taux d'accord global de 92,5% a été atteint entre la méthode d'EUCAST et la méthode du CLSI lors d'un essai qui a englobé le posaconazole et le voriconazole contre *Aspergillus*.

**Expression des résultats :** Les résultats des 2 méthodes de référence en milieu liquide s'expriment par :

**CMI** (mg/L) = Concentration Minimale Inhibitrice : Plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum/témoin.

**CME** (mg/L) = Concentration Minimale Efficace : Plus petite concentration d'antifongique pour laquelle on observe des hyphes courtes, trapues et compactes/témoin.

**CMF** (mg/L) = Concentration Minimale Fongicide : Plus petite concentration d'antifongique qui tue  $\geq 99,9\%$  de l'inoculum ou qui diminue de 3 log au moins la densité de l'inoculum/témoin.

**Valeurs seuils d'interprétation** : pour les 2 méthodes diffèrent d'une espèce à l'autre.

**a) Pour *Candida sp.***

Les valeurs seuils d'interprétation pour *Candida* selon les méthodes de référence sont représentées dans le tableau suivant.

**Tableau 22** : Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories de *Candida* vis-à-vis des antifongiques selon l'EUCAST et le CLSI

Antifongique	EUCAST			CLSI		
	S	I	R	S	SDD	R
<b>Fluconazole</b>	≤2	4	>4	<8	16 – 32	≥4
<b>Voriconazole</b>	≤0,125	-	>0,125	<1	2	≥4
<b>Caspofungine</b>	NE	NE	NE	≤2*	NE	NE
<b>Micafungine</b>	NE	NE	NE	≤2*	NE	NE
<b>Anidulafungine</b>	NE	NE	NE	≤2*	NE	NE

\*Les isolats de *Candida* testés qui ont des CMI > 2 mg/L pour les échinocandines ont été définis comme non sensibles.

NE: Non établi, S-DD sensible dose dépendant.

Les données sont exprimées en mg/L.

**b) *Aspergillus fumigatus* :**

Il n'existe pas de valeurs seuils d'interprétation approuvées par le CLSI ou l'EUCAST pour tester la sensibilité des filamenteux aux azolés. Mais il existe des propositions de valeurs seuils pour les différentes catégories (S, I, R) d'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des antifongiques azolés actifs (Tableau 23).

**Tableau 23**: Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories (S, I, R) d'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des antifongiques azolés actifs

Antifongique	S	I	R
<b>Itraconazole</b>	<2	2	>2
<b>Voriconazole</b>	<2	2	>2
<b>Posaconazole</b>	<0,5	0,5	>2

**c) Cas particulier de l'amphotéricine B :**

Il n'existe pas de valeurs seuils d'interprétation approuvées par le CLSI ou l'EUCAST concernant l'amphotéricine B.

*Candida sp.* : CMI > 1mg/L → Résistant

*Aspergillus sp.* : CMI > 1mg/L → Résistant

**Méthodes colorimétriques (dérivées de la méthode du NCCLS) :** Nous avons vu précédemment que la détermination des CMI pour les méthodes de dilution demande une appréciation visuelle du degré de croissance par rapport à un témoin. Cette évaluation nécessite de l'expérience. Afin de faciliter l'expression des résultats, des indicateurs colorimétriques ou des colorants fluorescents peuvent être utilisés [12, 23, 36].

Plusieurs méthodes colorimétriques sont utilisées tels que Sensititre Yeast One. Des méthodes non commercialisées sont également utilisées (celles qui utilisent les sels de tétrazolium). Alamar blue ou d'autres indicateurs colorimétriques peuvent être ajoutés au RPMI. En utilisant Alamar blue, le bleu indique l'absence de croissance, le violet indique une inhibition partielle de la croissance, et le rouge indique la présence d'une croissance. Ces résultats peuvent également être évalués par spectrophotométrie. Dans l'autre cas, où c'est les sels de tétrazolium qui sont utilisés, le changement de couleur reflète l'activité métabolique et peut être évaluée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique. Le sel de tétrazolium jaune vire au violet quand il est réduit en formazan.

Parmi ces méthodes colorimétriques commercialisées on citera :

**a. Sensititre Yeast One®:**(Trek Diagnostic Systems)

Le système de sensibilité Sensititre est un produit de diagnostic *in vitro* destiné à tester la sensibilité des levures non-exigeantes dont *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, et les champignons dont *Aspergillus sp.* Ainsi que diverses autres espèces de levures à croissance rapide.

**Principe :** Le test de sensibilité des levures Sensititre est un test de microdilution colorimétrique en milieu liquide. Il fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de CMI sous forme d'une plaque sèche. Chaque plaque est dosée avec des antifongiques à des dilutions appropriées, et avec un indicateur colorimétrique (Alamar Blue). Les résultats

sont lus visuellement par l'observation de la concentration d'antifongique la plus basse indiquant l'inhibition de la croissance mise en évidence par l'absence de changement de couleur.

**Antifongiques :** Les antifongiques disponibles pour ce test sont représentés dans le tableau suivant avec la fourchette de dilutions de chacun.

**Tableau 24 :** Antifongiques à tester par le Sensititre Yeast One

Pos.	Antifongique	Abréviation	Fourchette de dilutions (µg/ml)
A1	Positive Croissance	+CONT	
A2-A12	Posaconazole	PZ	0,008 - 8
B1-12	Amphotéricine B	AB	0,008 - 16
C1-12	Fluconazole	FZ	0,125 - 256
D1-12	Itraconazole	IZ	0,008 - 16
E1-12	Kétoconazole	KZ	0,008 - 16
F1-12	5 - Flucytosine	FC	0,03 - 64
G1-12	Voriconazole	VOR	0,008 - 16
H1-12	Caspofungine	CAS	0,008 - 16

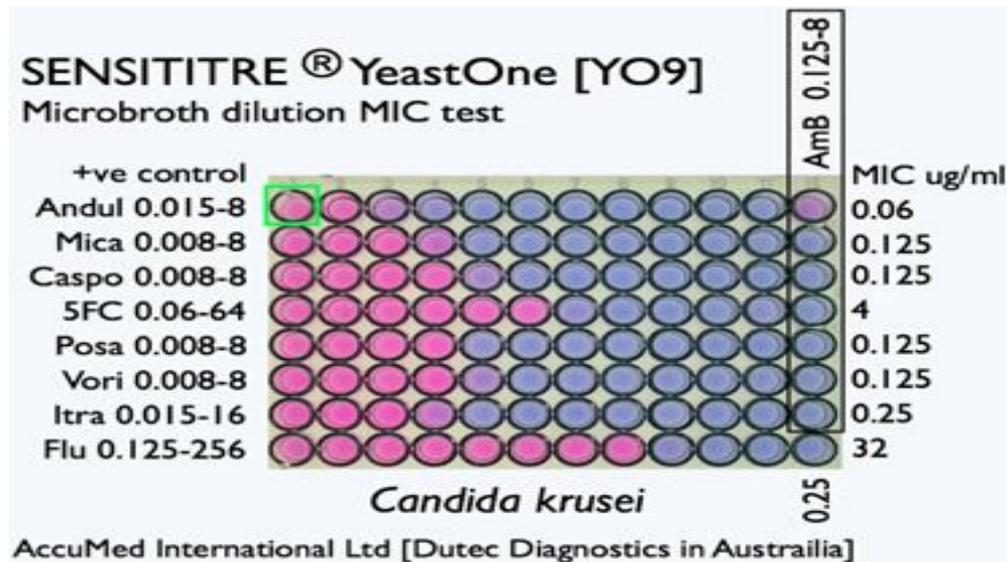
**Mode opératoire:** Plusieurs colonies de levures bien isolées, de plus de 1mm de diamètre, sont prélevées d'une culture pure de 24 heures et émulsifiées dans l'eau stérile. La densité est ensuite ajustée à 0,5 McFarland. 20 mL de la suspension est transféré dans 11 ml de milieu liquide d'inoculum YeastOne pour obtenir un inoculum d'une densité de 0,6 à 5 x 10<sup>6</sup> cellules souches/mL.

La plaque est ensuite inoculée par 100µl en suivant l'une ou l'autre de ces méthodes:

- **AutoInoculator Sensititre :** Remplacer le capuchon du tube par une tête de dosage Sensititre à usage unique, et inoculer la plaque selon le mode d'emploi de l'AutoInoculator.
- **Pipette manuelle :** Verser le milieu liquide dans une cuve d'ensemencement stérile et inoculer la plaque à l'aide d'une pipette appropriée.

Les plaques sont étuvées pendant 24 à 25 heures à 35°C dans une étuve à culture sans CO<sub>2</sub>. *Cryptococcus sp.* est incubé pendant 72 heures et *Aspergillus sp.* pendant 48 à 72h.

**Lecture des résultats :** Les plaques peuvent être lues visuellement sous l'éclairage normal du laboratoire à l'aide d'un miroir de lecture présentant le dessous des cupules. La croissance des levures dans les solutions d'antifongiques sera mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu (négatif) au rouge (positif).



**Figure 24 :** Lecture des résultats du Sensititre YeastOne® (virage de la couleur de l'indicateur)

Les différents cas qu'on peut rencontrer sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 25 :** Illustration et interprétation des résultats des tests que l'on peut rencontrer

	Concentration de la cupule $\mu\text{g/ml}$						<b>R = ROUGE : Indication positive de croissance</b> <b>B = BLEU : Indication négative de croissance</b>
	1	2	4	8	16	32	
<b>A.</b>	R	R	R	B	B	B	Modèle de croissance typique ; le point de virage de la CMI est à 8 $\mu\text{g/ml}$ .
<b>B.</b>	R	R	R	R	R	R	Croissance dans toutes les cupules ; le point de virage de de la CMI est >32 $\mu\text{g/ml}$ .
<b>C.</b>	B	B	B	B	B	B	Aucune croissance dans aucune cupule ; le point de virage de la CMI est $\leq 1$ $\mu\text{g/ml}$ .
<b>D.</b>	R	R	R	B	R	R	"Cupule sautée". Le point de virage de la CMI est >32 $\mu\text{g/ml}$ . Ne pas tenir compte du "saut" si les cupules ont une croissance des deux côtés. Si plusieurs "sauts" devaient se produire dans une colonne, les résultats du test seraient invalidés <sup>1</sup>
<b>E.</b>	R	R	B	B	R	R	Double "cupule sautée". Le test devra être répété <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Avec une technique soignée, ces événements sont rares.

**Avantages :** Selon les évaluations publiées, ce test présente une concordance de plus de 85% avec les résultats obtenus avec la méthode M27-A. La présence d'un indicateur d'oxydoréduction rend la lecture des CMI beaucoup plus aisée.

**Inconvénients :** Le système Sensititre Yeast One Colorimetric Antifungal Panel (procédé BlueAlamar®) est disponible commercialement, mais il n'est pas encore approuvé par la FDA aux USA ni enregistré en France par l'AFSSAPS. Des améliorations sont encore nécessaires concernant la détection des résistances à l'amphotéricine B et la croissance des isolats à développement lent (*cryptococcus neoformans*).

**b. Fungitest®:**

**Principe :** Cette technique permet d'étudier la croissance des levures in vitro en milieu liquide en présence de six antifongiques testés à deux concentrations différentes. Elle dérive de la dernière recommandation du NCCLS. Le milieu de culture utilisé est RPMI glucosé à 2% et tamponné. Il est additionné d'un indicateur d'oxydoréduction qui traduit la croissance des levures par virage de sa couleur du bleu au rose.

La microplaque contient 16 puits : Deux puits réservés aux témoins négatifs. Deux puits réservés aux témoins positifs. Douze puits contenant les six antifongiques cités avec deux concentrations différentes sous forme déshydratées.

**Antifongiques:** Les antifongiques utilisés sont : Amphotéricine B 2 et 8 µg/ml, Fluconazole 8 et 64 µg/ml, Itraconazole 0.5 et 4 µg/ml, Kétoconazole 0.5 et 4 µg/ml, Miconazole 0.5 et 8 µg/ml, 5-Fluorocytosine 2 et 32 µg/ml

**Mode opératoire :** Le mode opératoire du Fungitest est représenté dans la figure suivante :

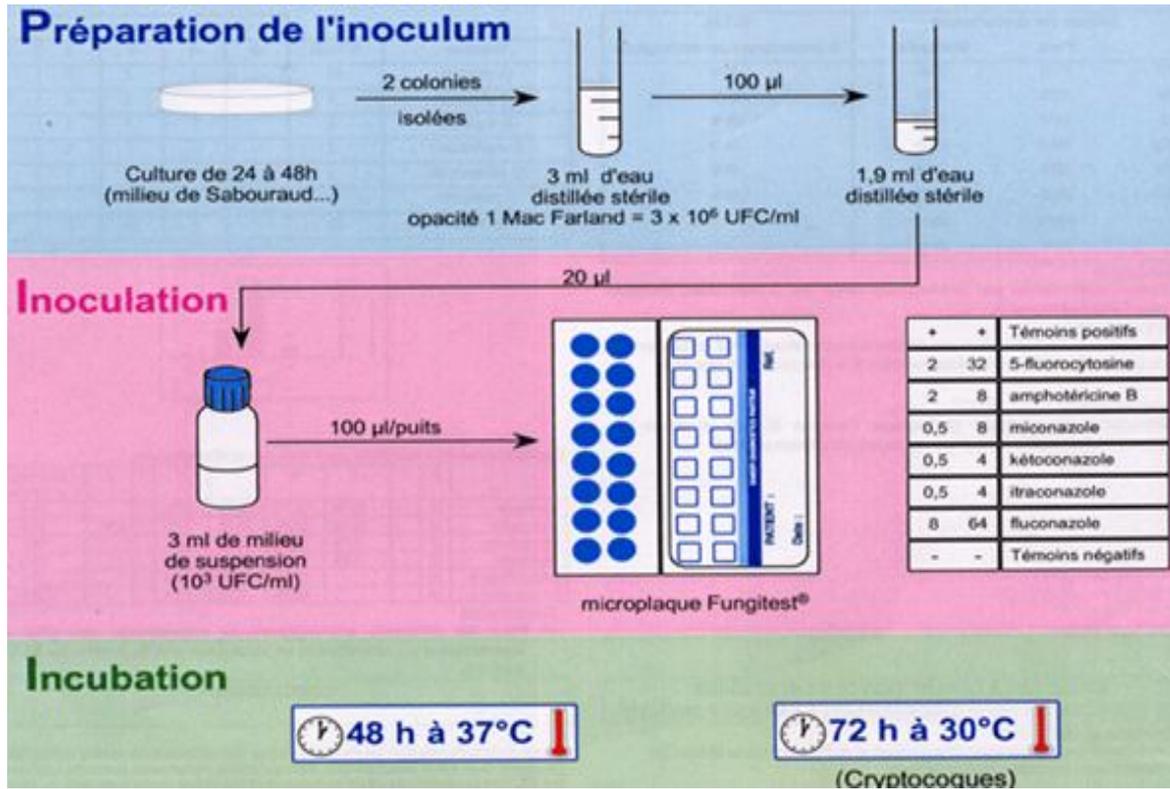


Figure 25 : Mode opératoire du Fungitest

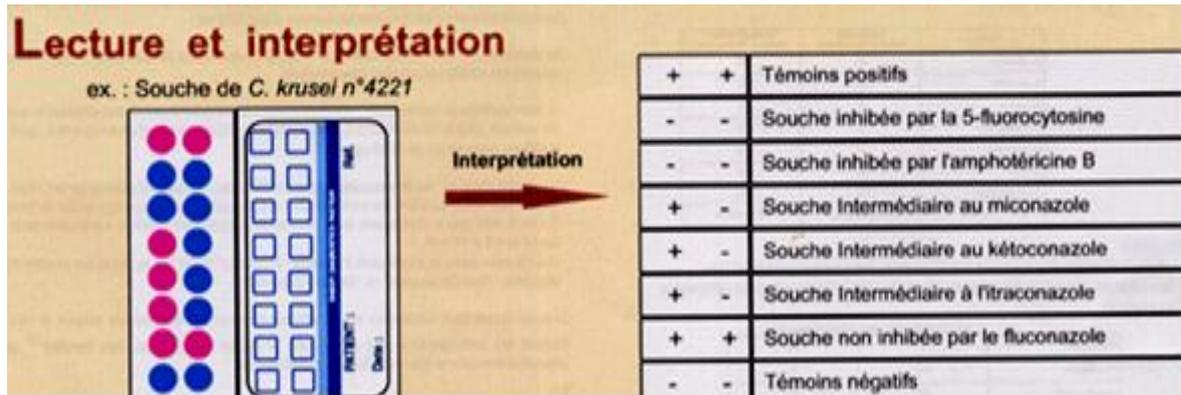
**Lecture des résultats :**

L'interprétation se fait en fonction de la couleur des deux cupules pour chaque antifongique.

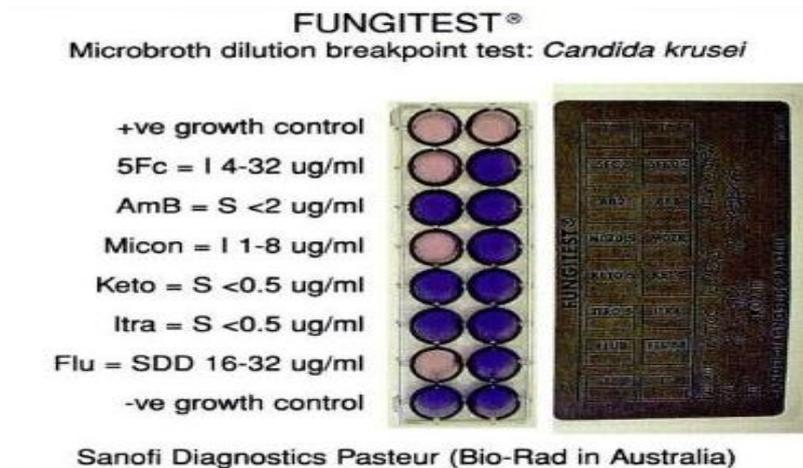
Bleu-Bleu : absence de croissance → souche inhibée par l'antifongique.

Rose-Rose : croissance → souche non inhibée par l'antifongique.

Rose-Bleu : faible croissance → souche intermédiaire [58].



**Figure 26 :** Lecture et interprétation des résultats du Fungitest



**Figure 27:** Lecture des résultats du Fungitest® en fonction de la couleur des cupules

**Avantage:** Cette technique présente une bonne condition de standardisation et a une bonne corrélation par rapport à la méthode de référence du NCCLS pour les souches trouvées sensibles.

**Inconvénients :** Le Fungitest a une faible capacité de détecter les souches résistantes. Par rapport à la méthode de référence du NCCLS, une proportion importante de *C.glabrata* trouvée intermédiaire ou résistante par cette technique se retrouve sensible par le Fungitest. Aussi, les valeurs des CMI sont différentes de celles du NCCLS. L'autre limite de cette technique est qu'elle ne peut doser que deux valeurs d'antifongiques.

## 2.2 Méthode par diffusion :

**Méthode de diffusion des disques du CLSI :** Après le succès du développement de méthodes standardisées de dilution en bouillon pour tester la sensibilité aux antifongiques des champignons, l'étape suivante pour le CLSI était de simplifier cette approche et la rendre plus attrayante pour les essais de petits volumes. La diffusion en disque est depuis longtemps une technique populaire et simple pour tester la sensibilité et cette méthodologie a été adaptée par le CLSI aux antifongiques. Ainsi, sur la base d'études du fluconazole et du voriconazole contre *C.albicans*, une méthode normalisée de la susceptibilité des levures, particulièrement *Candida*, aux antifongiques (fluconazole et voriconazole) par la diffusion des disques (M44-A) est disponible. Elle est utilisée pour les études de surveillance antifongique [67, 68, 136].

Cette méthode utilise les règles de base, à savoir, un milieu agar de Mueller-Hinton complété par du glucose à 2% et 0,5µg/mL de bleu de méthylène (pH 7,2-7,4 à température ambiante après gélification). Bien que l'ajout du glucose fournisse une croissance favorable, l'addition du bleu de méthylène améliore la définition des contours de la zone d'inhibition. La densité de l'inoculum doit être ajustée par une solution saline à 0,5 McFarland visuellement ou par spectrophotométrie à 530 nm, pour avoir une concentration finale de 1-5 x 10<sup>6</sup> cellules/ ml. Les résultats se lisent à 80% de la croissance après incubation des plaques pendant 24h à 35°C. La période d'incubation peut être prolongée à 48h pour les isolats qui ne se développent pas suffisamment à 24h. Pour l'interprétation des résultats, elle se fait en fonction des diamètres d'inhibition.

**Tableau 26:** Critères d'interprétation de la méthode de diffusion pour le fluconazole et le voriconazole contre *Candida*

Disque	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		
	R	SDD	S
<b>Voriconazole</b>	≤13	14 – 16	≥17
<b>Fluconazole</b>	≤14	15 – 18	≥19

Les résultats quantitatifs (CMI en mg/L) sont le plus souvent interprétés par les laboratoires en termes de possibilité thérapeutique. La confrontation des diamètres d'inhibition aux CMI permet donc aux laboratoires de donner les résultats sous la forme de souche sensible, sensible dose dépendante ou résistante à un antifongique.

**Une souche sensible** est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte. **Une souche de sensibilité intermédiaire** est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie sensible. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ; peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie résistante, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues). La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques. **Une souche résistante** est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée. Même si elle n'est pas encore normalisée et/ou documentée, la méthode de diffusion est sous enquête pour d'autres drogues: tels que le posaconazole vs *Candida*; caspofungine vs *Candida*; amphotéricine B, la flucytosine, et azolés; caspofungine et micafungine vs *Aspergillus* et *Fusarium*; posaconazole vs *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium* et *Fusarium*; posaconazole, voriconazole, itraconazole, l'amphotéricine B, et la caspofungine vs *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, et *Scedosporium*; itraconazole, terbinafine, voriconazole, et ravuconazole vs *Microsporium* et *Trichophyton*, et terbinafine et naftifine vs *Microsporium*, *Epidermophyton*, et *Trichophyton*. Les résultats de ces études, en général, suggèrent un degré acceptable de corrélation entre la diffusion des disques et les dosages de la méthode de dilution de référence du CLSI. Cependant, la méthode de référence de diffusion des disques peut parfois donner des résultats qui diffèrent de ceux obtenus par la méthode de dilution en bouillon. Certains isolats qui

sont sensibles au fluconazole peuvent être classés comme résistants par le test de diffusion des disques. De plus, ce test peut ne pas différencier les isolats résistants au fluconazole de ceux sensibles dose dépendant. Plus important encore, certains isolats résistants au fluconazole peuvent être classés comme sensibles par un test de diffusion des disques. La méthode de référence de dilution en bouillon reste le gold standard pour la catégorisation correcte de la sensibilité, en particulier lorsque l'étude de résistance aux antifongiques est effectuée à des fins de routine et pour guider le traitement antifongique.

**Méthode de diffusion des comprimés Néo-sensitabs™:** Il s'agit d'un test de diffusion qui utilise des comprimés d'antifongiques commercialisés au lieu des disques. Cette méthode a été étudiée en comparaison avec le test de référence de diffusion du CLSI. Jusqu'ici, elle a donné des taux acceptables d'accord avec la méthode de diffusion des disques de référence et les méthodes de dilution en bouillon, dans des essais sur le fluconazole, le voriconazole, l'itraconazole, et la caspofungine contre *Candida* ou *C.neoformans*.

Le choix du milieu à utiliser et l'interprétation des points finaux sont les difficultés rencontrées pour cette technique. La plupart des utilisateurs ont amélioré les performances de cette technique par modification de l'agar RPMI qui est complété avec 0,2% de glucose et l'adoption des directives de base du CLSI pour rendre ce test plus standardisé.

Des études récentes ont utilisé l'agar Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5µg/mL de bleu de méthylène comme milieu et un lecteur de plaques Biomic qui permet une lecture électronique et une interprétation des 16 zones d'inhibition.

**Antifongiques :** La liste des agents antifongiques disponibles depuis le 1er janvier 2009 pour la technique de Neo-Sensitabs est représentée dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 27** : Antifongiques à tester par le Néo-Sensitabs

Ref N°	Produit	Code	Puissance (µg)
81012N	Amphotericin B	AMPHO	10
82412N	Caspofungin	CASP5	5
	<i>For research use only</i>		
81112N	Ciclopirox	CICLO	50
81212N	Clotrimazole	CTRM	10
81312N	Econazole	ECONZ	10
82512N	Fluconazole	FLUCZ	25
81512N	Fluorocytosine 1 µg	FLU.1	1
81612N	Fluorocytosine 10 µg	FLU10	10
81812N	Itraconazole	ITRAC	8
81912N	Ketoconazole	KETOC	15
82012N	Miconazole	MICOZ	10
82212N	Nystatin	NYSTA	50
82612N	Posaconazole	POSAC	5
87412N	Terbinafine	TERBI	30
82312N	Voriconazole	VOR.1	1

**Mode opératoire:** A partir d'une culture fraîche de 24h, quelques colonies sont prélevées pour préparer une suspension de levures. La densité de l'inoculum préparé doit être de 0,5 McFarland. Avec un écouvillon stérile, la boîte contenant le milieu agar de Mueller-Hinton complété par du glucose à 2% et 0,5µg/ml de bleu de méthylène doit êtreensemencée sur toute la surface. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24-48 heures pour *Candida*. Pour *Cryptococcus* l'incubation se fait à 30°C pendant 42-48 heures. Une durée d'incubation plus longue peut entraîner une fausse résistance contre les imidazolés. Les boîtes doivent toujours être examinées après une incubation d'une nuit et si les zones d'inhibition sont visibles, elles doivent être mesurées. Si la croissance n'est pas encore visible, les plaques peuvent être remises en incubation pendant 24 heures de plus.

**Lecture des résultats:** Pour les polyènes (amphotéricine B, nystatine) la zone claire sans croissance visible est mesurée. Les colonies à l'intérieur de la zone d'inhibition doivent être considérées comme des mutants résistants.

Pour les azolés, caspofungine et terbinafine (*Candida*), les zones doivent être mesurées à la hauteur de colonies détaille normale. Il ya souvent une zone de croissance des colonies partiellement inhibées (plus petites) à la limite de la zone réelle. Ils ne doivent être considérés comme des mutants résistants.

Pour la fluorocytosine, elle ne peut pas être testée avec le milieu Muller Hinton (glucose+bleu de méthylène) en raison de la présence d'antagonistes dans le milieu. Les milieux utilisés doivent être sans antagonistes tel que le milieu gélosé Shadomy. Sur ce milieu, généralement les grandes colonies individuelles dans la zone sont considérées comme des mutants résistants.

**Interprétation des résultats:**

\* Selon les valeurs seuils du CLSI : Lors de l'utilisation de la procédure recommandée par le CLSI pour le test de diffusion (gélose MH + 2% de glucose + 0,5 µg/mL bleu de méthylène et inoculum de 0,5 McF) [60,62, 63, 81-86]. L'interprétation sera comme suit:

MH Glucose Methylene Blue Agar Inoculum McFarland 0.5 undiluted MIC breakpoints according to CLSI (M44-A)							
NEO-SENSITABS	POTENCY	CODE	Zone diameter in mm			Break-points MIC µg/ml	
			S	I	R	S	R
Amphotericin B	10 µg	AMPHO	≥ 15	14-10	< 10	≤ 1	≥ 2
Caspofungin	5 µg	CASP5	≥ 15	14-12	≤ 11	≤ 2	> 2
Fluconazole *	25 µg	FLUCZ	≥ 19	18-15 (DD)	≤ 14	≤ 8	≥ 64
Itraconazole (50)	8 µg	ITRAC	≥ 23	22-14 (DD)	≤ 13	≤ 0.12	≥ 1
Ketoconazole	15 µg	KETOC	≥ 28	27-21	≤ 20	≤ 0.12	≥ 0.5
Posaconazole (52)	5 µg	POSAC	≥ 17	16-14	≤ 13	≤ 1	≥ 4
Voriconazole	1 µg	VOR.1	≥ 17	16-14	≤ 13	≤ 1	≥ 4

\* *C. krusei* should always be reported as resistant to fluconazole (no matter the zone size).

**Selon les valeurs seuils de l'EUCAST :** EUCAST travaille sur l'harmonisation des valeurs seuils, cependant, il n'existe aucun accord avec les valeurs seuils du CLSI. Dans les études comparant les méthodes, les erreurs d'interprétation des catégories peuvent être dues aux différences dans les valeurs seuils des CMI (87,88).

**Avantages:** Le Néo-Sensitabs est une méthode facile à mettre en place et a un potentiel pour le dépistage d'un grand nombre de souches résistantes.

**Inconvénients :** Il existe une mauvaise corrélation entre les diamètres de la zone d'inhibition et la CMI, aussi ces diamètres ne permettent pas de différencier entre souche sensible et souche sensible dose dépendante. C'est la raison pour laquelle les souches résistantes doivent être confirmées en utilisant une méthodologie appropriée de la CLSI.

### **2.3 Méthode par dilution-affusion : Il s'agit de la méthode de l'E-test® :**

**Principe :** L'E-test est une technique quantitative pour la détermination sur milieu gélosé de la concentration minimale inhibitrice des agents antifongiques vis-à-vis des champignons et pour la détection des mécanismes de résistance. Elle est basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antifongique à étudier sur une face et une échelle de lecture sur une autre face. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur la surface d'une géloseensemencée, le gradient exponentiel préformé de l'agent antifongique est immédiatement transféré dans la matrice de l'agar. Le gradient de concentration, continu et prédéfini, établi le long de la bandelette reste stable pendant une longue période de temps. Après une période d'incubation, d'une nuit ou plus, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette est formée.

**Avantage:** La méthode est standardisée et des souches de contrôle qualité sont définies. Des études récentes montrent une bonne corrélation avec la microméthode du NCCLS. Une très bonne concordance ( $\geq 96\%$ ) avec la méthode de référence (NCCLS) a été obtenue pour *Candida sp* et pour les filamenteux. L'avantage particulier de l'E-test est celui de permettre la détection d'isolats résistants à l'amphotéricine B rencontrés notamment chez *C.lusitaniae* et chez des espèces d'*Aspergillus non fumigatus*.

**Inconvénients :** La principale difficulté repose sur certaines difficultés de lecture, surtout pour les azolés, en raison de la présence possible de micro ou macrocolonies dans l'ellipse d'inhibition. Il s'agit d'un phénomène de traîne qui est observé chez 30 à 40% des souches de levures.

MH Glucose Methylene Blue Agar Inoculum McFarland 0.5 undiluted MIC breakpoints according to EUCAST (tentative)							
NEO-SENSITABS	POTENCY	CODE	Zone diameter in mm			Break-points MIC µg/ml	
			S	I	R	S	R
Amphotericin B	10 µg	AMPHO	≥ 18	17-13	≤ 12	≤ 0.25	≥ 2
Fluconazole *	25 µg	FLUCZ	≥ 28	27-23	≤ 22	≤ 2	> 4
Itraconazole (50)	8 µg	ITRAC	≥ 23	22-14	≤ 13	≤ 0.12	≥ 1
Ketoconazole	15 µg	KETOC	≥ 30	29-23	≤ 22	≤ 0.12	≥ 1
Posaconazole (52)	5 µg	POSAC	≥ 22	21-16	≤ 15	≤ 0.25	≥ 2
Voriconazole	1 µg	VOR.1	≥ 22	21-16	≤ 15	≤ 0.25	≥ 2

All MIC breakpoints from EUCAST are tentative

\* *C. krusei* should always be reported as resistant to fluconazole.

#### IV.3 Epidémiologie des résistances :

**L'utilisation des antifongiques :** La prophylaxie par fluconazole fut instaurée dans les années 1980 lors des neutropénies chimio-induites ou lors du conditionnement pré-greffe de moelle osseuse. Cette prophylaxie antifongique permet une réduction de l'utilisation du traitement curatif, une baisse des infections fongiques superficielles et profondes ainsi qu'une baisse de la mortalité relative à l'infection fongique. Cependant certains auteurs notent une absence d'amélioration de la survie totale [10, 20, 42,48].

Globalement, l'utilisation prophylactique du fluconazole entraîne une baisse des infections à *C. albicans* et *C. tropicalis* au dépend d'espèces de sensibilité réduite au fluconazole comme *C. glabrata* et *C. krusei*. D'autres études montrent plus particulièrement une augmentation des candidémies à *C. glabrata* ou *C. parapsilosis* après traitement antérieur par fluconazole.

Concernant l'impact sur la sensibilité aux antifongiques, les levures isolées présentaient des CMI plus élevées aux molécules utilisées au préalable. Certains auteurs ont démontré que l'augmentation des CMI de *C. glabrata* au fluconazole était liée à la consommation de

fluconazole. Bassetti *et al* montrent même en 2009 que l'arrêt de la prophylaxie par fluconazole entraîne une chute des candidémies à *Candida non-albicans* un an plus tard. Néanmoins, cette affirmation reste controversée et d'autres études ne retrouvent pas ces résultats. Certaines sont biaisées de par la méthodologie utilisée dans leur étude (monocentrique, non focalisation sur les services « à risque » etc...) et d'autres ont été faites dans des zones géographiques où la prévalence des ces espèces étaient moindres.

Une étude française récente portant sur les candidémies a montré que l'exposition antérieure au fluconazole (administré 30 jours avant l'épisode fongémique) était associée avec une augmentation du risque d'infection à *C. glabrata* et *C. krusei*, espèces de sensibilité diminuée au fluconazole. De même, la préexposition à la caspofungine entraîne un risque supérieur d'être infecté à *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. krusei*. Il y a une diminution du risque d'infection à *C. albicans* avec l'utilisation de chacune des deux molécules dans les 30 jours antérieurs, par rapport aux sujets non exposés [109,134].

Concernant les échinocandines seules, l'utilisation de cette classe médicamenteuse en traitement curatif a entraîné une augmentation de l'incidence de certaines espèces qui sont de sensibilité diminuée à cet antifongique : *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii*. Kabbara *et al* a décrit des candidémies à *C. parapsilosis* après traitement prolongé par caspofungine, tandis que Forrest *et al* ont montré une corrélation entre l'utilisation augmentée de la caspofungine et l'augmentation de 400% des cas de candidémies à *C. parapsilosis*.

Le fluconazole et les échinocandines semblent alors modifier l'équilibre entre les espèces mais aussi leur sensibilité aux antifongiques.

**La durée d'hospitalisation :** L'augmentation de la durée d'hospitalisation entraîne une augmentation de la colonisation à levure. Mais plus récemment a été démontré qu'une durée d'hospitalisation supérieure à 30 jours augmentait également le risque d'infection à espèces non sensibles au fluconazole.

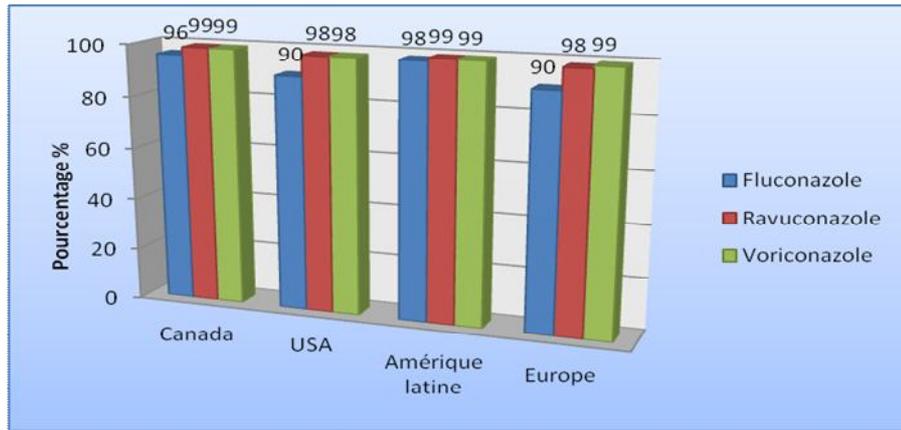
**L'augmentation du nombre de patients à risque et des facteurs de risques :** Le vieillissement de la population, l'augmentation du nombre de cancers et les changements dans les pratiques de transplantations (schémas de conditionnement, thérapies immunosuppressives, nou-

velles chimiothérapies) sont les principaux facteurs modifiant la distribution des espèces vers les non-albicans.

**Intérêt de la surveillance :** Depuis ces dernières années, on note une évolution de l'épidémiologie des résistances aux différents antifongiques, spécialement aux azolés. La surveillance de la résistance aux antifongiques s'est aujourd'hui généralisée. Plusieurs études sont réalisées continuellement dans le but d'évaluer la sensibilité des agents fongiques aux antifongiques, qu'ils soient anciennement mis sur le marché ou en vue de commercialisation. Dans le premier cas, l'étude fournit des données sur l'apparition et le profil de résistance des espèces. Alors que dans le deuxième, elle évalue l'activité du nouvel antifongique par rapport aux autres molécules disponibles sur le marché. L'amélioration de la prise en charge des patients nécessite de connaître l'évolution épidémiologique des agents pathogènes et de leur résistance aux différents antifongiques. Chose qui souligne l'importance de cette surveillance et l'intérêt majeur de la réaliser d'une manière constante. Dans cette partie on va détailler et rapporter les résultats des plus importants systèmes de surveillance en vue d'étaler l'épidémiologie des résistances aux antifongiques, spécialement aux azolés, des espèces de *Candida*.

#### **EVOLUTION DE L'EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES :**

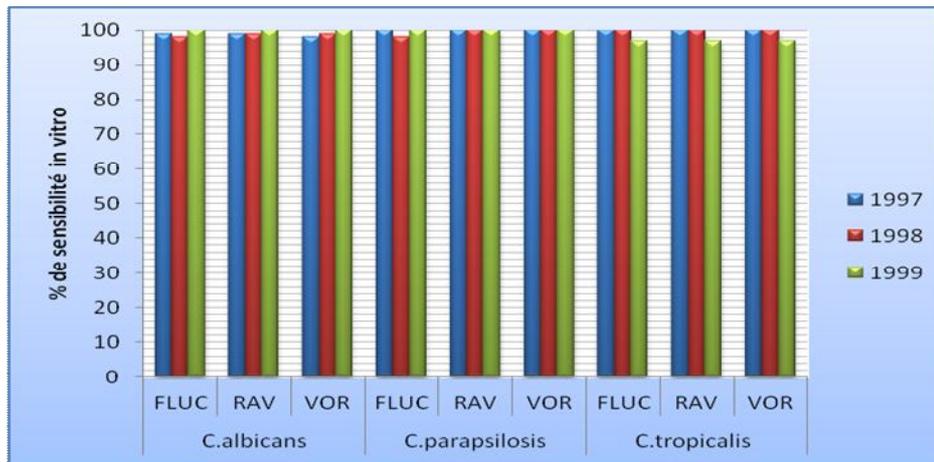
**Etude SENTRY :** L'étude SENTRY qui a porté sur 3 années (1997-1999) dans 74 sites (USA, Canada, Amérique latine et Europe) avait pour but d'étudier la sensibilité de *Candida* vis-à-vis du fluconazole, du voriconazole et du ravuconazole. La répartition de la sensibilité *in vitro* dans ces différents pays, toutes espèces confondues, oscille entre 98% pour l'Amérique latine et 90% pour les USA et l'Europe. Le fluconazole est actif dans les 4 aires géographiques. 90 à 98% des souches de *Candida sp.* sont sensibles avec une CMI  $\leq 8\mu\text{g/mL}$ . Quant au voriconazole et ravuconazole, leur efficacité est remarquée dans les 4 aires géographiques avec une sensibilité de 98 à 99% et une CMI entre 0,12 à 0,25  $\mu\text{g/mL}$  pour le voriconazole et entre 0,12 à 0,5  $\mu\text{g/mL}$  pour le ravuconazole (Figure 28).



**Figure 28 :** Sensibilité de *Candida* vis-à-vis du fluconazole, du voriconazole et du ravuconazole sur 3 années (1997-1999).

Les souches canadiennes et d'Amérique latine sont plus sensibles que les souches américaines et d'Europe du fait de la présence de souches de *C.glabrata* résistantes. La sensibilité *in vitro* au fluconazole, au voriconazole et au ravuconazole des différentes espèces de *Candida* a été stratifiée par année et par aire géographique.

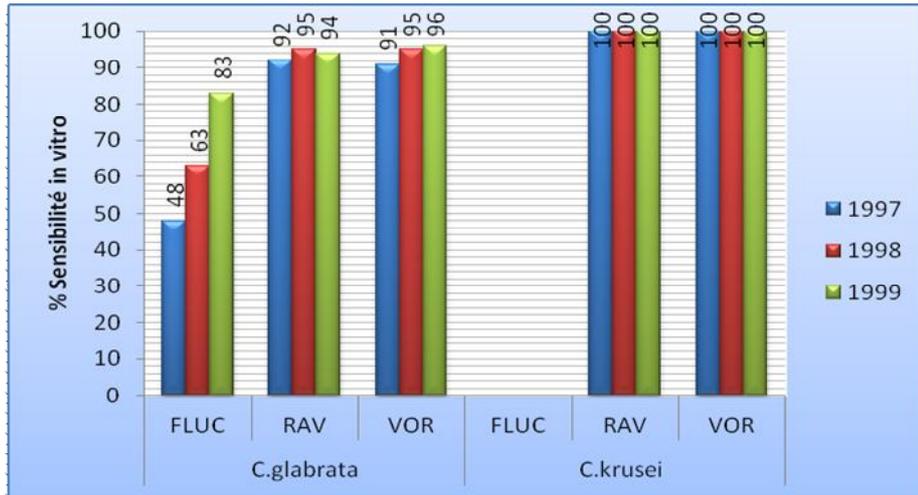
Les isolats de *C.albicans*, *C.parapsilosis* et *C.tropicalis* sont hautement sensibles aux trois azolés avec une sensibilité allant de 97 à 100% (Figure 29). Cependant, concernant l'évolution de cette résistance au cours des trois années, il a été constaté que dans les années 1997 et 1998, quelques isolats de *C.albicans* étaient résistants au fluconazole. Ces mêmes isolats l'étaient aussi aux voriconazole et au ravuconazole. Ce qui reflète une possibilité de résistance croisée vis-à-vis des triazolés. Par contre, au cours de l'année 1999, une augmentation de la sensibilité vis-à-vis de l'itraconazole.



**Figure 29 :** Sensibilité in vitro des isolats de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, au voriconazole, au fluconazole et au ravuconazole sur 3 années (1997-1999).

Au cours des trois années, la sensibilité de *C. glabrata* au fluconazole s'est modifiée. Une augmentation de la sensibilité vis-à-vis du fluconazole est constatée de 1997 à 1999, passant de 48% à 83%. Dans le même temps, une diminution de la CMI du fluconazole passant de 16 $\mu$ g/mL à 4 $\mu$ g/mL suggère une administration plus appropriée du fluconazole au cours des trois années.

À propos de *C. krusei*, toutes les souches isolées sont très sensibles aux nouveaux triazolés et toutes sont bien évidemment résistantes au fluconazole. Le voriconazole et le ravuconazole sont, donc, à la fois actifs sur *C. glabrata* et *C. krusei* avec une sensibilité variant de 97 à 100%. Tandis que la fluconazole n'est uniquement actif que sur *C. glabrata* du fait de la résistance innée de *C. krusei* à cet agent.



**Figure 30 :** Sensibilité in vitro des isolats *Candida glabrata*, *Candida krusei* au voriconazole, au fluconazole et au ravuconazole sur 3 années (1997-1999).

Dans notre étude l'espèce *C. glabrata* est l'espèce la plus isolée. Elle est isolée en première ligne dans les hémocultures, ce qui diffère des données des Etats Unis où elle représente la deuxième cause de candidémie. Il a été proposé que le changement de distribution des espèces puisse résulter de pressions sélectives imposées par l'utilisation accrue des agents antifongiques tels que des azolés. L'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis des molécules d'antifongiques disponible et en comparaison avec cette étude, prouve et confirme que le voriconazole a une sensibilité élevée de 76% et de 45% pour le fluconazole. Donc les fréquences de résistance les plus élevées appartiennent au fluconazole ce qui est en discordance avec cette étude qui montre une amélioration de la sensibilité de cet antifongique.

**Etude ARTEMIS :** Le programme de surveillance ARTEMIS est connu comme étant un système mondial de surveillance des antifongiques le plus complet et le plus ancien. Dans l'une de ses études récente publiée en 2005, les auteurs ont utilisé les résultats de ce programme pour évaluer les tendances globales de la sensibilité des levures au fluconazole et au voriconazole pendant une période de 6,5 ans dans 39 pays entre juin 1997 et décembre 2003. Au total, 134 715 isolats de *Candida sp.* ont été recueillis dans 127 centres médicaux répartis en Asie, Amérique latine, Europe, Moyen orient et en Amérique du nord. La sensibilité des souches a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé M-44 selon la technique préconisée par le CLSI.

Les valeurs seuils d'interprétation sont de :

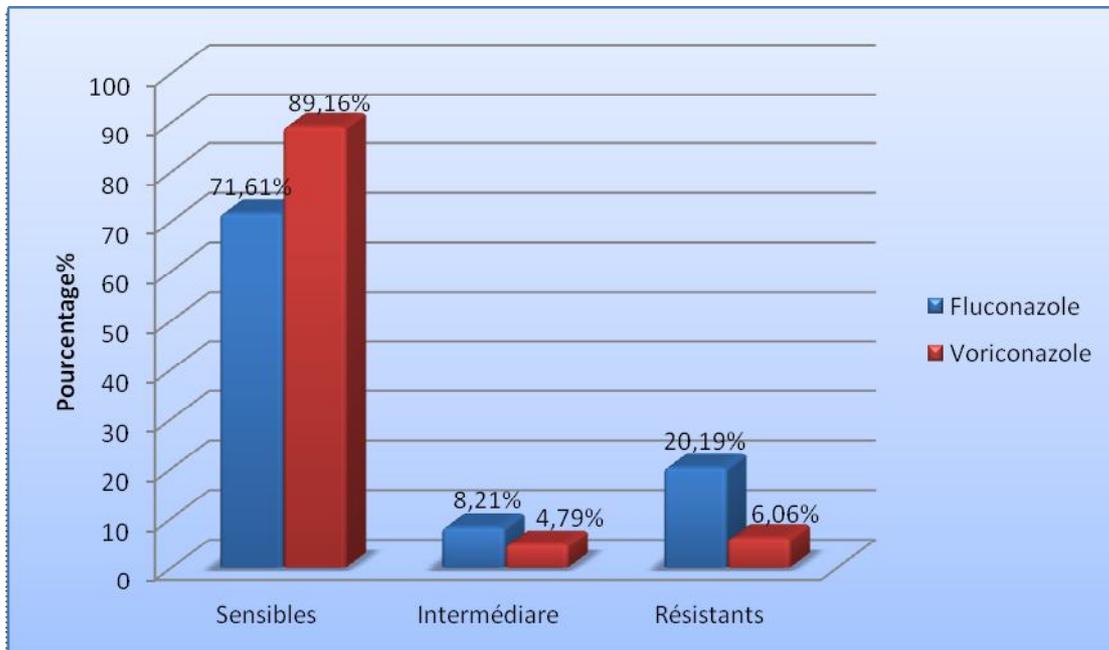
- Sensible (S) pour un diamètre zone d'inhibition  $\geq 19$ mm pour le fluconazole et 17mm pour le voriconazole.
- Résistante (R) pour un diamètre d'inhibition  $\leq 14$ mm pour le fluconazole et 13 mm pour le voriconazole.

**Activité du voriconazole et du fluconazole:** A l'issue des résultats de cette étude, le voriconazole, a montré qu'il est significativement plus actif que le fluconazole contre pratiquement toutes les espèces, hormis *C.tropicalis* avec 89,1% de sensibilité pour le fluconazole contre 87,1% pour le voriconazole. Globalement, 89,16% des souches sensibles ont été sensibles au voriconazole contre uniquement 71,61% pour le fluconazole. Le taux de résistance était significativement inférieur chez le voriconazole avec 6,06% de souches résistantes contre 20,19% pour le fluconazole.

Parmi les espèces présentant une sensibilité diminuée au fluconazole, plus de 80% étaient sensibles au voriconazole. De plus, parmi les souches de *C.glabrata* résistantes aux fluconazole, 30% ont été sensibles au voriconazole. Cependant, toutes les souches résistantes au voriconazole l'étaient aussi au fluconazole. Bien que le voriconazole fût plus actif que le fluconazole contre *C.rugosa*, *C.lipolytica*, *C.zeylanoides*, ces espèces se sont révélées nettement moins sensibles et plus résistantes au voriconazole que toutes les autres espèces *Candida*. Ces données confirment et complètent les observations antérieures, spécialement concernant les espèces de *Candida* moins courantes. Bien que les résultats de l'étude soulignent l'existence de résistances croisée entre le fluconazole et le voriconazole, ceci est variable selon l'espèce et ne doit pas être supposé en l'absence d'identification et de résultats de l'antifongigramme <sup>[125]</sup>.

**Tableau 28 :** Sensibilité *in vitro* au fluconazole et au voriconazole des levures du genre *Candida*

Espèces	Sensibilité					
	Fluconazole			Voriconazole		
	N	S%	R%	N	S%	R%
<i>C.albicans</i>	49 991	97,8	1,3	47 584	98,6	1,0
<i>C.glabrata</i>	9 040	66,7	16,6	8 719	81,7	10,1
<i>C.tropicalis</i>	5 959	89,1	5,0	5 643	87,1	6,7
<i>C.parapsilosis</i>	5 539	93,2	3,6	5 233	96,8	1,8
<i>C.krusei</i>	2 067	9,4	77,2	1 996	83,2	7,5
<i>C.guilliermondii</i>	662	73,3	9,8	633	91,2	4,9
<i>C.lusitaniae</i>	464	93,3	4,1	445	96,4	2,0
<i>C.rugosa</i>	417	39,3	51,8	394	61,4	26,4
<i>C.kefyr</i>	344	95,3	3,5	331	99,1	0,6
<i>C.famata</i>	253	79,8	11,9	238	89,5	5,5
<i>C.inconspicua</i>	187	25,7	49,2	186	89,2	5,4
<i>C.norvegensis</i>	92	50,0	38,0	91	92,3	1,1
<i>C.dublinsiensis</i>	63	96,8	3,2	63	100	0,0
<i>C.lipolytica</i>	53	54,7	39,6	52	67,3	19,2
<i>C.pelliculosa</i>	38	94,7	0,0	38	100	0,0
<i>Candida spp</i>	4 245	86,6	8,2	4 094	92,7	4,7



**Figure 31 :** Comparaison entre l'activité du voriconazole et du fluconazole des espèces de *Candida* isolées.

**Sensibilité au fluconazole :** Concernant la sensibilité de *Candida sp.* Au fluconazole, l'étude a montré que celui-ci a été plus actif sur *C.albicans* (97,8%), *C.parapsilosis* (93,2%), *C.lusitaniae* (93,3%), *C.dublinsiensis* (96,8%), *C.pelliculosa* (94,7%). Une sensibilité diminuée a été, par contre, observée pour *C.glabrata* (66,7%), *C.krusei* (9,4%), *C.guilliermondii* (9,8%), *C.rugosa* (39,3%), *C.famata* (79,8%), *C.inconspicua* (25,7%), *C.norvegensis* (50,0%), *C.lipolytica* (54,7%), *C.zeylanoides* (54,1%). Ces résultats confirment les données précédemment publiées concernant les espèces les plus courantes (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, et *C.krusei*) et accroissent fortement les connaissances sur la présence ou l'absence d'activité du fluconazole sur les espèces moins fréquemment isolées (*C.rugosa*, *C.inconspicua*, *C.norvegensis*).

**Sensibilité au voriconazole :** Concernant la sensibilité de *Candida sp.* Au voriconazole, l'étude a montré que celui-ci a été plus actif sur *C.albicans* (98,6%), *C.parapsilosis* (96,8%), *C.tropicalis* (87,1%), *C.glabrata* (81,7%), *C.krusei* (83,2%), *C.guilliermondii* (91,2%), *C.lusitaniae* (96,4%), *C.kefyr* (99,1%), *C.norvegensis* (92,3%), *C.dublinsiensis* (100%), *C.pelliculosa* (100%), et *C.sake* (100%). Une sensibilité diminuée a été, par contre, observée pour *C.rugosa* (61,4%) et *C.lipolytica* (67,3%).

❖ **Evolution de la résistance :**

**Au fluconazole :** L'évolution de la résistance des *Candida sp.* Au fluconazole sur la période a montré qu'aucune augmentation ou diminution notable par rapport au temps des degrés de résistance au fluconazole de *C.albicans* et de *C.glabrata* n'a été observée. Alors que le degré de résistance des isolats de *C.tropicalis* avait diminué entre 1997-1998, des augmentations ont été constatées en 2002 et en 2003. Un léger accroissement des résistances a été observé au cours du temps pour *C.parapsilosis* et *C.kefyr*, alors qu'une forte augmentation de résistance a été constatée pour les souches de *C.rugosa*. Bien que *C.famata* soit apparu relativement résistante au fluconazole en 1997 et 1998, cela doit être imputé au faible nombre de souches étudiées. Au cours des cinq années suivantes, le nombre d'isolats de *C.famata* ayant progressivement augmenté jusqu'à dépasser 50 par an, le niveau de résistance s'est stabilisé entre 10 et 12%. Malgré l'augmentation du pourcentage globale d'isolats de *C.krusei* résistantes au fluconazole, cette observation n'est pas significative car cette espèce doit être considérée clinique-

ment résistante à cet antifongique. Le CLSI recommande de ne pas tester la sensibilité de cette espèce au fluconazole.

**Au voriconazole :** Concernant l'évolution de la résistance au voriconazole des souches de *Candida sp.* depuis 2001 (date du commencement de son utilisation en clinique) à 2003. On a remarqué globalement une légère augmentation du pourcentage d'isolats de *Candida* résistants. Le taux est passé de 2,6% en 2001 à 3,5% en 2003. Cette élévation est due à l'accroissement de la résistance à cet antifongique de *C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.rugosa*, *C.lipolytica*, et des autres espèces de *Candida* non identifiées. En revanche, aucune variation de la résistance n'a été observée chez *C.albicans*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*. Par conséquent, le profil du voriconazole apparaît tout à fait favorable, tant au niveau du spectre que de l'activité thérapeutique contre *Candida*. Néanmoins, l'émergence de résistances requiert une surveillance étroite. Cette étude confirme les résultats retrouvés dans notre étude : que le fluconazole présente une résistance plus élevée que le voriconazole.

#### **Autres études :**

Dans une autre étude dans CHU Timone Marseille, les auteurs ont analysé la tendance sur 20 mois (de février 1997 à septembre 1998) de la sensibilité de *C.albicans* aux antifongiques. Au total, 23 095 prélèvements provenant de 2 464 malades hospitalisés dans des services à haut risque sont parvenus au laboratoire de mycologie. L'analyse des données montre que 8 076 souches ont été isolées. 64,3% étaient représentées par *C.albicans*, 14,5% par *C.glabrata*. Le profil de sensibilité aux antifongiques pour *C.albicans* montre une diminution significative de la résistance au fluconazole, qui passe de 8,6% au début de l'étude à 0,7% à sa fin. Les résultats sont similaires pour l'itraconazole avec une résistance variant de 7,1% au début à 0,7% à la fin. Le pourcentage moyen des résistances est plus élevé dans les souches provenant de malades VIH+. Pour la flucytosine, aucune variation n'est observée (4,7%-2,6%). Toutes les souches se sont avérées sensibles à l'amphotéricine B et au kétoconazole.

Une autre étude, réalisée sur une période d'un mois en octobre 2004, a été proposée à 209 biologistes répartis dans 193 hôpitaux en France. Cette étude était effectuée dans le cadre de l'enquête annuelle de surveillance des résistances des hôpitaux français non universitaires affiliés au collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH). Chaque centre devait recen-

ser de façon prospective les épisodes de septicémies, incluant les candidémies. Les tests de sensibilité aux antifongiques ont été réalisés par les biologistes selon leur méthodologie habituelle et ont été réévalués par technique E-test® (AB Biodisk) sur milieu RPMI (AB Biodisk®). La répartition des espèces au cours de ces 46 épisodes de candidémies est la suivante : 23 *C.albicans* (50 %), 13 *C.glabrata* (28,3 %), cinq *C.tropicalis* (10,9 %), trois *C.parapsilosis* (6,5 %), un *C.krusei* (2,2 %) et un *C.kefyr* (2,2 %).

Toutes espèces confondues, 97,7% des souches ont une sensibilité habituelle vis-à-vis de l'amphotéricine B, 93,2% vis-à-vis de la 5-fluorocytosine, 88,6% vis-à-vis du fluconazole, 70,5% vis-à-vis de l'itraconazole, et 100% des souches ont des CMI très basses vis-à-vis de la caspofungine. Dans cette étude, une sensibilité de 95,5% vis-à-vis du voriconazole a été renseignée.

Toujours en France, une autre étude prospective observationnelle a été conduite de janvier à décembre 2004 dans sept centres hospitaliers universitaires et dix centres hospitaliers non universitaires, membres du Groupe d'Epidémiologie et de Recherche en Infectiologie Clinique du Centre-Ouest (GERICCO). Tous les patients présentant une candidémie ont été inclus. L'étude de la sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* était réalisée soit par les méthodes de référence du Clinical and Laboratory Standards Institute, anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI) ou de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), soit par bandelette E-test. Un antifongogramme a été réalisé pour 142 des 193 souches (79 souches de *C.albicans*, 27 souches de *C.glabrata*, 18 souches de *C.parapsilosis*)<sup>[102,133]</sup>.

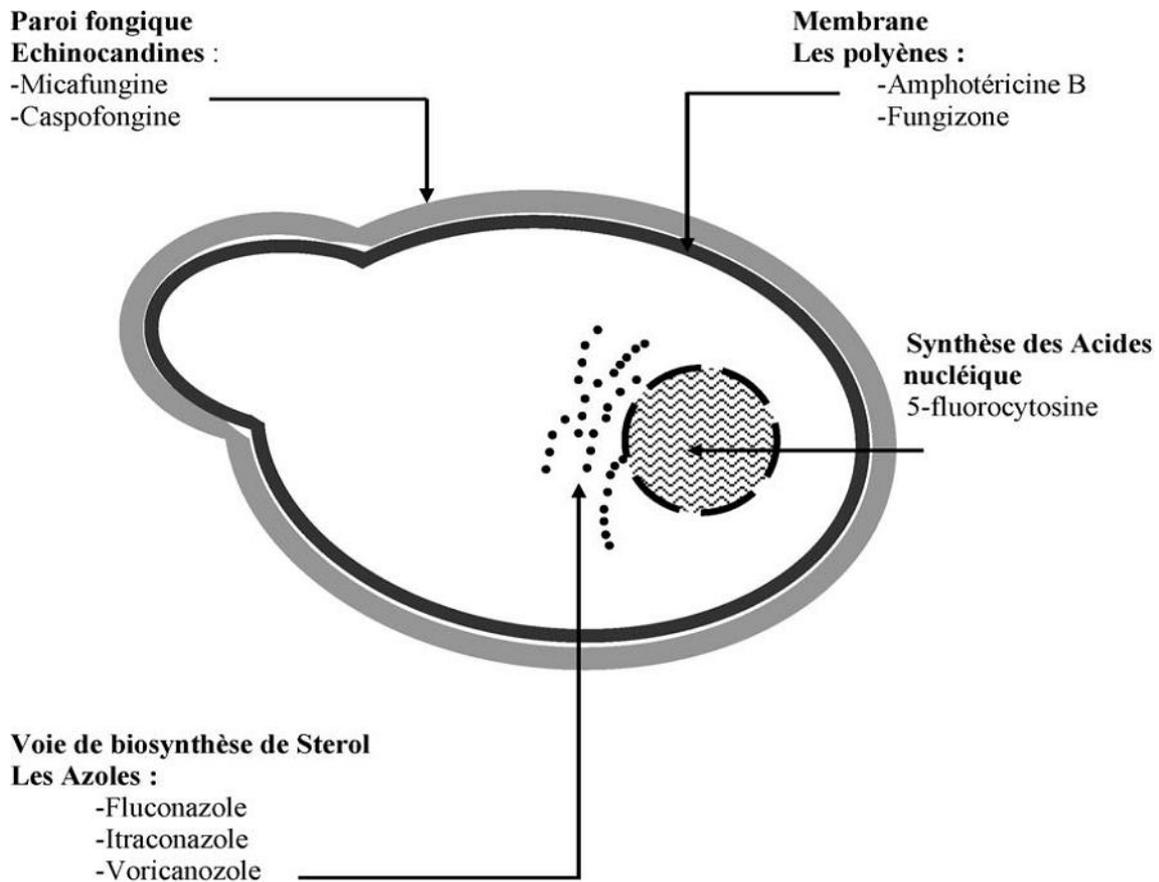
La répartition des différentes espèces isolées est : *C. albicans* (54,9%), *C.glabrata* (18,7%), *C.parapsilosis* (12,9%), *C.tropicalis* (4,7%), *C.krusei* (4,1%), *C.lusitaniae* (1,6%), *C.kefyr* (1%) et *C.guilliermondii* (0,5%).

La sensibilité des principales espèces de *Candida* au fluconazole était comme suit: 84,5% de sensibles, 7,8% dose-dépendantes, et 7,8% résistantes. Parmi les huit souches de *C.glabrata* avec une sensibilité dose-dépendante au fluconazole, sept étaient sensibles au voriconazole, et une résistante. Les trois souches résistantes au fluconazole étaient également résistantes au voriconazole.

Le voriconazole restait le plus souvent actif sur les souches de *C.glabrata* de sensibilité dose-dépendante au fluconazole, avec sept souches sur huit qui étaient sensibles. Toutefois, il existait un certain degré de résistance croisée entre ces deux molécules, les trois souches résistantes au fluconazole étant aussi résistantes au voriconazole. Cette résistance croisée entre les différents azolés vis-à-vis de *C.glabrata* a fréquemment été rapportée, et de nombreux auteurs recommandent la plus grande prudence avant d'envisager de traiter une infection invasive à *C.glabrata* par un antifongique de cette famille, notamment lorsqu'il existe une pré-exposition au fluconazole.

#### IV.4 Mécanisme de résistances :

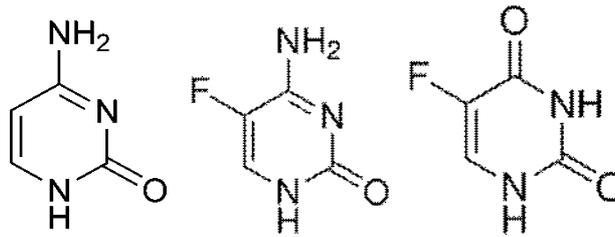
##### 4.1. Les antifongiques :



**Figure 32:** Mode d'action des composés antifongiques et leurs principales cibles.

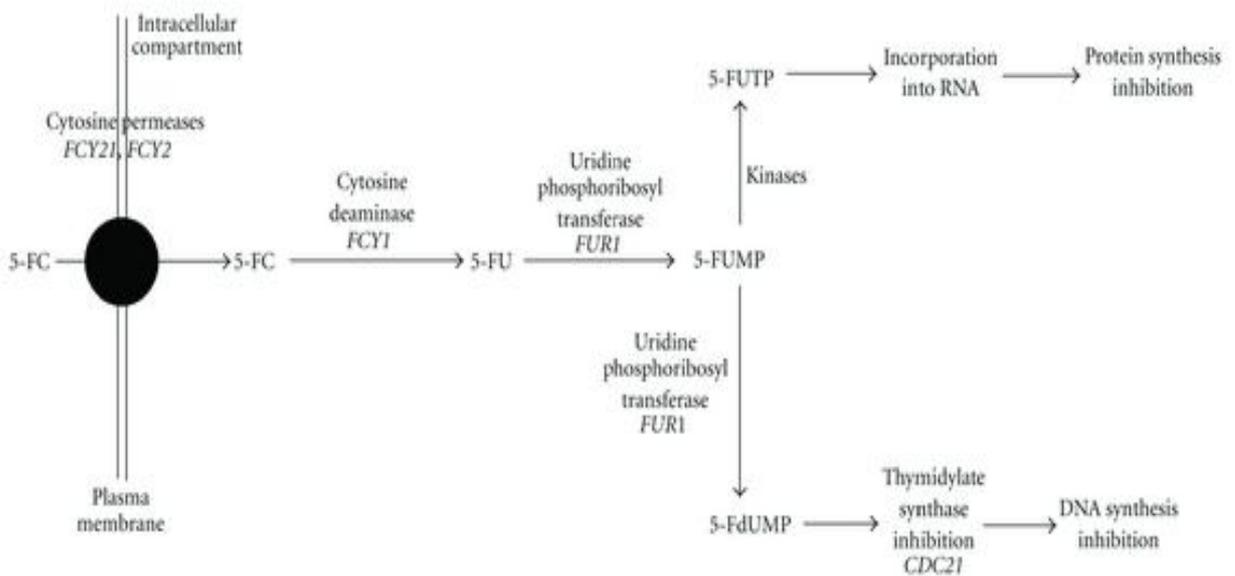
#### 4.1.1 Les fluoropyrimidines :

**Structure :** Les fluoropyrimidines, dont les seuls représentants actuellement utilisés chez l'homme sont la 5-fluorocytosine (5-FC) et le 5-fluorouracile (5-FU), sont des molécules de synthèse, analogues structuraux d'un nucléotide entrant dans la composition des acides nucléiques, la Cytosine<sup>[80,82]</sup>.



**Figure 33:** Structure chimique de la cytosine (A) et de deux analogues fluores des pyrimidines, la 5-fluorocytosine (B) et le 5-fluorouracile (C).

**Mode d'action :** La 5-FC n'a pas d'activité antifongique, c'est sa conversion en 5-FU par les cellules fongiques qui lui confère son pouvoir fongistatique. En effet, la 5-FC pénètre rapidement à l'intérieur des cellules fongiques par des transporteurs plus ou moins spécifiques, tels que la cytosine perméase ou des transporteurs des pyrimidines, puis elle est métabolisée en 5-FU par la cytosine désaminase. Le 5-FU est ensuite converti en 5-fluorouracile monophosphate par l'uridine phosphoribosyl-transférase ou UPRT. A partir de cette étape, deux voies distinctes permettent d'aboutir au blocage de la multiplication cellulaire. Le 5-fluorouracile monophosphate peut être converti en 5-fluorouracile triphosphate qui s'incorpore dans les ARN à la place de l'uracile triphosphate et bloque ainsi la synthèse protéique. Le 5-fluorouracile monophosphate peut également être converti par l'UPRT en 5-fluorodesoxyuridine monophosphate, composé qui va inhiber la thymidylate synthétase, une enzyme clé de la biosynthèse de l'ADN, et bloque ainsi la multiplication cellulaire.



**Figure 34:** Métabolisation intracellulaire et mode d'action de la 5-fluorocytosine chez *S.cerevisiae*.

En gras sont indiqués les noms des gènes codant pour chaque enzyme. 5-FC: 5-fluorocytosine; 5-FU: 5-fluorouracile; 5-FUMP: 5-fluorouridine monophosphate; 5-FUTP: 5-fluorouridine triphosphate; 5-FdUMP: 5-fluoro desoxyribouridine monophosphate.

**Mécanismes de résistances :** La résistance à la 5-FC est un phénomène relativement fréquent. Cette résistance peut être intrinsèque, c'est-à-dire une caractéristique d'espèce comme chez *Candida tropicalis*, ou acquise, par sélection de mutants résistants après exposition à l'antifongique. Chez le genre *Candida*, on estime à 7-8% la proportion d'isolats résistants, et ce taux passe à 22% si on ne considère que les *Candida non-albicans*. Chez *Cryptococcus neoformans*, 1 à 2% des isolats cliniques sont résistants à la 5-FC [9, 11, 103, 107].

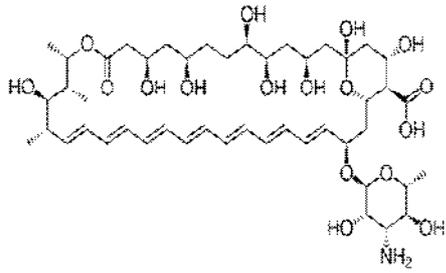
En raison de la complexité du mode d'action de la 5-FC, de nombreux évènements peuvent expliquer la résistance à cet antifongique. Ces mécanismes de résistance peuvent être regroupés en deux catégories.

- la résistance peut survenir par mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-FC. Ainsi, le mécanisme le plus fréquent à l'origine de la résistance acquise à la 5-FC est une mutation sur le gène *FURI*, codant l'UPRT.

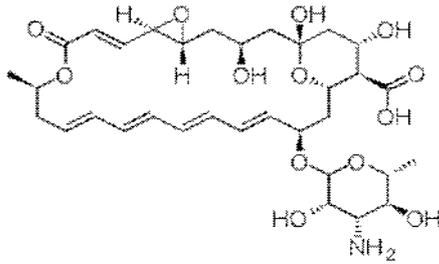
- la résistance à la 5-FC peut également résulter d'une induction du métabolisme des pyrimidines, qui entrent alors en compétition avec l'antifongique. Ce mécanisme de résistance se traduit notamment par une surexpression du gène *CDC21*, codant la thymidylate synthétase.

#### 4.1.2 Les polyènes :

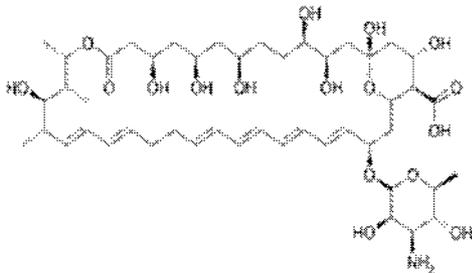
**Structure :** Les polyènes sont des macrolides, molécules organiques cycliques amphotères. La plupart sont constitués d'un cycle macrolactone de 20 à 40 atomes de carbone sur lequel est branché un groupement d-mycosamine. Leur caractère amphotère est lié au regroupement de plusieurs doubles liaisons conjuguées (d'où leur nom de "poly-ène") sur une face du cycle macrolactone, qui est donc hydrophobe, et de groupements hydroxyles sur l'autre face, qui est hydrophile.



Amphotericine B



Natamycine



Nystatine

Figure 35 : Structure chimique des trois antifongiques polyéniques majeurs.

**Mode d'action :**

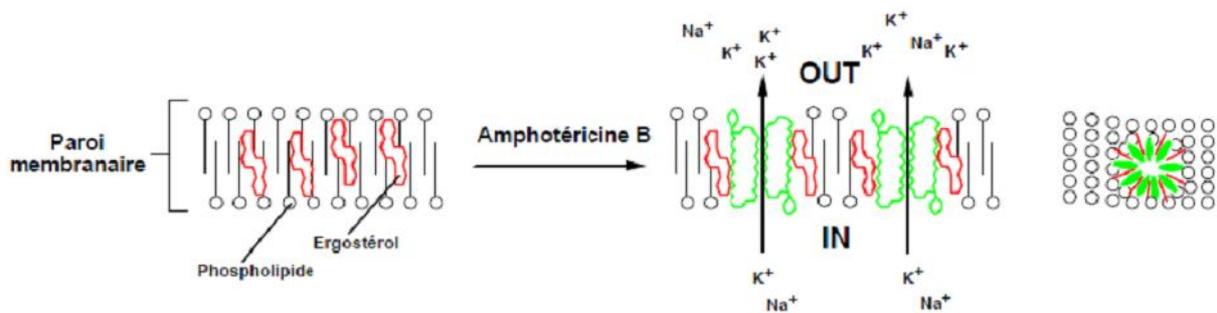


Figure 36 : Mode d'action des polyènes.

Les polyènes ont pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Leur caractère amphotère leur permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores. Les données de résonance magnétique nucléaire indiquent que 8 molécules d'AmB s'associent à 8 molécules d'ergostérol par leur partie polyénique tandis que les faces hydrophiles ménagent un canal central de 70 à 100 nm de diamètre (Figure 36). La formation des pores provoque la déstabilisation de la membrane plasmique tandis que le canal permet la fuite de composants intracellulaires, et notamment d'ions K<sup>+</sup>, à l'origine de la lyse cellulaire [60,89].

Si les données structurales concernant ces molécules indiquent que leur cible cellulaire est l'ergostérol, et bien que leur liaison à l'ergostérol ait été démontrée, une controverse existe quant à une éventuelle action au niveau intracellulaire. Des travaux ont en effet suggéré que les polyènes seraient capables d'induire un stress oxydatif, notamment chez *C. albicans* ; de plus, il semble que leur activité soit diminuée en conditions hypoxiques.

**Mécanisme de résistance :** Les polyènes n'ont pas besoin d'agir au niveau intracellulaire pour exercer leur activité lytique puisqu'ils s'intègrent à la membrane plasmique par sa face externe. Ils échappent ainsi à une éventuelle métabolisation par les enzymes intracellulaires ainsi qu'aux systèmes d'efflux, dont l'hyperactivité est à l'origine de la majorité des résistances aux antifongiques azolés. Ainsi, la seule possibilité pour la cellule fongique de résister à l'action des polyènes est de modifier leur cible, l'ergostérol. Ce dernier étant nécessaire à l'intégrité de la membrane et donc à la survie cellulaire, les alternatives permettant de le substituer sont en nombre limité.

D'autres travaux ont cependant suggéré un autre mécanisme possible expliquant la résistance aux polyènes. Yoon et ses collaborateurs ont montré chez *Candida lusitanae* que la résistance aux polyènes pouvait être la conséquence d'une diminution de l'accessibilité de la membrane, par modification de la structure de la paroi fongique. Bien que rarement décrits, les mécanismes de résistance acquise ou induite aux polyènes ont été étudiés chez plusieurs espèces fongiques. Comme nous l'avons vu, il s'agit, à quelques exceptions près, d'une diminution du contenu en ergostérol des membranes plasmiques, voire une absence totale d'ergostérol dans

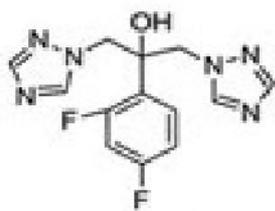
les membranes, par mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol. Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux polyènes ont été principalement décrits chez des mutants induits de levures du genre *Candida* et chez *S. cerevisiae*. Ainsi, la délétion du gène *ERG11* chez *C. albicans* ou du gène *ERG3* chez *S. cerevisiae* conduisent à l'obtention de colonies présentant une résistance croisée aux antifongiques azolés et polyéniques. De même, l'inactivation du gène *ERG6* conduit à une résistance à l'AmB chez *C. lusitaniae* et chez *S. cerevisiae*. Toutefois, peu de données concernant les mécanismes de résistance aux antifongiques polyéniques sont disponibles pour des isolats cliniques de champignons pathogènes et les études ont essentiellement porté sur l'espèce *C. albicans*. Ainsi, des travaux ont montré qu'un déficit en D5,6-désaturase, codée par le gène *ERG3*, pouvait être à l'origine de la résistance aux polyènes chez des isolats cliniques de *C. albicans* prélevés chez des patients atteints de leucémie ou du SIDA.

#### 4.1.3 Les azolés :

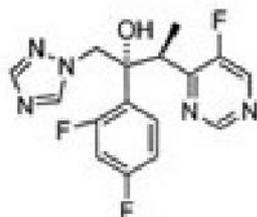
**Structure :** Les dérivés azoles sont de loin les antifongiques les plus utilisés en clinique et pour cette raison, ce sont aussi les antifongiques les plus étudiés par la communauté scientifique, aussi bien au niveau de leurs propriétés pharmacologiques et de leur mode d'action, que des stratégies de défense adoptées par les micro-organismes. Les antifongiques azolés ont été également très étudiés par les industries pharmaceutiques qui n'ont cessé d'améliorer leur efficacité, à la recherche de l'antifongique parfait.

Les dérivés azolés sont des molécules cycliques organiques, qui peuvent être divisées en deux groupes, les imidazoles, contenant deux atomes d'azote dans le cycle azolé, et les triazolés, contenant trois atomes d'azote (Figure 37).

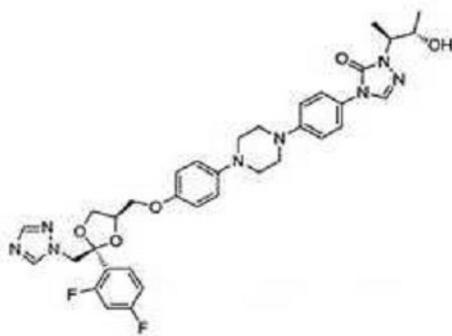




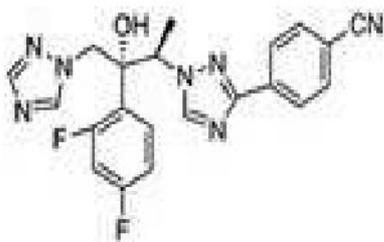
Fluconazole (F)



Voriconazole (G),



Posaconazole (H)

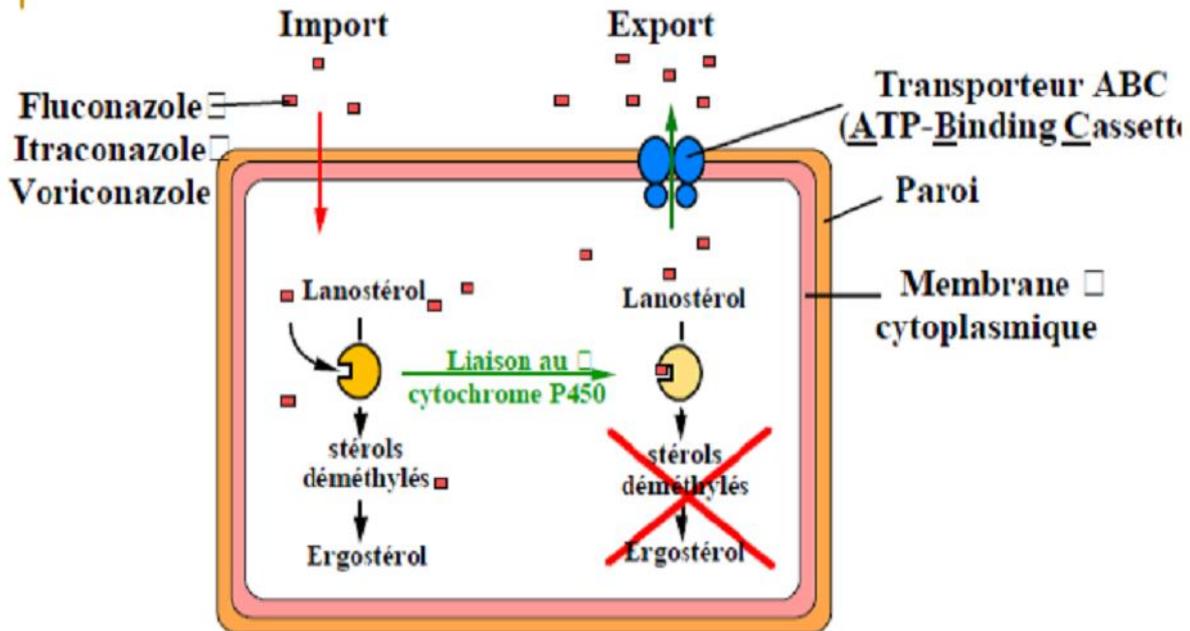


Ravuconazole (I).

**Figure 37 :** Structure chimique des principaux antifongiques azolés.

Sont représentés quatre imidazoles : le clotrimazole (A), l'econazole (B), le miconazole (C) et le ketoconazole (D); deux triazolés : l'itraconazole (E) et le fluconazole (F); ainsi que les trois triazolés dits de seconde génération : le voriconazole (G), le posaconazole (H) et le ravuconazole (I).

**Mode d'action :**



**Figure 38 :** mode d'action des azolés

Les antifongiques azolés ont pour cible la voie de biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane fongique. Ils inhibent spécifiquement la lanosterol 14 $\alpha$  déméthylase à cytochrome P450, codée par le gène *ERG11*. Cette inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle imidazole ou triazolé à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme et a pour conséquence l'accumulation de dérivés 14 $\alpha$ -méthyles, dont la métabolisation par les enzymes situées en aval d'*ERG11p* dans la voie de biosynthèse produit des dérivés toxiques, incapables de remplacer l'ergostérol.

La spécificité de chaque azolé est dépendante de la nature du substituant sur le carbone en position b sur la chaîne latérale greffée sur l'atome d'azote en 1 du noyau imidazole ou triazolé. De même, les effets secondaires observés avec les antifongiques azolés sont le plus souvent la conséquence de l'affinité des azolés pour les cytochromes P450, présents également chez l'homme.

**Mécanismes de résistance :** Bien que depuis quelques années la fréquence de la résistance aux antifongiques azolés n'augmente plus en raison de l'amélioration des thérapies antifongiques, le début des années 1990 s'est accompagné d'une augmentation considérable du nombre d'isolats cliniques résistants. De même, si le profil des espèces rencontrées s'est modifié depuis ces vingt dernières années, c'est en partie en raison de l'utilisation croissante des antifongiques azolés et de la sélection des espèces qui leurs sont le moins sensibles, ou ayant la plus forte propension à développer une résistance à cette classe d'antifongiques.

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux antifongiques azolés ont été largement étudiés, principalement chez les levures du genre *Candida* et *S. cerevisiae*, et peuvent être repartis en quatre catégories.

- une diminution de l'affinité des azolés pour leur cible peut être à l'origine de la résistance. Ainsi, une mutation ponctuelle du gène *ERG11*, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme. De nombreuses mutations, dont le rôle dans la résistance a été démontré expérimentalement, ont été identifiées, notamment chez *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans* et *C. tropicalis*.

- la résistance aux antifongiques azolés peut également résulter d'une multiplication du Nombre de copies de la 14  $\alpha$ -déméthylase. Dans cette situation, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanosterol en stérol 14 $\alpha$ -déméthyle. Ainsi, la surexpression du gène *ERG11*, par duplication chromosomique ou modification du promoteur, comme l'augmentation de la demi-vie des ARNm, peut aboutir à la résistance.

- un mécanisme moins fréquemment observé chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolés est le blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol après l'intervention de l'enzyme codée par *ERG11*. L'effet fongistatique des azolés reposant sur la conversion en stérols toxiques des intermédiaires 14  $\alpha$ -méthyles synthétisés suite au blocage de la lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase, la mutation d'un gène responsable de la synthèse de ces intermédiaires

toxiques aura pour conséquence une résistance aux azolés. C'est notamment le cas pour *C. albicans*, chez qui la mutation du gène *ERG3* aboutit à une résistance aux azolés.

- enfin, la résistance peut être la conséquence d'une diminution de la concentration intracellulaire en antifongique, par surexpression des protéines d'efflux. Les protéines d'efflux sont des transporteurs membranaires très ubiquitaires qui ont pour rôle de rejeter en dehors des cellules une grande variété de substances.

Les azolés peuvent être les substrats de deux types de protéines d'efflux, les protéines de type ABC pour "ATP-binding cassette", utilisant l'ATP comme source d'énergie pour le transfert, et les MFS pour "major facilitator superfamily", qui utilisent comme source d'énergie un gradient de protons. Il semble que les ABC protéines soient capables de prendre en charge tous les azolés alors que les MFS seraient plus spécifiques du fluconazole.

La résistance aux antifongiques azolés par surexpression des protéines d'efflux est le mécanisme le plus fréquemment retrouvé chez les isolats cliniques des espèces appartenant au genre *Candida*. Chez *C. glabrata* et *C. albicans*, ce mécanisme est aussi à l'origine de la résistance aux azolés des mutants *petite*, pour qui une surexpression des gènes *CDR1* et *CDR2*, codant des ABC protéines, a été identifiée.

Si la surexpression des protéines d'efflux est maintenant aisément caractérisée chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolés, l'enjeu de la recherche dans ce domaine depuis le début des années 2000 est de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la dérégulation de l'expression de ces gènes. Il semble que la surexpression des gènes codant les protéines d'efflux soit plus dépendante du contrôle de ces gènes par un facteur de transcription que par une modification de leur promoteur ou de l'augmentation de la demi-vie des ARNm.

En effet, les gènes codant les protéines d'efflux de type ABC contiennent dans leur promoteur une séquence, nommée PDRE pour "pleiotropic drug responsive element", reconnue par un facteur de transcription appelé *PDR1* chez *S. cerevisiae* et *C. glabrata* ou *TAC1* chez *C. albicans*. Le rôle de ce facteur de transcription dans la surexpression des protéines d'efflux de type ABC, et par conséquent dans la résistance aux azolés, a été mis en évidence. Ainsi, la disruption de ce gène chez des isolats résistants aux azolés de *C. glabrata* aboutit à la restau-

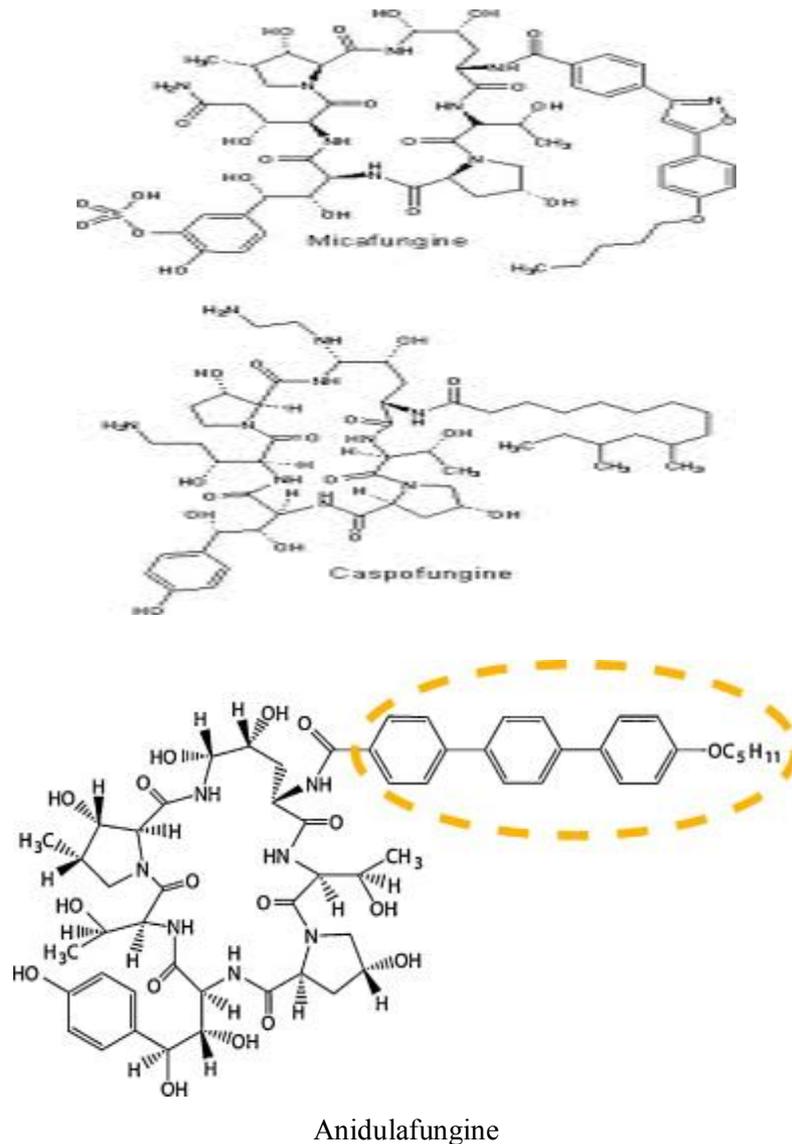
ration d'une sensibilité normale. De même, des travaux ont montré qu'une activation constitutive de ce facteur de transcription, obtenue par mutation ponctuelle du gène correspondant, était suffisante pour induire la résistance aux antifongiques azolés. Cependant, si des travaux récents suggèrent que les azolés sont capables de se lier directement au facteur de transcription et de l'activer, les mécanismes à l'origine de son activation chez les isolats cliniques résistants restent à élucider. Un début de réponse a été fourni pour *C. albicans*. En effet, des travaux récents ont montré que chez des isolats cliniques de *C. albicans* résistants aux azolés, des mutations portées à l'état homozygote sur le gène *TAC1* peuvent aboutir à une activation constitutive de l'expression de ce facteur de transcription. Une dizaine de ces mutations conférant une activation constitutive ont été identifiées. De même, comme précédemment décrit pour le gène *ERG11*, la duplication du chromosome 5, porteur du gène *TAC1*, peut aboutir à une surexpression des protéines d'efflux et donc à la résistance aux azolés par augmentation du nombre de copies du gène.

Par ailleurs, si un mécanisme moléculaire base sur un évènement mutationnel peut expliquer la résistance aux azolés, cette résistance peut également résulter d'un mécanisme épigénétique, par exemple la capacité à former des biofilms qui limitent le passage de l'antifongique à l'intérieur de la cellule. Un autre exemple de mécanisme non-moléculaire participant à la résistance aux azolés est la capacité à contourner l'absence d'ergostérol suite au blocage de sa voie de biosynthèse par l'antifongique. Ce mécanisme est observé chez *C. glabrata* qui, contrairement aux autres levures du genre *Candida* et notamment à *C. albicans*, mais comme *S. cerevisiae*, est capable d'assimiler et d'utiliser une source de stérol exogène en présence d'azolés, telle que le cholestérol présent chez l'homme. Cette observation pourrait d'ailleurs en partie expliquer la moindre sensibilité de cette espèce aux antifongiques azolés.

#### 4.1.4 Les Echinocandines :

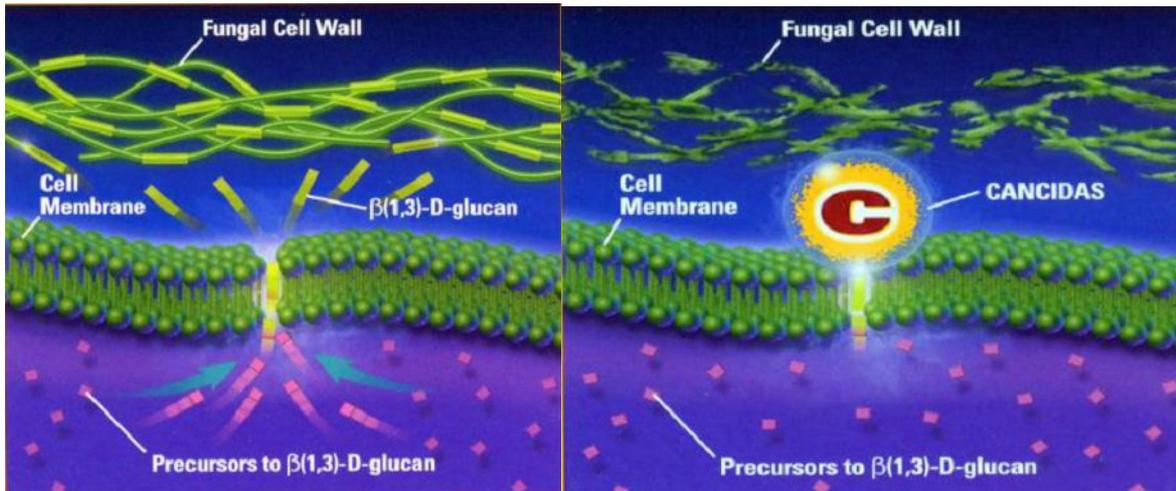
**Structure :** Depuis ces 15 dernières années, les echinocandines représentent la seule nouvelle classe d'antifongiques mise à disposition des praticiens pour lutter contre les infections fongiques invasives. A l'heure actuelle, trois echinocandines ont vu leur utilisation clinique approuvée aux Etats-Unis par la FDA et par la suite en Europe par l'Agence Européenne pour

l'Evaluation des Médicaments (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products - EMEA): la caspofungine en 2001 par la FDA et en 2002 par l'EMEA, la micafungine en 2005 et enfin l'anidulafungine en 2006. Les echinocandines sont des dérivés synthétiques de lipopeptides (Figure 39). Ces lipopeptides sont secrétés à l'état naturel par plusieurs espèces de champignons, telles qu'*Aspergillus rugulovalvus* qui synthétise la caspofungine B, *Zalerion arboricola* la pneumocandine B, ou *Papularia sphaerosperma* la papulacandine.



**Figure 39** : Structure chimique des trois echinocandines actuellement utilisées en clinique, la micafungine (A), la caspofungine (B) et l'anidulafungine (C).

**Mode d'action :**



**Figure 40 :** mode d'action des echinocandines

L'originalité des echinocandines réside dans leur cible chez le pathogène. Depuis plusieurs années, la paroi fongique était considérée comme une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules à activité antifongique. En effet, la paroi fongique est constituée de composants qui n'ont pas d'équivalents chez l'homme et son intégrité est indispensable à la survie du microorganisme puisque la paroi joue un rôle de protection physique vis-à-vis des cellules immunitaires ou des autres micro-organismes. La paroi est également responsable du maintien de l'osmolarité, de la forme et de la taille de la cellule fongique, mais elle est aussi le siège de nombreuses réactions enzymatiques et a un rôle important dans la communication intercellulaire. Cette paroi est composée d'une couche interne, constituée par un enchevêtrement de polysaccharides, les  $\beta(1,3)$ -glucanes et la chitine, dans lequel sont insérées des mannoprotéines, et d'une couche externe de mannoprotéines.

Les echinocandines sont des inhibiteurs non compétitifs de la  $\beta(1,3)$ -glucane synthétase, une enzyme qui catalyse la polymérisation de l'uridine diphosphate-glucose en  $\beta(1,3)$  glucane, un des composants structuraux responsables du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique. La  $\beta(1,3)$ -glucane synthétase est composée d'une sous-unité activatrice et d'une sous-unité catalytique, codée par les gènes *FKS*. Chez la plupart des champignons, deux gènes

*FKS* sont présents, *FKS1* serait exprimé lors de la phase végétative de croissance tandis que *FKS2* serait exprimé lors de la sporulation, les échinocandines pouvant inhiber indifféremment les deux formes de l'enzyme. Le blocage de la b (1-3)-glucane synthétase entraîne une fragilisation de la paroi qui se traduit par une fuite des composants intracellulaires, aboutissant à la lyse de la cellule fongique.

**Mécanismes de résistance :** La résistance aux échinocandines est un événement relativement rare. On estime à plus de 99% le taux d'isolats sensibles à ces antifongiques chez les espèces du genre *Candida*. Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une résistance aux échinocandines et déterminent le mécanisme moléculaire à l'origine de cette résistance, en particulier chez *S. cerevisiae* et *C. albicans*. Dans tous les cas, il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes *FKS1* ou *FKS2*. L'analyse de l'ensemble des mutations ponctuelles détectées a permis de définir deux régions dont l'intégrité est indispensable à l'activité de l'enzyme, appelées "hot spots". Chez les autres espèces, des mutations dans les "hot spots" ont également été mises en évidence, c'est notamment le cas chez *C. glabrata*, *C. krusei* et *A. fumigatus*.

La résistance innée aux échinocandines chez *C. neoformans* n'est pas liée à une mutation des gènes *FKS1* et *FKS2*. En effet, la b (1-3)-glucane synthétase de *C. neoformans* est inhibée par les échinocandines, bien que cet organisme soit capable de croître en présence de fortes concentrations de l'antifongique. Le mécanisme de résistance aux échinocandines chez *C. neoformans* reste donc à élucider, mais il semble lié à la composition de la paroi en polysaccharides qui diffère de celle des autres champignons.

Certaines espèces de levures et de champignons filamenteux sont capables de croître en présence de fortes concentrations en échinocandines, bien supérieures à la CMI. Ce phénomène, appelé effet paradoxal, serait dû à une adaptation physiologique du micro-organisme, médiée par la voie de signalisation responsable du maintien de l'intégrité de la paroi, en réponse au blocage de la synthèse des b (1-3)-glucanes et à la modification de la structure de la paroi qui en résulte. Des travaux suggèrent que cet effet paradoxal serait plus ou moins important en fonction de la nature de l'agent pathogène, mais également de l'échinocandine utilisée. Ainsi,

l'effet paradoxal serait plus prononcé en présence de caspofungine qu'en présence de micafungine ou d'anidulafungine, et il n'est pas observé chez *C. glabrata*. Cependant, la signification clinique de cet effet paradoxal n'a pas encore été étudiée et cet effet n'a d'ailleurs jamais été observé chez les patients traités par les échinocandines.

## 4.2 Biosynthèse et fonctions de l'ergostérol :

### A. Voie de biosynthèse :

**Description :** L'ergostérol est spécifique aux membranes cellulaires des champignons, son équivalent chez les mammifères étant le cholestérol. Pour cette raison, sa voie de biosynthèse comporte des étapes spécifiques au règne des Fungi, qui sont donc des cibles de choix pour la conception de molécules antifongiques.

En effet, six enzymes de cette voie de biosynthèse sont des cibles spécifiques de certains antifongiques. L'HMG coA réductase est inhibée par les statines, et notamment la lovastatine, qui présentent des propriétés antifongiques, mais sont utilisées essentiellement pour le traitement de l'hypercholestérolémie chez l'homme. La squalène monooxygénase (aussi appelée squalène époxydase) est la cible des allylamines telles que la terbinafine, qui est utilisée pour traiter les infections à dermatophytes. La C14 stérol réductase et la C8 stérol isomérase sont inhibées par le fenpropimorphe, un antifongique de la famille des morpholines principalement utilisées en agriculture. La 14a stérol déméthylase et la C22 stérol désaturase, les deux seules enzymes à cytochrome P450 de la voie, sont inhibées spécifiquement par les antifongiques azolés. Enfin, le produit final de la voie, l'ergostérol, est la cible des antifongiques polyéniques. La voie de biosynthèse de l'ergostérol est une voie métabolique complexe, étudiée principalement chez l'organisme de référence *S. cerevisiae* <sup>[11, 60,4]</sup>. Elle comporte plus de 20 enzymes. La principale singularité de cette voie, qui explique en partie sa complexité, réside dans le fait qu'elle n'est pas une voie métabolique figée, c'est-à-dire qu'une même enzyme peut prendre en charge des substrats différents et ainsi court-circuiter la voie. Ainsi, toutes les enzymes ne sont pas indispensables et l'inactivation (*in vivo* ou *in vitro*) de certains gènes reste viable pour le champignon. Cette singularité est d'ailleurs à l'origine de résistances aux antifongiques polyéniques et azolés, les deux classes moléculaires ayant pour cible l'ergostérol et sa voie de

biosynthèse. Ainsi, la délétion systématique des phases ouvertes de lecture du génome de *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence le caractère essentiel des gènes *ERG1*, *ERG7*, *ERG8*, *ERG9*, *ERG10*, *ERG11*, *ERG12*, *ERG19*, *ERG20*, *ERG24*, *ERG25*, *ERG26* et *ERG27*. La plupart de ces gènes essentiels codent des enzymes très précoces de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et, chez *S. cerevisiae*, les mutants pour ces gènes sont auxotrophes pour le mevalonate ou l'ergostérol, en fonction de la position du gène dans la voie. La délétion des gènes *ERG11* et *ERG24* est létale, mais elle peut être compensée par une mutation inactivant le gène *ERG3* pour *ERG11* ou par une culture en anaérobiose pour *ERG24*. De même, la délétion du gène *ERG25* est viable en présence d'azolés dans un contexte où les gènes codant des enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème (*HEM2* ou *HEM4*) sont inactifs.

En revanche, la délétion des gènes *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG5* ou *ERG6* est viable et se traduit par une absence d'ergostérol, une diminution des capacités de croissance, ou une modification de la sensibilité aux azolés et/ou aux polyènes.

**Régulation :** Le début de la voie de biosynthèse de l'ergostérol est commun à tous les terpénoïdes tels que le dolichol, les protéines sur lesquelles sont branchés des groupements farnesyl, l'hème ou l'ubiquinone. Cette voie est même appelée la voie du mevalonate, dont le produit final, le farnesyl pyrophosphate, est à l'intersection de nombreuses voies métaboliques. Pour cette raison, la machinerie enzymatique responsable de ces premières réactions est extrêmement régulée, notamment par un mécanisme de rétrocontrôle négatif exercé par le farnesyl pyrophosphate sur sa propre biosynthèse.

La partie propre à la synthèse de l'ergostérol commence à partir de la formation du squalène et le premier intermédiaire stérolique synthétisé est le lanosterol. Le rétrocontrôle négatif est également un mécanisme par lequel l'ergostérol est capable de réguler sa propre biosynthèse. Des travaux ont mis en évidence la présence d'une séquence régulatrice au niveau du promoteur des gènes appartenant à la voie de biosynthèse. Cette séquence, appelée SRE pour "Sterol Response Element", est reconnue par un facteur de transcription appelé SREBP pour "Sterol Response Element Binding Protein". SREBP appartient à la famille des facteurs de transcription de la famille bHLH, il est localisé dans le cytoplasme sous une forme complète.

Quand le taux d'ergostérol diminue dans la cellule fongique, SREBP est clivée et sa partie active se retrouve dans le noyau où elle active la transcription des gènes contenant une séquence SRE dans leur promoteur.

### **B. Fonctions de l'ergostérol :**

L'ergostérol, principal composant lipidique des membranes de la cellule fongique avec les sphingolipides, est responsable du maintien des propriétés des membranes cellulaires, tant au niveau de leur fluidité que de leur perméabilité, et ainsi leur permettent d'exercer leur rôle de barrière physique.

L'ergostérol joue également un rôle prépondérant dans la composition en protéines des membranes et par conséquent dans une multitude de phénomènes cellulaires dépendants de ces protéines membranaires. En effet, la présence de radeaux lipidiques, qui sont des portions membranaires dont la composition en stérols se distingue du reste de la membrane cellulaire, détermine l'adressage des protéines membranaires. Ainsi, en influençant l'activité des enzymes liées à la membrane, l'ergostérol détermine les capacités de croissance cellulaire ou la progression du cycle cellulaire lui-même.

### **IV.5 Les traitements et les référentiels :**

En réanimation il est difficile de définir une stratégie globale de prise en charge des candidémies. Les malades diffèrent les uns des autres en termes de nature de la maladie sous-jacente et du degré d'immunodépression. Par ailleurs dans un même hôpital on peut observer une différence d'écologie microbiologique au sein des services <sup>[17,65]</sup>.

#### **5.1 Les différents types de traitement**

L'utilisation des antifongiques se fait selon trois approches différentes : en traitement prophylactique, en traitement probabiliste et en cas d'infection prouvée (Figure 41).

**Traitement empirique** : Un traitement empirique se définit comme une thérapie pour les patients chez qui on soupçonne une infection fongique, en l'absence de preuve microbiologique, histologique ou sérologique.

Il n'existe pas actuellement des recommandations établies, bien que dans les faits, le traitement empirique est clairement efficace chez les patients faisant un choc septique du fait d'une infection abdominale. Plusieurs auteurs ont suggéré que face à une suspicion clinique de candidémie, la colonisation de plus de deux sites corporels est suffisante pour justifier un traitement antifongique empirique.

Le terme « suspicion clinique » basé sur l'appréciation des facteurs de risque reste à définir car il n'y a pas de consensus fort concernant ces facteurs de risque. Le clinicien devra apprécier cas par cas en se fondant sur les facteurs actuellement proposés dans la littérature [106,119].

**Traitement préemptif** : Un traitement préemptif se définit comme une thérapie chez les patients à haut risque et présentant des signes cliniques d'infection avec des résultats microbiologiques non probants mais laissant supposer une infection.

Eggiman et ses collaborateurs ont évalué l'efficacité clinique et l'innocuité d'une administration préemptive de fluconazole à 400 mg par jour (n=23) versus un placebo (n=20) chez des patients chirurgicaux à haut risque. Les patients devaient avoir subi une chirurgie abdominale récente avec perforations gastro-intestinales ou écoulements anastomotiques. Tous les patients recevaient un traitement antibactérien à large spectre, et la plupart présentaient d'autres facteurs de risque comme une colonisation à *Candida*, un score Apache II élevé et une alimentation parentérale. Seulement 1 patient (4%) dans le groupe fluconazole a développé une péritonite à *Candida*, comparativement à 7 patients (35 %) dans le groupe placebo. Aucune mortalité liée à une infection fongique n'est survenue dans le groupe fluconazole.

La conférence de consensus de 2004 sur la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives a déclaré que malgré des études insuffisantes pour valider le traitement préemptif en réanimation, un tableau septique préoccupant sans autre documentation microbiologique, avec

colonisation de plusieurs sites par *Candida sp.* et des facteurs de risques de candidémie, autorise de débiter le traitement.

**Traitement curatif :** Tous les auteurs s'accordent sur la nécessité de démarrer un traitement antifongique chez les patients à risque en cas de preuve bactériologique. Un examen direct positif au niveau d'un site normalement stérile, une seule hémoculture positive ou une candidurie importante (supérieure à  $10^5$ /ml) chez un malade présentant un tableau septique, suffisent pour instaurer un traitement antifongique [138].

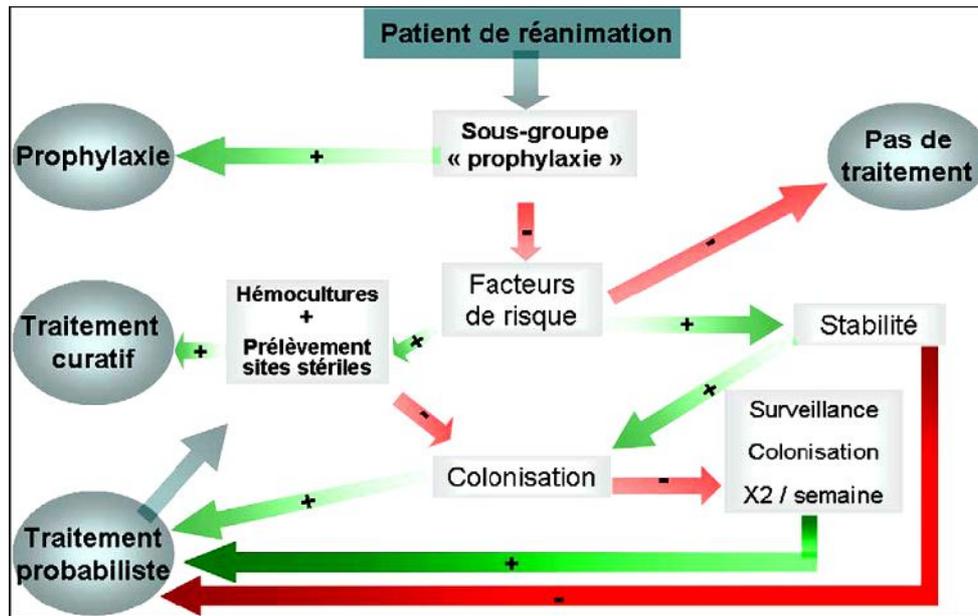


Figure 41: Algorithme de prise en charge des patients en réanimation.

**Le choix de l'antifongique dans le traitement curatif :** Il se fait après isolement de levure et avant l'identification de l'espèce et une fois l'espèce isolée, le traitement est adapté en fonction de la sensibilité aux antifongiques.

• *Le choix après isolement d'une levure et avant identification de l'espèce :*

Les critères qui interviennent dans le choix sont: le statut clinique du patient (neutropénique ou non, stabilité sur le plan hémodynamique, fonction hépatique ou rénale), ses antécédents de traitement antifongique et la possibilité d'interaction médicamenteuse. Le fluconazole était

utilisé en 1<sup>ère</sup> ligne car il est actif sur la plupart des *Candida spp* pathogènes à l'exception de *C. krusei* qui est résistant et *C. glabrata* inconstamment sensible, mais l'émergence de souches résistantes aux azolés a remis en cause la possibilité de son utilisation systématique. L'IDSA (Infectious Diseases Society of America) est prudente et ne recommande pas l'utilisation du fluconazole comme traitement de première ligne si l'état clinique du patient n'est pas stable ou en cas d'exposition préalable aux azolés [139]. La notion d'instabilité est habituellement utilisée pour décrire des patients dont les fonctions vitales, notamment hémodynamiques et respiratoires sont altérées ou en cours d'aggravation. Chez les malades instables, dans les recommandations plus récentes pour le traitement des candidémies publiées en 2009 par l'IDSA, la caspofungine est préférée ; quant aux formes lipidiques de l'amphotéricine B, elles sont recommandées à une posologie de 3mg/kg par jour pour LAMB et 5 mg/kg par jour pour ABLC en deuxième ligne.

Chez les patients neutropéniques, la plupart des experts recommandent d'utiliser un agent fongicide couvrant toutes les espèces de *Candida* (comme les polyènes ou les échinocandines), plutôt que les agents fongistatiques (comme les azolés) qui ne couvrent pas des espèces observées chez de tels patients.

• *Le choix après l'identification de l'espèce de Candida responsable :*

Après identification de l'espèce de *Candida* responsable, le choix du traitement dépend des caractéristiques épidémiologiques du service hospitalier. La connaissance des espèces et leur sensibilité aux différents antifongiques est importante pour guider le choix de l'antifongique. Concernant les données de la littérature sur les profils de sensibilité ou de résistance aux antifongiques, elles sont résumées dans le tableau 29 ci-dessous, cependant, ces données sont à considérer avec réserve, car il existe beaucoup de variabilité en fonction de l'écologie locale de l'hôpital.

**Tableau 29:** Sensibilité présumée des *Candida spp.* Aux antifongiques

Espèce	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Fluycytosine	Amphotéricine B	Candidines
<i>C.albicans</i>	S	S	S	S/R	S	S
<i>C.tropicalis</i>	SDD/R	SDD/R	S/I	S	S/I	S
<i>C.parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S/I
<i>C.glabrata</i>	SDD/R	S	S	S	S	S
<i>C.Krusei</i>	R	SDD/R	S	I/R	S/I	S

**Etude de la sensibilité selon l'agent antifongique :** Dans les cas d'infections systémiques, *C. albicans*, reste généralement sensible à tous les agents antifongiques majeurs. La résistance aux azolés (< 3 %) pour cette espèce est sporadiquement signalée chez des adultes dans un état clinique sévère et ayant une candidose invasive. Cependant, comme les espèces non *albicans* sont de plus en plus associées aux candidoses invasives, des tests de sensibilité pour détecter une résistance aux azolés sont utilisés pour guider la prise en charge de la candidose chez ces patients, en particulier dans les situations où l'on observe un échec du traitement empirique initial. La majorité des *Candida spp* isolés reste sensible à l'amphotéricine B. La thérapie médicale initiale peut donc théoriquement comporter soit de la caspofungine, soit le fluconazole, le voriconazole ou l'amphotéricine B. Le spectre antifongique de l'amphotéricine B couvre la plupart des espèces pathogènes pour l'homme. Seules certaines souches de *Candida lusitaniae* et *C. guilliermondii* sont connues résistantes. *C. glabrata* et *C. krusei* tendent à avoir des concentrations minimales inhibitrices supérieures à celles de *C. albicans*. Le fluconazole a également un large spectre. Les espèces résistantes sont *C. krusei* et certaines souches de *C. glabrata*. La 5-fluorocytosine est active sur la plupart des *Candida*. Cependant, 30 % des souches de *C.tropicalis* et de *C. krusei* sont résistantes. Le risque de développement de résistances en cours de traitement en cas de taux sériques trop faibles est élevé, d'où son utilisation en association à un autre antifongique.

Les antifongiques récents (voriconazole et caspofungine) sont actifs contre pratiquement toutes les souches de *Candida*, y compris celles résistantes au fluconazole.

**Sensibilité au fluconazole :** Les tests de sensibilité des 85 souches testées vis-à-vis du fluconazole, montre une efficacité modérée sur les souches isolées car 45% des souches sont résistantes au fluconazole. Ces résultats montrent une augmentation importante du nombre des souches résistantes au fluconazole, d'autres études ont montrées aussi une baisse de la sensibilité pour le fluconazole qui est expliqué par l'utilisation accru du fluconazole en première attention dans les candidémies. Mais ces résultats ne sont pas la règle, d'autres travaux ont montrés des fréquences de sensibilité importante pour le fluconazole pouvant atteindre 76% ou même 95,8% de souches sensibles dans une étude plus ancienne menée à Taiwan entre 1996 et 1999. Une étude réalisée par la même équipe en 2002 a montré un pourcentage de souches sensibles au fluconazole égale à 93,5%. En revanche, d'autres études démontrent que le fluconazole montre toujours une bonne activité sur les espèces de *Candida* sauf le *C. krusei* qui est naturellement résistant au fluconazole.

**Sensibilité au voriconazole :** Les résultats de la sensibilité vis-à-vis du voriconazole montrent une sensibilité de l'ordre de 63%. Cette étude montre que le voriconazole est plus actif sur les levures *Candida* que le fluconazole.

**Sensibilité à la 5-flucytosine :** Les résultats montrent un taux de sensibilité de l'ordre de 60,6%. Nous signalons que cette molécule n'est jamais utilisée en monothérapie à cause de sa toxicité hématologique. D'autres études démontrent aussi que la 5-FC montre des limites pour son utilisation dans le traitement des candidoses à cause des taux élevés de résistance.

#### Etude de la sensibilité selon l'espèce :

*Candida albicans* : Le *Candida albicans* présente un taux de sensibilité intéressant au voriconazole avec 73% des isolats, par contre des fréquences élevées de résistance sont notées vis-à-vis du 5-flucytosine (57,9%), et le fluconazole (42,1%). Ces résultats sont également retrouvés dans d'autres études.

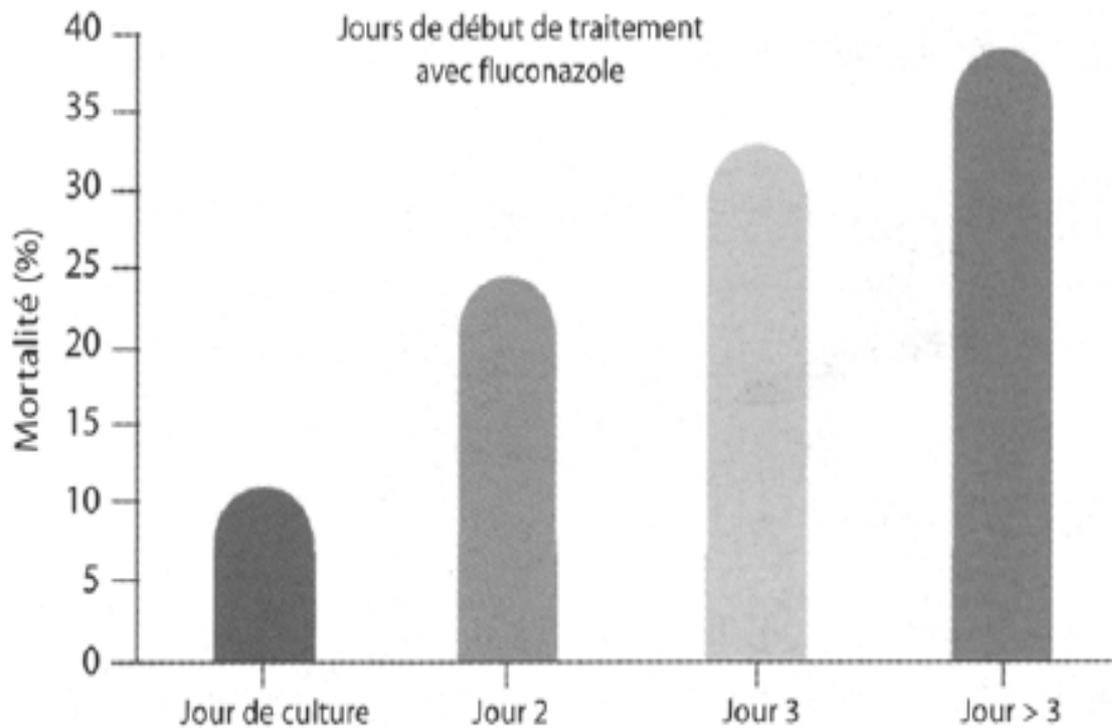
*Candida glabrata* : Les isolats de *Candida glabrata* montrent des fréquences de résistance élevées pour le fluconazole et le voriconazole de l'ordre de 60%. Ces résultats rejoignent les

données tunisiennes sur l'importance de cette espèce dans les flores fongiques isolées dans les services de réanimation ainsi que l'émergence de cette résistance importante.

*Candida tropicalis* : Les isolats de *Candida tropicalis* montrent des fréquences de résistance élevées pour le fluconazole et le voriconazole de l'ordre de 80%. Ces résultats suggèrent l'émergence de résistance comme celle remarquée pour le *Candida glabrata*.

*Candida krusei* : Cette étude démontre que Le *Candida krusei* présente une résistance de 100% pour le fluconazole ce qui rejoint les données déjà connus puisque cette espèce présente une résistance innée au fluconazole.

Enfin, le succès thérapeutique ne dépend pas seulement de l'efficacité et de la tolérance de l'agent antifongique utilisé mais aussi du délai d'administration du traitement. En effet, Garey et al ont étudié l'impact d'un retard de traitement antifongique dans plusieurs centres de soins aux Etats-Unis. Le but de leur analyse était d'établir la fréquence et le délai d'initiation d'un traitement antifongique et d'évaluer la relation entre le retard de traitement et la mortalité. Sur un total de 230 patients hospitalisés atteints de candidémie, ils ont pu montrer que chaque jour de retard d'administration d'un traitement adapté (en l'occurrence le fluconazole) augmentait significativement et corrélativement la mortalité (Figure 42). De ce fait, il est nécessaire de mettre au point des méthodes de diagnostic rapide (sérologie *Candida*, identification des facteurs de risques) qui permettraient de diminuer le retard de délai d'administration d'un traitement antifongique.



**Figure 42:** Impact d'un retard de traitement par un antifongique

**Choix de l'antifongique :** Le choix du traitement antifongique à utiliser dépend de plusieurs facteurs. Avant l'identification de la souche de *Candida*, il doit être envisagé en fonction du terrain, notamment la stabilité, les antécédents de traitements antifongiques et les fonctions rénale et hépatique.

**Stabilité et antécédents de traitements antifongiques :** La notion d'« instabilité » est assez vague. Elle est habituellement utilisée pour décrire des patients dont les fonctions vitales, notamment hémodynamiques et respiratoires sont altérées ou en cours d'aggravation. Chez le malade instable, l'efficacité thérapeutique est requise. Le délai nécessaire à la détermination de la résistance au fluconazole constitue un risque pour le malade. De ce fait, l'amphotéricine B est classiquement préconisée <sup>[145]</sup>. Seulement, depuis l'an 2000 la préférence est à la généralisation de l'utilisation du fluconazole même chez le malade instable : dans les « guidelines » de Rex, la préférence va à l'amphotéricine B pour son spectre plus large mais le

fluconazole a aussi été utilisé avec succès. Dans le consensus allemand de 2002, 11 experts sur 16 préconisent le fluconazole, contre deux pour l'association amphotéricine B – 5-fluorocytosine et trois pour ses formulations lipidiques. Il a été constaté, depuis la généralisation de l'utilisation du fluconazole, l'apparition de souches de *C. albicans* ainsi que l'émergence de souches de *Candida-non albicans* résistantes au fluconazole. Dans notre étude, l'utilisation du fluconazole comme antifongique prophylactique peut s'avérer inefficace : dans la littérature la résistance au fluconazole des souches de *Candida* est controversée. Depuis l'application du document M27A du NCCLS en 1997 normalisant la mesure de la sensibilité des souches de *Candida* aux antifongiques, l'incidence réelle aussi bien des souches de *C. albicans* résistantes au fluconazole que celle des souches de *Candida-non albicans* intrinsèquement résistantes, a été nettement revue à la baisse. Si la prévalence de *Candida-non albicans* et la mortalité qui lui est attribuable ont globalement augmenté, le développement de résistances au fluconazole ne semble néanmoins pas incriminé.

Enfin, dans une large étude portant sur les *Candida* isolés d'hémocultures entre 1995 et 2000, aucune relation n'a pu être établie entre l'incidence des infections à *C. glabrata* et sa résistance au fluconazole. En d'autres termes, la résistance au fluconazole d'une espèce particulière n'est statistiquement pas corrélée aux taux d'infections dus à cette espèce.

***Insuffisance hépatique et rénale :*** En cas d'insuffisance rénale, l'amphotéricine B est contre-indiquée du fait de sa néphrotoxicité. Le choix se portera sur le fluconazole (en adaptant les doses), l'itraconazole (aux mêmes doses) ou sur les nouvelles molécules. Le consensus français de 2004 préconise, en cas de créatininémie supérieure à 1,5 fois la normale, l'utilisation des formes lipidiques de l'amphotéricine B, de la caspofungine ou du voriconazole. En cas d'insuffisance hépatique, le médicament de choix est l'amphotéricine B. Les azolés et les échinocandines sont contre-indiqués.

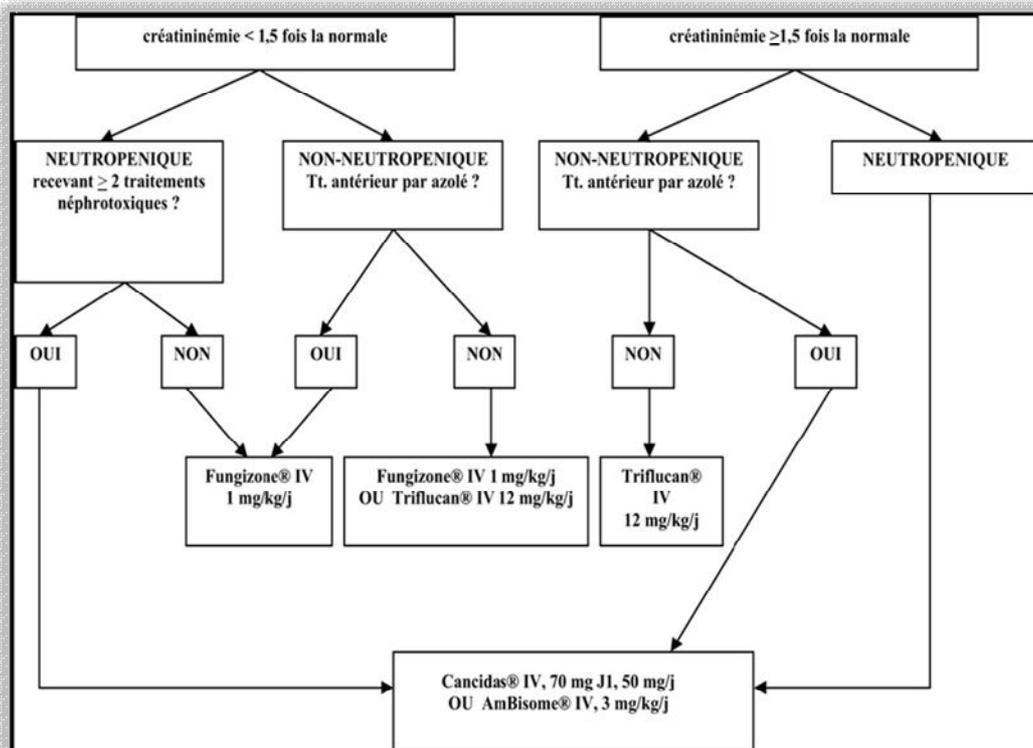
## **5.2 Recommandations thérapeutiques**

La conférence du consensus de 2004 sur la prise en charge thérapeutique des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte a mis au point des recommandations pour le traitement des candidoses invasives (Figure 43 et 44). Le traitement curatif dépend du genre et de l'espèce

de la levure. Elle se fait après isolement de la levure mais avant l'identification pour éviter le retard d'administration. Le choix fait intervenir également l'augmentation de l'incidence des *Candida sp.* De sensibilité diminuée ou résistants aux azolés, une neutropénie, une insuffisance rénale, les médicaments co-prescrits et la localisation.

En ce qui concerne la localisation pour la candidémie, il n'y a pas d'arguments pour une association d'antifongiques. La durée du traitement est de 2 semaines après la dernière hémoculture positive et la disparition des symptômes, ou au moins 7 jours après la correction de la neutropénie. Le retrait des cathéters intravasculaires est recommandé.

Plus récemment l'IDSA a publié en 2009 des recommandations pour le traitement des candidémies (Tableau 30). Dans ces recommandations la durée du traitement de la candidémie est également de 2 semaines après la dernière hémoculture positive. Chez les sujets non neutropéniques, il est recommandé si possible l'ablation de tous les cathéters intravasculaires.



**Figure 43:** Traitement des candidoses invasives : après isolement d'une levure et avant identification de l'espèce <sup>[33]</sup>.

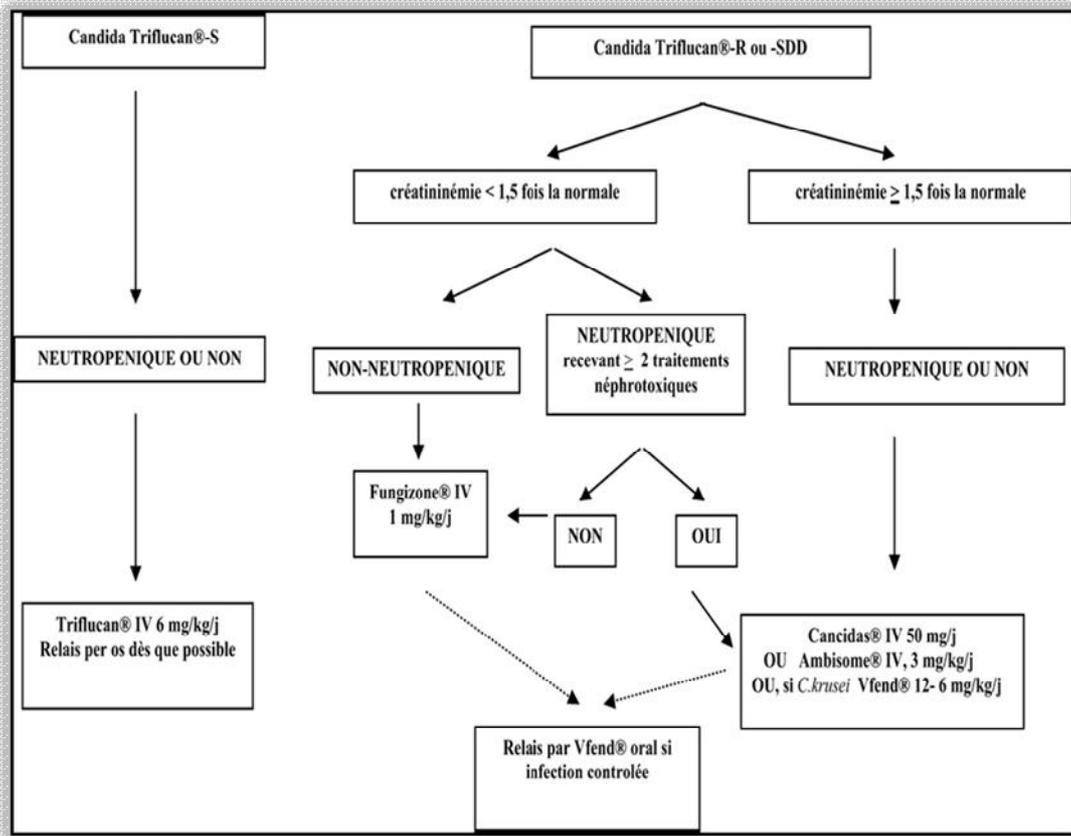


Figure 44 : Traitement des candidoses invasives : après identification de l'espèce de *Candida sp* [33].

**Tableau 30:** Recommandations américaines concernant le traitement des candidémies : Pappas 2009(IDSA)

Traitement	Durée de traitement	Commentaires
<p><b>Patients non-neutropéniques</b></p> <p><i>1<sup>ère</sup> intention</i></p> <p>Fluconazole 800mg (12mg/kg) en dose de charge puis 400mg/kg ou echinocandine</p> <p><i>2<sup>ème</sup> intention</i></p> <p>LFAmb 3-5mg/kg/jour ou AmB 0,5-1mg/kg/jour ou Voriconazole 400mg (6mg/kg) x2 pour deux doses puis 200mg (3mg/kg) x2/jour</p> <p><b>Patients neutropéniques</b></p> <p>LFAmb 3-5 mg/kg/jour ou Echinocandine</p>	<p>14 jours après dernière hémoculture positive et symptômes + régression de la neutropénie chez les neutropéniques.</p>	<p>-Ablation de tous les cathéters intra-vasculaires si possible chez les patients non-neutropéniques.</p> <p>-Ablation de tous les cathéters intravasculaires controversée chez les patients neutropéniques, origine digestive classique.</p>

#### IV.6 Etude de la sensibilité aux antifongiques dans notre étude:

##### 6.1 Selon l'espèce :

***Candida albicans*** : L'espèce de *Candida albicans* est retrouvée dans 27 isolats parmi les 85 souches de *Candida*, cette espèce présente des sensibilités variables vis-à-vis des antifongiques testés. Notre étude montre que e *Candida albicans* présente une sensibilité élevée vis-à-vis de l'amphotéricine B (93% de S) et voriconazole (82% de S), par contre des fréquences élevées de résistance sont notées vis-à-vis du 5-flucytosine (48% de R), et le fluconazole (37% de R). Ces résultats notés chez le *Candida albicans* sont les mêmes

retrouvés dans d'autres études, qui indiquent l'émergence de souches de *Candida albicans* résistantes au fluconazole et la 5-flucytosine.

***Candida glabrata*** : Cette espèce occupe la deuxième place en fréquence dans la répartition des espèces du genre *Candida*, elle est retrouvée dans 33 isolats sur les 85 souches de *Candida* spp. Dans notre étude, les isolats de *Candida glabrata* montrent des fréquences de sensibilité élevées pour l'amphotéricine B (91% de S), le 5-flucytosine (85% de S) et le voriconazole (70% de S). En parallèle ces tests ont confirmé, les observations de plusieurs études, l'émergence de résistance pour le fluconazole de 67%. Ces résultats rejoignent les données tunisiennes sur l'importance de cette espèce dans les flores fongiques isolées dans les services de réanimation ainsi que l'émergence de cette résistance importante.

***Candida tropicalis*** : Les souches de *Candida tropicalis* testées témoignent, inversement au *C.albicans* et *C.glabrata*, d'une bonne sensibilité vis-à-vis des 4 antifongiques du fluconazole (62% de S), 5-flucytosine (69% de S). L'amphotéricine B et le voriconazole apparaissent comme les agents antifongiques les plus efficaces sur le *Candida tropicalis* à 85% de sensibilité. Nos résultats démontrent que le *C.tropicalis* est l'espèce la plus sensible à tous les antifongiques étudiés, mais avec une meilleure efficacité notée chez l'amphotéricine B et le voriconazole.

***Candida krusei*** : Cette étude démontre que le *Candida krusei* est sensible au l'amphotéricine B à (90% de S), 5-flucytosine 80% de S), voriconazole (70% de S) et avec une résistance naturelle au fluconazole à 100%.

Concernant les souches de *Candida parapsilosis* et *Candida dubliniensis*, tous les isolats sont sensibles aux différents antifongiques testés.

## 6.2 Selon l'antifongique :

**Sensibilité au fluconazole** : L'étude de la sensibilité *in vitro* au fluconazole a démontrée des taux élevés de résistance de l'ordre de 55%, considéré ainsi comme le taux de résistance le plus élevé noté dans cette étude.

Les tests de sensibilité des 85 souches testées vis-à-vis du fluconazole, montre une efficacité modérée sur les souches isolées car plus de la moitié des isolats sont résistantes au

fluconazole (55%) contre 45% sensibles. Ces résultats montrent une augmentation importante du nombre des souches résistantes au fluconazole, d'autres études ont montrées aussi une baisse de la sensibilité pour le fluconazole qui est expliqué par l'utilisation accru du fluconazole étant le traitement de première attention dans les candidémies. Mais ces résultats ne sont pas la règle, d'autres travaux ont montrés des fréquences de sensibilité importante pour le fluconazole pouvant arriver à 76% ou même 95,8% de souches sensibles dans une étude plus ancienne menée à Taiwan entre 1996 et 1999. Une étude réalisée par la même équipe en 2002 a montré un pourcentage de souches sensibles au fluconazole égale à 93,5%. En revanche, d'autres études démontrent que le fluconazole montre toujours une bonne activité sur les espèces de *Candida* sauf le *C. krusei* qu'est résistant au fluconazole de façon intrinsèque.

**Sensibilité au voriconazole :** L'évaluation de la sensibilité *in vitro* du voriconazole illustre une fréquence de souches de sensibilité élevée égale à 76%, alors que 24% des souches isolées sont résistant au voriconazole.

Le Voriconazole possède des CMI plus basses que celle des autres antifongiques, confirmant ainsi son activité supérieure. Chose qui prouve que le voriconazole pourrait avoir un rôle important dans le traitement des infections fongiques qui se caractérisent par un taux de mortalité très élevé.

La fréquence des souches sensibles au voriconazole plus élevée par rapport à celle retrouvée chez le fluconazole. La fréquence des souches sensibles au voriconazole est de 76%. Cette étude montre une compatibilité avec d'autres études, que le voriconazole est plus actif sur les levures *Candida* que le fluconazole. Mais une augmentation inquiétante de la fréquence des souches résistantes au voriconazole est observée, qui est passé de 2,6% en 2001 à 3,5 en 2003 à 11% en 2011 Notre étude montre une fréquence de résistance de l'ordre de 24%.

Cette observation confirme l'émergence de la résistance au voriconazole causée par l'instauration du voriconazole en traitement initial chez les patients instables présentant une candidose invasive, notamment en cas d'une exposition antérieure aux dérivés azolés ce qui favorise l'apparition de souches résistantes.

**Sensibilité à la 5-flucytosine :** L'étude de la sensibilité *in vitro* à la 5-flucytosine indique que 72% des souches testées résistent, alors que 28% des souches sont sensibles à la 5FC.

Les résultats de la sensibilité sont comparables à ceux retrouvés pour le voriconazole, avec un pourcentage de sensibilité de 72%. Nous signalons que cette molécule n'est jamais utilisée en monothérapie à cause de sa toxicité hématologique. D'autres études démontrent aussi que la 5-FC montre des limites pour son utilisation dans le traitement des candidoses à cause de leur taux élevé de résistance

**Sensibilité à l'Amphotéricine B :** L'étude de la sensibilité *in vitro* à l'amphotéricine B montre un taux faible de résistance de l'ordre de 9%, alors que 91% des souches de *Candida* isolées sont sensibles à cet agent antifongique.

L'utilisation de l'amphotéricine B est limitée par sa toxicité et son administration astreignante, l'amphotéricine B devra être prescrit en second plan si une résistance au fluconazole est confirmée ainsi que dans certaines indications particulières notamment les localisations cérébro-méningées.



## *Conclusion*



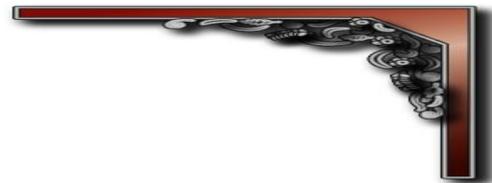
## V. CONCLUSION

Les infections fongiques invasives connaissent depuis une trentaine d'années un développement sans précédent. D'un point de vue qualitatif, avec l'émergence progressive de champignons filamenteux, mais principalement d'un point de vue quantitatif, avec un accroissement majeur de l'incidence de ces pathologies. Les causes de ce phénomène sont multiples, mais ce sont surtout les progrès médicaux en matière de réanimation et de thérapies immunosuppressives qui génèrent une population fortement à risque [84,85,112].

Les agents étiologiques de ces infections sont principalement les levures appartenant au genre *Candida*. Chez les patients fragilisés de réanimation, qui présentent souvent un lourd passé médical, ces infections fongiques sont redoutables. La mortalité élevée nécessite une prise en charge thérapeutique rapide, en dépit d'une difficulté de diagnostic clinique, ainsi qu'un délai encore difficilement compressible dans le diagnostic biologique actuel.

Les facteurs de risque de ces infections sont partiellement connus et peuvent orienter avant confirmation biologique vers une espèce particulière. Ainsi des recommandations de prise en charge thérapeutique ont été émises et préconisent l'utilisation de molécules antifongiques large spectre en première intention dans des situations cliniques précises. Néanmoins les conséquences de l'usage de ces molécules récentes sur les espèces et sur leur sensibilité aux antifongiques restent peu étudiées, et les recommandations de bon usage des antifongiques pourraient se voir modifier si l'émergence d'espèces à sensibilité diminuée se généralise.

Face à ces questions essentielles, mais aussi face à l'observation quotidienne de modifications dans le suivi mycologique des patients du service de réanimation, nous avons voulu objectiver cette impression par une étude monocentrique, afin d'évaluer réellement au sein de notre hôpital les modifications de l'épidémiologie et de la sensibilité aux antifongiques des levures en réanimation. Ces données ont été confrontées aux modifications de la consommation des antifongiques dans ce même service, afin de mieux cerner l'impact des prescriptions sur la flore à *Candida* de ces patients.



## *Résumé*



## **RESUME**

**Titre:** Etude moléculaire et profil de résistance phénotypique aux antifongiques systémiques des souches de *Candida* isolées dans les services à risque au CHU de Rabat

**Auteur:** BELMAATI Nissrine

**Mots clés :** Antifongigramme, Résistance, Réanimation, PCR, E-TEST

**Objectifs :** établir le profil de résistance phénotypique et moléculaire aux antifongiques systémiques des souches de *Candida* isolées dans les services à risque du CHU de Rabat.

**Matériels et méthodes :** Notre étude prospective de 6 mois a inclus les souches cliniques de *Candida*. L'identification des souches de *Candida* a été faite selon les méthodes conventionnelles et la sensibilité in vitro aux antifongiques était réalisée par méthode du E-test®. L'étude moléculaire a été réalisée au CHU de Nancy par PCR.

**Résultats :** Ont été inclus 85 souches cliniques. Parmi les prélèvements effectués, *Candida* non *albicans* représentait 68%, le pourcentage de résistance de chaque antifongique est comme suit : 55% pour le fluconazole, 24% pour le voriconazole et 28% pour la 5-flucytosine, 9% pour l'amphotéricine B. L'étude moléculaire a permis de retrouver les gènes de surexpression impliqués dans la résistance au fluconazole concernant les isolats de *Candida glabrata*.

**Discussion :** La distribution des espèces montre une prédominance de *Candida* non *albicans*. *C.glabrata* est l'espèce la plus isolée. L'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis des quatre molécules d'antifongiques, prouve que l'amphotéricine B est la plus efficace avec une sensibilité de 91%. La voriconazole a une sensibilité de 76%, la 5-flucytosine de 72% et la fluconazole de 45%.

**Conclusion :** Nécessité d'une surveillance épidémiologique continue des candidoses afin de suivre les tendances de distribution des levures et de leurs profils de résistance aux antifongiques pour la mise en place de lignes directrices pour leurs traitements.

## **SUMMARY :**

**Title:** Molecular Design and phenotypic profile of resistance to systemic antifungal strains of *Candida* isolated from the services at risk CHU Rabat

**Author:** BELMAATI Nissrine

**Keywords:** Antifongigramme, resistance, E-test, PCR, Reanimation

**Objectives:** to establish the profile of phenotypic and molecular systemic antifungal resistance of *Candida* strains isolated in services at risk of Rabat University.

**Materials and methods:** This prospective 6-month study included clinical isolates of *Candida*. The identification of *Candida* strains was made using conventional methods and in vitro antifungal susceptibility method was performed by E-test ®. Molecular study was conducted at the University Hospital of Nancy PCR.

**Results:** We included 85 clinical isolates. Of the samples taken, 29% had blood cultures and 71% were peripheral sites. Non-*Candida albicans* accounted for 68%. The isolated species show different sensitivities vis-à-vis the four antifungals tested, the percentage of antifungal resistance of each is as follows: 55% for fluconazole, 24% for voriconazole and 28% for 5-flucytosine, 9% for amphotericin B. The molecular study to find the genes involved in the overexpression of resistance to fluconazole for *Candida glabrata* isolates.

**Discussion:** The species distribution shows a predominance of non-*albicans Candida*. *C.glabrata* is the most isolated species. The study of the sensitivity of strains isolated vis-à-vis the four antifungal molecules available, shows that amphotericin B is most effective with a sensitivity of 91%, followed by voriconazole with a sensitivity of 76%, third class is 5-flucytosine 72% of sensitive strains and the final fluconazole with 45% sensitivity.

**Conclusion:** The need for continuous epidemiological surveillance of *Candida* to monitor trends in distribution of yeast and their patterns of resistance to antifungal agents for the establishment of guidelines for their treatment.





*Références  
bibliographiques:*



- [1] **Anane S, Khalfallah F.** Diagnostic biologique des candidoses systémiques: difficultés et perspectives. *Pathologie Biologie*.**2007** ; 55 : 262-272.
- [2] **Almirante B., Rodriguez D., Park B.J., et Al.** Epidemiology and predictors of mortality in cases of candida bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol***2005**; 43: 1829-1835.
- [3] **Alvarez-Lerma F, Nolla-Sallas J., Leon C., et Al.**Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intensive Care Med***2003**; 29 :1069–1076.
- [4] **Ang B.S.P., Telenti A., King B et Al.** Candidemia from a urinary tract source: microbiological aspects and clinical significance. *Clin Infect. Dis* **1993**; 17:662–666.
- [5] **Aloia T et Al.** *Candida* in pancreatic infection: a clinical experience. *Am Surg***1994**; 60: 793-796.
- [6] **Anane S; Khalfallah F.** Diagnostic biologique des candidoses systémiques : difficultés et perspectives. *Pathologie biologie* **2007**;55: 262-272.
- [7] **Arendorf T. M., And Walker D. M.** The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man, *Arch. Oral Biol***1980**; 25.
- [8] **Ascioglu S., Rex J.H., De Pauw B. Et Al.** Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis***2002**; 34: 7–14.
- [9] **Accoceberry I. Noel T.** Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* **2006**; 3.
- [10] **Abi Said D., Anaissie E., Uzun O., et Al.** The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin. Infect. Dis.***1997**; 24: 1122–1128.

- [11] **Baixench MT, Aoun N, Desnos-Ollivier M, et al.** Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* **2007**; 59:1076-83.
- [12] **Bruce R, Smith D, Rodgers D et al.** Identification of a novel response regulator, *crp1*, that is required for hydrogen peroxide resistance in *Candida albicans*. *PLoS ONE.* **2011**;6(12).
- [13] **Bizerra FC, Nakamura CV, Poersch C et al.** Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *Federation of European Microbiological Societies FEMS*, **2008**; 8:442-450.
- [14] **Bouchara J.P., Tronchin G., Annaix V. et al.** Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect Immun* **1990**;58: 48–54.
- [15] **Bittner R et al.** Pancreatic abscess and infected pancreatic necrosis. Different local septic complications in acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* **1987**; 32: 1082-1087.
- [16] **Buchler MW et al.** Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* **2000**; 232: 619-626.
- [17] **Bille J.** Le diagnostic des infections fongiques invasives. *Revue Médicale Suisse* **2005**; 15.
- [18] **Bates D.W, Su.L, Yu D.T, et al.** Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy. *Clin Infect Dis* **2001**; 32: 686–693.
- [19] **Buchner T., Fegeler W., Bernhardt H. et al.** Treatment of severe *Candida* infections in high-risk patients in Germany: consensus formed by a panel of interdisciplinary investigators. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**; 21: 337–352.

- [20] **Cigdem K, Durmaz R, Oflu B et al.** species distribution, antifungal susceptibility and clonal relatedness of candida isolates from patients in neonatal and pediatric intensive care units at medical center in turkey. *New Microbiologica*. **2008**; 31:401-408.
- [21] **Canton E, Peman J, Quindos G et al.** prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *candida parapsilosis*, *candida orthopsilosis*, and *candida metapsilosis* isolated from patient with candidemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. **2011**; 55(12), 5590-5596.
- [22] **C.white T, Holleman S, Dy F et al.** Resistance Mechanisms in clinical isolates of candida albicans. *Antimicrobial agents and chemotherap*, 2002; 46(6):1704-1713.
- [23] **Cuenca-Estrella M, lee-yang W, Meral A.ciblak et al .** comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of candida species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2002**;46(11): 3644-3647.
- [24] **Chen YC, Lin YH, Chen KW et al.** Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of *candida parapsilosis* sensu stricto, *candida orthopsilosis*, and candida metapsilosis in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **2010**; 68:284-292.
- [25] **Chabasse D.** Intérêt de la numération des levures dans les urines. Revue de la littérature et résultats préliminaires d'une enquête multicentrique réalisée dans 15 centres hospitaliers universitaires. *Ann Fr Anesth Reanim* **2001**; 20: 400-406.
- [26] **Chen S., Slavin M., Nguyen Q., et Al.** Active surveillance for candidemia. Australia *Emerg Infect Dis* **2006**; 12: 1508-1516.
- [27] **Charlier C., Hart E., Lefort A., et Al.** Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years. *J Antimicrob Chemother* **2006**; 57: 384-410.

- [28] **Canuto M.M., Rodero F.G.** Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect. Dis* **2002**; 2: 550–563.
- [29] **Collins B., Clancy C.J.** And Nguyen M.H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. *Drug Resist Updates* **1999**; 2: 9–14.
- [30] **Cruciani M., Lalla F., Mengoli C.** Prophylaxis of *Candida* infections in adult trauma and surgical intensive care patients: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med* **2005**; 31:1479-87.
- [31] **Caillot D., Chavanet P., Casanova O. et Al.** Clinical evaluation of a new lipid based delivery system for intravenous administration of amphotericin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1992**; 11: 722-25.
- [32] **Coopersmith CM., Rebmann TL., Zack JE., Ward MR., Corcoran RM, Schallom ME., Sona CS, Buchman TG., Boyle WA., Polish LB., et Al.** Effect of an education program on decreasing catheter-related bloodstream infections in the surgical intensive care unit. *Crit Care Med* **2002**; 30(1):59–64
- [33] Conférence de consensus commune organisée conjointement par la SFAR, la SPILF et la SRLF. Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte. *J Mycol Med* **2004**; 14: 142-6.
- [34] **Develoux M, Bretagne S.** Candidoses et levures diverses. *EMC (Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses*. **2005**; 8-602-A-10.
- [35] **Dhanushki P, Steven D.** Milestones in *Candida albicans* gene manipulation. *Fungal Genetics and Biology* **2011**; 48: 858-865.
- [36] **Dupont H, Bourichon A, Paugam-Burtz C, et Al.** Can yeast isolation in peritoneal fluid be predicted in intensive care unit patients with peritonitis. *Crit Care Med* **2003**; 31: 752-757.

- [37] **Denning D.W., Kibbler C.C., Barnes R.A.** British society for medical mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. *The Lancet Infectious Diseases* **2003**; 3: 230-240.
- [38] **Delclaux C., Roupie E., Blot F., Et Al.** Lower respiratory tract colonization and infection during severe acute respiratory distress syndrome: incidence and diagnosis. *Am J Respir Crit Care M* **1997**; 156: 1092-1098.
- [39] **Denning D.W., Evans E.G.V., Kibbler C.C. et Al.** Guidelines for the investigation of invasive fungal infections in haematological malignancy and solid organ transplantation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* **1997**; 16: 424–436.
- [40] **Dupont B.** Fongluries. Pathogénie et conduite thérapeutique. *Bult. Soc. Fr. Mugol. Med* **1986**; 15: 307-310.
- [41] **Espinel-ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M et al.** international and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 Broth Microdilution Methods for Testing susceptibilities of *candida* spp To fluconazole, itraconazole, Posaconazole, and Voriocozazole *journal of clinical microbiology*. **2005**; 43(8):3884-3889.
- [42] **Eloy O, Blanc V, Pina P, Gaudart A et al** ,Epidemiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique ColBVH, *Pathologie Biologi*.**2006**; 54 :523-530.
- [43] **Eloy O, Blanc V, Mallié M, Decousser JW, Pina P, Allouch PY.** identification et sensibilité aux antifongiques de deux souches de candida dans 95 hôpitaux français, *journal de mycologie médicale*. **2005**; 15 :117-123.
- [44] **Eggiman P, Pittet D.** Candidémie et candidose généralisée. *anesthésie-réanimation*. **2010**; 36-983.
- [45] **Eggimann P., Garbino J., Pittet D.** Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis***2003**; 3 : 772-785.

- [46] **Eggimann P., Pittet D., And Montravers D.** Prophylaxie des candidoses en reanimation infections fongiques: resistances et nouvelles modalités thérapeutiques. *Jidif, Paris: Optimed Ed***2003** : 77-108.
- [47] **Eggimann P., Pittet D.** Physiopathologie et prévention des infections liées aux accès vasculaires. *Médecine et maladies infectieuses***2003**; 33:554-563.
- [48] **Edwards J.E., Bodey G.P., Bowden R.A., et Al.**International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections, *Clin Infect Dis* **1997**; 25: 43–59.
- [49] **Eggimann P., Pittet D.** Candidémie et Candidoses généralisés. *Anesthésie-Réanimation*; **2010**: 36-983-D-10.
- [50] **Ellis D.** Amphotericin B: spectrum and resistance. *J. Antimicrob. Chemother* **2002**; 49 (Suppl A): 7–10.
- [51] **Eggimann P., Garbino J., Pittet D.** Management of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis***2003**; 3:772-85.
- [52] **Eggimann P., Wolff M., Garbino J.** Oral nystatin as antifungal prophylaxis in critically ill patients: an old SDD tool to be renewed. *Intensive Care Med* **2005**; 31:1466-8.
- [53] **Eggiman P., Francioli P., Bille J., Sceder R., Wu M.M., Chapuis G.et Al.** Fluconazole prophylaxis prevents intraabdominal candidiasis in hight-risk surgical patients. *Crit Care Med***1999**; 27: 1066-1072.
- [54] **Eggimann P., Harbarth S., Constantin M.N., Touveneau S., Chevrolet JC., Pittet D.** Impact of a prevention strategy targeted at vascular-accesscare on incidence of infections acquired in intensive care. *Lancet***2000**; 355: 1864–8.

- [55] **Febre N., Silva V., Medeiros E.A., Wey S.B. et Al.** Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. *J. Clin. Microbiol***1999**; 37: 1584–1586.
- [56] **Fisher J.F., Chew W.H., Shadomy S., Duma R.J., Mayhall C.G., House W.C.** Urinary tract infections due to *Candida albicans*. *Rev. Infect. Dis***1982**; 4: 1107- 1116.
- [57] **Gallè F, Sanguinetti M, Colella G et al.** oral candidosis : characterization of a sample of recurrent infections and study of resistance determinants. *New Microbiological*. **2011**; 34:379-389.
- [58] **Grillot R,** Anidulafungine: activité in vitro sur les levures et les champignons filamenteux d'intérêt clinique. *Réanimation*. **2007**; 16 :S261-S266.
- [59] **Garnacho-Montero J, diaz-Martin A, Garcia-cabrera E et al** .Risk factors for fluconazole-Resistant candidemia. *Antimicrobial agent and chemo therapy*, **2010**; 54(8),3149-3154.
- [60] **Gauzit R.** Epidémiologie et facteurs de risque des candidoses systémiques en réanimation. *Ann Fr Anesth Reanim***2001**; 20 : 394-399.
- [61] **Garbino J., Kolarova L., Rohner P., Lew D., Pichna P., Pittet D.** Evolution des candidémies sur 12 ans chez les patients adultes hospitalisés en Centre de Soins Spécialisés. *Medicine***2002**; 81:425-33.
- [62] **Gubbins P.O., Piscitelli S.C., Danziger L.H.** Candidal urinary tract infections: a comprehensive review of their diagnosis and management. *Pharmacotherapy***1993**; 13: 110-127.
- [63] **Goldberg P.K., Kozinn P.J., Wise G.J, Et Al.** Incidence and significance of candiduria. *Jama***1979**; 241: 582-584.

- [64] **Garey K.W., Rege M., Pai M.P., Mingo D.E., Suda K.J., Turpin R.S. et al.** Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia multi-institutional study. *Clin Infect Dis* **2006**; 43: 25-31.
- [65] **Garbino J.** Fluconazole prophylaxis for critically ill patients at high risk for *Candida* infection. *Clin Infect Dis* **2005**; 41:1690-1.
- [66] **Guze L.B., Haley L.D.** Fungus infections of the urinary tract. *Yale J. Biol. Med.*, **1958**; 30: 292-305.
- [67] **Herbrecht R, Nivoix Y, Fohrer C, et al.** Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. *J Antimicrob Chemother.* **2005**; 56: 139–48.
- [68] **Hamory B.H., Wenzel R.P.** Hospital-associated candiduria: predisposing factors and review of the literature. *J. Urol* **1978**; 120: 444-44.
- [69] **Hazen Kc, Howell Sa.** *Candida, Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. *Manual Of Clinical Microbiology* **2007**: 1762-1788.
- [70] **Hanna S., A. Blancard, J.C. De La Roziere J. et Al.** Diagnostic des candidémies par per nichée et comparaison avec les hémocultures. *J Mycol Med* **2003**; 13 :61–66.
- [71] **Jorge Garbino M.D Lenka K., Pittet et Al.** Evolution des candidémies sur 12 ans chez les patients hospitalisés en centre de soins spécialisés. *Revue Médecine* **6 2002**.
- [72] **Johnson L.B. and Kauffman C.A.** 48, Voriconazole: a new triazole antifungal agent, *Clin Infect Dis* **2003**; 36: 630–637.
- [73] **Kalkanci A, Berk E, Aykan B, Caglar K et al.** Epidemiology and antifungal susceptibility of candida sp isolated from hospitalized patients. *Journal de mycologie médicale*, **2007**; 17:16-20.

- [74] **Khosravi AR, Shokri H, Manssouri P, Katirae F, Ziglari T.** *Candida* sp isolated from nails and their in vitro susceptibility to antifungal drugs in the department of dermatology ( University of Tehran, Iran ). *Journal de mycologie médicale*, **2008**; 18: 210-215.
- [75] **Kauffmann-lacroix C, Witthuhn F, Dufour X, Klossek JM, Charron M et Rodier MH.** Etude par la technique du E-test® de la sensibilité aux antifongiques de souches de champignons de souches de champignons filamenteux isolées des voies aériennes supérieures. *Journal de mycologie médicale*, **2004**; 14 : 75-77.
- [76] **Khelif M, Sellami A, Sellami H, Makni F, Ayadi A.** *Candida dubliniensis*: méthodes d'identification et implications épidémiologiques. *Pathologie Biologie*, **2011**, 59:166-172.
- [77] **Kleinegger C.L., Lockhart S.R., Vargas K. et Al.** Frequency, intensity, species and strains de oral *Candida* as a function de host age. *J Clin Microbiol* **1996**; 34(9): 2246-54.
- [78] **Kuse E.R., Chetchotisakd P., Da Cunha C.A. et Al.** Micafungin versus liposomal amphotericin b for candidaemia and invasive candidosis: a phase 3 randomised double-blind trial. *Lancet* **2007**;369: 1519–1527.
- [79] **Kulberg B.J., Sobel J.D., Ruhnke M., et Al.** Voriconazole versus a regimen of amphotericin b followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* **2005**; 366: 1435–1442.
- [80] **Kettani A., Belkhadir Z.H., Mosadik A., Faroudy M., Ababou A., Lazreq C., Sbihi A.** Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale* **2006**; 16: 16-25.
- [81] **Lupetti A, Danesi R, Campa M et al.** Molecular basis of resistance to azole antifungals. *TRENDS in Molecular Medicine*. **2002**; 8(2): 76-81.

- [82] **Lo H.J., Kholer J.R., Didomenico B. et Al.** Non filamentous *Candida albicans* mutants are avirulent. *Cell* **1997**; 939–945.
- [83] **Lavigne J.P., Sotto A.** Candiduria, *Prog. Urol.* **2005**; 15: 213–216.
- [84] **Laupland K.B., Bagshaw S.M., Gregson D.B. et Al.** Intensive care unit-acquired urinary tract infections in a regional critical care system. *Crit. Care* **2005**; 9: R60–R65.
- [85] **Leon C, Ruiz Santana S, Saavedra P et Al.** A bedside scoring system ("Candida score") for early antifungal treatment in nonneutropenic critically ill patients with *Candida* colonization. *Crit Care Med* **2006**; 34: 730-737.
- [86] **Lelarge P., Mariot J.** candidoses systémiques: Annales Françaises d'anesthésie et De Réanimation **1992** ; 11(5) : 558-565.
- [87] **Lanternier F. and Lortholary O.** Liposomal amphotericin b: what is its role in 2008, *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14 (Suppl. 4): 71–83.
- [88] **Lortholary O., Dannaoui E., Raoux D. et Al.** In vitro susceptibility to posaconazole of 1903 yeast isolates recovered in France (2003–2006) and tested by the eucast method, *Antimicrob Agents Chemother* **2007**; 51: 3378–3380.
- [89] **Leroy O., Gangneux J.P., Montravers P., Mira J.P., Gouin F., Sollet J.P. et al.** Epidemiology, management and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care units: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* **2009**; 37: 1612-8.
- [90] **Massou S, Ahid S, Azendour H, Bensghir M, Mounir K, Iken M, Lmimouni BE, Balkhi H, Drissi Kamili N, Haimeur C.** Systemic candidiasis in medical intensive care unit: Analysis of risk factors and the contribution of colonization index. *Pathol Biol*; **2012**.

- [91] **Michael A. Pfaller, MD.** Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *the American journal of Medecine*, **2012**; 125: S3–S13.
- [92] **Masson E.** Résumés des conférences et des communications du congrès de la Société française de mycologie médicale, Nancy. *Journal de Mycologie Médicale*, **2007**; 17 :202-239.
- [93] **Masson E.** The cellular and molecular defense mechanisms of the candida yeasts against azole antifungal drugs. *Journal de Mycologie Médicale*, **2012**; 22:173-178.
- [94] **Masson E.** Evolution de l'épidémiologie des candidoses et aspergillose invasives. *Médecine et maladies infectieuses*, **2007**; 37 :2-4.
- [95] **Morschhauser J,**the genetic basis of fluconazole resistance development in candida albicans,*biochimica et biophysica acta* 1587. **2002**; 240-248.
- [96] **Morschhauser J.** Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi.*fungi.fungal genetics and biology*, **2010**; 47,94-106.
- [97] **Méchaï F., Lefort A., Lanternier F., Bougnoux M.E., Lortholary O.** Prise en charge des infections systémiques à *Candida spp.* *La revue de médecine interne***2011**; 32:173-180.
- [98] **Maenza J.R., Merz W.G., Romagnoli M.J. et Al.** Infection due to fluconazole resistant *Candida* in patients with aids: prevalence and microbiology. *Clin. Infect. Dis.***1997**; 24: 28–34.
- [99] **Marr K.A., White T.C., Van Burik J.A. et Al.** Development of fluconazole resistance in *Candida albicans* causing disseminated infection in a patient undergoing marrow transplantation. *Clin Infect Dis***1997**; 25: 908–910.
- [100] **Mermel L.A.** Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med* **2000**; 132(5): 391–402.

- [101] **Maki D.G., Mermel L.A., Bennett J.V., Brachman P.S.** Hospital Infections. 4ed. Infections due to infusion therapy. Philadelphia: *Lippincott-Raven* **1998**; 44: 689–724.
- [102] **Noël T,** The cellular and molecular defense mechanism of the candida yeasts against azole antifungal drugs. *Journal de Mycologie Médicale*, **2012**; 22:173-178.
- [103] **Oh J, Fung E, Schlecht U et al.** Gene Annotation and drug target discovery in candida albicans with a tagged transposon mutant collection. *PLOS pathog.* **2010**; 6(10).
- [104] **Poulain D.** Physiopathologie des candidoses systémiques, annales de l'institut Pasteur/ actualités, Paris : *Elsevier* **2003** : 105-124.
- [105] **Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D., et Al.** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis***2009**; 48:503–535.
- [106] **Pfaller M.A., Messer S.A., Boyken L. et Al.** Use of fluconazole as a surrogate marker to predict susceptibility and resistance to voriconazole among clinical isolates of *Candida spp.* Tested by clinical and laboratory standards institute-recommended broth microdilution methods. *Journal Of Clinical Microbiology***2007**; 45: 70-75.
- [107] **Pfaller M.A., Diekema D.J., Jones R.N., et Al.** International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the sentry antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3254–3259.
- [108] **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol.* **2010**; 36:1-53.

- [109] **Pfaller MA, Castanheira M, Diekema DJ, et al.** Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and E-test methods with the CLSI broth microdilution method for echinocandin susceptibility testing of *Candida* species. *J Clin Microbiol.* **2010**; 48:1592-1599.
- [110] **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al.** *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:515–21.
- [111] **Pittet D,** candidémie et candidose généralisée, *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, **2000**; 10: 36-983.
- [112] **Pfaller M, Gary J.M, Shawn.A et al.** *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2008-2009. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2011**; 55(2):561-566.
- [113] **Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D., Benjamin D.K. et Al.** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* **2009**; 48 : 503–535.
- [114] **Pelz R.K., Hendrix C.W., Swoboda S.M. et Al.** Double- Blind placebo-controlled trial of fluconazole to prevent *Candida* infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* **2001**; 233:542-8.
- [115] **Qi Q.G, Hu T., Zhou X.D.** Frequency, species and molecular characterization of oral *Candida* in hosts of different age in China. *J Oral Pathol Med* **2005**; 34(6): 352-356.

- [116] **Rieu P, Eloy O, Bertout S, Mallié M, Bain P, Blanc V.** Sensibilité comparée par CLSI, EUCAST, E-test et ATB® Fungus 2 des souches de *Candida* sp. isolées au cours d'une enquête épidémiologique sur les candidémies dans des hôpitaux non universitaires. *Journal de Mycologie Médicale*, **2009** ; 19 :94-103.
- [117] **Richter SS, Galask RP, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA.** Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43:62-2155.
- [118] **Rupp S.** proteomics on its way to study host-pathogen interaction in *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, **2004**; 7:330-335.
- [119] **Rex J.H., Walsh T.J., Sobel J.D. et Al.** Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clin. Infect. Dis.* **2000**; 30 : 662–678.
- [120] **Schubert S, S.barker K, Znaidi S et al.** Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2011**; 55(5): 2212-2223.
- [121] **Sellami A, Sellami A.N., Makni F et Al.** La candidurie en milieu de réanimation : signification et intérêt de la numération des levures dans les urines. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* **2006**; 25: 584-588.
- [122] **Sobel J.D.** Practice guidelines for the treatment of fungal infections. For the mycoses study group. Infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis* **2000**; 30: 652.
- [123] **Stephan F., Sialou Bah M., , Rezaiguia Delclaux S., et Al.** Molecular diversity and routes of colonization of *Candida albicans* in surgical intensive care unit, as studies using microsatellite markers. *Clin Infect Dis* **2002**; 35: 1477-1483.
- [124] **Sandven P., Bevanger L., Digranes A. et Al.** Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 1977-81.

- [125] **Sendid B., Caillot D., Baccouch-Humbert B. et Al.** Contribution of the platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida-tropicalis* infection in neutropenic adults. *J. Clin. Microbiol.* **2003**;41 (10): 4551–4558.
- [126] **Sanglard D., Odds F.C.** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect. Dis* **2002**;2: 73–85.
- [127] **Sandven P., Qvist H., Skovlund E., Giercksky K.E., NORGAS Group and the Norwegian Yeast Study Group.** Significance of *Candida* recovered from intraoperative specimens in patients with intra-abdominal perforations. *Crit Care Med***2002**; 30:541-7.
- [128] **Thierry G, Morio F, Le pape P, Gay-Andrieu F , Barre O, Miegerville M.** Prévalence de candida parapsilosis, C. orthopsolosis et de c. metapsilosis au sein des candidémies au CHU de Nantes et profil de sensibilité aux échinocandines par la méthode E-test® : étude rétrospective de cinq ans (2004-2009). *pathologie biologique*,**2011**; 59 :52-56.
- [129] **Talarmin J-P, Boutoille D, Tattevin P et al.** Epidemiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'ouest de la France. *Médecine et maladie infectieuses*, **2009**; 39: 877-885.
- [130] **Talarmin J.P., Boutoille D., Tattevin P. et Al.** Epidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'ouest de la France. *Médecine et Maladie Infectieuses***2009**: 877-885.
- [131] **Takesue Y., Kakehashi M., Ohge H Et Al.** Combined assessment of  $\beta$ -(1–3)-d-glucan and degree of *Candida* colonization before starting empiric therapy for candidiasis in surgical patients. *World J. Surg.* **2004**;28: 625–630.

- [132] **Taieb F., Mechai F., Lefort A. et Al.** *La revue de médecine interne* **2011** ; 32 : 173-180.
- [133] **Voss A., Verweij P.** Epidémiologie tendances actuelles des infections systémiques à *Candida*. *Les Candidoses Systémiques* **2001** : 11-28.
- [134] **Willinger B.** Laboratory diagnosis and therapy of invasive fungal infections. *Curr Drug Targets* **2006**;7: 513–522.
- [135] **Yera H., Sendid B., Francois N., Camus D. And Poulain D.** Contribution of serological tests and blood culture to the early diagnosis of systemic candidiasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2001**; 20: 864–870.

# *Serment de Galien*

*Je jure en présence des maîtres de cette faculté :*

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à la législation en vigueur, aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession, de ne jamais consentir à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis*
- *fidèle à mes promesses, que je sois méprisé de mes confrères si je manquais à mes engagements.*

جامعة محمد الخامس  
كلية الطب والصيدلة  
- الرباط -

قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

أحس بالله العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوازع من ضميري لما فيه صالح الصحة العمومية، وأن لا أقصر أبدا في مسؤوليتي وواجباتي تجاه المريض وكرامته الإنسانية.
- أن ألتزم أثناء ممارستي للصيدلة بالقوانين المعمول بها وبأدب السلوك والشرف، وكذا بالاستقامة والترفع.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحضى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"

**الدراسة الجزيئية وجانب المقاومة المظهري الشخصي  
لمضاد الفطريات لـ 85 سلالة من الكونديدا المعزولة  
في الخدمات المعرضة للخطر بمستشفى ابن سينا بالرباط**

**أطروحة**

قدمت ونوقشت علانية يوم: .....

من طرف

**الآنسة: نسرين بلعطي**

المزودة في: 11 نونبر 1988 بالرباط

**لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة**

**الكلمات الأساسية:** المقاومة - أونتيفونجيكرام - PCR - E-TEST - الإنعاش.

**تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة**

رئيسة

مشرف

أعضاء

السيدة: نجية حجاج الحسوني  
أستاذة في أمراض الرثية  
السيد: بدر الدين ليموني  
أستاذ في علم الطفيليات  
السيد: إدريس لحلو أمين  
أستاذ في علم الأحياء الدقيقة  
السيد: عبد القادر بلمكي  
أستاذ في علم الدم  
السيد: منصف الراحي  
أستاذ في الطب الباطني