

UNIVERSITE MOHAMMED
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE -RABAT-

ANNEE: 2010
N °: 52

THESE

PLACE DE L'ANTIFONGIGRAMME DANS LA PRISE EN CHARGE
DES INFECTIONS FONGIQUES

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :.....

PAR

Mme. Nadia BOUROUDA

Née le 26 Août 1981 à Casablanca

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE

MOTS CLES : Champignon – Infection – Antifongique– Antifongigramme.

JURY

Mr. A. AGOUMI

Professeur de Parasitologie

PRESIDENT

Mr. H. TLIGUI

Professeur agrégé de Parasitologie

RAPPORTEUR

Mr. M. ZOUHDI

Professeur de Microbiologie

JUGES

Mme I HESSISSEN





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

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969: Docteur 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

ADMINISTRATION :

Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et Etudiantines
Professeur Mohammed JIDDANE
Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération
Professeur Ali BEN OMAR
Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie
Professeur Yahia CHERRAH
Secrétaire Général : Monsieur El Hassan AHELLAT

PROFESSEURS :

Décembre 1967

1. Pr. TOUNSI Abdelkader Pathologie Chirurgicale

Février, Septembre, Décembre 1973

2. Pr. ARCHANE My Idriss* Pathologie Médicale
3. Pr. BENOMAR Mohammed Cardiologie
4. Pr. CHAOUI Abdellatif Gynécologie Obstétrique
5. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

6. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Février 1977

7. Pr. AGOUMI Abdelaziz Parasitologie
8. Pr. BENKIRANE ép. AGOUMI Najia Hématologie
9. Pr. EL BIED ép. IMANI Farida Radiologie

Février Mars et Novembre 1978

10. Pr. ARHARBI Mohamed Cardiologie
11. Pr. SLAOUI Abdelmalek Anesthésie Réanimation

Mars 1979

12. Pr. LAMDOUAR ép. BOUAZZAOUI Naima Pédiatrie

Mars, Avril et Septembre 1980

13. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam Neurochirurgie
14. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

15. Pr. BENOMAR Said* Anatomie Pathologique
16. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
17. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
18. Pr. HAMMANI Ahmed* Cardiologie
19. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
20. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie Réanimation
21. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

22. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie
23. Pr. BENOMAR M'hammed Chirurgie-Cardio-Vasculaire
24. Pr. BENSOUA Mohamed Anatomie
25. Pr. BENOSMAN Abdellatif Chirurgie Thoracique
26. Pr. CHBICHEB Abdelkrim Biophysique
27. Pr. JIDAL Bouchaib* Chirurgie Maxillo-faciale
28. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma Physiologie

Novembre 1983

29. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir* Pneumo-phtisiologie
30. Pr. BALAFREJ Amina Pédiatrie
31. Pr. BELLAKHDAR Fouad Neurochirurgie
32. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najja Rhumatologie
33. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine Cardiologie

Décembre 1984

34. Pr. BOUCETTA Mohamed* Neurochirurgie
35. Pr. EL OUEDDARI Brahim El Khalil Radiothérapie
36. Pr. MAAOUNI Abdelaziz Médecine Interne
37. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi Anesthésie -Réanimation
38. Pr. NAJI M'Barek * Immuno-Hématologie
39. Pr. SETTAF Abdellatif Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

40. Pr. BENJELLOUN Halima Cardiologie
41. Pr. BENSALD Younes Pathologie Chirurgicale
42. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa Neurologie
43. Pr. IHRAI Hssain * Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
44. Pr. IRAQI Ghali Pneumo-phtisiologie
45. Pr. KZADRI Mohamed Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

46. Pr. AJANA Ali Radiologie
47. Pr. AMMAR Fanid Pathologie Chirurgicale
48. Pr. CHAHED OUZZANI ép.TAOBANE Houria Gastro-Entérologie
49. Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq Pneumo-phtisiologie
50. Pr. EL HAITEM Naïma Cardiologie
51. Pr. EL MANSOURI Abdellah* Chimie-Toxicologie Expertise
52. Pr. EL YAACOUBI Moradh Traumatologie Orthopédie
53. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah Gastro-Entérologie
54. Pr. LACHKAR Hassan Médecine Interne

- 55. Pr. OHAYON Victor* Médecine Interne
- 56. Pr. YAHYAOUI Mohamed Neurologie

Décembre 1988

- 57. Pr. BENHMAMOUCH Mohamed Najib Chirurgie Pédiatrique
- 58. Pr. DAFIRI Rachida Radiologie
- 59. Pr. FAIK Mohamed Urologie
- 60. Pr. FIKRI BEN BRAHIM Noureddine Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
- 61. Pr. HERMAS Mohamed Traumatologie Orthopédie
- 62. Pr. TOULOUNE Farida* Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

- 63. Pr. ABIR ép. KHALIL Saadia Cardiologie
- 64. Pr. ACHOUR Ahmed* Chirurgicale
- 65. Pr. ADNABOUI Mohamed Médecine Interne
- 66. Pr. AOUNI Mohamed Médecine Interne
- 67. Pr. AZENDOUR BENACEUR* Oto-Rhino-Laryngologie
- 68. Pr. BENAMEUR Mohamed* Radiologie
- 69. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali Cardiologie
- 70. Pr. CHAD Bouziane Pathologie Chirurgicale
- 71. Pr. CHKOFF Rachid Pathologie Chirurgicale
- 72. Pr. FARCHADO Fouzia ép. BENABDELLAH Pédiatrique
- 73. Pr. HACHIM Mohammed* Médecine-Interne
- 74. Pr. HACHIMI Mohamed Urologie
- 75. Pr. KHARBACH Aïcha Gynécologie -Obstétrique
- 76. Pr. MANSOURI Fatima Anatomie-Pathologique
- 77. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda Neurologie
- 78. Pr. SEDRATI Omar* Dermatologie
- 79. Pr. TAZI Saoud Anas Anesthésie Réanimation
- 80. Pr. TERHZAZ Abdellah* Ophtalmologie

Février Avril Juillet et Décembre 1991

- 81. Pr. AL HAMANY Zaïtounia Anatomie-Pathologique
- 82. Pr. ATMANI Mohamed* Anesthésie Réanimation
- 83. Pr. AZZOUZI Abderrahim Anesthésie Réanimation
- 84. Pr. BAYAHIA ép. HASSAM Rabéa Néphrologie
- 85. Pr. BELKOUCHI Abdelkader Chirurgie Générale
- 86. Pr. BENABDELLAH Chahrazad Hématologie
- 87. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdelatif Chirurgie Générale
- 88. Pr. BENSOUA Yahia Pharmacie galénique
- 89. Pr. BERRAHO Amina Ophtalmologie
- 90. Pr. BEZZAD Rachid Gynécologie Obstétrique
- 91. Pr. CHABRAOUI Layachi Biochimie et Chimie
- 92. Pr. CHANA El Houssaine* Ophtalmologie
- 93. Pr. CHERRAH Yahia Pharmacologie
- 94. Pr. CHOKAIRI Omar Histologie Embryologie
- 95. Pr. FAJRI Ahmed* Psychiatrie
- 96. Pr. JANATI Idrissi Mohamed* Chirurgie Générale
- 97. Pr. KHATTAB Mohamed Pédiatrie
- 98. Pr. NEJMI Maati Anesthésie-Réanimation
- 99. Pr. OUAALINE Mohammed* Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène

100. Pr. SOULAYMANI ép. BENCHEIKH Rachida Pharmacologie
101. Pr. TAOUIK Jamal Chimie thérapeutique

Décembre 1992

102. Pr. AHALLAT Mohamed Chirurgie Générale
103. Pr. BENOUDA Amina Microbiologie
104. Pr. BENSOUA Adil Anesthésie Réanimation
105. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib Radiologie
106. Pr. CHAHED OUAZZANI Laaziza Gastro-Entérologie
107. Pr. CHAKIR Noureddine Radiologie
108. Pr. CHRAIBI Chafiq Gynécologie Obstétrique
109. Pr. DAOUDI Rajae Ophtalmologie
110. Pr. DEHAYNI Mohamed* Gynécologie Obstétrique
111. Pr. EL HADDOURY Mohamed Anesthésie Réanimation
112. Pr. EL OUAHABI Abdessamad Neurochirurgie
113. Pr. FELLAT Rokaya Cardiologie
114. Pr. GHAFIR Driss* Médecine Interne
115. Pr. JIDDANE Mohamed Anatomie
116. Pr. OUAZZANI TAIBI Med Charaf Eddine Gynécologie Obstétrique
117. Pr. TAGHY Ahmed Chirurgie Générale
118. Pr. ZOUHDI Mimoun Microbiologie

Mars 1994

119. Pr. AGNAOU Lahcen Ophtalmologie
120. Pr. AL BAROUDI Saad Chirurgie Générale
121. Pr. ARJI Moha* Anesthésie Réanimation
122. Pr. BENCHERIFA Fatiha Ophtalmologie
123. Pr. BENJAAFAR Noureddine Radiothérapie
124. Pr. BENJELLOUN Samir Chirurgie Générale
125. Pr. BENRAIS Nozha Biophysique
126. Pr. BOUNASSE Mohammed* Pédiatrie
127. Pr. CAOUI Malika Biophysique
128. Pr. CHRAIBI Abdelmjid Endocrinologie et Maladies Métabolique
129. Pr. EL AMRANI ép. AHALLAT Sabah Gynécologie Obstétrique
130. Pr. EL AOUAD Rajae Immunologie
131. Pr. EL BARDOUNI Ahmed Traumatologie Orthopédie
132. Pr. EL HASSANI My Rachid Radiologie
133. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur Médecine Interne
134. Pr. EL KIRAT Abdelmajid* Chirurgie Cardio- Vasculaire
135. Pr. ERROUGANI Abdelkader Chirurgie Générale
136. Pr. ESSAKALI Malika Immunologie
137. Pr. ETTAYEBI Fouad Chirurgie Pédiatrique
138. Pr. HADRI Larbi* Médecine Interne
139. Pr. HDA Ali* Médecine Interne
140. Pr. HASSAM Badredine Dermatologie
141. Pr. IFRINE Lahssan Chirurgie Générale
142. Pr. JELTHI Ahmed Anatomie Pathologique
143. Pr. MAHFOUD Mustapha Traumatologie Orthopédie
144. Pr. MOUDENE Ahmed* Traumatologie Orthopédie
145. Pr. MOSSEDDAQ Rachid* Neurologie
146. Pr. OULBACHA Said Chirurgie Générale
147. Pr. RHRAB Brahim Gynécologie Obstétrique

148. Pr. SENOUCI ép. BELKHADIR Karima Dermatologie
149. Pr. SLAOUI Anas Chirurgie Cardio-vasculaire

Mars 1994

150. Pr. ABBAR Mohamed* Urologie
151. Pr. ABDELHAK M'barek Chirurgie - Pédiatrique
152. Pr. BELAIDI Halima Neurologie
153. Pr. BARHMI Rida Slimane Gynécologie Obstétrique
154. Pr. BENTAHILA Abdelali Pédiatrie
155. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali Gynécologie -Obstétrique
156. Pr. BERRADA Mohamed Saleh Traumatologie -Orthopédie
157. Pr. CHAMI Ilham Radiologie
158. Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae Ophtalmologie
159. Pr. EL ABBADI Najia Neurochirurgie
160. Pr. HANINE Ahmed* Radiologie
161. Pr. JALIL Abdelouahed Chirurgie Générale
162. Pr. LAKHDAR Amina Gynécologie Obstétrique
163. Pr. MOUANE Nezha Pédiatrie

Mars 1995

164. Pr. ABOUQUAL Redouane Réanimation Médicale
165. Pr. AMRAOUI Mohamed Chirurgie Générale
166. Pr. BAIDADA Abdelaziz Gynécologie Obstétrique
167. Pr. BARGACH Samir Gynécologie Obstétrique
168. Pr. BELLAHNECH Zakaria Urologie
169. Pr. BEDDOUCHE Amokrane* Urologie
170. Pr. BENZAOUZ Mustapha Gastro-Entérologie
171. Pr. CHAARI Jilali* Médecine Interne
172. Pr. DIMOU M'barek* Anesthésie Réanimation
173. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine* Anesthésie Réanimation
174. Pr. EL MESNAOUI Abbas Chirurgie Générale
175. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila Oto-Rhino-Laryngologie
176. Pr. FERHATI Driss Gynécologie Obstétrique
177. Pr. HASSOUNI Fadil Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
178. Pr. HDA Abdelhamid* Cardiologie
179. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed Urologie
180. Pr. IBRAHIMY Wafaa Ophtalmologie
182. Pr. BENOMAR ALI Neurologie
183. Pr. BOUGTAB Abdesslam Chirurgie Générale
184. Pr. ER RIHANI Hassan Oncologie Médicale
185. Pr. EZZAITOUNI Fatima Néphrologie
186. Pr. KABBAJ Najat Radiologie
187. Pr. LAZRAK Khalid (M)Traumatologie Orthopédie
188. Pr. OUTFIFA Mohamed*Gynécologie Obstétrique

Décembre 1996

189. Pr. AMIL Touriya* Radiologie
190. Pr. BELKACEM Rachid Chirurgie Pédiatrie
191. Pr. BELMAHI Amin Chirurgie réparatrice et plastique
192. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim Ophtalmologie
193. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan Chirurgie Générale
194. Pr. EL MELLOUKI Ouafae* Parasitologie

- 195. Pr. GAMRA Lamiae Anatomie Pathologique
- 196. Pr. GAOUZI Ahmed Pédiatrie
- 197. Pr. MAHFOUDI M'barek* Radiologie
- 198. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid Chirurgie Générale
- 199. Pr. MOHAMMADI Mohamed Médecine Interne
- 200. Pr. MOULINE Soumaya Pneumo-phtisiologie
- 201. Pr. OUADGHIRI Mohamed Traumatologie – Orthopédie
- 202. Pr. OUZEDDOUN Naima Néphrologie
- 203. Pr. ZBIR EL Mehdi* Cardiologie

Novembre 1997

- 204. Pr. ALAMI Mohamed Hassan Gynécologie – Obstétrique
- 205. Pr. BEN AMAR Abdesselem Chirurgie Générale
- 206. Pr. BEN SLIMANE Lounis Urologie
- 207. Pr. BIROUK Nazha Neurologie
- 208. Pr. BOULAICH Mohamed O.RL.
- 209. Pr. CHAOUIR Souad* Radiologie
- 210. Pr. DERRAZ Said Neurochirurgie
- 211. Pr. ERREIMI Naima Pédiatrie
- 212. Pr. FELLAT Nadia Cardiologie
- 213. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra Radiologie
- 214. Pr. HAIMEUR Charki* Anesthésie Réanimation
- 215. Pr. KADDOURI Nouredine Chirurgie – Pédiatrique
- 216. Pr. KANOUNI NAWAL Physiologie
- 217. Pr. KOUTANI Abdellatif Urologie
- 218. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid Chirurgie Générale
- 219. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ Pédiatrie
- 220. Pr. NAZZI M'barek* Cardiologie
- 221. Pr. OUAHABI Hamid* Neurologie
- 222. Pr. SAFI Lahcen* Anesthésie Réanimation
- 223. Pr. TAOUFIQ Jallal Psychiatrie
- 224. Pr. YOUSFI MALKI Mounia Gynécologie Obstétrique

Novembre 1998

- 225. Pr. BENKIRANE Majid*Hématologie
- 226. Pr. KHATOURI Ali*Cardiologie
- 227. Pr. LABRAIMI Ahmed*Anatomie Pathologique

Novembre 1998

- 228. Pr. AFIFI RAJAA Gastro - Entérologie
- 229. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali* Pneumo-phtisiologie
- 230. Pr. ALOUANE Mohammed* Oto- Rhino- Laryngologie
- 231. Pr. LACHKAR Azouz Urologie
- 232. Pr. LAHLOU Abdou Traumatologie Orthopédie
- 233. Pr. MAFTAH Mohamed* Neurochirurgie
- 234. Pr. MAHASSINI Najat Anatomie Pathologique
- 235. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae Pédiatrie
- 236. Pr. MANSOURI Abdelaziz* Neurochirurgie
- 237. Pr. NASSIH Mohamed* Stomatologie Et Chirurgie Maxillo Faciale
- 238. Pr. RIMANI Mouna Anatomie Pathologique
- 239. Pr. ROUIMI Abdelhadi Neurologie

Janvier 2000

- 240. Pr. ABID Ahmed* Pneumo-phtisiologie
- 241. Pr. AIT OUMAR Hassan Pédiatrie
- 242. Pr. BENCHERIF My Zahid Ophtalmologie
- 243. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd Pédiatrie
- 244. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine Pneumo-phtisiologie
- 245. Pr. CHAOUI Zineb Ophtalmologie
- 246. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer Chirurgie Générale
- 247. Pr. ECHARRAB El Mahjoub Chirurgie Générale
- 248. Pr. EL FTOUH Mustapha Pneumo-phtisiologie
- 249. Pr. EL MOSTARCHID Brahim* Neurochirurgie
- 250. Pr. EL OTMANY Azzedine Chirurgie Générale
- 251. Pr. GHANNAM Rachid Cardiologie
- 252. Pr. HAMMANI Lahcen Radiologie
- 253. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim Anesthésie-Réanimation
- 254. Pr. ISMAILI Hassane* Traumatologie Orthopédie
- 255. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss Gastro-Entérologie
- 256. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim* Anesthésie-Réanimation
- 257. Pr. TACHINANTE Rajae Anesthésie-Réanimation
- 258. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida Médecine Interne

Novembre 2000

- 259. Pr. AIDI Saadia Neurologie
- 260. Pr. AIT OURHROUIL Mohamed Dermatologie
- 261. Pr. AJANA Fatima Zohra Gastro-Entérologie
- 262. Pr. BENAMR Said Chirurgie Générale
- 263. Pr. BENCHEKROUN Nabiha Ophtalmologie
- 264. Pr. BOUSSELMANE Nabile* Traumatologie Orthopédie
- 265. Pr. BOUTALEB Najib* Neurologie
- 266. Pr. CHERTI Mohammed Cardiologie
- 267. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma Anesthésie-Réanimation
- 268. Pr. EL HASSANI Amine Pédiatrie
- 269. Pr. EL IDGHIRI Hassan Oto-Rhino-Laryngologie
- 270. Pr. EL KHADER Khalid Urologie
- 271. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah* Rhumatologie
- 272. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan Endocrinologie et Maladies Métaboliques
- 273. Pr. HSSAIDA Rachid* Anesthésie-Réanimation
- 274. Pr. MANSOURI Aziz Radiothérapie
- 275. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia Ophtalmologie
- 276. Pr. RZIN Abdelkader* Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
- 277. Pr. SEFIANI Abdelaziz Génétique
- 278. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali Réanimation Médicale

PROFESSEURS AGREGES :

Décembre 2001

- 279. Pr. ABABOU Adil Anesthésie-Réanimation
- 280. Pr. AOUAD Aicha Cardiologie
- 281. Pr. BALKHI Hicham* Anesthésie-Réanimation
- 282. Pr. BELMEKKI Mohammed Ophtalmologie
- 283. Pr. BENABDELJLIL Maria Neurologie
- 284. Pr. BENAMAR Loubna Néphrologie
- 285. Pr. BENAMOR Jouda Pneumo-phtisiologie
- 286. Pr. BENELBARHDADI Imane Gastro-Entérologie

- 287. Pr. BENNANI Rajae Cardiologie
- 288. Pr. BENOUACHANE Thami Pédiatrie
- 289. Pr. BENYOUSSEF Khalil Dermatologie
- 290. Pr. BERRADA Rachid Gynécologie Obstétrique
- 291. Pr. BEZZA Ahmed* Rhumatologie
- 292. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi Anatomie
- 293. Pr. BOUHOUCHE Rachida Cardiologie
- 294. Pr. BOUMDIN EI Hassane* Radiologie
- 295. Pr. CHAT Latifa Radiologie
- 296. Pr. CHELLAOUI Mounia Radiologie
- 297. Pr. DAALI Mustapha* Chirurgie Générale
- 298. Pr. DRISSE Sidi Mourad* Radiologie
- 299. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira Gynécologie Obstétrique
- 300. Pr. EL HIJRI Ahmed Anesthésie-Réanimation
- 301. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid Neuro-Chirurgie
- 302. Pr. EL MADHI Tarik Chirurgie-Pédiatrie
- 303. Pr. EL MOUSSAIF Hamid Ophtalmologie
- 304. Pr. EL OUNANI Mohamed Chirurgie Générale
- 305. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil Radiologie
- 306. Pr. ETTAIR Said Pédiatrie
- 307. Pr. GAZZAZ Miloudi* Neuro-Chirurgie
- 308. Pr. GOURINDA Hassan Chirurgie-Pédiatrie
- 309. Pr. HRORA Abdelmalek Chirurgie Générale
- 310. Pr. KABBAJ Saad Anesthésie-Réanimation
- 311. Pr. KABIRI EL Hassane* Chirurgie Thoracique
- 312. Pr. LAMRANI Moulay Omar Traumatologie Orthopédie
- 313. Pr. LEKEHAL Brahim Chirurgie Vasculaire Périphérique
- 314. Pr. MAHASSIN Fattouma* Médecine Interne
- 315. Pr. MEDARHRI Jalil Chirurgie Générale
- 316. Pr. MIKDAME Mohammed* Hématologie Clinique
- 317. Pr. MOHSINE Raouf Chirurgie Générale
- 318. Pr. NABIL Samira Gynécologie Obstétrique
- 319. Pr. NOUINI Yassine Urologie
- 320. Pr. OUALIM Zouhir* Néphrologie
- 321. Pr. SABBAAH Farid Chirurgie Générale
- 322. Pr. SEFIANI Yasser Chirurgie Vasculaire Périphérique
- 323. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia Pédiatrie
- 324. Pr. TAZI MOUKHA Karim Urologie

Décembre 2002

- 325. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane* Anatomie Pathologique
- 326. Pr. AMEUR Ahmed* Urologie
- 327. Pr. AMRI Rachida Cardiologie
- 328. Pr. AOURARH Aziz* Gastro-Entérologie
- 329. Pr. BAMOU Youssef * Biochimie-Chimie
- 330. Pr. BELGHITI Laila Gynécologie Obstétrique
- 331. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene* Endocrinologie et Maladies Métaboliques
- 332. Pr. BENBOUAZZA Karima Rhumatologie
- 333. Pr. BENZEKRI Laila Dermatologie
- 334. Pr. BENZZOUBEIR Nadia* Gastro – Enterologie
- 335. Pr. BERADY Samy* Médecine Interne
- 336. Pr. BERNOUSSI Zakiya Anatomie Pathologique

- 337. Pr. BICHRA Mohamed Zakarya Psychiatrie
- 338. Pr. CHOHO Abdelkrim * Chirurgie Générale
- 339. Pr. CHKIRATE Bouchra Pédiatrie
- 340. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair Chirurgie Pédiatrique
- 341. Pr. EL ALJ Haj Ahmcd Urologie
- 342. Pr. EL BARNOUSSI Leila Gynécologie Obstétrique
- 343. Pr. EL HAOURI Mohamed * Dermatologie
- 344. Pr. EL MANSARI Omar* Chirurgie Générale
- 345. Pr. ES-SADEL Abdelhamid Chirurgie Générale
- 346. Pr. FILALI ADIB Abdelhai Gynécologie Obstétrique
- 347. Pr. HADDOUR Leila Cardiologie
- 348. Pr. HAJJI Zakia Ophtalmologie
- 349. Pr. IKEN Ali Urologie
- 350. Pr. ISMAEL Farid Traumatologie Orthopédie
- 351. Pr. JAAFAR Abdeloihab* Traumatologie Orthopédie
- 352. Pr. KRIOULE Yamina Pédiatrie
- 353. Pr. LAGHMARI Mina Ophtalmologie
- 354. Pr. MABROUK Hfid* Traumatologie Orthopédie
- 355. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss* Gynécologie Obstétrique
- 356. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid* Cardiologie
- 357. Pr. MOUSTAINE My Rachid Traumatologie Orthopédie
- 358. Pr. NAITLHO Abdelhamid* Médecine Interne
- 359. Pr. OUJILAL Abdelilah Oto-Rhino-Laryngologie
- 360. Pr. RACHID Khalid * Traumatologie Orthopédie
- 361. Pr. RAISS Mohamed Chirurgie Générale
- 362. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha* Pneumo-phtisiologie
- 363. Pr. RHOU Hakima Néphrologie
- 364. Pr. RKIOUAK Fouad* Endocrinologie et Maladies Métaboliques
- 365. Pr. SIAH Samir * Anesthésie Réanimation
- 366. Pr. THIMOU Amal Pédiatrie
- 367. Pr. ZENTAR Aziz* Chirurgie Générale
- 368. Pr. ZRARA Ibtisam* Anatomie Pathologique

Janvier 2004

- 369. Pr. ABDELLAH EI Hassan Ophtalmologie
- 370. Pr. AMRANI Mariam Anatomie Pathologique
- 371. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas Oto-Rhino-Laryngologie
- 372. Pr. BENKIRANE Ahmed* Gastro-Entérologie
- 373. Pr. BENRAMDANE Larbi* Chimie Analytique
- 374. Pr. BOUGHALEM Mohamed* Anesthésie Réanimation
- 375. Pr. BOULAADAS Malik Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
- 376. Pr. BOURAZZA Ahmed* Neurologie
- 377. Pr. CHERRADI Nadia Anatomie Pathologique
- 378. Pr. EL FENNI Jamal* Radiologie
- 379. Pr. EL HANCHI Zaki Gynécologie Obstétrique
- 380. Pr. EL KHORASSANI Mohamed Pédiatrie
- 381. Pr. EL YOUNASSI Badreddine* Cardiologie
- 382. Pr. HACHI Hafid Chirurgie Générale
- 383. Pr. JABOUIRIK Fatima Pédiatrie
- 384. Pr. KARMANE Abdelouahed Ophtalmologie
- 385. Pr. KHABOUZE Samira Gynécologie Obstétrique
- 386. Pr. KHARMAZ Mohamed Traumatologie Orthopédie
- 387. Pr. LEZREK Mohammed* Urologie

- 388. Pr. MOUGHIL Said Chirurgie Cardio-Vasculaire
- 389. Pr. NAOUMI Asmae* Ophtalmologie
- 390. Pr. SAADI Nozha Gynécologie Obstétrique
- 391. Pr. SASSENOU Ismail*Gastro-Entérologie
- 392. Pr. TARIB Abdelilah* Pharmacie Clinique
- 393. Pr. TIJAMI Fouad Chirurgie Générale
- 394. Pr. ZARZUR Jamila Cardiologie

Janvier 2005

- 395. Pr. ABBASSI AbdelahChirurgie Réparatrice et Plastique
- 396. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*Chirurgie Générale
- 397. Pr. ALAOUI Ahmed EssaidMicrobiologie
- 398. Pr. ALLALI fadouaRhumatologie
- 399. Pr. AMAR YamamaNéphrologie
- 400. Pr. AMAZOUZI AbdellahOphtalmologie
- 401. Pr. AZIZ Nouredine*Radiologie
- 402. Pr. BAHIRI RachidRhumatologie
- 403. Pr. BARAKAT AminaPédiatrie
- 404. Pr. BENHALIMA HananeStomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
- 405. Pr. BENHARBIT MohamedOphtalmologie
- 406. Pr. BENYASS AatifCardiologie
- 407. Pr. BERNOUSSI AbdelghaniOphtalmologie
- 408. Pr. BOUKALATA SalwaRadiologie
- 409. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI MohamedOphtalmologie
- 410. Pr. DOUDOUH Abderrahim*Biophysique
- 411. Pr. EL HAMZAOUI SakinaMicrobiologie
- 412. Pr. HAJJI LeilaCardiologie
- 413. Pr. HESSISSEN Leila Pédiatrie
- 414. Pr. JIDAL Mohamed*Radiologie
- 415. Pr. KARIM AbdelouahedOphtalmologie
- 416. Pr. KENDOUCI Mohamed*Cardiologie
- 417. Pr. LAAROUSSI MohamedChirurgie Cardio Vasculaire
- 418. Pr. LYACOUBI MohammedParasitologie
- 419. Pr. NIAMANE Radouane*Rgumatologie
- 420. Pr. RAGALA AbdelhakGynécologie Obstétrique
- 421. Pr. REGRAGUI AsmaaAnatomie Pathologique
- 422. Pr. SBIHI SouadHisto Embryologie Cytogénétique
- 423. Pr. TNACHERI OUZZANI BtissamOphtalmologie
- 424. Pr. ZERAIDI NajiaGynécologie Obstétrique

Avril 2006

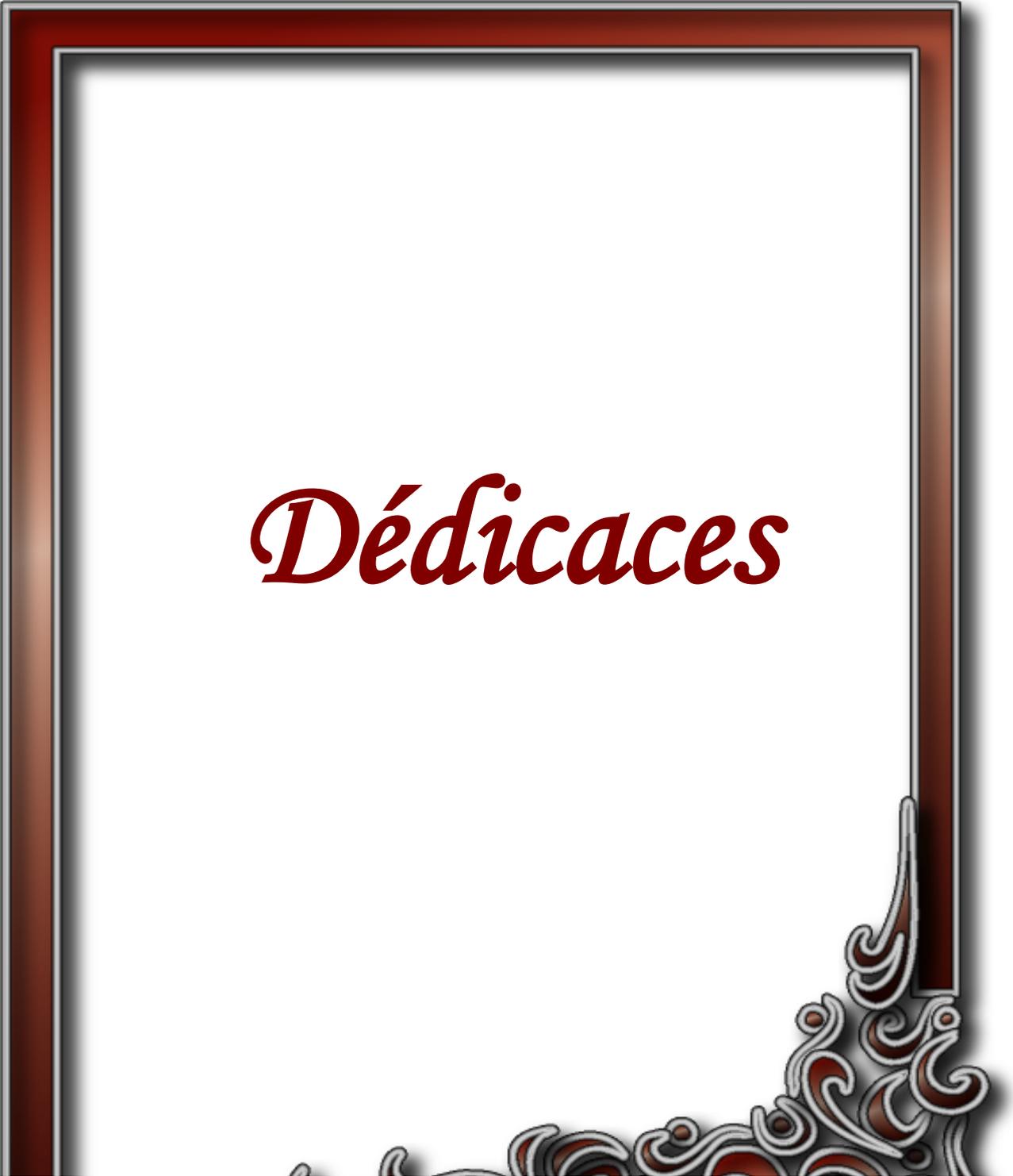
- 425. Pr. ACHEMLAL Lahsen*Rhumatologie
- 426. Pr. AFIFI YasserDermatologie
- 427. Pr. AKJOUJ Said*Radiologie
- 428. Pr. BELGNAOUI Fatima ZahraDermatologie
- 429. Pr. BELMEKKI Abdelkader*Hematologie
- 430. Pr. BENCHEIKH RazikaO.R.L
- 431. Pr. BIYI Abdelhamid*Biophysique
- 432. Pr. BOUHAFS Mohamed El AmineChirurgie – Pédiatrique
- 433. Pr. BOULAHYA Abdellatif*Chirurgie Cardio-Vasculaire
- 434. Pr. CHEIKHAOUI YounesChirurgie Cardio-Vasculaire
- 435. Pr. CHENGUETI ANSARI AnasGynécologie Obstétrique
- 436. Pr. DOGHMI NawalCardiologie

- 437. Pr. ESSAMRI Wafaa Gastro-Entérologie
- 438. Pr. FELLAT Ibtissam Cardiologie
- 439. Pr. FAROUDY Mamoun Anesthésie Réanimation
- 440. Pr. GHADOUANE Mohammed* Urologie
- 441. Pr. HARMOUCHE Hicham Médecine Interne
- 442. Pr. HNAFI Sidi Mohamed* Anesthésie Réanimation
- 443. Pr. IDRIS LAHLOU Amine Microbiologie
- 444. Pr. JROUNDI Laila Radiologie
- 445. Pr. KARMOUNI Tariq Urologie
- 446. Pr. KILI Amina Pédiatrie
- 447. Pr. KISRA Hassan Psychiatrie
- 448. Pr. KISRA Mounir Chirurgie – Pédiatrique
- 449. Pr. KHARCHAFI Aziz* Médecine Interne
- 450. Pr. LMIMOUNI Badreddine* Parasitologie
- 451. Pr. MANSOURI Hamid* Radiothérapie
- 452. Pr. NAZIH Naoual O.R.L
- 453. Pr. OUANASS Abderrazzak Psychiatrie
- 454. Pr. SAFI Soumaya* Endocrinologie
- 455. Pr. SEKKAT Fatima Zahra Psychiatrie
- 456. Pr. SEFIANI Sana Anatomie Pathologique
- 457. Pr. SOUALHI Mouna Pneumo-Phtisiologie
- 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida Pneumo-Phtisiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES
PROFESSEURS

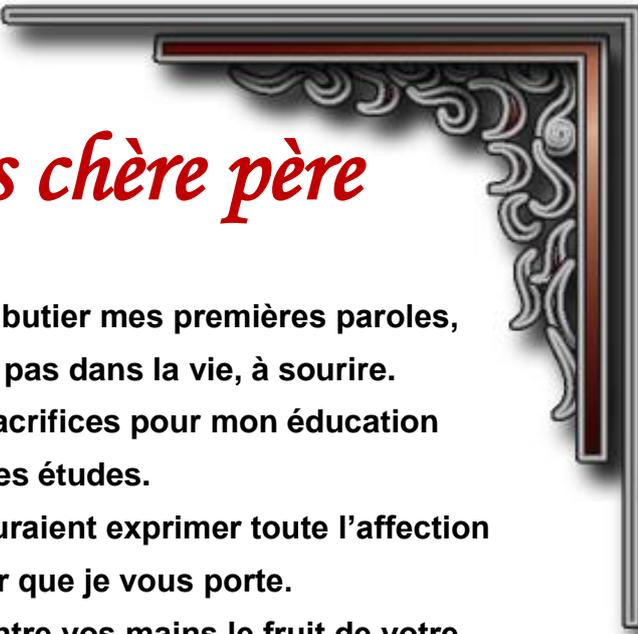
- 1. Pr. ALAMI OUHABI Naima Biochimie
- 2. Pr. ALAOUI KATIM Pharmacologie
- 3. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma Histologie – Embryologie
- 4. Pr. ANSAR M'hammed Chimie Organique et Pharmacie Chimique
- 5. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz Applications Pharmaceutiques
- 6. Pr. BOURJOUANE Mohamed Microbiologie
- 7. Pr. DRAOUI Mustapha Chimie Analytique
- 8. Pr. EL GUESSABI Lahcen Pharmacognosie
- 9. Pr. ETTAIB Abdelkader Zootechnie
- 10. Pr. FAOUZI Moulay El Abbès Pharmacologie
- 11. Pr. HMAMOUCHE Mohamed Chimie Organique
- 12. Pr. REDHA Ahlam Biochimie
- 13. Pr. TELLAL Saida* Biochimie
- 14. Pr. TOUATI Driss Pharmacognosie
- 15. Pr. ZELLOU Amina Chimie Organique

** Enseignants Militaires*



Dédicaces

A ma très chère mère

A decorative corner ornament with a dark grey border and intricate white scrollwork, positioned in the upper right quadrant of the page.

A mon très chère père

**Vous m'avez appris à balbutier mes premières paroles,
à faire mes premiers pas dans la vie, à sourire.
vous avez fait tant de sacrifices pour mon éducation
et mes études.**

**Ces quelques lignes ne sauraient exprimer toute l'affection
et tout l'amour que je vous porte.**

**Aujourd'hui, je dépose entre vos mains le fruit de votre
patience et de vos innombrables sacrifices, soit-il l'exhaussement**

A decorative corner ornament with a dark grey border and intricate white scrollwork, positioned in the lower right quadrant of the page.

A mon marie adorable

A mon bébé



A mes très chers frères





Je Dédie ce travail à

La famille Bourouda, la famille

El Majdoub et la famille Badrane

A tous ceux qui me sont trop chers et que

j'ai omis de citer.

A tous ceux qui ont contribué, de près ou

de loin à l'élaboration de ce travail.

A tous mes maîtres.



Remerciements

A notre maître et président de thèse

À notre maître et juge de thèse

Monsieur M. ZOUHDI



A notre maître et juge de thèse

Madame C. HESSISSEN



Je remercie vivement

Dr. Widad Oudaina

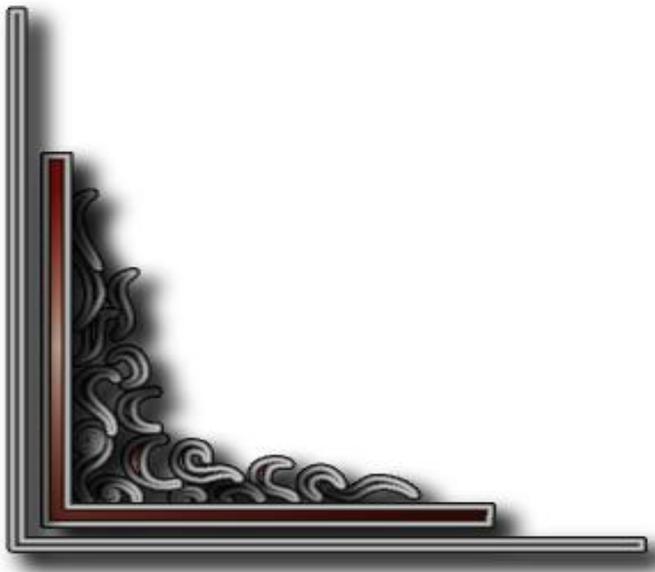
Dr. Gizlan

Je les remercie pour leur collaboration

et leur soutien

ainsi que pour leur sympathie

et leur gentillesse.





*LISTES DES
FIGURES ET
TABLEAUX*

LISTE DES FIGURES

Figure 1	structure de la cellule mycosique	Page: 4
Figure 2	Classification générale des champignons	Page: 6
Figure 3	classification des Zygomycètes	Page: 8
Figure 4	formation d'une zygospore	Page: 8
Figure 5	cycle évolutif des zygomycètes	Page: 9
Figure 6	Cycle évolutif des Ascomycètes	Page: 10
Figure 7	Présentation générale du phylum des Ascomycotina	Page: 12
Figure 8	Classification de la division des Deutéromycotina	Page: 14
Figure 9	Classification des Champignons Pathogènes	Page: 19
Figure 10	Reproduction d'une levure	Page: 20
Figure 11	Morphologie des champignons filamenteux	Page: 28
Figure 12	Différentes formes cliniques des aspergilloses bronchopulmonaires	Page: 35
Figure 13	Démarche diagnostique d'une levure au laboratoire	Page: 46
Figure 14	Démarche diagnostique d'une moisissure opportuniste au laboratoire	Page: 47
Figure 15	Historique des Antifongiques	Page: 50
Figure 16	Les sites d'action d'antifongiques	Page: 52
Figure 17	Mode d'action des polyènes	Page: 54
Figure 18	Modes d'action de la 5-fluorocytosine sur la synthèse protéique et la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN)	Page: 61
Figure 19	Mode d'action des dérivés azolés	Page: 64
Figure 20	mode d'action de la caspofungine	Page: 75
Figure 21	Schéma illustrant les facteurs de la résistance clinique	Page: 80
Figure	Principe de la dilution en milieu liquide	Page: 94

22		
Figure 23	Stockage des bandelettes	Page: 98
Figure 24	Inoculation de la boîte de pétri	Page: 101
Figure 25	l'applicateur E-test	Page: 102
Figure 26	Technique d'application des bandelettes	Page: 102
Figure 27	gabarit E-test	Page: 103
Figure 28	Microplaque FUNGITEST	Page: 107
Figure 29	Schéma illustrant la technique de préparation de l'inoculum	Page: 108
Figure 30	Schéma illustrant l'incubation	Page: 109
Figure 31	Schéma illustrant un exemple de lecture et de l'interprétation de la plaque Fungitest	Page: 109
Figure 32	Galerie ATB FUNGUS ₂ [®] , biomérieux SA Marchand S., 5(2004-2005).	Page: 111
Figure 33	Schéma illustrant le mode opératoire de la réalisation de la galerie ATB FUNGUS ₂ [®]	Page: 113
Figure 34	schéma illustrant le test Néo-Sensitabs	Page: 116
Figure 35	Méthode des disques	Page: 119
Figure 36	L'automate Carte Vitek AST-YS01 [®] .	Page: 121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Principales espèces de Candida impliquées en pathologie humaine	Page : 22
Tableau 2	Modalités du prélèvement selon la localisation dans les mycoses profondes et /ou systémiques	Page : 39
Tableau 3	Apport de l'examen direct dans le diagnostic d'une mycose profonde	Page : 40
Tableau 4	Morphologie des principaux agents de mycoses profondes cosmopolites à l'examen direct du produit pathogène	Page : 41
Tableau 5	Démarche de diagnostic mycologique	Page : 45
Tableau 6	L'amphotéricine B et formulations lipidiques. Données comparatives de toxicité et de coût	Page : 58
Tableau 7	Paramètres techniques de la macro et microdilution du CLSI	Page : 93
Tableau 8	Paramètres techniques du CLSI et EUCAST.	Page : 95
Tableau 9	Scores attribués à chaque observation de la croissance.	Page : 114
Tableau 10	comparaison des techniques d'étude des associations d'antifongiques in vitro.	Page :

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I

L'ANATOMIE DU CUIR CHEVELU ET LA PHYSIOLOGIE DU FOLLICULE PILEUX

I. Particularités anatomiques du cuir chevelu	4
I.1. Topographie	4
I.2. Différentes couches du cuir chevelu	4
I.3. Vascularisation artérielle	6
I.4. Anastomose et plan de passage des vaisseaux.....	7
I.5. Vascularisation veineuse.....	8
I.6. Drainage lymphatique	9
I.7. Innervation	10
II. Rappel physiologique du follicule pileux et cycle pileux ...	10
III. Glandes sébacées	13

CHAPITRE II

GENERALITES SUR LES CHAMPIGNONS

I. Définition	16
II. Classification des champignons	16
II.1. Classification générale des champignons	16

II.2. La classification des champignons responsables de mycoses du cuir chevelu	16
---	----

CHAPITRE III
L'ÉPIDÉMIOLOGIE DES MYCOSES DU CUIR
CHEVELU

I. Réservoir et mode de transmission	22
II. Réceptivité et facteurs favorisants	24
III. Répartition géographique et aspect épidémiologique	25

CHAPITRE IV
L'ASPECT CLINIQUE DES MYCOSES DU
CUIR CHEVELU

I. Les teignes du cuir chevelu	29
I.1. Définition	29
I.2. La clinique de l'atteinte	29
1. Les teignes tondantes	29
2. Les teignes inflammatoires (kérion de Celse)	32
3. La teigne favique ou Favus	33
II. Les candidoses et autres levures atteintes du cuir chevelu	34
II.1. Les candidoses	34
1. Définition des Candida	34
2. La clinique de l'atteinte	34
II.2. Malassezioses	36

1. Définition des malassezioses	36
2. La clinique de l'atteinte	37
3. La physiopathologie.....	39
II.3. Trichosporonoses superficielles : Piedra blanche.....	39

CHAPITRE V
LE ROLE DU LABORATOIRE DANS LE
DIAGNOSTIC DES MYCOSES DU CUIR
CHEVELU

I. Le diagnostic mycologique des mycoses du cuir chevelu .	42
I.1. Interrogatoire	42
I.2. Examen macroscopique des lésions en lumière Wood ...	42
I.3. Le prélèvement	44
1. Matériel.....	44
2. Principes généraux de prélèvements.....	44
3. Conservation des prélèvements.....	45
I.4. Examen microscopique des lésions.....	45
I.5. Culture.....	50
I.6. Identification	52
1. L'identification des dermatophytes.....	52
2. L'identification du <i>Candida spp.</i>	55
I.7. Interprétation des résultats	58
II. Autres méthodes de diagnostic.....	59
II.1. Examens anatomopathologiques	59
II.2. Examens immunologiques	59

II.1. Techniques de biologie moléculaire.....	59
---	----

CHAPITRE VI
TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE DES
MYCOSES DU CUIR CHEVELU

I. Traitement des mycoses du cuir chevelu	61
I.1. Traitement des teignes du cuir chevelu	61
I.2. Traitement des candidoses du cuir chevelu	63
I.3. Traitement des malassezioses du cuir chevelu.....	64
1. Pytiriasis capitis	65
2. Dermatite séborrhéique du nourrisson.....	65
I.4. Traitement de la Piedra blanche	66
II. Prophylaxie	66

PARTIE PRATIQUE

I. OBJECTIFS	69
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	69
III. EXAMEN MYCOLOGIQUE.....	70
1. Le prélèvement.....	70
2. L'examen direct	70
3. La culture	71
4. L'identification.....	71
IV. RESULTATS.....	73
V. DISCUSSION.....	85
VI. CONCLUSION.....	90

RESUMES

REFERENCES BIBVLIORAPHIQUES

INTRODUCTION

Au cours de ces vingt dernières années, il a été observé une très nette augmentation du nombre d'infections nosocomiales dues aux champignons pathogènes, notamment aux levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, ainsi que l'émergence d'espèces filamenteux telles que l'*Aspergillus*, les mucorales, *Fusarium*, *Scedosporium* qui sont souvent plus réfractaires aux traitements classiques. Ces agents pathogènes sont en forte recrudescence, en raison de trois principaux facteurs :

- un accroissement du nombre de patients immunodéprimés dans la population, qui correspond à une large utilisation de traitements chimiothérapeutiques toxiques, d'immunosuppresseurs dans le cas des transplantés, d'antibiotiques à large spectre, et qui correspond également à l'augmentation de patients atteints du SIDA ;
- une prise en compte plus juste des infections fongiques profondes ou superficielles notamment grâce à l'évolution des méthodes diagnostiques ;
- une émergence de plus en plus fréquente des souches résistantes aux traitements antifongiques.

La détection de la résistance de ces agents pathogènes se fait à l'aide de l'antifongigramme qui permet de déterminer la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. La fiabilité de l'antifongigramme est influencée par plusieurs paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

Actuellement, on retrouve deux techniques d'antifongigrammes dits de référence (CLSI , EUCAST) qui sont utilisés uniquement par des laboratoires

spécialisés ainsi que plusieurs autres test commercialisés parmi lesquelles on distingue le E-test et le Fungitest qui offrent une meilleure corrélation avec la méthode CLSI.

CHAPITRE 1

RAPPEL SUR LES CHAMPIGNONS

I. DEFINITION DU CHAMPIGNON

Un champignon est un organisme eucaryote uni- ou pluricellulaire, dépourvu de pigment assimilateur (chlorophylle); ce qui le distingue profondément du règne végétal. Le champignon peut rester invisible à l'oeil nu (Micromycète) sauf en cas de développement intense formant des « colonies », c'est le cas des levures et des filamenteux sur des milieux appropriés, tandis que d'autres sont toujours visibles (Macromycètes) en particulier par leur « chapeau » ou « carpophore » (organe reproducteur). Qu'ils soient macromycètes ou micromycètes, l'organisation végétative ou nutritionnelle et reproductive des champignons est la même. Rappelons ici que la nutrition du champignon se fait par absorption et non par phagocytose comme les composants du règne animal ou par photosynthèse comme chez les végétaux. Les champignons, à l'opposé des animaux, sont des êtres immobiles qui compensent cet handicap par la production d'un nombre considérable de spores [1].

II. STRUCTURE DU CHAMPIGNON [6].

Les champignons, ou mycètes, sont des végétaux eucaryotes, ce qui les différencie des bactéries. Ils sont dépourvus de pigments chlorophylliens, ceci les distingue des algues. Ils se composent d'une paroi formée de polysides, phospholipides, stérols et des molécules spécifiques au champignon (chitine, glucane), et d'une membrane complexe constituée essentiellement par des protéines, phospholipides et d'ergostérol qui entoure le cytoplasme. Ce dernier contient l'appareil de golgi et très riche en mitochondries (Figure 1).

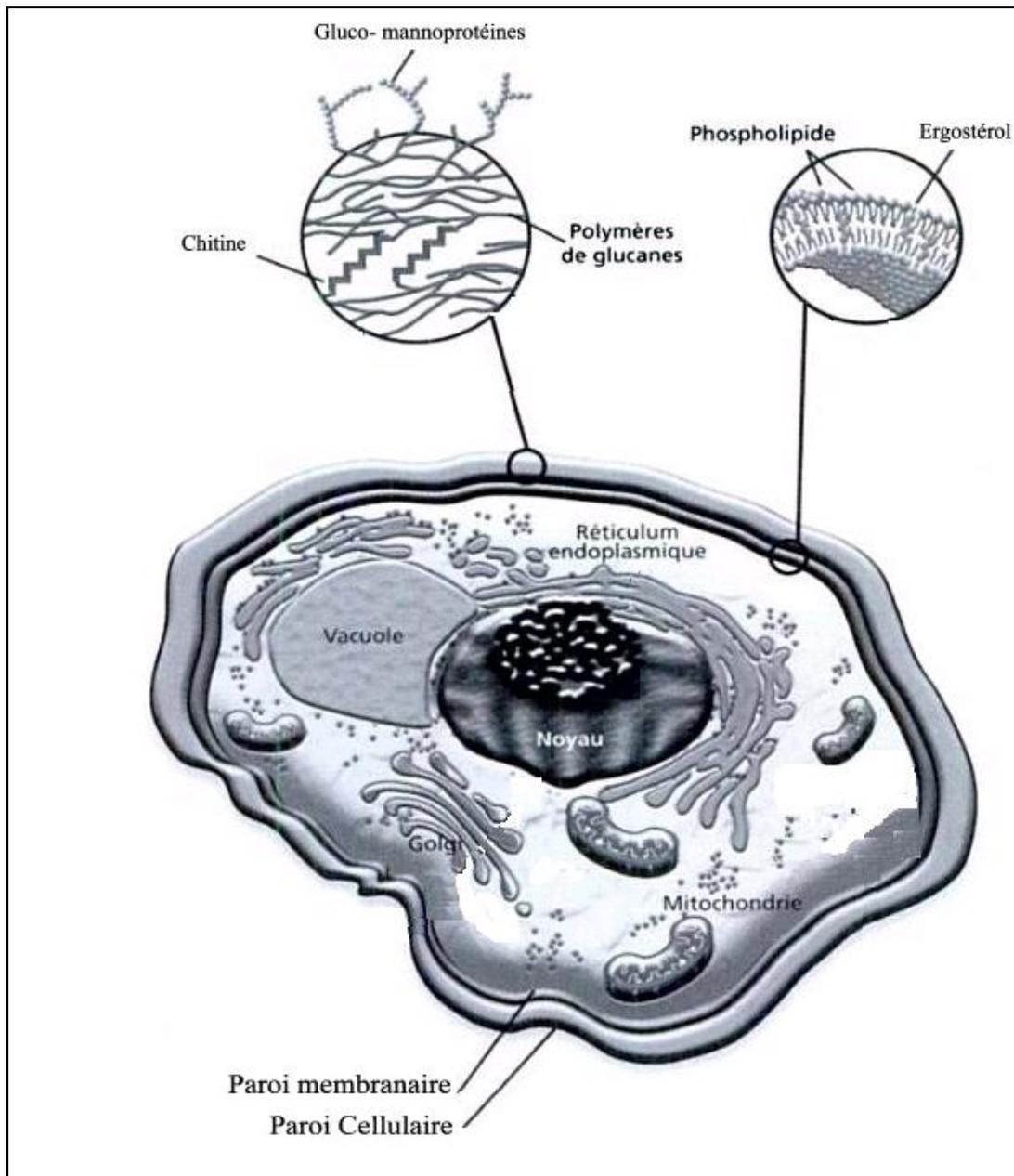


Figure 1 : Structure de la cellule mycosique [3 ;42]

La structure des champignons est constituée d'un système de filaments ramifiés appelé thalle qui n'a ni racine, ni tige, ni feuille et qui assure leur nutrition par absorption, ainsi ils sont appelés Thallophytes.

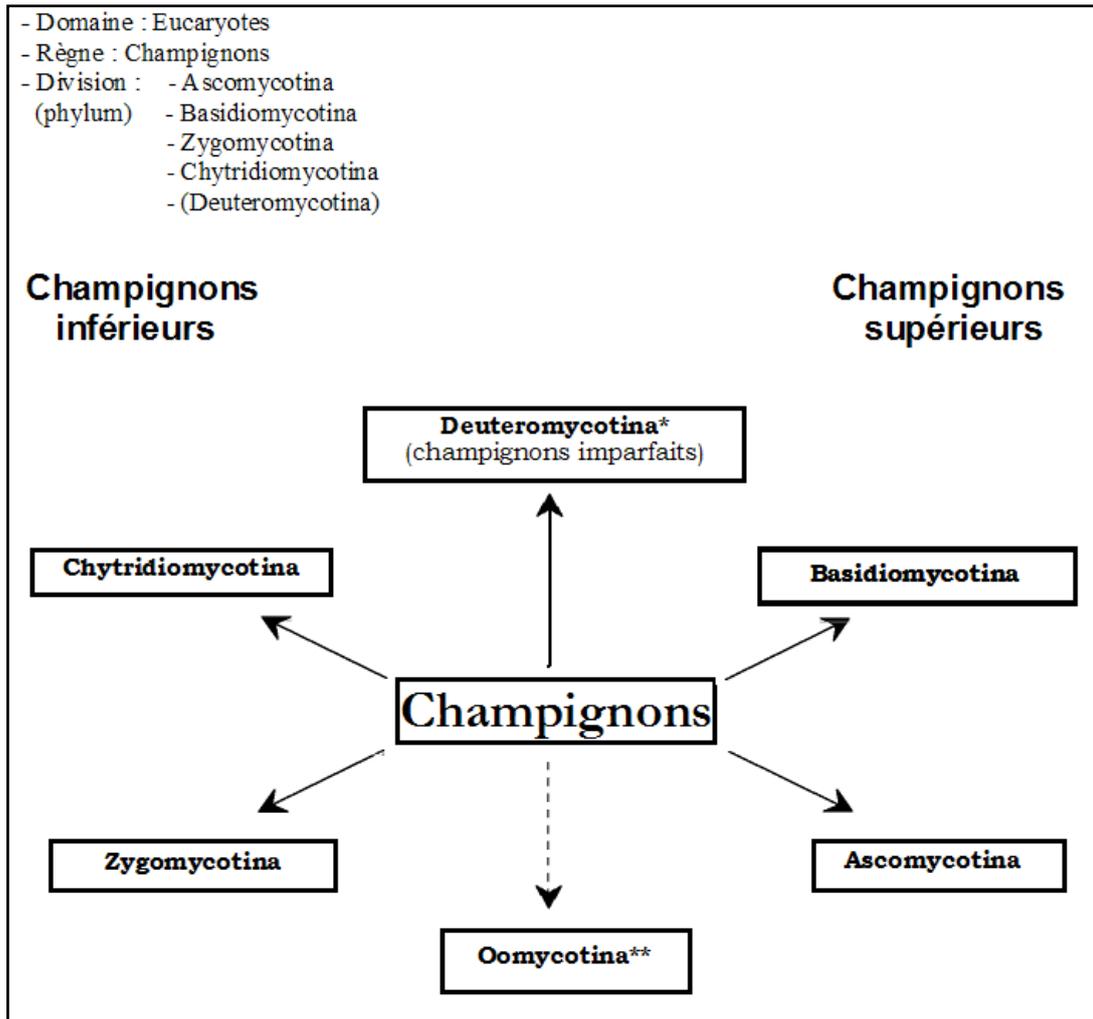
Le thalle peut se présenter sous deux aspects différents : unicellulaire, dans ce cas on les nomme levures, ou pluricellulaire, organisé en réseaux de filaments plus ou moins développés comme chez les moisissures et les champignons supérieurs.

III. CLASSIFICATION GENERALE DES CHAMPIGNONS

Le règne des champignons, ou Fungi, comprend des sous-ensembles appelés divisions ou phylums. Le nom de chaque division se termine par Mycotina, les phylums se divisent en classes, le nom de ces dernières se termine par - Mycètes, ensuite le suffixe « ale » est utilisé pour désigner les ordres, le suffixe « aceae » pour les familles. Chaque famille renferme les genres et les espèces qui représentent la base de la classification. Ainsi, Chaque champignon est identifié par un nom binomial qui débute par le genre et qui se termine par l'espèce.

L'identification des champignons est fondée principalement sur des critères morphologiques liés aux modes de reproduction. Classiquement, on distingue chez les champignons, en dehors du bouturage, deux types de reproduction, l'une étant appelée asexuée car la cellule fongique se divise par simple mitose, l'autre appelée sexuée car elle intègre un processus de fusion cytoplasmique, de caryogamie et de méiose [1].

Les classifications actuelles proposées par Kwon-Chung et Bennet (1992), Hoog et Guarro (1995), Alexopoulos, Mims et Blackwell (1996) et Sutton, Fothergill et Rinaldi (1998), se basent principalement sur ces critères morphologiques liés aux modes de reproduction (Figure 2),[12, 13, 14,15,52].



* : Champignons connus par leur stade asexué, en attente de classification.

** : Actuellement les espèces issues de cette division ne sont plus classées parmi les vrais champignons (Eufungi).

Figure 2 : Classification générale des champignons [5,25]

III.1. Mastigomycotina [25,52]

Ce phylum est rarement impliqué en pathologie humaine, ils comportent deux classes : les Chytridiomycètes et les Oomycètes, mais leur nomenclature actuelle dans le règne des champignons ne retient que les Chytridiomycètes à cause de la présence de chitine dans leur paroi ainsi que leur nutrition qui se fait par absorption.

Cette division se caractérise par la présence de spores munies de flagelles, leur nombre est variable entre les deux classes, un pour les Chytridiomycètes, deux pour les Oomycètes.

III.2. Zygomycotina [1, 17, 25, 52].

Les Zygomycotina comme les Mastigomycotina sont considérés des champignons inférieurs. Ces champignons présentent du mycélium végétatif plus large, souvent dilaté, peu ou pas cloisonné ; ces caractéristiques les différencient des autres champignons dits « supérieurs » (Ascomycotina et Basidiomycotina).

Cette division comporte deux ordres qui intéressent la pathologie humaine : les Mucorales, agents des mucormycoses et les Entomophthorales, agents des entomophthoromycoses.

L'ordre des Mucorales et plus précisément la famille des Mucoraceae nous intéressent plus particulièrement : elle est représentée par quatre genres principaux :

- *Mucor spp* : sporocystes globuleux ; pas de stolons ni de rhizoïdes. Quelques espèces sont parfois parasites (*Mucor. circinelloides*, *Mucor. racemosus*).

- *Absidia* : sporocystes piriformes ; pas de stolons : parfois des rhizoïdes (*Absidia. corymbifera*)

- *Rhizopus* : sporocystes globuleux ; filaments généralement non ramifiés qui partent des noeuds : rhizoïdes bien développés (*Rhizopus. microsporus*, *Rhizopus. oryzae*).

- *Rhizomucor* sporocystes globuleux ; filaments mycéliens très ramifiés qui partent des stolons ; rhizoïdes réduits (*Rhizomucor. pusillus*) (Figure 3).

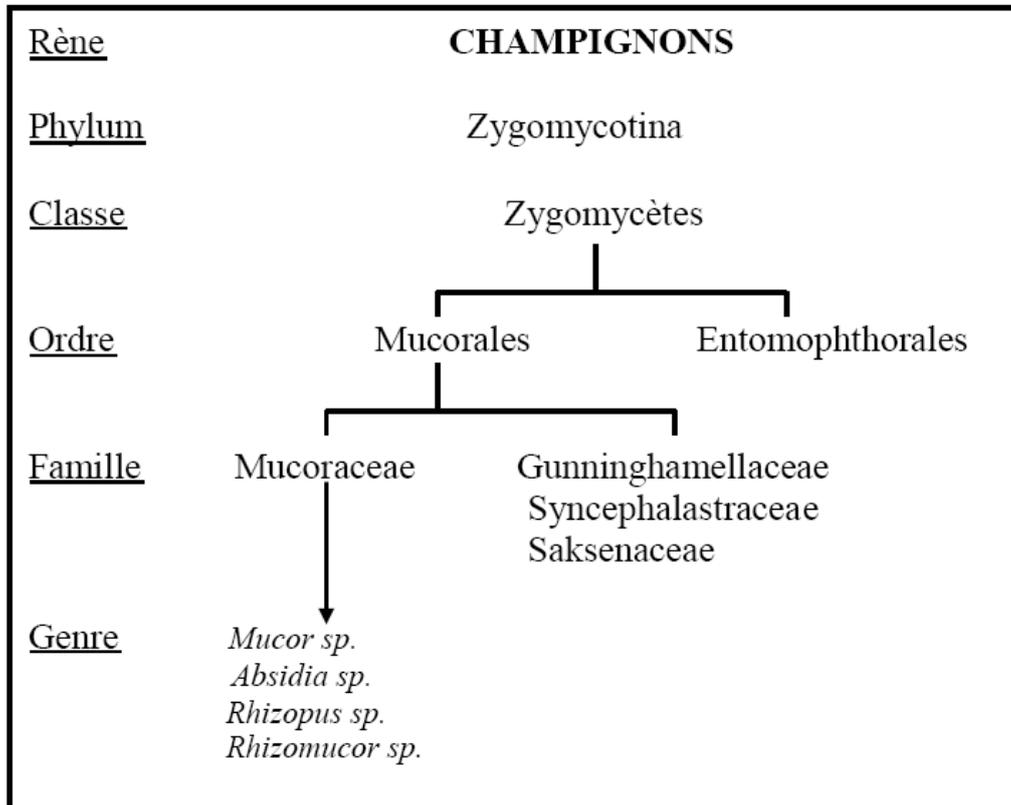


Figure 3 : Classification des Zygomycètes [25]

La reproduction asexuée se fait par des endospores non mobiles, dite endogène, tandis que la reproduction sexuée consiste en la fusion directe de deux gamétocystes en une spore enkystée ou zygospore qui donne naissance à des sporophytes par une méiose (Figure 4&5).

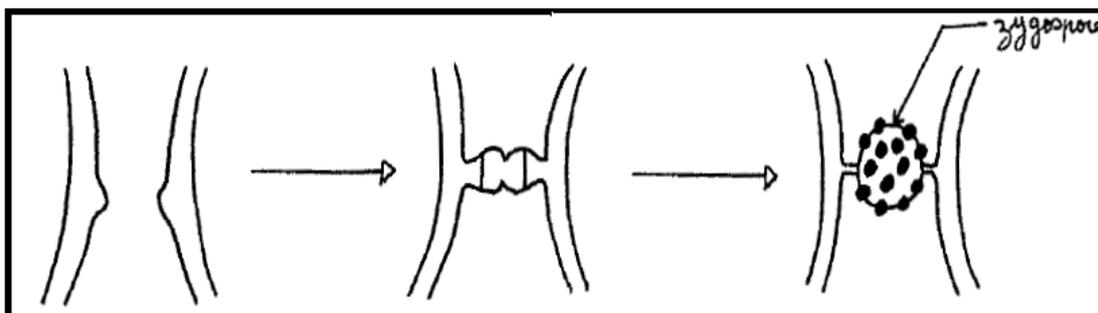


Figure 4 : Formation d'un zygospore [16]

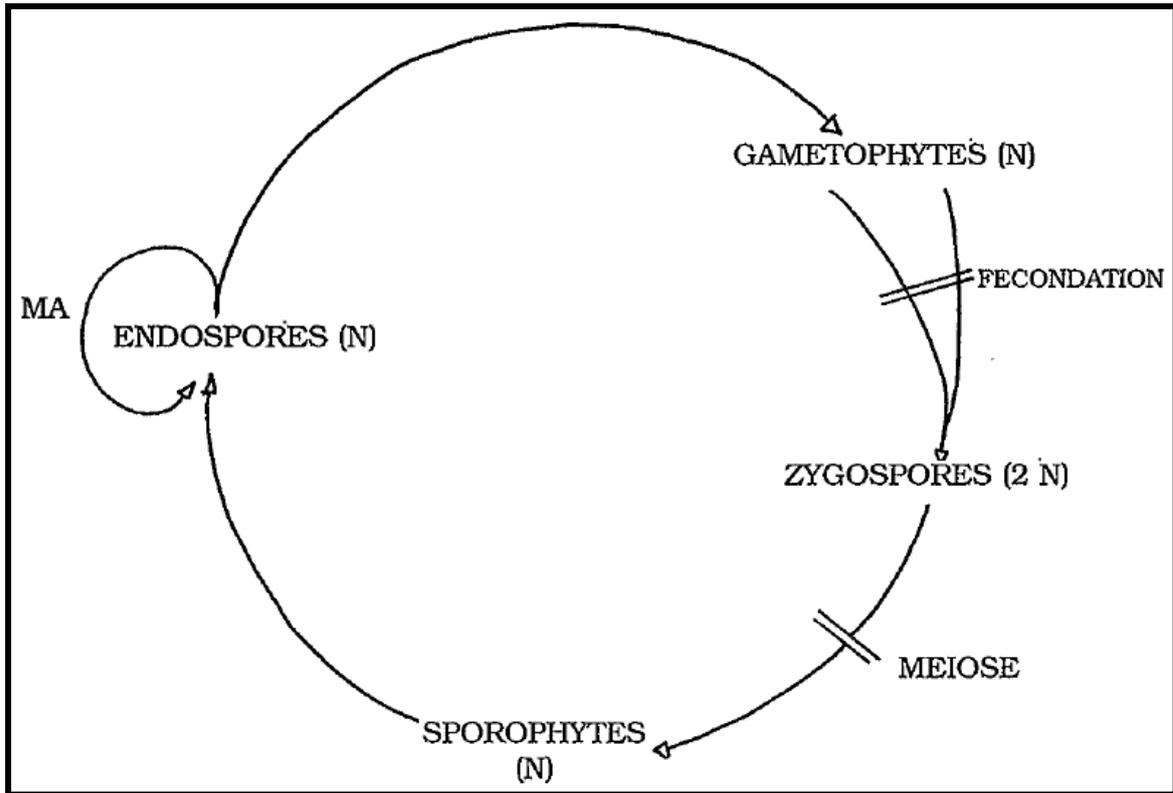


Figure 5 : Cycle évolutif des zygomycètes [16]

Chez les Mucorales, les spores sont produites à l'intérieur d'un sac appelé sporocyste, pour cette raison ces filaments porteurs de ce sac sont appelés sporocystophores. Chez les Entomophthorales, les spores asexuées sont produites à l'extrémité de filaments et sont habituellement projetées à distance, elles portent le nom de ballistospores.

III.3. Ascomycotina

C'est le phylum le plus important, il regroupe la plupart des champignons impliqués en pathologie humaine, plus des trois quarts des espèces observées chez l'Homme proviennent des ascomycètes. Ces

champignons présentent des filaments mycéliens cloisonnés à bord parallèle ; mais parfois ces mycéliens se présentent sous l'aspect de levures.

La multiplication asexuée de ce phylum se fait par des conidies (haploïdes) de formes très variées alors que la reproduction sexuée entre les gamétophytes haploïdes commence par une fusion des cytoplasmes (plasmogamie) qui conduit à la formation de dicaryons, puis se poursuit par une caryogamie (fusion des noyaux) et enfin par la méiose, aboutissant finalement à la formation d'ascospores haploïdes. Ces ascospores sont produites de manière endogène à l'intérieur d'un sac appelé asque, généralement sont octosporées (Figure 6), [1 ,17 ,25 ,52].

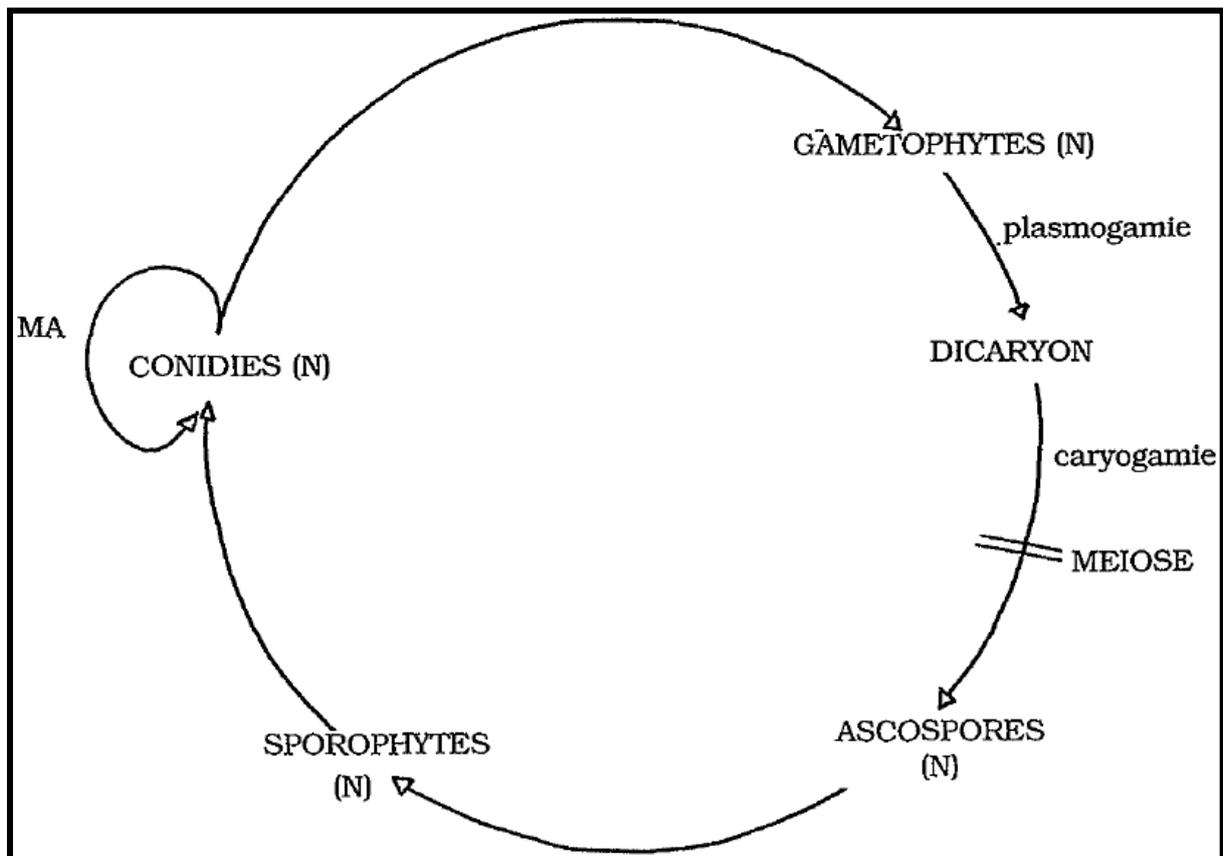


Figure 6 : Cycle évolutif des Ascomycètes [16]

La division des Ascomycotina comprend trois classes principales :

○ Les Archiascomycètes : cette classe ne comprend qu'une seule espèce *Pneumocystis jirovecii* qui est impliquée dans la pathologie humaine.

○ Les Hémiascomycètes ou endomycètes : les espèces issues de cette classe ont des asques libres non protégés, on y retrouve les levures ascosporées.

○ Les Euascomycètes ou Ascomycètes vrais : Dans cette classe les asques sont produits à l'intérieur d'un organe protecteur de forme variable appelé ascocarpe, leurs principaux ordres impliqués en pathologie humaine sont :

1. Les Onygnéales : les ascospores de cet ordre sont produites principalement dans des gymnothèces, leur reproduction asexuée s'effectue selon le type thalique solitaire.

2. Les Eurotiales : les ascospores de cet ordre sont produites dans des cleistothèces, leur reproduction asexuée s'effectue selon le type phialidique ou annellidique.

3. Les Microascales : l'ascocarpe de cet ordre est clos, il contient des asques et des ascospores brunes, leur reproduction asexuée s'effectue selon le type annellidique.

4. Les Ophiostomatales : les ascocarpes de cet ordre sont des périthèces, leur reproduction asexuée s'effectue selon le type sympodial.

5. Les Sordariales : les ascocarpes de cet ordre sont des périthèces, leur reproduction asexuée s'effectue selon le type phialidique.

6. Les Dothidéales : les ascocarpes de cet ordre sont des cléistothèces ou des périthèces (Figure 7).

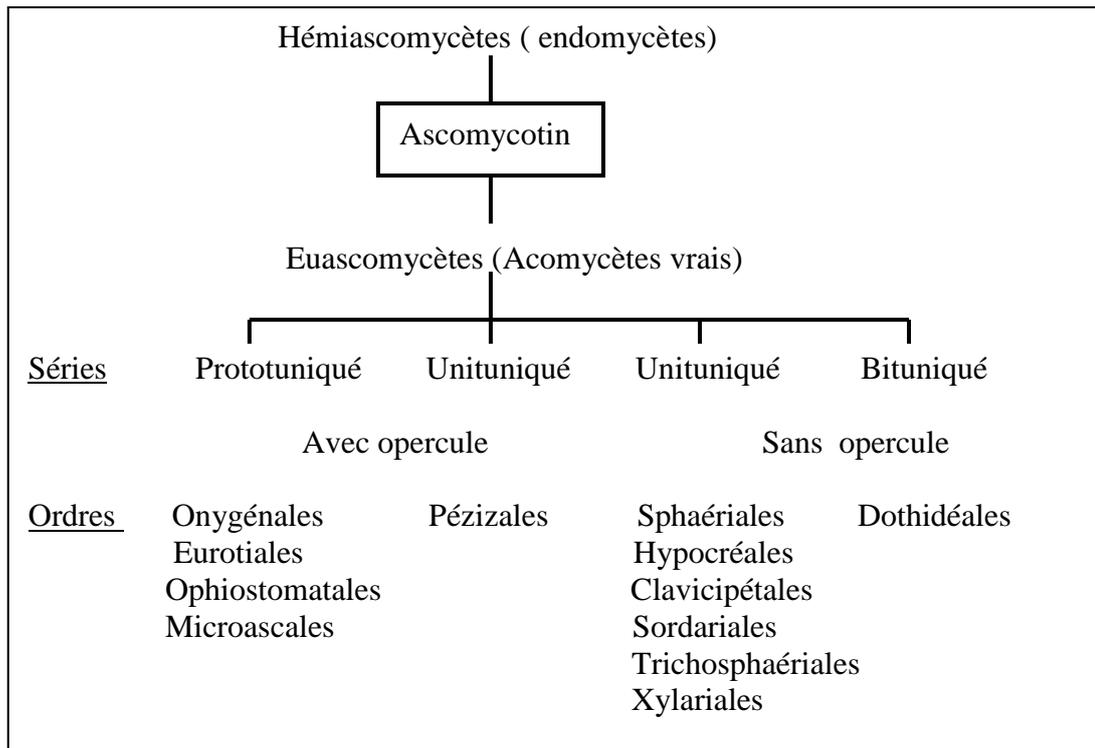


Figure 7: Présentation générale du phylum des Ascomycotina [51]

III.4. Basidiomycotina [25,52]

Ces champignons se caractérisent par la production de spores sexuées (basidiospores), formées par bourgeonnement à l'extrémité d'éléments allongés (basides), elles-mêmes disposées sur un organe de fructification (basidiocarpe). Ils ont un thalle cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons. Les cloisons des filaments mycéliens comportent le plus souvent un pore central unique de structure complexe appelée dolipore.

La division des basidiomycotina comprend deux groupes principaux : Les Hétérobasidiomycètes à basides divisées ou ramifiées et les Holobasidiomycètes, macromycètes à basides simples, mais les données

récentes, reposant sur l'ultrastructure, la biochimie et la biologie moléculaire (pigments) remettent en cause ces divisions classiques. Trois phylums sont actuellement proposés : les Ustilaginomycètes, les Urédiniomycètes et les Agaricomycètes .

La plupart des Basidiomycètes sont des saprophytes de l'environnement ou parfois des pathogènes de plantes, mais ils sont peu impliqués en pathologie humaine. Ceux qui vivent en parasitisme chez l'homme sont le plus souvent des *Cryptococcus*, notamment *Cryptococcus neoformans* dont la forme parfaite appartient au genre *Filobasidiella*. D'autres levures appartenant aux genres *Malassezia*, *Rhodotorula* et *Trichosporon* dont les formes sexuées ne sont pas connues, ont des caractères communs avec les Basidiomycètes.

III.5. Deuteromycotina [25,52].

C'est dans cette division qu'on retrouvera le plus grand nombre d'espèces d'intérêt médical. Cet ensemble, très hétérogène, englobe toutes les espèces se multipliant suivant le mode asexué. Des données récentes reposant d'une part sur la microscopie électronique, d'autre part sur la biologie moléculaire, permettent d'établir des liens étroits avec de nombreux Ascomycètes ou Basidiomycètes. En pratique, le maintien de cette division s'avère utile car beaucoup d'espèces n'expriment pas en culture leur reproduction sexuée, appelé Fungi Imperfecti ou champignon imparfait.

La division des Deutéromycotina comprend trois classes selon le mode de reproduction (Figure 8) :

➤ Les Blastomycètes qui regroupent l'ensemble des champignons levuriformes qui se multiplient par bourgeonnement.

- Les Hyphomycètes qui regroupent tous les champignons filamenteux à thalle septé dont les cellules conidiogènes (productrices de spores ou conidies) sont libres.
- Les Coelomycètes qui rassemblent les champignons filamenteux dont les cellules conidiogènes sont contenues dans des organes protecteurs appelés pycnides ou acervules.

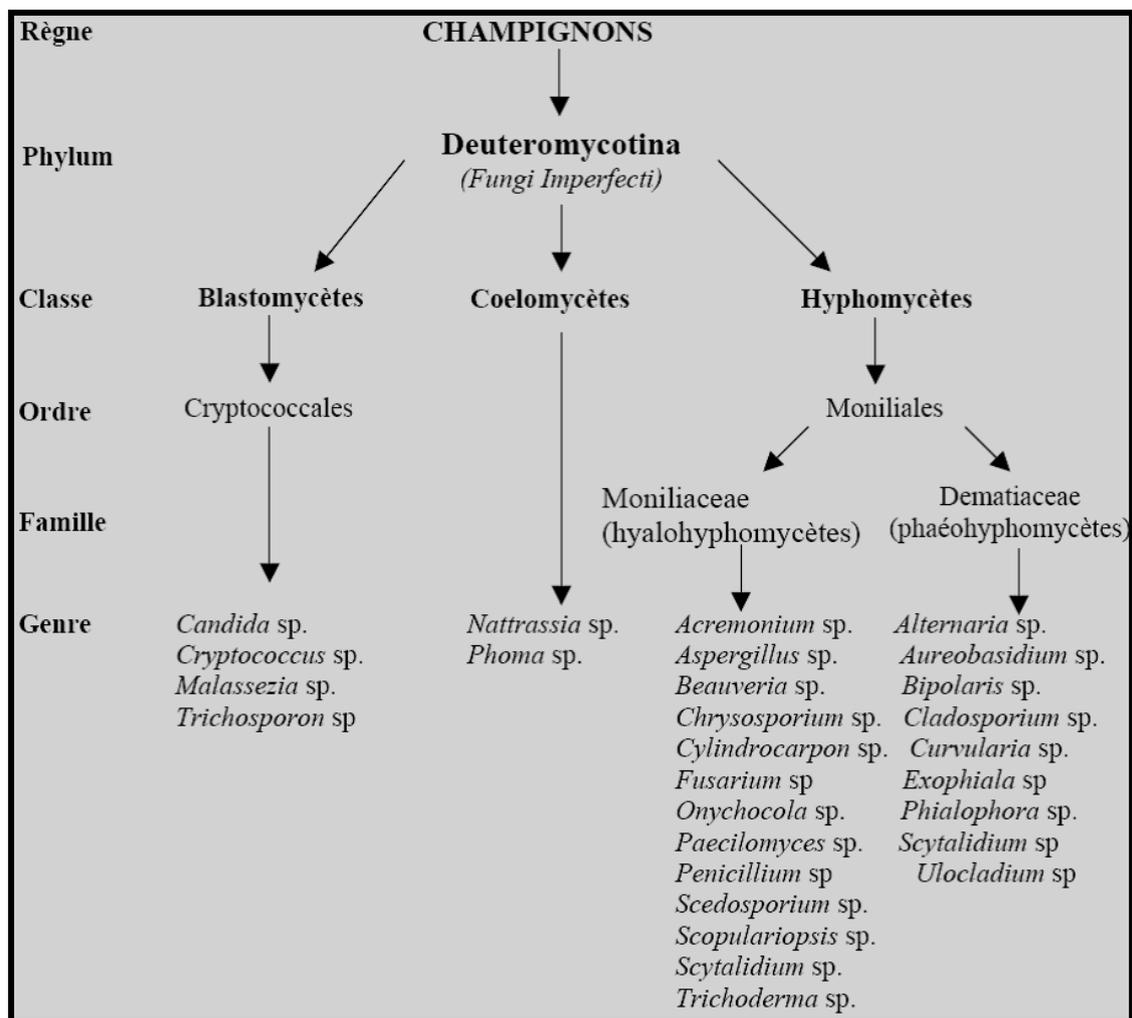


Figure 8 : Classification de la division des Deutéromycotina [25]

CHAPITRE II

CHAMPIGNONS IMPLIQUES DANS LA PATHOLOGIE

HUMAINE

I. INFECTIONS FONGIQUES

Il existe plus d'un million d'espèces de champignons regroupées en 4 000 genres environ. Plus de 500 espèces ont été décrites comme susceptibles d'être pathogènes pour l'homme, mais seule une cinquantaine d'espèces sont régulièrement isolées de prélèvements d'origine humaine, qui peuvent se manifester par des infections superficielles au niveau de la peau, des téguments et des membranes ou par des infections disséminées invasives très sévères responsables d'un taux de mortalité important chez les patients ayant un système immunitaire affaibli. Ces infections fongiques sont difficiles à diagnostiquer et à traiter. Les tests d'identification et de sensibilité pour les champignons sont beaucoup moins rapides et performants que ceux qui existent pour les bactéries. De plus, la relation entre l'efficacité clinique, les résultats de sensibilité et les concentrations sériques des antifongiques demeure inconnue. Ainsi, l'émergence de nouveaux pathogènes fongiques et le développement de résistance représentent également des facteurs importants face au défi de prolifération des mycoses invasives.

II. POUVOIR PATHOGÈNE:

Les champignons microscopiques sont responsables de mycoses, Ils sont extrêmement répandus dans la nature, mais peu d'espèces sont des pathogènes opportunistes, pour l'Homme. La localisation des mycoses, dans l'organisme, ainsi que la gravité, sont variables. On distingue :

- Les mycoses superficielles de la peau et des phanères
- Les mycoses superficielles des muqueuses
- Les mycoses sous-cutanées
- Les mycoses profondes dites systémiques

L'infectiosité d'un champignon chez son hôte est directement liée à la succession de 5 étapes primordiales qui sont : la colonisation, l'adhérence, la pénétration, la multiplication et la survie [29].

II.1. Colonisation et adhérence

Le champignon s'implante la zone de contamination, c'est-à-dire au niveau de la muqueuse respiratoire en cas d'inhalation ou de la muqueuse digestive en cas d'ingestion. La colonisation des épithéliums s'effectue grâce à ses propriétés d'adhérence ; celles-ci sont liées à l'existence d'adhésives variées, qui sont les mannoprotéines reconnaissant différents types de récepteurs de l'hôte et les ligands (protéines) présents sur les épithéliums et les endothéliums. Certaines de ces adhésives ont une affinité pour le fibrinogène : quand elles le reconnaissent, l'adhérence du champignon est nettement facilitée. Dans ces conditions, on comprend que la formation de dépôts de fibrine lors de réactions inflammatoires favorise largement l'implantation du champignon. Ces mécanismes ont été vérifiés en particulier avec les genres *Aspergillus* et *Candida*.

II.2. Pénétration dans l'organisme de l'hôte.

Il est important de différencier entre l'introduction passive du champignon (par inhalation, ingestion, traumatisme...) et sa pénétration active après colonisation de la muqueuse. Dans le cas des endomycoses, la pénétration du

champignon conduit à l'envahissement des tissus et vaisseaux sous-jacents. Elle met en jeu deux types de substances secrétées par le champignon :

- Des enzymes, qui sont des protéases (collagénases, élastases...) conduisant à l'invasion fongique grâce à la destruction des tissus. Dans le cas de *Candida albicans*, on a pu prouver que ces enzymes étaient responsables de la virulence du champignon ; par contre, pour *Aspergillus fumigatus*, on a montré que certaines souches rendues déficientes en diverses protéases spécifiques ne perdaient pas leur virulence.

- Des toxines, comme la gliotoxine synthétisée par *Aspergillus fumigatus*, dont on pense qu'elle perturbe la synthèse des cytokines. Par ailleurs, d'autres toxines inhiberaient la fonction macrophagique ou auraient un effet immuno-dépresseur sur la réponse cellulaire de l'hôte.

Enfin, on a pu mettre en évidence, dans certains cas, un transfert passif des champignons par les macrophages, du foyer initial vers d'autres viscères.

Après pénétration dans l'organisme, un champignon peut rester quiescent chez le porteur, c'est le stade saprophyte. Dans certaines circonstances ou sous la pression de différents facteurs, ces champignons vont développer chez l'hôte une maladie : il y a passage du stade saprophyte au stade pathogène.

II.3. Survie et multiplication du champignon chez l'hôte.

Pour proliférer, le champignon doit rencontrer des conditions de température, de pression et d'humidité favorables à son développement, ainsi que des nutriments (en particulier du fer).

Pour survivre, il doit par ailleurs avoir la capacité d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte.

C'est le cas lors de:

- la synthèse de toxine immuno-modulatrices ou immuno-suppressives,
- la présence d'une capsule comme chez *Cryptococcus neoformans*.

III. LES PRINCIPAUX FACTEURS INCRIMINÉS [2].

III.1. Les facteurs intrinsèques (facteurs dépendants de l'hôte) :

Ces facteurs peuvent être :

- d'ordre physiologique :

- Age extrême : vieillard et nouveau - né
- Grossesse (augmentation de presque 30% des candidoses)

- d'ordre pathologique :

- Hémopathies malignes (surtout les leucémies)
- Diabète
- Endocrinopathies
- Déficit acquis de l'immunité (Sida).

III.2. Les facteurs extrinsèques (facteurs iatrogènes) :

- Il s'agit surtout de la prise de médicaments :
 - Anti-infectieux : antibiotiques, antituberculeux...
 - Oestroprogestatifs
 - Immunosuppresseurs
 - Corticoïdes, antimitotiques
- Ou autre tels que :
 - Cathéterisme veineux ou artériels
 - Sondage vésicale ou gastrique
 - Chirurgies cardiaques, pulmonaires, osseuses
 - Transplantations d'organes, transfusions sanguines...

-vaccins

La pénétration dans l'organisme se fait en général par trois voies principales:

- la voie cutanée pour les dermatophytes
- la voie des muqueuses, pour les candidoses
- la voie pulmonaire, pour les aspergilloses, pneumocryptoses.

IV. LES PRINCIPAUX CHAMPIGNONS IMPLIQUES DANS LA PATHOLOGIE HUMAINE [2].

En mycologie médicale, ces champignons sont classés en trois grands groupes distincts, selon des critères morphologiques (tel que le genre ou l'espèce), (Figure 9).

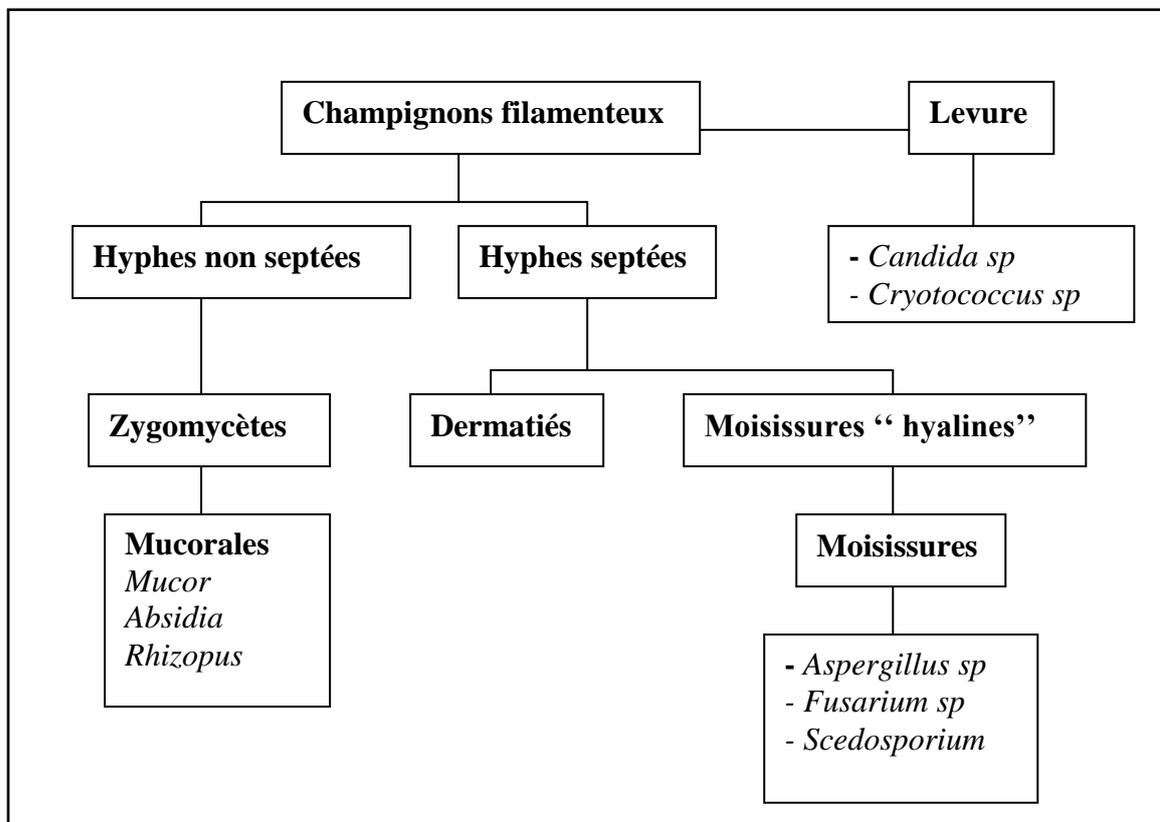


Figure 9: Classification des Champignons Pathogènes [4]

Ces champignons peuvent être :

- des champignons filamenteux
- des champignons levuriformes (levures)
- ou des champignons dimorphiques

IV.1. Les levures ou champignons lévuriformes

IV.1.1. Définition [2].

Une levure est constituée d'une cellule, élément de base, qui se reproduit par bourgeonnement unique ou multiple.

Dans certains cas ce bourgeonnement s'allonge générant une expansion qu'on appelle pseudo filament (figure n° 10).

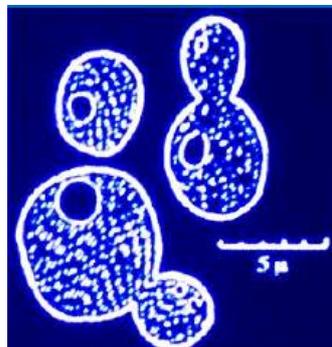


Figure 10 : Reproduction d'une levure

IV.1.2. Principales levures potentiellement pathogène de l'Homme.

A. *Candida* [19, 20, 21, 67,68]

A.1. Généralités

Les levures représentées essentiellement par les *Candida*, sont des micro-organismes commensaux, endo ou exogènes, diversement adaptés au parasitisme et dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants, dits « facteurs de risques », locaux ou généraux.

Les souches de *Candida* représentent la principale cause des infections fongiques nosocomiales (80 %) peuvent produire une grande variété d'infections, allant des infections légères mucocutanées aux infections invasives affectant un organe.

Il existe au-delà de 150 espèces de *Candida*, parmi les espèces de *Candida* non *albicans* on cite (*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondi*, *Candida famata*, *Candida lusitaniae*, *Candida norvegensis*, etc, mais seul *Candida albicans* est responsable de la majorité des infections (Tableau n° 1).

Cette levure vit normalement en saprophyte dans l'intestin humain ou animal en se nourrissant de matières organiques en décomposition. Elle est généralement sans danger, tant que l'équilibre bactérien qui contrôle sa multiplication n'est pas altéré. Dans certaines conditions, elle peut se multiplier de manière excessive et envahir tout l'appareil digestif (bouche, intestin, anus). Après dissémination par voie sanguine, elle peut même se propager dans tout l'organisme (bronches, peau, vagin, etc...) sous forme de muguet ou de mycoses.

Tableau 1 : Principales espèces de Candida impliquées en pathologie humaine [69].

Espèce	Fréquence	Etat saprophyte	Manifestation clinique	Remarque
<i>Candida albicans</i>	+++	Tube digestif	Candidoses cutanéomuqueuses Candidoses digestives et urinaires	
<i>Candida glabrata</i>	++	Tube digestif Voies génito-urinaires	Vaginites Candidose urinaire Candidémies, candidosessystémiques	Plus fréquent en cancérologie Souches résistantes au fluconazole
<i>Candida parapsilosis</i>	++	Peau	Candidémie, infections liées aux cathéters, solution contaminées Endocardite du toxicomane	Fréquemment en cause dans les candidémies du nouveau-né
<i>Candida tropicalis</i>	+	Sol, végétaux, eau	Vaginites Candidémies, candidoses systémiques	Plus fréquent en oncohématologie
<i>Candida krusei</i>	++	Produits laitiers, bière	Vaginites Candidémies	Résistance au fluconazole
<i>Candida guilliermondii</i>	+	Produits alimentaires	Endocardites candidoses systémiques	
<i>Candida kefyr</i>	+	Produits laitiers	candidoses systémiques	
<i>Candida lusitaniae</i>	+	Tube digestif d'animaux	Candidoses systémiques Candidémies	Sensibilité moindre et résistance à l'amphotéricine B
<i>Candida dubliniensis</i>	+		Candidoses orales chez les patients infectés par le VIH Candidémies	Souches résistantes au fluconazole
<i>Candida rugosa</i>	+	Eau, produits laitiers	Candidémies liées aux cathéters	
<i>Candida norvegensis</i>	+	Aliments	Candidémies	
<i>Candida zeylanoides</i>	+	peau	Candidémies	
<i>Candida lipolytica</i>	+	Milieu extérieur	Candidémies liées aux cathéters	Levure peu virulente
<i>Candida famata</i>	+		Candidémies	

A.2. La symptomatologie clinique [22].

Les manifestations cliniques liées aux candidoses invasives ne sont pas spécifiques et se résument souvent à une hyperthermie résistante aux antibiotiques, accompagnées d'une altération de l'état général dans environ 80 % des cas avec un syndrome inflammatoire dans un contexte multi-pathologique chez des patients sous antibiothérapie à large spectre. Une hyperleucocytose est rencontrée dans 50 % des cas. D'autres signes cliniques peuvent se manifester tels que l'eczéma, la séborrhée, le psoriasis, l'acné, les onychomycoses, les mycoses du pied ainsi des manifestations cutanées des candidoses systémiques considérées comme des métastases prenant l'aspect de papulopustules uniques ou multiples et siégeant préférentiellement au tronc et aux extrémités. De même, des manifestations oculaires liés aux candidoses systémiques sont à rechercher systématiquement en cas de candidémies, l'aspect typique réalisé au fond d'oeil est celui de nodules rétiens blanchâtres ou jaunâtres, duveteux. Enfin, d'autres localisations de candidoses disséminées, plus rares, peuvent exister comme des localisations cardiaques, ostéoarticulaires (douleurs articulaires et musculaires) ou neurologiques se manifestent par des troubles du comportement : dépression, anxiété, fatigue chronique, maux de tête, avec un troubles du sommeil (difficulté d'endormissement), de la concentration (mémoire, volonté en baisse) et de l'humeur (irritation, inquiétude, agressivité, insatisfaction...), ces différentes localisations nécessitent un bilan.

La candidurie peut être un signal d'alarme devant faire évoquer la possibilité d'une candidose disséminée en particulier chez un patient immunodéprimé. La candidurie est le plus souvent asymptomatique, chez un porteur de sonde (80 % des candiduries).

La candidose hépatosplénique est une forme particulière de candidose systémique évoluant sur le mode chronique, elle s'observe chez des patients ayant une leucémie aigüe dont la maladie est en rémission après une chimiothérapie. Ce syndrome est associé à une fièvre rebelle aux antibiotiques, hépato et/ou splénomégalie et douleurs abdominales.

- Troubles digestifs se manifestent par des colites intestinales avec gaz, ballonnements, démangeaisons anales, diarrhées et constipations, accompagnés d'un trouble du comportement alimentaire alcoolisme, boulimie, besoin accru à consommer le sucre (chocolat, gâteaux...), les graisses saturées (charcuterie, fromage...) et les boissons alcoolisées.
- Fatigue progressive et inexplicée avec sommeil médiocre et récupération insuffisante.
- Allergies aggravées (cutanée, respiratoire ou alimentaire) et des mycoses ;
- Problèmes gynécologiques : champignons vaginaux répétitifs (pertes blanches et démangeaisons), inflammations glandulaires (glandes de Bartolin) kystes et endométriose; cystite et infections rénales.
- Problèmes respiratoires : asthme, bronchite.
- Problèmes auriculaires, endocriniens (thyroïde).

B. *Cryptococcose* [70].

B. 1. généralités

La *cryptococcose* est une infection fongique cosmopolite opportuniste d'évolution subaigüe ou chronique, due à une levure capsulée : *Cryptococcus neoformans*. On distingue deux variétés : *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* correspondant aux sérotypes A et D, et *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* correspondant aux sérotypes B et C. Ils sont associés à ces deux

variétés, deux formes sexuées classées parmi les basidiomycètes et appelées respectivement, *Filobasidiella neoformans* et *Filobasidiella bacillospora*. D'autres espèces sont plus rarement incriminées en pathologie humaine, ce sont *Cryptococcus albidus* et *Cryptococcus laurentii*.

La variété *neoformans*, est une variété cosmopolite inféodée aux fientes d'oiseaux (pigeons) et aux chauves-souris. La contamination se fait généralement par inhalation des poussières virulentes contenant les spores du champignon, plus rarement par voie transcutanée lors d'un traumatisme tellurique.

La variété *gattii* est localisée aux régions tropicales ou subtropicales, elle n'est pas isolée du sol et sa niche écologique est surtout constituée par les forêts d'*Eucalyptus camaldulensis* et *E. terreticornis*. Pour l'anecdote, en Australie, ce sont les fécès de koala se nourrissant de feuilles de cet eucalyptus, qui contiennent la variété *gattii*.

B.2. La symptomatologie clinique

La variété *neoformans* se rencontre surtout chez les patients immunodéprimés. Les patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), avec un taux de lymphocytes CD4 effondré, contractent la cryptococcose dans 10 à 30 % des cas selon les séries publiées. La cryptococcose est la mycose systémique observée le plus fréquemment au cours du sida, représentant la troisième cause d'infection opportuniste du système nerveux central après la toxoplasmose et les encéphalites virales (cytomégalovirus (CMV) et VIH)

Le pronostic d'une cryptococcose est directement lié à l'atteinte du système nerveux central. L'infection se présente en général sous la forme d'une

méningoencéphalite fréquemment torpide à l'occasion de laquelle sont souvent découvertes d'autres localisations (pulmonaire, urinaire, prostatique, ostéoarticulaire ...).

- **Méningoencéphalite** :

En effet, *Cryptococcus neoformans* envahit non seulement les méninges, mais aussi tout le parenchyme cérébral. La symptomatologie est variable : céphalées et fièvre modérée sont les signes les plus fréquents (> 70 % des cas), vertiges, irritabilité, troubles de l'idéation, crise convulsive, obnubilation, voire coma, paralysie d'un nerf crânien, plus rarement déficit moteur peuvent apparaître dans 20 à 50 % des cas selon les séries, y compris chez des patients sans facteurs de risque. L'existence de troubles de conscience est associée à un risque élevé de mortalité précoce.

- **Atteinte pulmonaire**

L'atteinte pulmonaire peut également être découverte dans le cadre du bilan de dissémination après diagnostic d'une méningite cryptococcique.

La symptomatologie est généralement modérée et non spécifique (toux avec ou sans expectoration, vague douleur thoracique, fièvre modérée ou absente, amaigrissement), mais il existe des formes cliniques avec détresse respiratoire aiguë imposant des mesures de réanimation d'urgence.

- **Atteinte urinaire et prostatique**

La localisation urinaire est particulièrement importante à rechercher chez les hommes ayant une infection à *Cryptococcus neoformans*, puisqu'un gîte prostatique mal stérilisé a été incriminé dans les rechutes de l'infection cryptococcique.

- Atteintes ostéoarticulaires

Les atteintes ostéoarticulaires sont rares. Elles peuvent concerner tous les os et se manifestent par des douleurs locales, parfois associées à des abcès ossifluants ou à des localisations cutanées. Elles surviennent chez les sujets séropositifs et séronégatifs pour le VIH.

- Autres localisations

Toutes les localisations peuvent se voir : ganglionnaire, hépatique, cardiaque avec endocardite, péritonéale avec ascite positive au cours d'une cirrhose éthylique, oculaire, musculaire. Les levures peuvent également être isolées de selles sans que des localisations tissulaires (intestinales) soient identifiées.

IV.2. Les champignons filamenteux

IV.2.1. Définition [2].

Les champignons filamenteux sont identifiés généralement sur les caractères morphologiques de leur reproduction non sexuée qui a pour finalité la pérennité d'une espèce. En produisant des spores appelées aussi conidies. Elles peuvent être de formes et de tailles très variables. Ces spores sont des organes de résistance et de dissémination à partir desquelles naît un filament qui va se développer puis se diviser en se ramifiant et va constituer un enchevêtrement de filaments formant le mycélium. Elles peuvent naître directement du filament ou à partir d'organes spécialisés (phialides, sporocystes...).

Dans certains cas, un filament spécialisé appelé conidiophore porte ces organes de reproduction. Dans la majorité des espèces, les filaments sont cloisonnés (figure n°11).

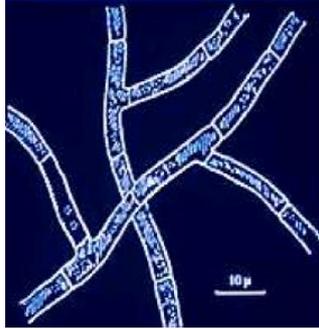


Figure 11 : Morphologie des champignons filamenteux

IV.2.2. Principaux champignons filamenteux potentiellement pathogènes pour l'Homme.

A. Les Mucorales [71, 72, 73].

A.1. Généralités

Les Mucorales sont des champignons cosmopolites très répandus. Saprophytes du sol humide riche en azote, sur les matières organiques en décomposition où ils se nourrissent à partir de végétaux, de céréales ou d'excréments, ils contaminent fréquemment les denrées alimentaires (fruits, légumes...). Certaines espèces sont des pathogènes de plantes et d'insectes, d'autres espèces sont utilisées en industrie agroalimentaire pour des préparations culinaires ou dans des processus de fermentation. L'inhalation des spores est la porte d'entrée la plus commune; de même, la pénétration transcutanée consécutive à un traumatisme (brûlures, écrasement des membres lors d'accidents de la circulation), à un cathétérisme ou à une injection (insulinothérapie, toxicomanie ...), voire à une piqûre d'insectes, est aussi observée. En milieu hospitalier (unités de soins intensifs), on rapporte des observations où la contamination provenait de pansements adhésifs infectés ou

d'abaisse-langues également souillés. Les principales espèces en cause sont *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus Rhizopodiformis*, *Rhizopus microsporus*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*. Les *Mucor* sont en revanche moins fréquemment impliqués (*Mucor racemosus*, *Mucor circinereus*).

A.2. La symptomatologie clinique.

Les Mucorales sont en effet de redoutables opportunistes notamment chez les sujets diabétiques et les patients atteints d'hémopathies malignes. Ils peuvent également être rencontrés chez les transplantés comme chez les sujets atteints de sida au stade terminal. Ils sont à l'origine d'infections cutanées (surtout chez les grands brûlés), mais aussi des atteintes viscérales (rhinocérébrales, pulmonaires, digestives, rénales ...).

Les Mucorales ont une forte capacité d'angio-invasion expliquant leur pouvoir de dissémination par voie hématogène et leur aptitude à entraîner une nécrose ischémique des tissus infectés. L'expression clinique caractéristique est l'atteinte rhinocérébrale.

L'infection par les Mucorales débute au niveau de la muqueuse nasale ou sinusienne puis s'étend aux tissus avoisinants jusqu'au système nerveux central ; les signes cliniques usuels de la phase initiale sont, avec une fréquence variable, de la fièvre, des douleurs, des sécrétions nasales purulentes ou hémorragiques. Selon l'extension anatomique, il s'y associera une escarre nasale ou palatine, une cellulite gangreneuse de la face ou périorbitaire, une exophtalmie, une atteinte des nerfs oculomoteurs, du trijumeau ou du nerf facial, une perte de la vision par thrombose des vaisseaux rétiniens et des troubles de la conscience associés ou non à des signes neurologiques focaux.

Les autres localisations primitives sont pulmonaires qui surviennent préférentiellement, sur un terrain d'immunodépression sévère (hémopathie maligne, greffe de moelle ou d'organe) même si de telles formes sont également possibles au cours d'un diabète ou d'une insuffisance rénale ; et localisations gastro-intestinales. L'aspect typique est celui d'une plaque tout d'abord décolorée puis nécrotique éventuellement ulcérée ; ou cutanée. La dissémination multiviscérale est fréquente et pratiquement toujours synonyme d'évolution fatale.

B. *Aspergillus* [23, 24, 25, 27,28].

B.1. généralités

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites très abondants dans l'environnement, ils se développent en saprophytes sur la matière organique en décomposition, dans le sol, les denrées alimentaires, et les céréales. Ils sont présents dans l'environnement humain, notamment dans les fleurs, les aiguilles de conifères, les grains moisissés, les foin, dans le terreau des plantes, les fientes de pigeon, les fruits, la poussière et l'air ; A partir de ces réservoirs les spores aspergillaires sont disséminées dans l'atmosphère et peuvent pénétrer à la faveur des courants d'air dans l'habitat et dans les hôpitaux, y séjourner et y proliférer si les conditions sont favorables. On trouve de 1 à 20 spores par mètre cube et nous inhalons entre 10 à 30 spores par jour.

Les *Aspergillus* sont également des pathogènes opportunistes. Les mycoses provoquées par *Aspergillus* sont appelées des aspergilloses. On répertorie plus de 185 espèces, dont une vingtaine sont impliqués dans des pathologies humaines. Leur développement chez l'hôte nécessite en effet l'existence de conditions favorables locales (caverne tuberculose, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathie chronique obstructive, emphysème, dilatation des bronches

...) ou générales (corticothérapie prolongée, hémopathie maligne, chimiothérapie, sida ...). En outre, des facteurs environnementaux (abondance des spores aspergillaires dans l'air inhalées lors de la manipulation de fumier, de foin moisi) ou des facteurs liés au champignon (taille des spores aspergillaires, thermotolérance, facteurs de virulence) contribuent à la fréquence de la pathologie aspergillaire.

- De ce fait, *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus pathogène, responsable d'environ 80 à 90 % des aspergilloses humaines invasives responsable d'aspergillose broncho-pulmonaire, d'asthme aspergillaire, d'aspergillomes, d'aspergilloses profondes. Toutefois, d'autres espèces sont également rencontrées en mycologie médicale citons, par ordre décroissant de fréquence, *Aspergillus flavus* qui élabore divers antibiotiques et des composés très toxiques et carcinogènes, *Aspergillus niger* est une espèce très utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour la production d'acide citrique, mais aussi d'autres acides organiques. Cette espèce peut être, pathogène pour l'homme, responsable d'aspergillose du conduit auditif, productrice d'ochratoxine, *Aspergillus terreus* est utilisé en raison de ses activités cellulolytique, lipolytique et amylolytique pour la production d'acide itaconique à partir du sucre de canne ou de betterave, *Aspergillus nidulans* qui peut provoquer des atteintes respiratoires (asthme, aspergillose bronchopulmonaire). *Aspergillus versicolor* il est souvent isolé de prélèvements cutanés, il peut être responsable d'onxyxis et d'aspergillose pulmonaire, il est exceptionnellement retrouvé dans les tissus profonds chez les immunodéprimés, et plus rarement *Aspergillus repens*.

- Certaines espèces peuvent produire des mycotoxines comme les aflatoxines (par *Aspergillus flavus* ou l'ochratoxine (*Aspergillus ochraceus*,

Aspergillus carbonarius). *Aspergillus fumigatus* peut produire un grand nombre de composés plus ou moins toxiques (gliotoxine).

B.2. La symptomatologie clinique [23, 27,73, 74].

Le spectre clinique est extrêmement varié. Ces champignons sont en effet à l'origine de mycoses profondes résultant d'une inoculation traumatique, mais surtout de l'inhalation de spores, sont également fréquentes. En effet, les *Aspergillus* sont principalement des pathogènes respiratoires car la contamination aspergillaire se fait le plus souvent par l'inhalation de spores, ce qui explique que la localisation préférentielle de l'aspergillose soit pulmonaire. La colonisation de l'arbre respiratoire par des spores aspergillaires peut être favorisée par la contamination dans des locaux hospitaliers en raison de la proximité de travaux. Ils sont ainsi à l'origine de sinusites ou de surinfections bronchiques au cours des broncho-pneumopathies chroniques obstructives, et la colonisation des voies aériennes participe à l'altération de la fonction respiratoire chez les enfants atteints de mucoviscidose. Outre *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* est aussi fréquemment retrouvé chez ces jeunes patients. Par ailleurs, cette espèce, qui est aussi impliquée dans l'aspergillose invasive, est habituellement résistante à l'amphotéricine B.

En milieu rural, la pathologie aspergillaire chez le sujet non immunocompétent est dominée par l'aspergillome, cette infection est dû à la colonisation par *Aspergillus* d'une cavité pulmonaire, bronchique, voire pleurale préexistante, du fait d'une diminution de l'immunité locale au niveau de la cavité (telle qu'une caverne tuberculeuse ou une bulle d'emphysème), d'une modification de sa muqueuse et de la présence d'une bronche de drainage.

L'*Aspergillus* se développe sous forme d'une boule fongique appelée truffe aspergillaire. Mais les formes cliniques les plus graves sont observées chez les patients fortement immunodéprimés, notamment chez les patients sous chimiothérapie pour préparation à la greffe allogénique de moelle osseuse. L'infection aspergillaire revêt alors un caractère invasif (aspergillose pulmonaire invasive) il présente une évolution très rapide et souvent fatale.

Le pouvoir pathogène des *Aspergillus* se manifeste selon les trois processus suivants :

1. Sensibilisation de type allergique ou immunologique évoluant sans prolifération du micro-organisme :

➤ Asthme aspergillaire(AA) : Il s'agit rarement d'une monosensibilisation à *Aspergillus*, cet allergène est plus fréquent dans les asthmes du milieu agricole.

➤ Alvéolite allergique extrinsèque (AAE) : Ils sont dus à une exposition répétée à des concentrations importantes d'*Aspergillus*. Il existe un facteur probablement génétique, cette affection ne touchant qu'une partie des gens exposés. Il s'agit d'une hypersensibilité de type III et IV à *Aspergillus* avec une réaction semi retardée 6 à 8 heures après l'inhalation

➤ Aspergillose broncho-pulmonaire allergique(ABPA) : est due à une colonisation bronchique par *Aspergillus*, favorisée par des anomalies sévères de la clairance mucociliaire (asthme chronique,mucoviscidose...), qui va déclencher, chez certains patients, des réactions d'hypersensibilité de type I, III, voire IV, et un syndrome inflammatoire responsable de séquelles : bronchectasies,fibrose. Cette maladie évolue par exacerbations avec une fréquence de 4 à 14 % chez l'asthmatique corticodépendant, 6 % chez les patients atteints de la mucoviscidose.

2. Colonisation d'une cavité préformée avec développement fongique local : aspergillome pulmonaire ou sinusien. Les hémoptysies sont la traduction clinique essentielle des aspergillomes pulmonaires dus à des ulcérations vasculaires par une toxine nécrosante.

3. Infection proprement dite avec prolifération mycélienne dans les organes atteints. L'exemple le plus courant et le plus redoutable est la pneumopathie aspergillaire du malade leucémique dont le tableau clinique se traduit le plus souvent par une fièvre à 38,5 °C résistante à l'antibiothérapie, parfois accompagnée de toux, dyspnée, douleurs thoraciques et hémoptysies apparaissant après quinze jours d'aplasie chez le patient leucémique et à partir du deuxième mois chez le patient allogreffé de moelle osseuse.

La radiologie est contributive dans le diagnostic de l'aspergillome : image de « grelot » surmonté du croissant gazeux. Le scanner thoracique objectivant le signe du « halo » est l'examen clé du diagnostic précoce de l'aspergillose pulmonaire invasive (API). L'image peut évoluer vers le signe du croissant gazeux, témoin d'une excavation et de la formation d'un aspergillome. L'observation d'infiltrats hétérogènes plus ou moins excavés est fréquente (Figure 12).

➤ Aspergillose pulmonaire invasive (API) :

C'est une complication infectieuse majeure de l'immunodéprimé, responsable d'une mortalité de plus de 50 %. Ses facteurs favorisants sont la neutropénie profonde (< 500/mm³) prolongée (> 15 j), et les immunosuppresseurs : corticoïdes... Elle touche principalement les malades traités pour hémopathies : 5 % des leucémies aiguës, 10 % des allogreffés de moelle osseuse, les greffés d'organe (rein < 2 %, coeur 5 %, foie 2 à 10 %, poumon 8,4 %), les patients

porteurs d'un sida évolué (CD4 < 50), des patients sous corticoïdes ou sous immunosuppresseurs pour bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), maladie de système... Son origine peut être extrahospitalière ou nosocomiale.

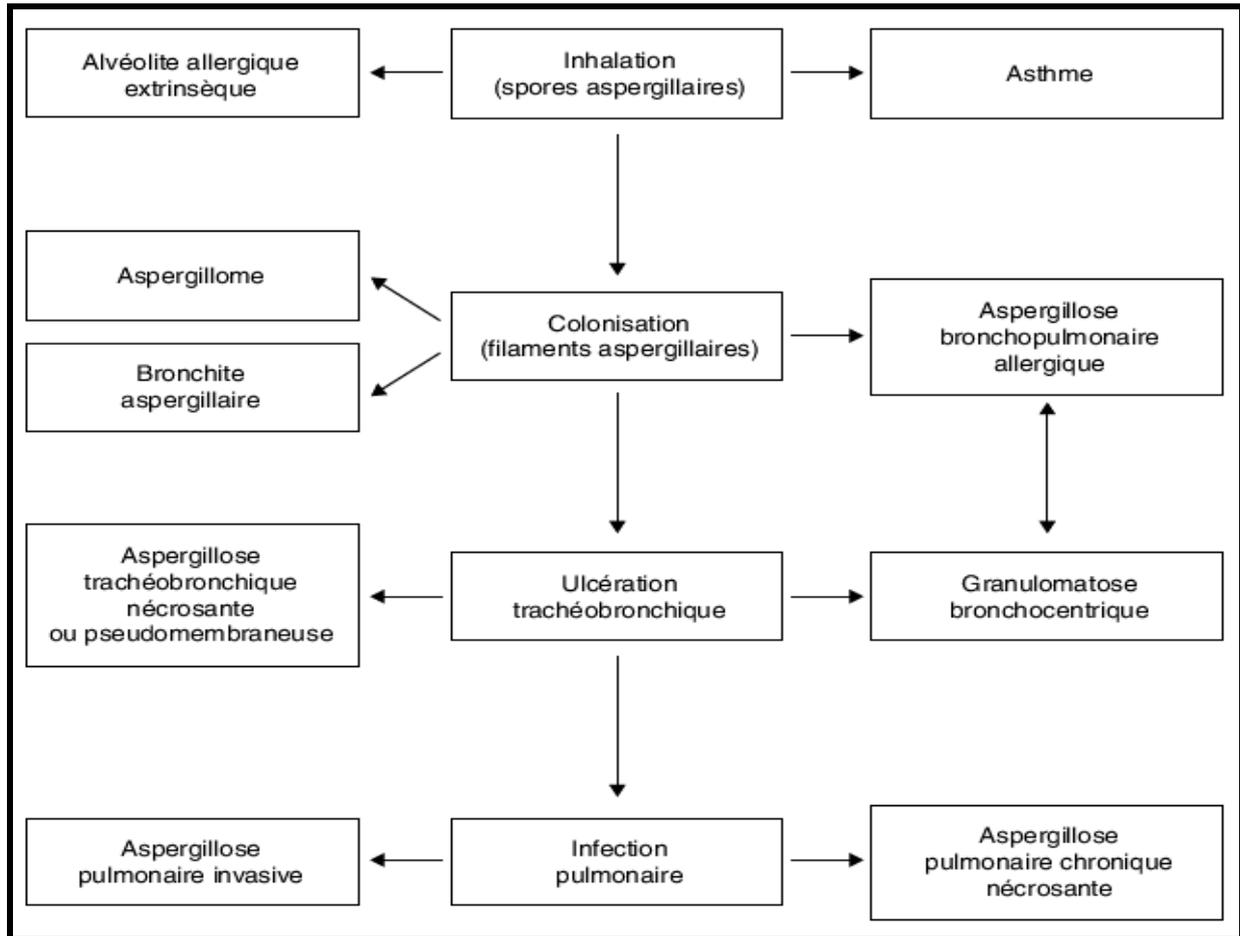


Figure 12 : Différentes formes cliniques des aspergilloses bronchopulmonaires.

➤ Aspergillose trachéobronchique nécrosante ou endomembraneuse :

L'aspergillose trachéobronchique nécrosante ou pseudomembraneuse est une infection de la muqueuse plus ou moins invasive pouvant se compliquer d'aspergillose pulmonaire invasive, d'obstruction bronchique par les pseudomembranes, d'hémoptysies, de fistulisation dans le médiastin. Elle

survient le plus souvent chez des patients immunodéprimés : transplantés pulmonaires, syndrome de l'immunodéficience acquise (sida), hémopathies. Les signes révélateurs sont la fièvre, la toux, les hémoptysies, la dyspnée.

➤ Aspergillose pulmonaire chronique nécrosante :

Il s'agit d'une infection d'évolution prolongée favorisée par une immunodépression modérée (diabète, cirrhose, traitement par immunosuppresseurs, corticothérapie...) et par des facteurs locaux (bronchopneumopathie obstructive chronique, fibrose, pneumonie radique, sarcoïdose stade IV...).

C. *Fusarium* [73,75]

C. 1. Généralités

Les *Fusarium* sont des champignons cosmopolites. On distingue plus de 40 espèces largement répandues dans la nature et vivant en saprophytes. Certaines sont des phytopathogènes et beaucoup produisent des mycotoxines contaminant les denrées alimentaires et provoquant alors des maladies graves chez les herbivores (mycotoxicoses). Le pouvoir pathogène des *Fusarium* ressemble à celui des *Aspergillus*. *In vitro* il apparaît clairement que les *Fusarium* sont résistants à la flucytosine, à la rifampicine, aux triazolés de première génération (fluconazole, itraconazole). La sensibilité à l'amphotéricine B est réduite avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées aussi bien pour l'amphotéricine B conventionnelle que pour ses formes liposomales. Parmi les nouvelles molécules, le voriconazole apparaît prometteur ; il existe cependant une variabilité dans les CMI obtenues en fonction de l'espèce, *Fusarium solani* étant l'espèce la moins sensible. Parmi les autres dérivés azolés en cours

d'évaluation, le posaconazole est sans doute le plus efficace. En revanche, la caspofungine n'exerce aucune activité vis-à-vis des *Fusarium*.

C.2. La symptomatologie clinique.

Certaines espèces sont à l'origine de kératites consécutives à un traumatisme, d'onxyis des mains ou des pieds (porte d'entrée dans l'organisme), plus rarement sous nos climats de mycétomes. Les *Fusarium* colonisent volontiers des brûlures étendues. Par ailleurs, ces champignons sont de plus en plus souvent impliqués dans des affections systémiques surtout chez les sujets atteints d'hémopathies malignes, notamment *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum*. D'autres espèces plus rares sont isolées de lésions profondes chez le leucémique neutropénique, par exemple *Fusarium chlemydosporum*, *Fusarium moniforme* et *Fusarium napiforme*. De même, les *Fusarium* sont à l'origine de péritonites chez les patients dialysés. Enfin, chez les patients cancéreux, les *Fusarium* arrivent en seconde position avec les *Trichosporon* parmi les pathogènes fongiques inhabituels. Comme pour l'*Aspergillus*, le facteur de risque majeur est une neutropénie profonde et prolongée (durée moyenne 45 jours) ou un traitement à base de corticoïdes. Les *Fusarium* ont une meilleure diffusion sanguine que les *Aspergillus*, d'où leur isolement à partir des hémocultures au cours de formes septicémiques. Les septicémies à *Fusarium* se traduisent aussi par des lésions cutanées sous forme de papules au centre nécrotique.

D. *Scedosporium* [73,76]

Les *Scedosporium* sont de redoutables pathogènes. Ils arrivent en troisième position (après les *Aspergillus* et les *Fusarium*) par ordre de fréquence dans les mycoses humaines.

On individualise deux espèces :

D.1. *Scedosporium piospermum* :

C'est un champignon tellurique, présent principalement dans les sols enrichis de débris organiques (litières animales, fumiers) et dans les eaux boueuses et polluées. Il détermine par inoculation traumatique de spores, des mycétomes à grain blanc, des lésions cutanées ou sous-cutanées, mais aussi des arthrites chroniques invalidantes touchant les articulations des doigts, de la main, des poignets ou des genoux en regard de la zone d'inoculation. Il est aussi incriminé dans des atteintes oculaires consécutives à un traumatisme (kératites et enophtalmies post-traumatiques) ou dans des localisations viscérales chez l'immunodéprimé (endocardites, méningites, ostéomyélites, abcès cérébraux). L'immunodépression n'est cependant pas toujours retrouvée dans ces formes systémiques. Comme chez les *Aspergillus*, cependant *Scedosporium apiospermum* peut aussi être à l'origine d'atteintes respiratoires (sinusites, tumeurs pulmonaires). Par ailleurs, il est de plus en plus fréquemment isolé dans la mucoviscidose, le plus souvent en association avec un *Aspergillus*. Enfin, sa responsabilité dans le déclenchement d'une bronchopneumopathie allergique est aussi admise.

D. 2. *Scedosporium prolificans* (ex *Scedosporium inflatum*):

C'est une espèce redoutable, thermophile. Ce champignon est à l'origine d'arthrites, de sinusites et d'endocardites.

V. LE DIAGNOSTIC MYCOLOGIQUE

V.1. Les prélèvements

Le diagnostic repose sur un prélèvement de qualité, il doit être effectué dans des conditions aussi stérile que possible afin d'éviter toute contamination

de l'environnement. Les modalités du prélèvement dépendent de la localisation des lésions (Tableau n° 2).

Tableau n° 2 : Modalités du prélèvement selon la localisation dans les mycoses profondes et /ou systémiques [77].

Localisation	Prélèvement	Conditionnement	Délai maximal d'acheminement	Conservation si traitement différé
Cutanée ou sous cutanée : -pustules, abcès... -nodules sous-cutanées	Ecouvillonnage biopsie	-Recueil avec un écouvillon stérile -Recueil en flacon stérile	24h	4°C
Broncho-pulmonaire	-Lavages bronchiolo-alvéolaire -Aspiration bronchique, crachats	-Recueil en flacon stérile	24h	4°C
- pleurale -Articulaire -Péritonéale	-Ponction pleurale -liquide de ponction -liquide de dialyse -redons, drains	-Recueil en flacon stérile	24h	4°C
Cérébrale	-Ponction lombaire	-Recueil en flacon stérile	2h	Traitement immédiat
septicémies	-sang -Cathéters centraux	-Hémoculture fongique -Recueil en flacon stérile	Consignes spécifiques 24h	Consignes spécifiques 4°C
Tissus profonds (foie...)	-biopsiement	-Partager le prélèvement en deux : -un flacon stérile pour la mycologie -un flacon avec fixateur pour l'examen anatomopathologique	2h	Traitement immédiat

V.2. L'examen direct [77,78].

L'examen direct est la première étape de diagnostic biologique en mycologie. Il est facilement réalisé à l'aide d'une observation directe au microscope d'un prélèvement qu'on dépose entre lame et lamelle à l'état frais ou avec une goutte de liquide de montage (bleu lactique, encre de chine). Cet

examen peut également être réalisé par l'observation au microscope d'un fragment de biopsie coloré au May-Grunwald-Giemsa et au Gomori-Grocott, placé sur lame.

L'examen direct permet d'affirmer la nature fongique d'une infection. Ainsi, on peut observer les levures isolées ou avec des filaments, comme on peut observer uniquement des filaments de diamètres variables, cloisonnés ou non, ou des éléments fongiques particuliers (Tableau n° 3 et n° 4).

Tableau 3 : Apport de l'examen direct dans le diagnostic d'une mycose profonde [78].

Eléments observés	Caractéristiques	Diagnostic évoqué
Levures isolées	-rondes, taille variable (2-10) μm capsule à l'encre de chine - taille et forme variables	- <i>Cryptococcus (neoformans)</i> -Levure type <i>Candida</i> (<i>Candida glabata</i>)
Filaments	- cloisonnés, diam : 2 μm avec ou sans levures - cloisonnés, diam : 3-6 μm ramifiés à angle aigu avec paroi claire - non cloisonnés, diam : 8-15 μm ramifiés à angle droit	- <i>Candida sp</i> Hyalohyphomycètes - <i>Aspergillus sp</i> - <i>Fusarium sp</i> - <i>Scedosporium sp</i> Zygomycètes - <i>Absidia</i> - <i>Mucor sp.</i> - <i>Rhizopus sp.etc</i>

Tableau 4 : Morphologie des principaux agents de mycoses profondes cosmopolites à l'examen direct du produit pathogène [78].

	Agents de mycoses	Taille	Aspect à l'examen direct
Filamenteux	hyalohyphomycètes	- <i>Aspergillus spp</i> 3 à 6µm ^a - <i>Fusarium spp</i> 2 à 8µ m ^a - <i>Scedosporium spp</i> 2 à 6µm ^a	- Filaments cloisonnés, fins, réguliers, ramifications dichotomiques à angle aigues. - Filaments cloisonnés, fins, +/- réguliers, ramifications dichotomiques à angle droits. - Filaments cloisonnés, fins, +/-réguliers, irrégulièrement ramifiés parfois formes arrondies.
	Zygomycètes	- <i>Rhizopus spp</i> , <i>Absidia spp</i>	-Filaments larges et irréguliers, peu ou pas septés, irrégulièrement ramifiés
Levures	- <i>Candida non glabrata</i>	3 à 8 µm ^b	-Blastospores et filaments mycéliens (mycélium vrai ou pseudomycélium)
	- <i>Candida glabrata</i>	3 à 6µm ^b	-Blastospores, pas filaments
	- <i>Cryptococcus neoformans</i>	3 à 6µm ^b	-Blastospores rondes avec une capsule vue en négatif (encre de chine ++)
^a Largeur des filaments ^b Diamètre des éléments			

V. 3. La culture [94]

La culture est obligatoire pour préciser l'identification et pour pouvoir réaliser un antifongogramme. Elle nécessite l'utilisation de milieux spéciaux. Ils sont aérobies strictes ou aérobies facultatifs, on utilise des milieux solides. Le pH est légèrement acide. Tous les milieux doivent apporter des matières azotées, des facteurs de croissance et des glucides. Le milieu de base utilisé est le milieu Sabouraud. Lorsque le prélèvement est monomicrobien, on utilise un Sabouraud seul. Alors que celui qui est polymicrobien, la culture est faite sur un milieu

sélectif pour champignons (Sabouraud additionné du Chloramphénicol ou de Gentamicine). Ce milieu peut être supplémenté d'un antifongique (Actidione), afin d'éviter la pousse des champignons saprophytes.

V. 4. L'identification

L'identification des espèces de levures ou de Champignons filamenteux permet d'adapter la thérapeutique et de préciser le mode de contamination. Elle se fait sur des caractères morphologiques (macro- et microscopiques) et/ou physiologiques (vitesse de croissance, besoins vitaminiques, utilisation et fermentation du sucre).

> **Identification des Levures :** La phase d'identification des Levures, notamment de celles du genre *Candida*, doit tenir compte de l'éventualité de l'association de deux, trois, voire quatre espèces ou plus dans un même échantillon biologique (ces associations sont liées à la fois à l'augmentation du nombre de patients atteints de pathologies et/ou soumis à des traitements déterminant la prolifération des levures, et à la prescription au long cours d'antifongiques favorisant des levures naturellement peu sensibles à ces molécules, par exemple *Candida glabrata*, *Candida krusei* ...).

Classiquement, la détection de ces associations passe par un repiquage sur milieu de Sabouraud contenant du triphényl-2, 3,5-tétrazolium, substance que chaque espèce est plus ou moins apte à réduire en fournissant un composé coloré. Les colonies prenant des teintes différentes (du blanc au rouge violacé) doivent être considérées comme autant de souches d'espèces différentes, qui seront repiquées et identifiées séparément. Récemment, la détection de ces associations a pu bénéficier de la mise au point de milieux contenant des

chromogènes, teintant plus ou moins les colonies de couleurs particulières de certaines souches, sans pour autant permettre l'identification spécifique précise.

L'identification de *Candida albicans* passe par la révélation d'au moins un des deux caractères suivants formation de chlamydospores caractéristiques, 24 à 48 heures après repiquage en stries profondes (anaérobiose) sur des milieux pauvres en sucres et tensio-actifs (PCB Pomme de terre - Carotte - Bile; RAT Riz - Agar -Tween); filamentation en sérum : (blastèse) à température de 37° C en trois heures.

L'identification spécifique des autres espèces de *Candida* nécessite l'étude de certaines propriétés physiologiques de la levure, en particulier son aptitude à assimiler divers sucres «auxanogramme » ou à les fermenter «zymogramme ».

L'identification spécifique par agglutination de particules inertes sensibilisées par des anticorps monoclonaux est en cours d'évaluation. Outre par sa mise en évidence à l'état parasitaire par l'examen direct.

> Identification des champignons filamenteux :

En pratique, la morphologie microscopique des organes de reproduction asexuée est le critère majeur d'identification spécifique des champignons filamenteux. Le milieu glucosé d'isolement de Sabouraud favorise la croissance du mycélium de ces champignons, mais non leur sporulation. Par conséquent, il est nécessaire de repiquer les colonies sur milieux d'identification non glucosés qui stimuleront la fructification des organes sporigènes (par exemple « têtes » aspergillaires) et des spores (par exemple micro- et macroconidies des dermatophytes). Les principaux critères d'identification des Champignons filamenteux sont:

- le délai d'apparition des colonies et la vitesse de leur croissance;

- la thermotolérance du Champignon et son optimum thermique de croissance;
- les caractères macroscopiques des colonies : forme (plane, bombée, cérébriforme, ...), consistance (poudreuse, duveteuse, cotonneuse, dure, élastique, ...), couleur (recto et verso), ... ;
- les caractères microscopiques: mycélium (diamètre, régularité, ramifications, arthrospores, chlamydospores, ...), organes sporigènes conidiophores et vésicules, phialides, ...), spores (abondance, dimensions, morphologie, coloration, segmentation, ...), ornementations du mycélium (nœuds, vrilles, chandeliers, ...) (Tableau 5).

V.5. Les étapes du diagnostic mycologiques au laboratoire [77].

Tableau 5: Démarche de diagnostic mycologique

Démarche de diagnostic mycologique	Remarque pratiques
Prélèvement	Acheminement rapide au laboratoire
Préparation du produit biologique	Homogénéisation des urines Fluidification par Digest-Eur (crachat ou broncho-aspiration visqueuse) Broyage au potter pour biopsie hémoculture
Examen direct	Etats frais (bleu lactique, encre de chine), frottis, apposition sur lame Coloration (noir chlorazole, May Grunwald Giemsa, Gomori-Grocott) Immunofluorescence direct (Pneumocystis jirovecii)
Examen anatomo-pathologique	Coloration (HES, bleu alcian, mucicarmin) Immunomarquage Confirmation de mycose profonde
culture	-Milieux gélosés en boite -Milieux sabouraud+chloramphénicol ou gentamicine (pas de cycloheximide) -Milieux chromogènes -Milieux spéciaux (gélose au malt, gélose au sang)
Numération des formules fongiques	Résultats en CFU par ml (en nombres de colonies pour les autres prélèvements)
identification	Intérêts des techniques d'identification rapide (milieux chromogènes, test d'agglutination) Dépistage des associations de levures Repiquage souvent nécessaire
Etude de la sensibilité aux antifongiques	Réalisée principalement pour des levures isolées de prélèvements profonds Pas de pratique courante pour les champignons filamenteux
Interprétation	-patient immunodéprimé : toute espèce sera prise en compte -patient non immunodéprimé : nécessité d'une confrontation clinico-biologique

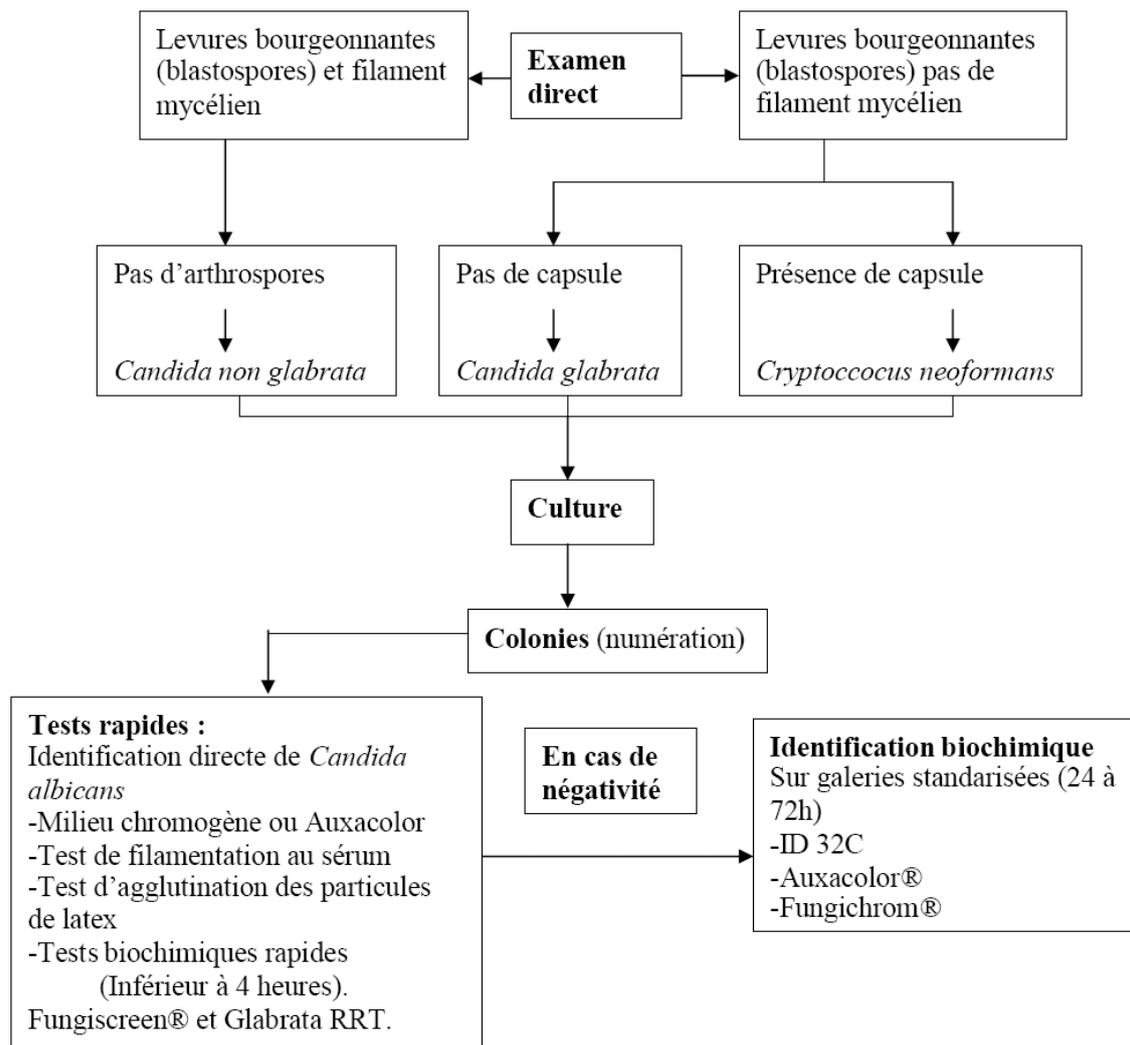


Figure 13: Démarche diagnostique d'une levure au laboratoire

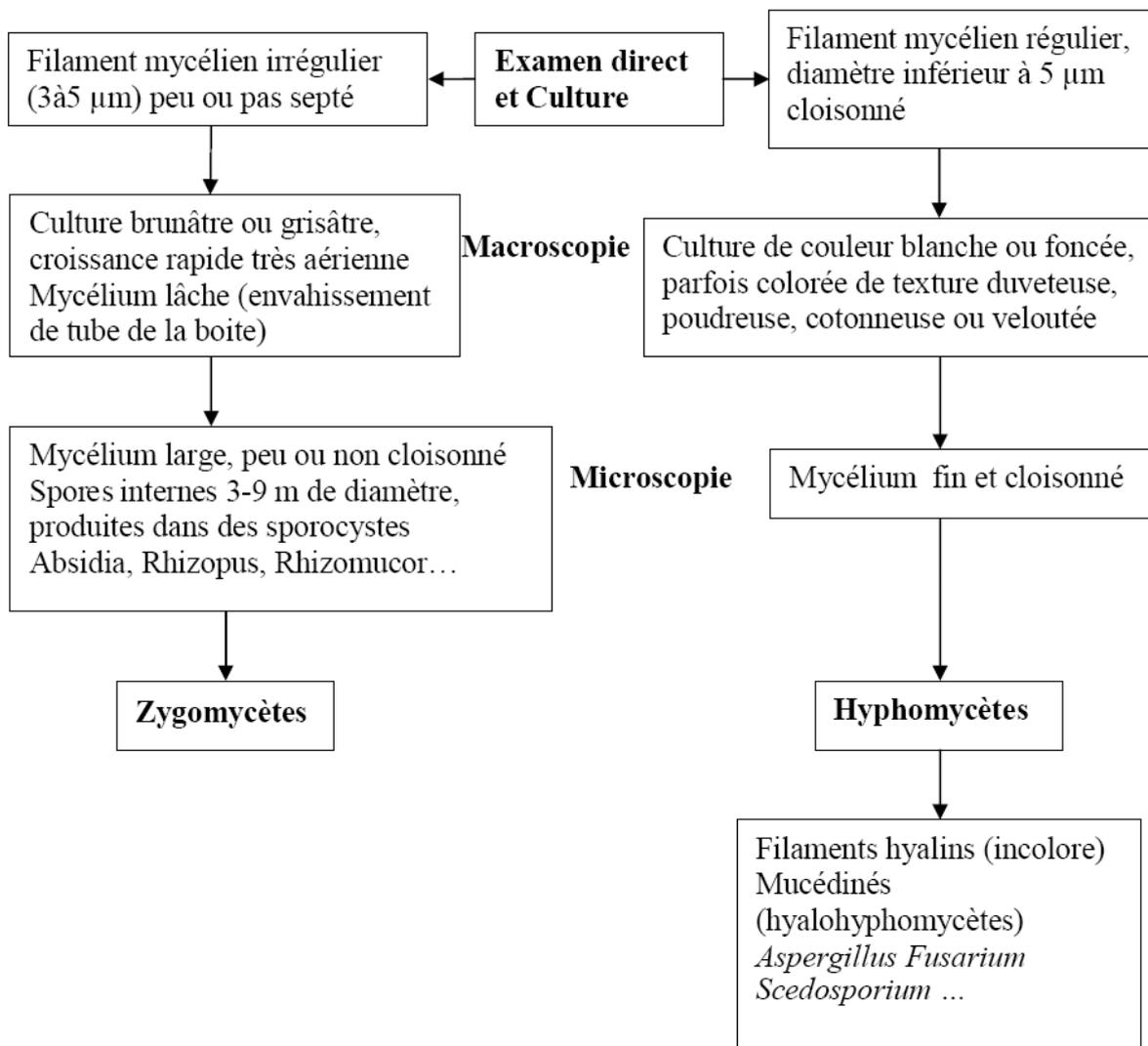


Figure 14 : Démarche diagnostique d'une moisissure opportuniste au laboratoire

CHAPITRE III

LES ANTIFONGIQUES

I. DEFINITION

Les antifongiques sont des drogues, capables d'inhiber spécifiquement les différents champignons isolés en mycologie médicale et responsables de lésions plus au moins graves [6].

L'action des antifongiques sur les champignons est semblable à celle des antibiotiques sur les bactéries. Les antifongiques sont donc utilisés pour lutter contre les infections locales ou profondes à champignons microscopiques. Les infections provoquées par ces champignons sont appelées mycoses qui touchent fréquemment la peau, les cheveux et les ongles.

Les antifongiques ou antifungiques, appelés également fongicides sont des médicaments possédant la capacité de traiter les mycoses alors que les fongistatiques sont considérés comme des antifongiques à la limite qui ne détruisent pas les champignons mais limitent leur développement [7].

II. HISTORIQUE

Parmi les plus anciens antifongiques, on peut citer l'Iode existant sous forme d'Iodure de potassium découvert en 1903, qui est encore utilisé aujourd'hui pour le traitement de la sporotrichose, ainsi que certains dérivés organiques iodés (polyvinylpyrrolidone). Des produits soufrés (pyrithione, tolnaftate, sulfure de sélénium) et des acides organiques (benzoïque, salicylique) sont encore employés surtout pour le traitement des mycoses superficielles.

A partir des années cinquante, de nouveaux antifongiques ont révolutionné le traitement des mycoses. Ces produits se répartissent en deux catégories : antifongiques naturels et antifongiques de synthèse.

Antifongiques naturels : Ils appartiennent à deux familles, les polyènes et les benzohydrofuranes.

Les polyènes sont extraits, depuis l'année 1950, à partir de culture d'actinomycètes du genre *streptomyces*. Ils inhibent la croissance d'un nombre considérable de champignons levuriformes ou filamenteux saprophytes ou pathogènes. Ainsi que la nystatine isolée de *Streptomyces noursei*, elle est utilisable dans les mycoses superficielles et des muqueuses.

En 1955, L' amphotéricine B isolée à partir de *Streptomyces nodosus* a été le premier antifongique vraiment efficace pour le traitement des mycoses profondes. Il est toujours l'antifongique de référence. Enfin, depuis les années quatre vingt dix les formulations lipidiques d'amphotéricine B viennent compléter la pharmacopée des polyènes.

La griséofulvine a été isolée de *Penicilium griseofulvum* en 1958. Même s'elle présente une certaine toxicité, la griséofulvine a révolutionné le traitement des teignes anthropophiles qui ne pouvaient être traitées auparavant qu'avec la radiothérapie épilatoire.

Antifongiques de synthèses : Parmi les premières molécules synthétisées, on distingue la pyrimidine fluorée dont dérive la 5- fluorocytosine à large spectre qui a été utilisée dès 1963, les dérivés azolés (imidazolés, triazolés), les imidazolés forment une vaste classe, les premiers d'entre eux datent de 1969 et sont uniquement utilisable par voie externe (clotrimazole, éconazole, isoconazole, tioconazole) car ils sont inactivés dans la voie générale. Le

miconazole a été le premier imidazolé utilisable par voie buccale et générale puis, en 1976, le kétoconazole a été synthétisé.

Plus récemment les triazolés ont été mis sur la marché : en 1987 le fluconazole active sur les levures puis, en 1993, l'itraconazole, molécule à large spectre d'action très efficace sur les moisissures du genre *Aspergillus*. D'autres molécules : le tolnaftate, la ciclopiroxolamine, l'amorolfine et les allylamines (terbinafine et naftifine) se révèlent très actifs sur les mycoses superficielles, certains (terbinafine) peuvent présenter un intérêt dans le traitement de certaines mycoses profondes (Figure 15).

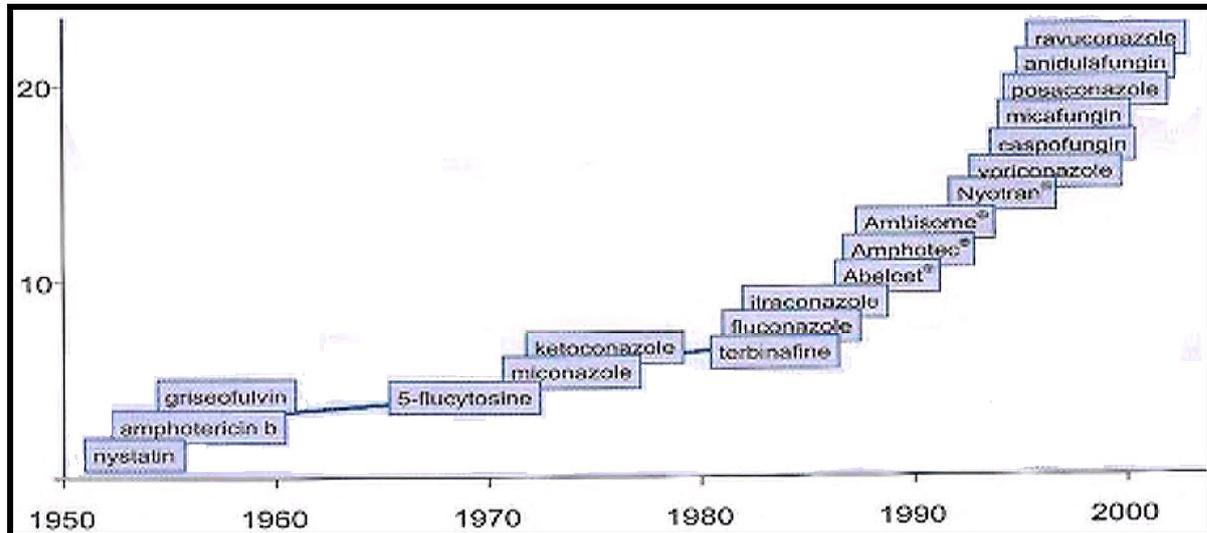


Figure 15 : Historique des Antifongiques [4].

De nouvelles molécules de synthèse comme les nouveaux triazolés sont étudiés chez l'Homme (voriconazole), d'autres antifongiques sont également étudiés (cilofungine, échinocandine, pneumocandine, papulocandine, etc...) [6].

III. CLASSIFICATION DES ANTIFONGIQUES

Les antifongiques peuvent être classés en plusieurs groupes selon leur structure chimique, leur mode d'action, leur origine et leurs voies d'administration. On peut répartir ces antifongiques en deux catégories : les

antifongiques naturels (Amphotéricine B, Nystatine, Griséofulvine) et de synthèse (5-Fluorocytosine, dérivés azolés et Sulfamides) qui, eux-mêmes, se décomposent en antifongiques locaux et systémiques.

➤ **Les antifongiques locaux** : sont réservés aux mycoses superficielles (de la peau et des muqueuses) : traitement des mycoses du cuir chevelu (teigne), des mycoses buccales (candidose et muguet) et des mycoses gynécologiques. Ils se présentent sous la forme de pommade, de crème, de gel, de lotion, d'ovules gynécologiques.

➤ **Les antifongiques oraux et systémiques** : sont destinés au traitement des candidoses intestinales ou des cryptococcoses, observées surtout chez les sujets immunodéprimés et/ou toxicomanes. Ils empruntent deux voies : orale pour les mycoses du tube digestif, injectable pour les mycoses profondes (infections des organes ou du sang) (Figure n°16).

On distingue quatre grandes classes d'antifongiques à sites d'action différents [81]:

-Polyène : Amphotéricine B, Nystatine.

- ❑ Blocage de l'incorporation de l'ergostérol (membrane cytoplasmique).
- ❑ Fongicides sur *Candida spp* (sauf *Candida lusitaniae*) et *Aspergillus spp*.

-Azolés : kétoconazole, Miconazole, Econazole, Itraconazole, Fluconazole, Voriconazole, Posaconazole

- ❑ Blocage de la synthèse de l'ergostérol (membrane cytoplasmique)
- ❑ Fongicides sur *Aspergillus*, fongistatiques sur *Candida*.

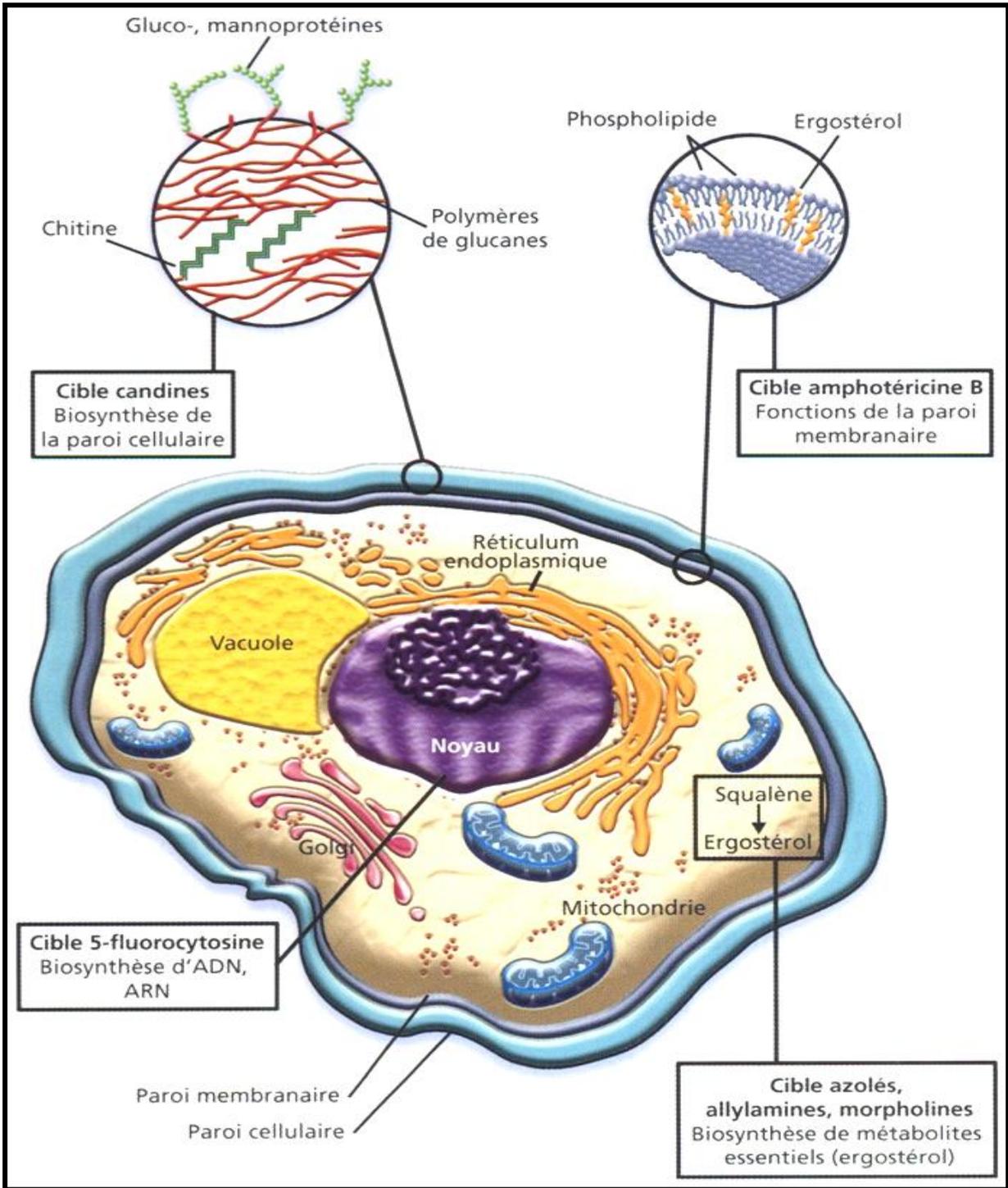


Figure 16 : Les sites d'action des antifongiques [3]

-Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques : 5-fluorocytosine.

- Synthèse des acides nucléiques (noyau)
- Active sur *Candida* (sauf *Candida krusei*)

-Echinocandines : caspofongine

- Paroi de la cellule fongique
- Fongicides sur *Candida* (sauf *Candida parapsilosis* et *Candida guilliermondii*) et fongostatiques sur *Aspergillus*.

III.1. Les polyènes

Ils sont produits par des actinomycètes du genre *streptomyces*. Plus de 200 molécules à action antifongique, élaborées par les actinomycètes, appartiennent à cette famille, les deux principaux polyènes utilisés sont l'amphotéricine B (Fungizone[®]) et la nystatine (Mycostatine[®]). Elle est caractérisée par un groupe chromophore formé de doubles liaisons conjuguées (CH = CH) *n*, d'où le nom de polyènes, ainsi un grand anneau lactone macrocyclique et sont parfois dénommés, pour cette raison, macrolides polyléniques. La partie active de ces composés est l'anneau macrolide, avec une partie rigide lipophile et une partie flexible hydrophile. En outre, elle est caractérisée par un spectre d'absorption aux ultraviolets [8], [11].

D'après leur spectre d'absorption dans l'UV, on distingue : [9]

- Les tétraènes : nystatine, pimaricine
- Les heptaènes : amphotéricine B

III.1.1. Mode d'action des polyènes [24, 37,83].

Les polyènes se lient de façon irréversible à l'ergostérol membranaire du champignon entraînant la formation de pores dans la membrane fongique ce qui augmente la perméabilité membranaire aux ions (déplétion en K⁺ intracellulaire).

Cela entraîne l'altération de la membrane cellulaire puis la mort de la cellule fongique (Figure 17).

Cible : membrane fongique

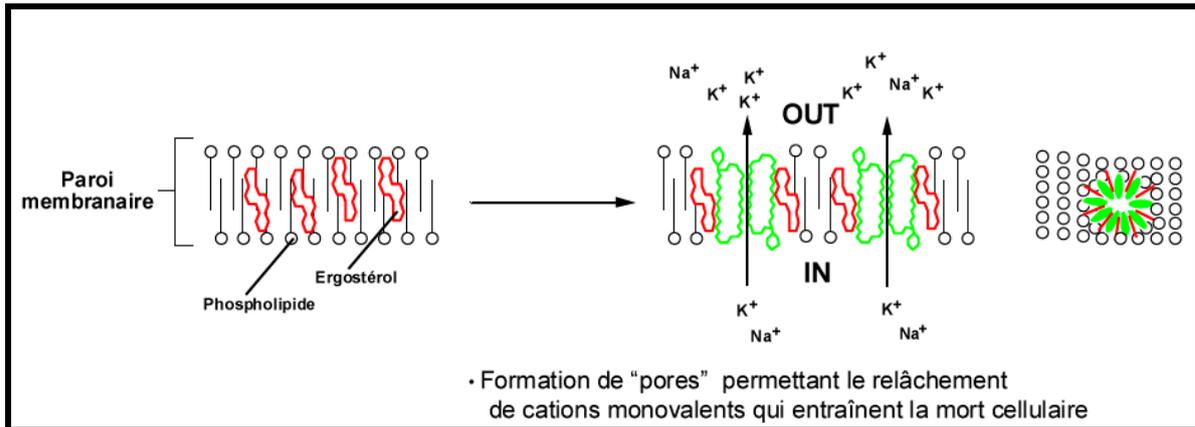


Figure 17 : Mode d'action des polyènes [3]

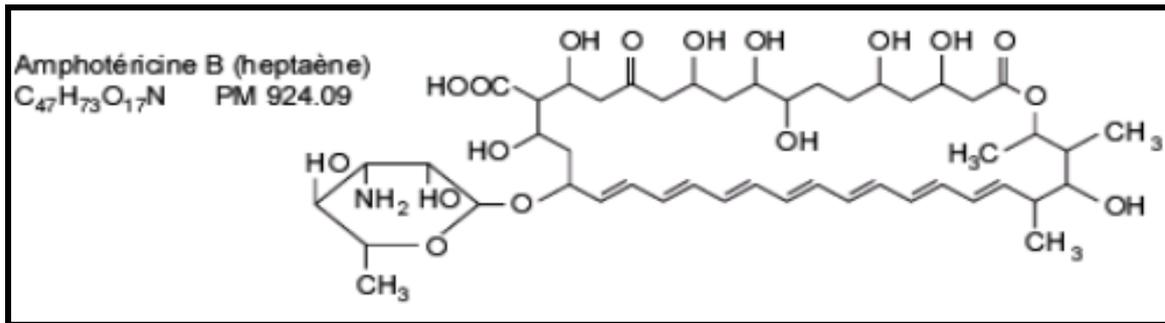
III.1.2. Amphotéricine.B. 1955

a. Propriété physico-chimique

L'amphotéricine B est un polyène heptaénique isolé de *Streptomyces nodosus*, C'est une poudre jaune insoluble dans l'eau et dans l'alcool, soluble dans des solvants organiques diméthylsulfoxyde (30 A 40 mg/mL) ou diméthylformamide (4 mg/ml). Combinée à des sels biliaires tel le désoxycholate de sodium, **l'amphotéricine B** est facilement mise en suspension dans un soluté glucosé isotonique à 5 %, réalisant ainsi une suspension colloïdale - et non une solution – injectable par voie intraveineuse. En suspension dans un milieu aqueux, il existe une discrète diminution d'activité au bout de 24 heures de même l'exposition à la lumière dégrade légèrement la molécule mais la poudre sèche est stable à 4 °C. Ces deux paramètres sont négligeables en thérapeutique humaine [11].

L'amphotéricine B reste l'antifongique de référence dans le traitement des mycoses profondes. Elle est surtout utilisée par voie intraveineuse, et ses effets indésirables disparaissent progressivement chez la plupart des patients.

b. Structure



c. Spectre

Large spectre, active aussi bien sur les champignons lévuriformes que filamenteux [8].

Elle est inactive sur les dermatophytes, le *Malassezia furfur*, dans l'aspergillose invasive chez le malade agranulocytaire et les localisations cérébrales car elle franchit très mal la barrière hématoencéphalique. Mais intéresse tout particulièrement les levures du genre *Candida*. Par contre *Penicillium marniffei* (agent d'une mycose du système réticulo-endothélial) est sensible à son action. Il n'y a pas de résistance secondaire car son activité diminue après un traitement prolongé.

Certains champignons sont résistants *in vitro*, tel que *Pseudallescheria boydii* d'autre le sont *in vivo* : agents de mycétomes fongiques, *Coccidioides immitis*, agents d'entomorphoroses, de basidioboloses et agents de chromomycoses [76,98].

d. Pharmacocinétique [3,87].

-Absorption-Distribution

Par voie orale, l'amphotéricine B n'est pratiquement pas absorbée par le tube digestif chez l'homme mais, par voie intraveineuse, la distribution du

médicament est tricompartimentale (un compartiment central vasculaire, un compartiment périphérique s'équilibrant rapidement avec le précédent, un troisième compartiment d'équilibration lente).

-La demi-vie est de 24 à 48 heures. Avec des traitements à doses progressivement croissantes, les taux sériques supposés efficaces ne sont atteints que vers le quatrième jour.

-La diffusion dans le liquide céphalorachidien (LCR) est faible, pourtant les méningites à cryptocoque ont vu leur mortalité passer de 100 à 25 % lors de l'utilisation de l'amphotéricine B.

Il existe un fort stockage tissulaire au niveau du foie, du rein, de la rate.

-L'élimination de l'amphotéricine B est partiellement connue : élimination rénale faible (de 2 à 5% de la dose injectée, après 24 heures), élimination biliaire (20 % de la dose totale passent ainsi dans les selles) et 60 % reste inchangée.

e. Indications [34, 88]

L'amphotéricine B, malgré sa toxicité, est très largement prescrite car elle reste l'antifongique de référence dans un grand nombre d'infections en particulier au stade initial du traitement d'une infection sévère. Elle est indiquée dans :

- le traitement des septicémies à *Candida* des patients neutropéniques ;
- le traitement des infections profondes à *Candida* (endocardite, ostéite, endophtalmie) ;
- le traitement initial des aspergilloses invasives ;
- le traitement initial des infections à cryptocoque ;
- le traitement initial des formes graves des infections à *Histoplasma capsulatum*

– le traitement des infections à *Penicillium marneffei* ;

f. Interactions médicamenteuses [92].

L'amphotéricine B désoxycholate ne présente pas d'interactions significatives avec les autres médicaments : les risques d'interactions sont liés aux effets néphrotoxiques, hypokaliémiques et hématotoxiques de l'amphotéricine B.

La prescription d'amphotéricine B est alors déconseillée avec d'autres médicaments néphrotoxiques, avec les digitaliques et avec les diurétiques hypokaliémants.

Toxicité [34, 87].

Elle est nulle par voie orale mais importante par voie intraveineuse, très fréquente en cas de perfusion, surtout les premiers jours de traitement, avec fièvre, frissons, céphalées, malaise générale, baisse tensionnelle et troubles digestifs. On peut observer, exceptionnellement, lors de la première perfusion, un collapsus cardiovasculaire, voire un arrêt cardiorespiratoire, ce qui justifie le respect de la dose-test en début de traitement. Après 2 à 3 semaines de traitement, on note souvent une amélioration de la tolérance.

-La toxicité rénale : est importante, potentialisée par d'autres médicaments : ciclosporine, diurétiques, aminosides, aciclovir et certains médicaments générateurs d'hypokaliémie (carbénicilline, ticarcilline) (Tableau 6).

On note une hypokaliémie dans 25 % des cas, parfois une hypomagnésémie.

Après arrêt du traitement, la fonction rénale redevient normale.

-La toxicité hépatique : est rare.

-**La toxicité hématologique** : se traduit par une anémie normochrome normocytaire, due à une action suppressive sur les cellules souches médullaires, une leucopénie plus rare et des thrombopénies exceptionnelles.

-**La toxicité pulmonaire** : n'est pas constante.

On note une irritation locale pour les veines perfusées, plus graves lorsqu'il s'agit d'arachnoïdites à la suite d'injections intrarachidiennes.

L'amphotéricine B peut être injectée par voie intrathécale, intraarticulaire, intrapleurale, intracavitaire (aspergillome).

Tableau 6 : L'amphotéricine B et formulations lipidiques. Données comparatives de toxicité et de coût.

Molécule	Nom commercial	Posologie (mg/kg/j)	Toxicité*		Coût** FF
			Immédiate	Rénale	
AmB	Fungizone [®]	0,6-1	-	-	20
ABCD	Amphocil [®]	1-4	↓	↓↓	ND
ABLC	Abelcef [®]	1-5	↓↓	↓↓	500
AmB-liposomale	AmBisome [®]	1-5	↓↓↓	↓↓	1500
AmB-Intralipide [®]	-	1-3	↓↓	↓	50

g. Formes galéniques-posologie-voie d'administration [3,87]:

+ **Fungizone[®]** :

– Poudre pour usage parentéral (1961) : poudre de 50 mg d'amphotéricine B, la dose injectée étant de 1 mg/kg.

– Suspension buvable (1967) à 100 mg/mL : les doses sont de 50 mg/kg/j pour les nourrissons et les enfants (une cuillerée à café pour 10 kg/24 heures).

– Lotion aqueuse à 3 % (1969) pour le traitement des candidoses cutanéomuqueuses.

– Gélules à 250 mg (1977) : six à huit gélules par jour pour les adultes (1,5 à 2 g/24 heures) pendant 15 à 20 jours.

+ Formulations lipidiques [3, 87, 97] :

Trois formulations lipidiques ont été faites, afin d'obtenir une diminution de la toxicité du médicament, tout en conservant son activité dans les mycoses profondes : l'**Ambisome**[®] où l'amphotéricine B est incorporée dans des liposomes ; l'**Abelcet**[®] ou Amphotericin B lipid complex (ABLC), rubans de lipides ; la troisième forme à structure discoïde, dans laquelle l'amphotéricine B est incorporée, commercialisée sous le nom de **Amphocil**[®] ou **Amphotect**[®]. Elle a aussi été introduite dans des émulsions lipidiques à 20 %. Ces molécules sont employées pour le traitement des mycoses profondes (aspergillose, cryptococcose, candidose).

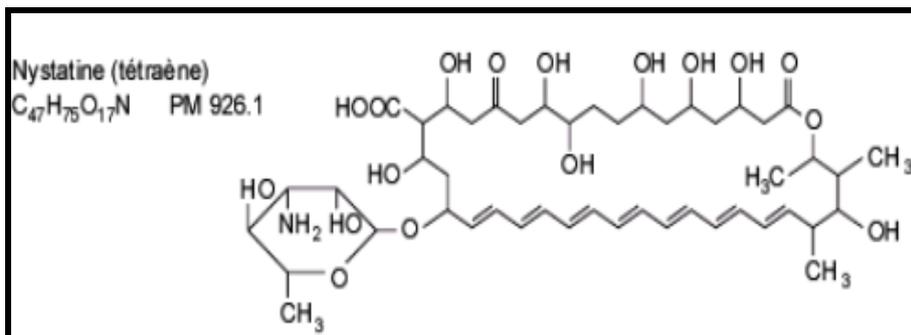
+ Amphocycline :

C'est une association d'amphotéricine B (50 mg) et de tétracycline (250 mg) dans le même comprimé.

III.1.3. Nystatine (1949).

La nystatine (Mycostatine[®]) est un tétraène extraite du mycélium de *Streptomyces noursei*, son mode d'action et ses propriétés antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'amphotéricine B. C'est une substance amphotère qui subit une détérioration en milieu acide. L'incorporation de la nystatine dans des liposomes a permis de l'administrer par voie intraveineuse chez la souris et de documenter son efficacité dans l'aspergillose expérimentale de l'animal neutropénique mais sa toxicité en cas d'injection intramusculaire et intraveineuse ainsi l'absence d'absorption intestinale limitent sa prescription aux mycoses cutanées, vaginales et digestives [11, 89].

a. Structure



b. Spectre / Indication

Le spectre d'action est limité aux champignons lévuriformes et quelques champignons filamenteux [9].

C'est un anticandidosique. Ce produit n'est utilisable qu'en usage local car il est toxique par voie intramusculaire ou intraveineuse [39].

L'indication de la Nystatine est limitée aux candidoses digestives [87]

III. 2. Flucytosine : 5- Fluorocytosine (1967)

a. Mode d'action [24, 37,83].

La 5- Fluorocytosine traverse la membrane cellulaire fongique grâce à la cytosine perméase, puis est transformée en 5-fluorouracile (5-FU) par la cytosine désaminase. La 5-fluorouracile exerce son activité antifongique selon deux mécanismes [16] :

— Inhibition de la synthèse protéique : La 5-fluorouracile est transformée en 5-fluorouridine monophosphate (FUMP) par une réaction catalysée par une enzyme l'uracil phosphoribosyl transférase (UPR-Tase). FUMP est ensuite transformé en diphosphate (FUDP) puis triphosphate (FUTP) qui est incorporé dans l'ARN fongique à la place de l'acide uridylique.

— Inhibition de synthèse de l'ADN fongique : La 5-FU se métabolise en 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), puissant inhibiteur de la thymidylate synthétase, enzyme clé de la biosynthèse de l'ADN et de la division nucléaire (Figure 18).

Cible : Acide nucléique

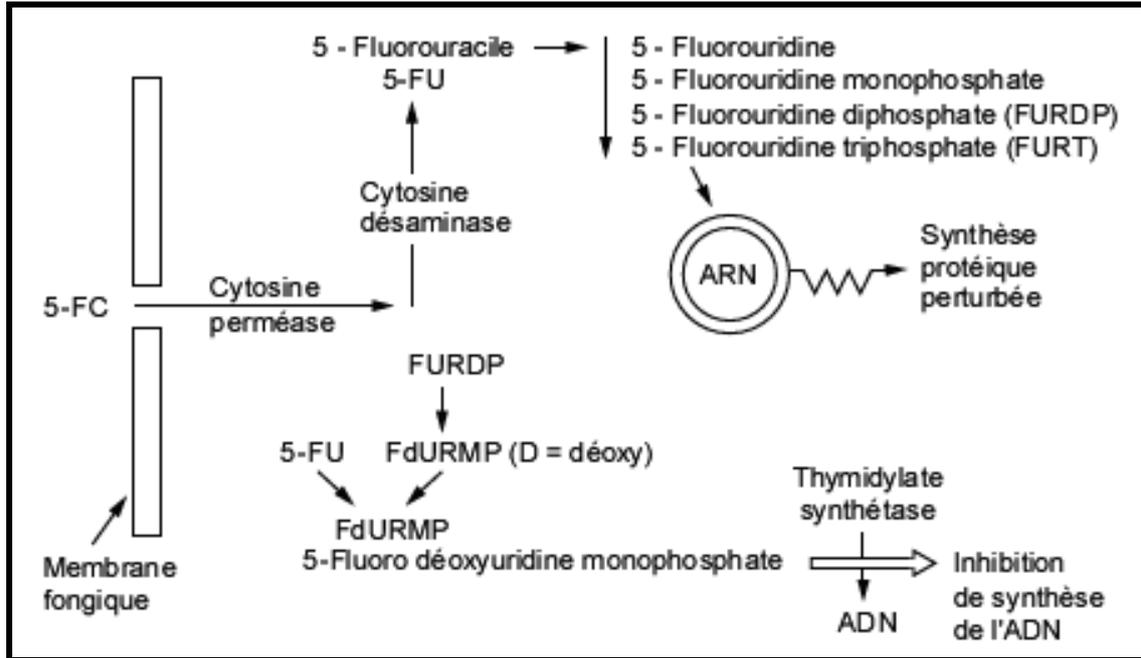


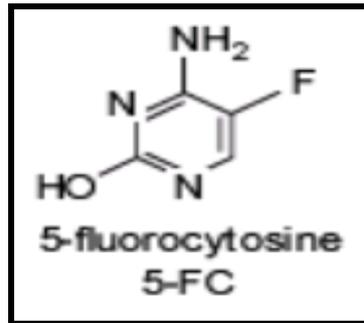
Figure 18 : Modes d'action de la 5-fluorocytosine sur la synthèse protéique et la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [11].

b. Propriétés physico-chimiques

La 5-Fluorocytosine (5-FC) ou flucytosine, est une pyrimidine fluorée. C'est une poudre blanche cristalline, faiblement soluble dans l'eau distillée à 20 °C (1,2 %), soluble dans l'eau à 60 °C ou dans l'alcool. La solution est relativement stable à la température du laboratoire. La présentation orale ne contient pas de sodium, la forme injectable de la 5-Fluorocytosine a pour véhicule un soluté physiologique à 9 % de NaCl. Le poids moléculaire est de 129,1.

La 5-Fluorocytosine est peu liée aux protéines sériques (10 à 12 %) et elle est dialysable [11].

c. Structure



d. Spectre

La 5-Fluorocytosine est active sur un moindre restreint de champignons, essentiellement de certaines levures : *Candida torulopsis* et *Cryptococcus*, active à moindre degré sur des champignons filamenteux tels que : *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Cladosporium trichoides* et les agents de la chromoblastomycose [8].

e. Pharmacocinétique [91, 94].

-L'absorption par voie orale, la flucytosine est absorbée avec une biodisponibilité de 90 %. Le pic sérique est atteint en 30 minutes à 2 heures chez l'adulte à fonction rénale normale, mais le pic est retardé (4 à 6 heures) chez l'insuffisant rénal. La concentration maximale (en mg/l) après la première administration est à peu près égale à la dose exprimée en mg/kg (soit 37,5 à 50 mg/kg). L'absorption digestive de la 5-Fluorocytosine est rapide et complète.

- **La diffusion tissulaire** est excellente, avec notamment 74 % des concentrations sériques retrouvées dans le LCR et 90 % dans le liquide synovial.

-**La demi-vie** est de 3 à 6 heures.

- **L'excrétion urinaire** est de 90 %, sous forme inchangée. La 5-Fluorocytosine n'étant pas métabolisée, elle s'élimine par voie rénale où l'on retrouve la quasi-totalité de la dose absorbée. La demi-vie d'élimination dépend de la fonction rénale.

f. Indications [88]

La flucytosine ne s'administre pas en monothérapie en raison du risque d'émergence de résistance secondaire. En association avec l'amphotéricine B elle est utilisée dans les infections à cryptocoque (cryptococcoses neuroméningées) et les septicémies à *Candida* (lorsque la souche est sensible, en particulier en cas d'atteintes méningées ou ostéoarticulaires).

g. Interactions médicamenteuses. [89, 92]

Les médicaments altérant la filtration glomérulaire de la 5-Fluorocytosine (qui est sa voie d'élimination) augmentent sa demi-vie, son pic et donc son potentiel médullotoxique. C'est le cas de nombreux produits dont l'amphotéricine.

Le dosage plasmatique de la 5FC est nécessaire et doit se situer entre 25 et 75 µg/ml au pic (maximum 100 µg/ml).

h. Formes galéniques-posologie-voie d'administration [91]:

5-Fluorocytosine (Ancotil[®]) doit se situer entre 100 et 200 mg/kg par jour en 3 ou 4 prises orales ou en perfusion de 45 minutes. Cette posologie doit être adaptée en fonction de l'insuffisance rénale. Des précautions d'emploi sont donc à envisager en cas d'association avec des médicaments ayant une toxicité médullaire comme la zidovudine : un contrôle fréquent de l'hémogramme est alors recommandé (Tableau 7).

5-Fluorocytosine (Ancotil[®]) se présente sous deux formes :

-Comprimés à 500 mg.

-Solution pour perfusion de 1%.

III.3. Dérivés azolés

a. Mode d'action des dérivés azolés [24, 37, 83].

Les azolés entraînent une inhibition de la synthèse de l'ergostérol nécessaire à la formation de la membrane de la cellule fongique. Cette inhibition de synthèse est obtenue par inhibition de l'alpha-déméthylase fongique nécessaire à la conversion du lanostérol en ergostérol. Les azolés exercent donc une activité très spécifique sur les enzymes dépendant du cytochrome P450 du foie et de la paroi du tube digestif (Figure 19).

Cible : Membrane fongique

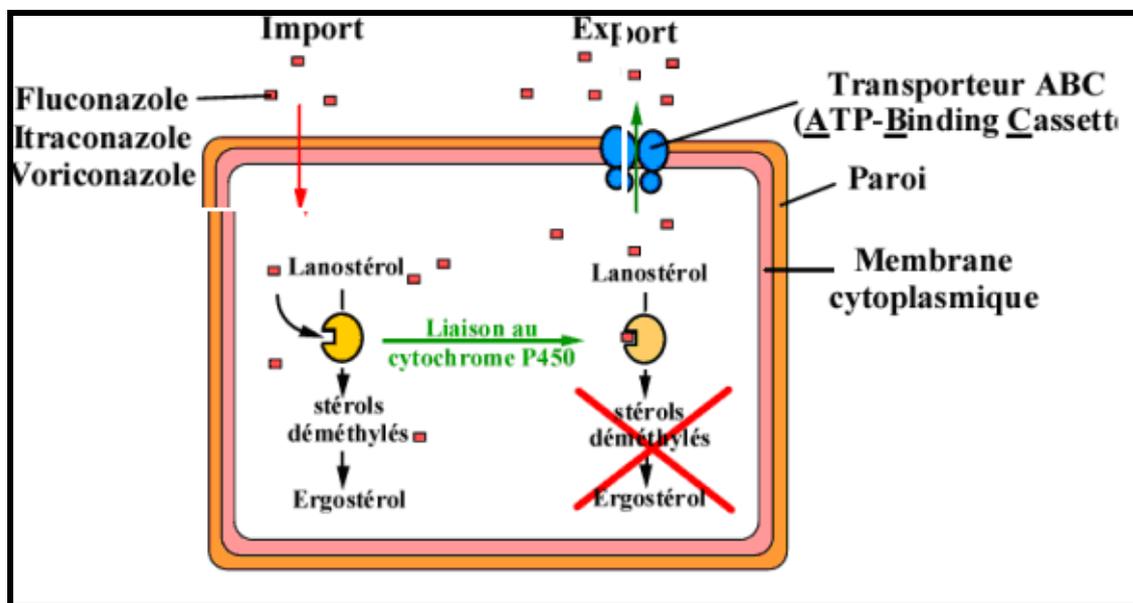


Figure 19 : Mode d'action des dérivés azolés

b. Propriétés physico-chimiques [11]

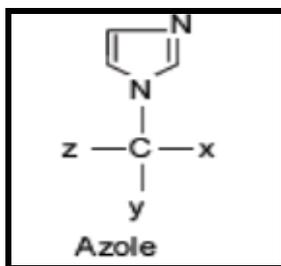
C'est une poudre pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques : polyéthylène glycol, alcool, chloroforme, diméthylformamide, diméthylsulfoxyde. Elles sont hygroscopiques et se conservent plus de

un an à +4 C°. Ces molécules sont généralement lipophiles. La liaison aux protéines plasmatiques et aux érythrocytes est proche de 100 %.

c. Classification

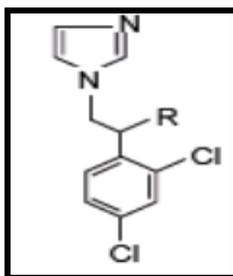
Les dérivés azolés ont constitué une étape importante de la thérapeutique antifongique. Utilisés à partir de 1968, ils sont obtenus par synthèse chimique. Les premiers dérivés employés ne convenaient que pour un usage local, car ils étaient assez mal tolérés, mais l'apparition sur le marché de dérivés tels que le miconazole ou le kétoconazole ou, plus récemment le fluconazole, a permis un usage systémique. Tous ces composés ont en commun le noyau azolé; On distingue :

- Les imidazolés le noyau azolé contenant deux atomes d'azote.
- Les triazolés contenant trois atomes d'azote. [11]



c.1. Les imidazolés

La majorité est utilisée comme topiques. On distingue les imidazolés à action systémique qui sont peu nombreux (Miconazole, kétoconazoles), et les imidazolés à usage local.

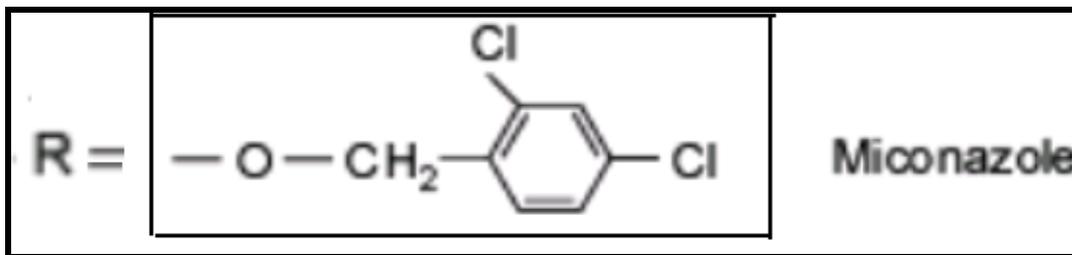


A part le Miconazole et le kétonazole, qui ont l'avantage d'une double action systémique et locale, de nombreux imidazolés à action exclusivement locale sont apparus ces dernières années, à titre d'exemple éconazole, isoconazole, tioconazole et sulfoconazole.

c.1.1. Miconazole

C'est le premier antifongique azolé utilisable par voie intraveineuse, il est principalement prescrit en usage topique.

c.1.1.1. Structure



c.1.1.2. Spectre

Il est surtout actif sur les levures sauf *Candida glabrata* et les agents des mycoses exotiques [8, 9,39]

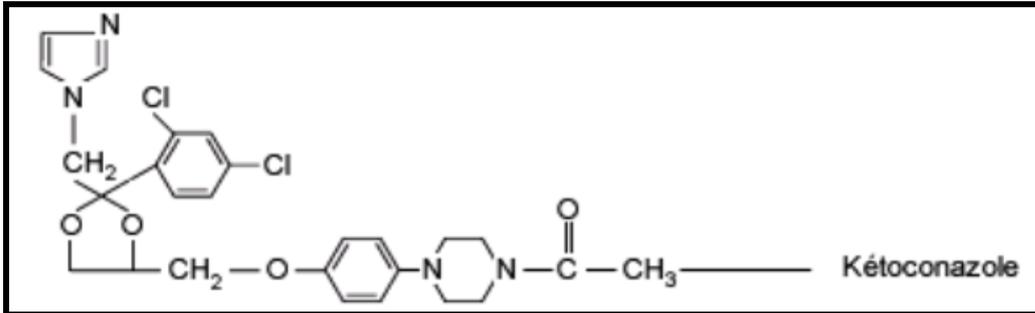
c.1.1.3. Indications [34]

En fait, les indications du traitement injectable sont restreintes depuis la mise à disposition d'azolés mieux tolérés et mieux absorbés. Elle peut être utile en dernier recours dans les infections à *Scedosporium sp.*

c.1.2. Kétoconazole.

C'est le premier imidazolé bien absorbé par voie orale.

c.1.2.1. Structure



c.1.2.2. spectre [9 ,39]

Il est caractérisé par un large spectre, il est actif sur les champignons levuriformes telles que *Candida* à l'exception *Candida glabrata*, *Histoplasma*, *Blastomyces* ainsi que sur les champignons filamenteux les dermatophytes, la plupart des champignons dimorphiques et certaines moisissures comme *Scytilidium*, *Fonsecaea*, *Exophiala*.

c.1.2. 3. Indications [34]

Elles sont limitées aux mycoses rares comme les infections à *Scedosporium sp* et les basidiobolomycoses. Le kétoconazole est efficace dans les infections profondes à *Malassezia furfur* (agent du pityriasis versicolor). Efficace également sur *Histoplasma* et *Blastomyces*, le kétoconazole est délaissé au profit de l'itraconazole.

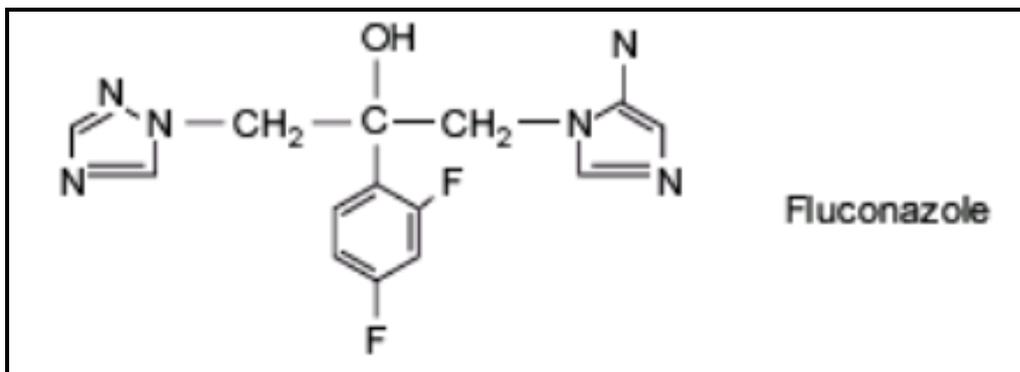
c.2. Les triazolés

Ils possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques que les imidazolés, ces molécules sont généralement lipophiles. La liaison aux protéines plasmatiques et aux érythrocytes est proche de 100 %. Elles sont soluble dans les solvants organiques : polyéthylène glycol, alcool, chloroforme, diméthylformamide, diméthyl-sulfoxyque [11].

c.2.1. Fluconazole[34].

C'est un bi-triazolé mis sur le marché depuis 1988. L'utilisation du fluconazole dans les candidémies a été validée par au moins cinq études randomisées contrôlées contre l'amphotéricine B. L'efficacité globale était identique avec les deux traitements avec une mortalité identique mais une toxicité accrue de l'amphotéricine B [11].

c.2.1.1. Structure



c.2.1.2. Spectre [97, 98]

Un large spectre sur les levures ayant une excellente activité vis-à-vis de *Candida albicans* et de la plupart des *Candida non albicans* (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*).

Il est utilisé pour traiter les candidoses oropharyngées, les candidoses profondes ainsi que la cryptococcose. Il est inactif sur *Candida krusei* [39] et peu actif sur *Candida glabrata*. Ainsi que sur certains champignons dimorphiques (*Blastomyces*, *Histoplasma...*), mais n'est pas efficace contre les *Aspergillus* et les dermatophytes sont peu sensibles.

c.2.1.3. Indications [34]

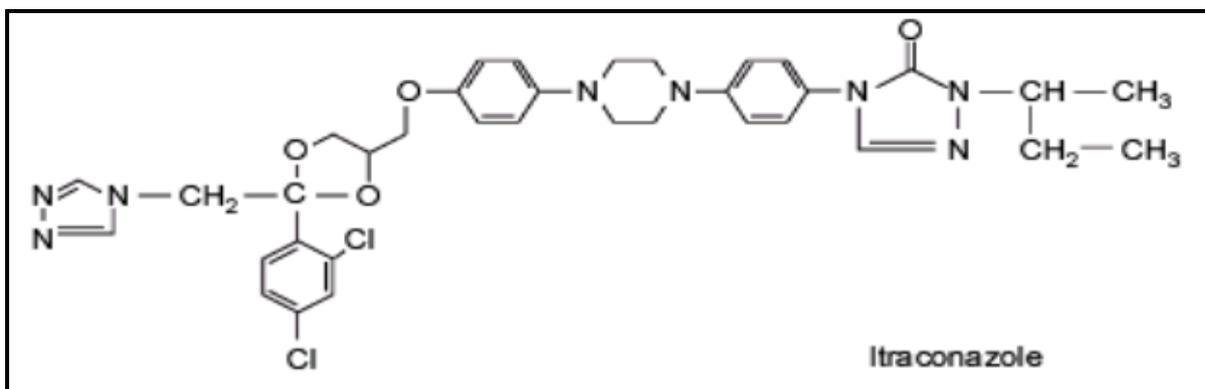
Le fluconazole est indiqué dans :

- Le traitement initial des septicémies à *Candida* du sujet non granulopénique ; En relai, de l'amphotéricine B dans le traitement des infections à cryptocoque des patients immunodéprimés ou non (400 mg/j pendant 8 semaines).
- Le traitement d'entretien des cryptococcoses des patients infectés par le VIH (200 mg/J). Le traitement des coccidioïdomycoses soit en relai de l'amphotéricine B (200 à 400 mg/j), soit en traitement initial dans les formes peu sévères (800mg/j). En association avec l'amphotéricine B dans le traitement initial des infections à *Trichosporon* des patients infectés par le VIH, puis en monothérapie en traitement d'entretien.

c.2.2.Itraconazole

C'est une molécule très liposoluble utilisable uniquement par voie orale son intérêt repose essentiellement sur son activité vis-à-vis des *Aspergillus*, car son activité vis-à-vis des *Candida* est moins intéressante que celle des autres azolés.

c.2.2.1. Structure



c.2.2.2. Spectre [30, 39, 97].

L'itraconazole possède un spectre très large. Il a une activité antifongique très puissante contre les dermatophytes et les levures (*Candida*, *Cryptococcus*

neoformans, pytirosporium). Il est également actif sur les champignons filamenteux non dermatophytiques (*Aspergillus, fusarium, Scopulariopsis, Alternaria*)

c.2.2.3. Indications[34]

L'itraconazole est utilisé dans :

- les aspergilloses invasives des sujets infectés par le VIH ou non (400 mg/j) en relais de l'amphotéricine B ;
- le traitement initial des histoplasmoses peu sévères (400 mg/j pendant 3 mois puis à demi-dose pendant au moins un an), et en relais de l'amphotéricine B dans les formes graves. Chez les patients infectés par le VIH, l'itraconazole doit être administrée à vie;
- les candidoses oropharyngées et/ou oesophagiennes résistantes au fluconazole, l'itraconazole est administrée en solution ;
- les sporotrichoses cutanées (200-400 mg/j pendant 4 semaines) ou ostéoarticulaires (dose identique pendant 1 à 2 ans).

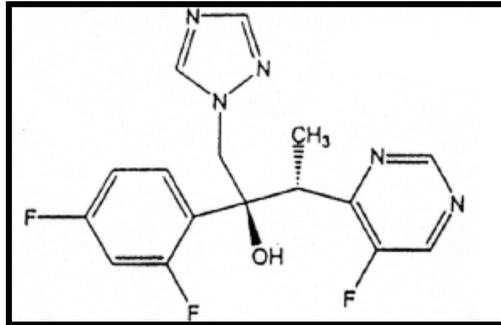
c.2. 3. Les nouveaux triazolés

Ces nouveaux agents qualifiés de seconde génération représentent un progrès dans cette famille d'antifongiques avec des propriétés proches des autres azolés et une meilleure activité antifongique. Le premier représentant de cette nouvelle génération de dérivés azolés est le voriconazole.

- Voriconazole [35, 38, 89]

Le voriconazole est un dérivé du fluconazole, au plus large spectre et à l'activité plus puissante *in vitro*. Chronologiquement, cet agent est la première des nouvelles molécules mise à disposition. Le voriconazole a les mêmes propriétés et les mêmes mécanismes d'action que les autres azolés.

c.2.3.1. Structure [91]



c.2.3.2. Spectre [35; 38]

Il s'en différencie par une activité fongicide pour certains organismes filamenteux tels que les *Aspergillus*. Cet agent est actif contre toutes les souches de *Candida*, y compris *Candida krusei*, les souches de *Candida glabrata* résistantes au fluconazole et la plupart des souches de *Candida albicans* devenues résistantes au fluconazole. Le voriconazole est également actif contre de nombreuses souches d'*Aspergillus*. Bien que l'activité fongicide soit dose-dépendante vis-a-vis d'*Aspergillus* et moins efficace qu'avec l'amphotéricine B, elle reste meilleure que celle constatée avec l'itraconazole. Il a récemment obtenu l'AMM en France dans le traitement des aspergilloses invasives, des infections graves à *Candida* et dues aux espèces *Scedosporium* et *Fusarium*. Son efficacité dans l'aspergillose invasive et les oesophagites à *Candida* été confirmée dans de larges essais comparatifs.

c.2.3.3. Pharmacocinétique [89, 96]

Le voriconazole (Vfend[®]) est disponible sous forme orale et injectable. Il présente une excellente biodisponibilité. Il possède une cinétique non linéaire avec des élévations substantielles des concentrations sériques avec une augmentation légère des doses. Le voriconazole est extensivement métabolisé au foie, et moins de 2 % de la dose se retrouvent sous forme inchangée dans

l'urine. Des études *in vitro* ont démontré que le voriconazole est un substrat et un inhibiteur des isoenzymes du CYP2C9 et du CYP2C19. Le CYP2C19, en grande partie, et le CYP3A4, en plus faible partie, seraient responsables de son métabolisme. Le CYP2C19 présente un polymorphisme génétique, et de 3 % à 5 % de la population caucasienne ainsi que 20 % de la population asiatique sont de faibles métabolismes, donc ces derniers produiront des concentrations plus élevées de voriconazole. Sa demi-vie d'élimination est d'environ 6 heures et nécessite une administration biquotidienne.

-Dose de charge : 6mg /kg deux fois le premier jour par voie intraveineuse

-Dose d'entretien : 4mg /kg deux fois par jour par voie intraveineuse ou 200 à 300mg/j per os en deux prises.

-Pic sérique : 2,3 -5,1 µg/ml

-Elimination urinaire inchangée : 1,5 (%)

- Demi-vie sérique: 6 à 24 heures

-Temps de demi-vie : 6 heures

-Liaison protéique : 60 %

-Volume de distribution : 4,6 l /kg

-Passage SNC : 90 % du plasma

d. Interactions médicamenteuses communes aux dérivés azolés [92].

Une des limitations majeures pour les azolés est leur pouvoir à interagir avec d'autres thérapeutiques. Ils augmentent plus ou moins l'espace QT justifiant les recommandations avec les autres médicaments ou les situations induisant la même anomalie. Leur mode d'action sur les cytochromes peut expliquer une augmentation de la concentration plasmatique d'autres

médicaments qui sont métabolisés par le cytochrome CYP 2C9 et le cytochrome CYP 3A4, si ceux-ci sont associés aux dérivés azolés.

On peut distinguer trois types d'interactions :

➤ **Inhibition enzymatique compétitive**

L'azolé peut diminuer le métabolisme de certains médicaments et ainsi augmenter : la demi-vie, le pic plasmatique et/ou l'aire sous la courbe (ASC). Exemple : azolé +antivitamine K (AVK) = augmentation de l'international normalized ratio (INR) et du risque hémorragique. L'enzyme impliquée dans le métabolisme du voriconazole est le CYP 2C19.

➤ **Induction enzymatique**

Certains médicaments augmentent le métabolisme de l'antifongique jusqu'à rendre sa concentration plasmatique indétectable. Exemple : rifampicine + voriconazole = diminution de la concentration du voriconazole.

➤ **Coexistence de l'inhibition compétitive et de l'induction**

Exemple : phénytoïne + itraconazole = diminution de la concentration de l'itraconazole et augmentation de la phénytoïnémie. La conférence de consensus commune sfar–spilf–srlf sur la prise en charge des aspergilloses et candidoses de l'adulte (2004) indique que le suivi des concentrations plasmatiques à l'équilibre est pertinent pour l'itraconazole et le voriconazole. L'enzyme impliquée dans le métabolisme du voriconazole est le CYP 2C19.

Le posaconazole, à la différence des autres azolés, inhiberait essentiellement les enzymes du cytochrome CYP 3 à 4 d'où, des possibilités d'interactions avec des médicaments métabolisés par les isoenzymes du CYP 3 à 4.

III.4. Echinocandines [37, 38,93].

Ces agents représentent la première nouvelle classe d'antifongiques découverte depuis plus de 15 ans. Le premier de ces agents a été la caspofungine (CANCIDAS[®]). D'autres molécules de cette famille sont en cours de développement, telles que la micafungine ou l'anidulafongine. Ces trois agents ont de multiples caractéristiques communes : ce qui conduit les experts à débattre du choix et du positionnement de ces molécules.

La caspofungine, CAS [3,35, 40]

La caspofungine appartient à la famille des échinocandines. C'est un lipopeptide qui agit en bloquant la synthèse du β (1-3)-D-glucane, un des constituants de la paroi fongique. Le fait que les cellules de mammifères ne contiennent pas de β (1-3)-D-glucane explique l'activité sélective de cette molécule sur les cellules fongiques. Cette molécule a récemment obtenu l'AMM dans le traitement de l'aspergillose invasive (AI) chez les patients en échec ou intolérants aux autres molécules. L'activité antifongique de la caspofungine est démontrée *in vitro* sur les levures du genre *Candida* et sur les *Aspergillus*, alors qu'elle n'est pas active ni sur les *Fusarium* tels que *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* ni sur les mucorales du genre *Rhizopus*. Les zygomycètes (*Mucor circinelloides*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*...) ne sont pas sensibles *in vitro* à cette molécule. Mais les champignons dimorphiques, tels que *Blastomyces dermatitidis* ou *Histoplasma capsulatum*, y sont sensibles. Par ailleurs, des modèles animaux ont permis de comparer l'efficacité de la caspofungine à celle d'autres molécules antifongiques dans différentes situations pathologiques.

a. Mode d'action [90, 106].

Les échinocandines sont des inhibiteurs non compétitifs de la β -(1-3)-glucane synthétase, une enzyme qui catalyse la polymérisation de l'uridine diphosphate-glucose en β -(1-3) glucane, un des composants structuraux responsables du maintien de l'intégrité et de la rigidité de la paroi fongique (Kurtz et Douglas, 1997; Marco *et al.*, 1998). La β -(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 (Georgopapadokou et Tkacz, 1995). Le blocage de la β -(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 (Stone *et al.* 2002) (figure 20).

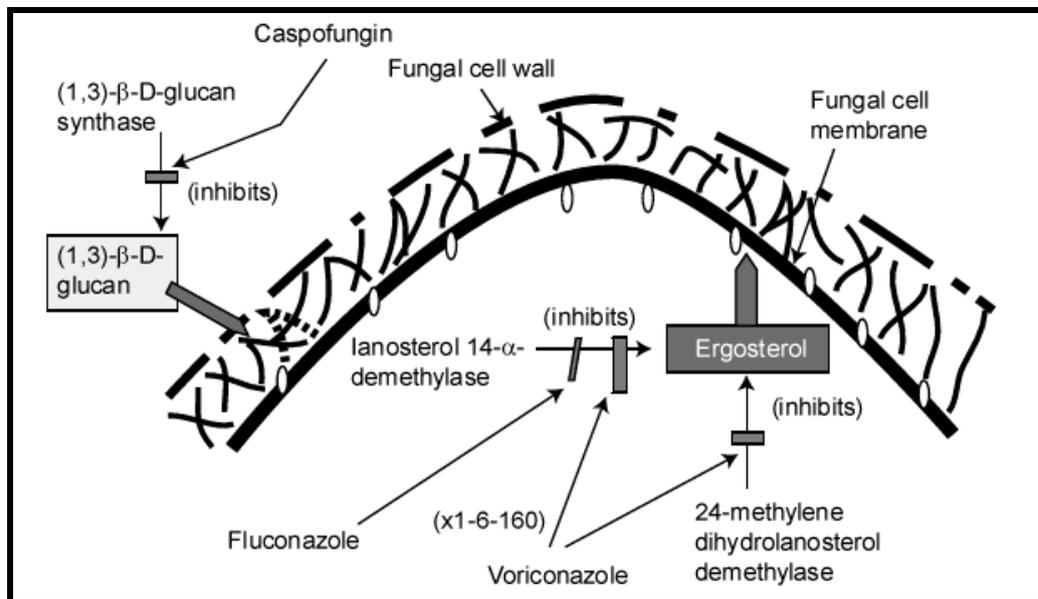
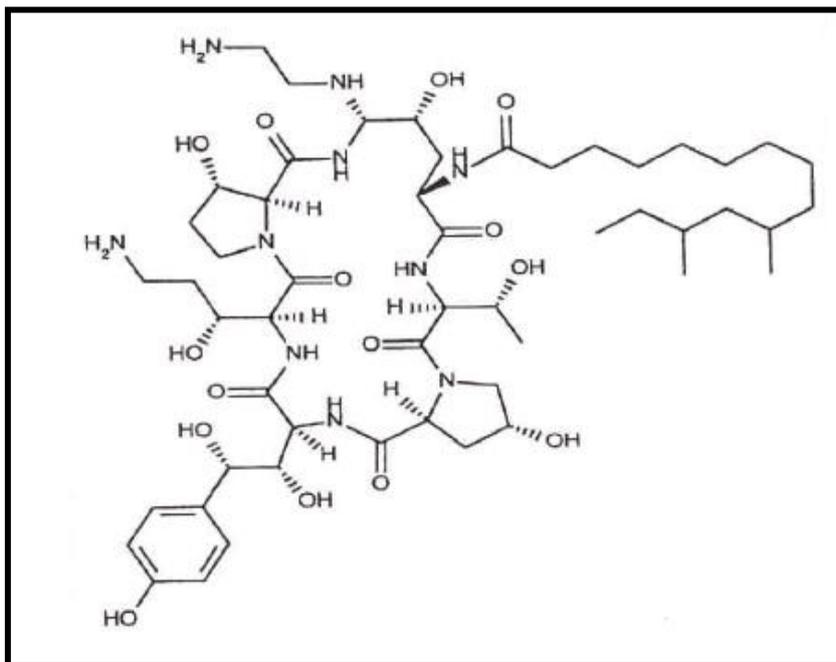


Figure 20 : mode d'action de la caspofungine [36]

b. Structure [90]



c. Spectre [106].

Les échinocandines sont efficaces sur les genres *Candida* et *Aspergillus*, bien que ces molécules soient, fongicides chez *Candida* et seulement fongistatiques sur les *Aspergillus* (Espinel-Ingroff, 1998; Oakley *et al.*, 1998). Il existe cependant quelques exceptions, parmi lesquelles *Cryptococcus neoformans* (Feldmesser *et al.*, 2000), les espèces du genre *Trichophyton* ainsi que celles appartenant au genre *Fusarium*, qui sont insensibles aux échinocandines. D'autres espèces semblent avoir une sensibilité intermédiaire aux échinocandines, par exemple *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium prolificans* et *Cladophialophora bantiana* (Espinel-Ingroff, 1998).

d. Pharmacocinétique [82, 90, 96, 106]

- **Absorption-Distribution :** Les échinocandines présentent comme caractéristiques communes de n'être utilisables uniquement par voie parentérale

et sont généralement bien tolérées. Le poids moléculaire élevé des échinocandines explique leur utilisation parentérale exclusive. À la suite d'une administration intraveineuse, leur pharmacocinétique est linéaire entre 5 et 100 mg avec un volume de distribution de 9,51 L et un pourcentage de la liaison protéique de 97%. Ces agents sont concentrés dans le foie, la rate, le poumon et le tube digestif, présents en concentrations égales dans le sang et le plasma, et en de plus faibles concentrations dans les autres tissus, voire négligeables dans les urines, le LCR et l'humeur vitré.

- **La demi-vie terminale** de 40 à 50 heures

- **Élimination** : Après un métabolisme non oxydatif hépatique, les catabolites inactifs sont éliminés par voie biliodigestive, tandis que de très faibles concentrations sont éliminées par voie urinaire sous forme inchangée 1,4%. Aucune variation pharmacocinétique n'est rapportée liée à l'âge, au sexe ou à la race.

e. Indication [3,88, 106].

Les échinocandines représentent une alternative de choix pour lutter contre les infections fongiques, notamment parce que la plupart des pathogènes réfractaires à un traitement par les antifongiques traditionnels (polyènes, azolés et 5-Fluorocytosine) répondent bien au traitement par les échinocandines (Denning, 2002). Ainsi, la caspofungine est préconisée pour les candidémies et les candidoses invasives, en prophylaxie des infections fongiques, et pour le traitement de l'aspergillose invasive réfractaire au traitement par l'amphotéricine B ou l'itraconazole.

f. présentation-posologie-forme galénique [3,90, 96]

CANCIDAS®

- Mode d'administration : Pas de forme orale, seulement intraveineuse avec une très bonne tolérance.

Les échinocandines se présentent sous deux formes :

-Poudre pour solution à diluer pour perfusion intraveineuse de 50 ou 70 mg

-Poudre injectable 50 et 70mg

Aucune adaptation posologique n'est nécessaire en cas d'insuffisance rénale.

Une réduction de moitié des doses est nécessaire en cas d'insuffisance hépatique. Les posologies des échinocandines sont présentées comme suit :

- Dose de charge 70mg le premier jour

- Dose d'entretien puis 50 à 70 mg/j jusqu'à 1 mg /kg/j

CHAPITRE IV

LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES

I. DÉFINITION [36 ; 43].

La résistance aux antifongiques est un concept large, pour décrire un organisme dont l'infection progresse malgré un traitement antifongique adapté. Les données cliniques sont, dans le domaine de la bactériologie et de l'antibiothérapie, généralement confortées par les tests de sensibilité *in vitro*.

L'étude des résistances au cours des infections fongiques est très complexe. Les tests de sensibilité sont encore sujets à discussion et de nombreux autres facteurs liés au champignon, au patient et à la drogue jouent un rôle fondamental dans la réponse thérapeutique. Comme pour les bactéries, la résistance pour les champignons peut être classée en primaire, secondaire et clinique.

I.1 La résistance primaire ou intrinsèque [36 ; 43].

Elle fait intervenir les caractéristiques génétiques et biochimiques d'une espèce de champignon. Elle se réfère à la sensibilité naturelle à un antifongique. Ce niveau inné de sensibilité est indépendant de l'exposition à la drogue. Par exemple, il est largement admis que *Candida krusei* est intrinsèquement résistant au fluconazole.

I.2. La résistance secondaire ou acquise [36 ; 43].

Elle survient seulement après exposition de l'organisme à la drogue. Deux types de situations peuvent se produire : soit l'espèce fongique de colonisation ou d'infection est initialement sensible et devient résistante sous traitement par mutation génotypique, soit le patient est colonisé ou infecté par de multiples

souches ou espèces, avec sélection sous l'effet du traitement d'une espèce ou souche intrinsèquement résistante à l'antifongique.

I. 3. La résistance clinique [36 ; 43].

À côté de la résistance primaire et secondaire, on décrit un troisième type de résistance, la « résistance clinique », qui correspond à la progression ou à la rechute d'une infection par un isolat qui reste sensible à la drogue antifongique prescrite, sur les tests de laboratoire. Ce type de résistance est souvent lié à des facteurs de risque dépendants du patient.

II. LES FACTEURS DE RISQUE DE RÉSISTANCE

L'identification des facteurs de risque contribuant à la résistance aux antifongiques est un problème complexe compte tenu de l'intrication de facteurs liés au patient, à la drogue et au champignon, qui peuvent intervenir dans l'échec thérapeutique ou la rechute de l'infection (Figure 21).

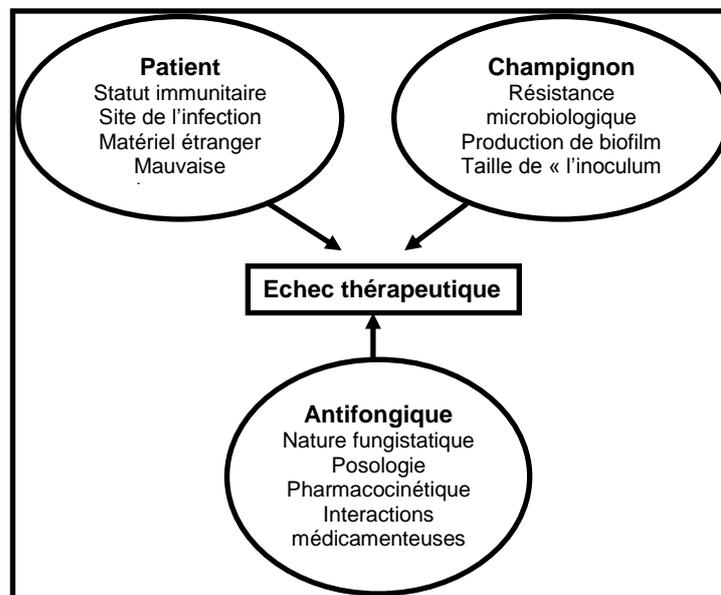


Figure 21 : Schéma illustrant les facteurs de la résistance clinique [103].

La résistance au fluconazole des candidoses chez les patients VIH en est un exemple, montrant le rôle conjoint de l'immunodépression et de l'antifongique prescrit [36].

II. 1. Les facteurs liés au patient [36]

Ils s'agissent de son statut immunologique (taux de lymphocytes CD4, neutropénie) ou de la maladie sous-jacente (cancer, hémopathie, VIH), ont une influence primordiale comme le montrent plusieurs travaux.

Les immunodéprimés ont souvent une mauvaise réponse au traitement malgré des concentrations sériques de la drogue et une sensibilité *in vitro* correctes. Interviennent également le site et la gravité de l'infection, la présence d'un abcès et de matériel étranger (cathéter, valves, prothèse) qui peut modifier le cours de l'infection.

Une étude de surveillance des candidémies effectuée par l'EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) a montré que les candidémies à *Candida glabrata* étaient plus fréquentes chez les malades d'hématologie que chez ceux ayant des tumeurs solides. Les infections fongiques invasives aux espèces *Fusarium* ont été décrites chez des patients d'hématologie, dans les neutropénies sévères et prolongées et après antibiothérapie à large spectre. Les infections disséminées à *Aspergillus terreus* surviennent chez des patients leucémiques et neutropéniques, ayant une neutropénie plus prolongée que les patients infectés à d'autres espèces d'*Aspergillus*.

II.2. Les facteurs liés à la drogue [36].

Ils sont bien illustrés par l'utilisation du fluconazole chez les patients VIH, concernant son mode d'action (fongistatique), ses caractéristiques

pharmacocinétiques, le schéma thérapeutique proposé (fréquence d'administration, posologie, doses cumulatives, administration intermittente ou continue). En cas d'interactions médicamenteuses ou de mauvaise compliance (pour les traitements sous forme orale), un dosage sérique de la drogue devient important.

II. 3. Les facteurs liés au champignon [36].

Ils concernent les concentrations minimales inhibitrices initiales, la stabilité génomique de la souche, la taille de la population, la capacité à former un biofilm et le type cellulaire.

III. EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES

III.1. Les polyènes [36].

L'amphotéricine B d'activité antifongique large contre une grande variété de champignons est considérée comme la molécule de référence dans le traitement des IFI. Il existe une résistance primaire à l'amphotéricine B pour les champignons filamenteux émergents (espèces *Scdoseporium*, *Fusarium*, *Scopulariopsis* et *Aspergillus terreus*) ainsi que pour quelques rares levures (*Candida lusitaniae*, *Candida guilliermondii*, *Trichosporon beigeli*).

La survenue d'une résistance secondaire à l'amphotéricine B demeure limitée mais a été rapportée chez des patients très immunodéprimés, transplantés et cancéreux en chimiothérapie. La part respective dans la survenue de cette résistance de la durée de l'immunodépression, de la neutropénie, de l'exposition à une chimiothérapie cytotoxique et de la fréquence d'administration de l'amphotéricine B est incertaine. Plusieurs souches de *Candida albicans* résistantes au fluconazole et à l'amphotéricine B ont été décrites chez des

patients VIH ayant reçu des traitements prophylactiques prolongés avec fluconazole. Une résistance de *Cryptococcus neoformans* à l'amphotéricine B a été documentée dans quelques cas, mais sa signification et sa prévalence sont inconnues. Il s'agit là encore d'une résistance croisée avec le fluconazole.

III. 2. La flucytosine [36].

Cet antifongique à une excellente activité *in vitro* contre de nombreuses espèces de *Candida* et des isolats de Cryptocoque. Une résistance primaire est commune pour les espèces de *Candida non-albicans*, les espèces d'*Aspergillus* et 10 % des *Candida albicans*. Très rapidement après le début d'utilisation de cette drogue en monothérapie, des résistances secondaires est apparu, pour *Candida* sp et *Cryptococcus neoformans*, d'où la nécessité de l'associer à l'amphotéricine B ou au fluconazole.

La sévérité de l'immunodépression et l'importance de l' inoculum sont les facteurs principaux conduisant au développement de résistances.

III.3. Les azolés [36].

Jusqu'à la fin des années 1980, l'acquisition d'une résistance aux azolés restait un problème marginal. Quelques cas publiés concernaient des patients ayant des candidoses cutanéomuqueuses chroniques qui rechutaient au cours de traitements prolongés par le kétoconazole. Ces échecs thérapeutiques étaient associés au développement de souches de *Candida albicans* ayant des concentrations minimales inhibitrices élevées pour le kétoconazole et une résistance croisée aux imidazolés. La résistance des espèces de *Candida* au fluconazole est devenue un problème significatif avec l'épidémie du SIDA et sa prescription large dans le traitement des candidoses muqueuses. Elle été décrite au cours des candidémies des immunodéprimés non infectés par le VIH et chez

des patients en réanimation. La résistance aux azolés pour d'autres champignons, *Cryptococcus neoformans*, certaines espèces *Aspergillus* et certaines moisissures, est plus rare.

Au cours de l'infection par le VIH, avant l'avènement des trithérapies, les candidoses oropharyngées et digestives étaient particulièrement fréquentes et récidivantes, et ont conduit à des prescriptions itératives de fluconazole.

De plus, une résistance croisée entre fluconazole et itraconazole est fréquente chez ces patients. En dehors du SIDA, les infections aux espèces de *Candida*, constituent la cause la plus fréquente de mycose systémique. Dès les années 1990, on a constaté une modification épidémiologique avec l'accroissement des candidémies à des espèces de *Candida-non-albicans* (*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*), moins sensibles ou résistantes au fluconazole.

Une résistance des infections à *Candida* au fluconazole, par sélection d'espèces plus résistantes a également été décrite, en dehors du SIDA, chez des patients immunodéprimés cancéreux et greffés de moelle et chez des patients en unité de soins intensifs.

Les isolats résistants sont principalement acquis à partir de la flore endogène et sous la pression de sélection de l'environnement. Une résistance secondaire de *Cryptococcus neoformans* au fluconazole est rare. Elle a été rencontrée chez des patients ayant un SIDA avancé qui recevaient un traitement prolongé au fluconazole. Les infections fongiques invasives dues à des moisissures, en particulier l'aspergillose, sont en augmentation et sont une cause majeure de décès chez les patients d'hématologie et les transplantés. Les espèces d'*Aspergillus* sont intrinsèquement résistantes au fluconazole, mais sensibles à

l'itraconazole. Une résistance secondaire à l'itraconazole de l'aspergillose est rare mais existe.

IV.MECANISME DE LA RÉSISTANCE

IV. 1. L' amphotéricine B [43 ; 44].

Par analogie à la nystatine que cette résistance a été étudiée. Elle est liée à la disparition de la cible qui est l' érgostérol et se traduit par : des mutations rares qui s'adressent à des gènes codant pour la biosynthèse de l' ergostérone. Il s'agit de gène ERG5 codant pour C₂₂ stérol désaturase (une des enzymes permettant le passage de 5, 7,24(28)-ergostatriénol à l' ergostérol) et du gène codant pour la Δ5,6 désaturase (une autre enzyme de la voie de biosynthèse de l'ergostérol). Il en résulte, un blocage de la synthèse de l' ergostérol et son emplacement par du méthylfécostérol qui s'accumule ainsi dans la cellule.

La résistance croisée entre azolés et l'amphotéricine B chez *Candida albicans*, de plus en plus fréquente, liée uniquement à la perte d'activité de la Δ5,6 désaturase. En fait, en bloquant C₁₄ Déméthylase, les azolés déplaceraient le métabolisme de lanostérol vers la voie du méthylfécostérol qui va s'accumuler et s'incorporer fonctionnellement dans les membranes. Cela suffit, à rendre la cellule multi-résistante à la fois aux azolés et l' amphotéricine B.

IV.2. La 5-fluorocytosine [43 ; 44].

Cette résistance se caractérise par deux types de mutations :

- Les mutations qui assurent une résistance de la cellule vis-à-vis de la flucytosine concernent des gènes codant pour la cytosine perméase et cytosine désaminase. Ces mutations se traduisent par la perte de l'activité enzymatique correspondante. Il en résulte une non pénétration de la flucytosine dans la cellule

et une absence de sa transformation en forme toxique 5-fluorouracile. Ceci entraîne une protection quasiment totale de la cellule vis-à-vis de l'antifongique.

- D'autres mutations peuvent être responsables de résistance partielle, elle concerne :

- Des gènes codant pour les enzymes permettant la conversion du 5-fluorouracile en 5-fluoro-desoxy-uracile-monophosphate et 5-fluoro-uracile-triphosphate notamment l'uracile phosphoribosyle transférase et l'uracile-monophosphate pyrophosphorylase .

- Des gènes codant pour la thymidylate synthétase. Elle en résulte soit une diminution de l'affinité de l'enzyme 5-fluoro-desoxy-uracile-monophosphate soit la surexpression de l'enzyme conduisant à une surproduction de la desoxy-uracile-monophosphate.

Ces mutations expliquent la fréquence élevée des souches fongiques flucytosine résistantes, tout cela contre-indique l'utilisation de la flucytosine en monothérapie mais toujours associée à un autre antifongique polyène ou azolé.

IV.3. Les azolés [43 ; 44].

Les résistances aux azolés sont nombreuses, elles sont dues à :

- a.** Des mutations du gène ERG16 qui code pour la C₁₄ déméthylase pouvant entraîner la réduction de l'affinité de l'enzyme pour les azolés et aussi parfois la diminution de l'activité de l'enzyme par modification de la conformation de la protéine au niveau de l'hème .

- b.** Une surexpression du gène ERG11 : il y a une surproduction de l'enzyme C₁₄ α déméthylase corrélée directement à une augmentation d'ARNm fongique correspondants.

c. Des mutations dans d'autres gènes de la voie de biosynthèse des stérols : elles concernent d'autres enzymes pouvant assurer fonctionnellement la viabilité de la cellule en absence d'ergostérol. Ce sont la $\Delta 5,6$ désaturase, la kétoréductase et la $\Delta 7,8$ isomérase.

d. Une surexpression des gènes codant pour des transporteurs membranaires : des mécanismes de résistance font intervenir des transporteurs membranaires dont le rôle est de rejeter activement dans le milieu extérieur les substances cytotoxiques présentes dans la cellule.

IV.4. Les échinocandines [106].

La résistance aux échinocandines est un événement relativement rare (Espinel-Ingroff, 2008). On estime à plus de 99% le taux d'isolats sensibles à ces antifongiques chez les espèces du genre *Candida* (Espinel-Ingroff, 2003; Pfaller *et al.*, 2008). Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une résistance aux échinocandines et ont déterminé le mécanisme moléculaire à l'origine de cette résistance, en particulier chez *Sacharomycète cerevisiae* et *Candida albicans*.

Dans tous les cas, il s'agit d'une mutation ponctuelle sur les gènes *FKS1* ou *FKS2* (Park *et al.*, 2005; Balashof *et al.*, 2006). 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" (Perlin, 2007). Chez les autres espèces, des mutations dans les "hot spots" ont également été mises en évidence, c'est notamment le cas chez *Candida glabrata* (Park *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2006), *Candida krusei* (Kahn *et al.*, 2007) et *Aspargillus fumigatus* (Gardiner *etal.*, 2005; Rocha *et al.*, 2007).

La résistance innée aux échinocandines chez *Cryptococcus neoformans* n'est pas liée à une mutation des gènes *FKS1* et *FKS2*. En effet, la (1-3)-glucane synthétase de *Cryptococcus 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 *Cryptococcus neoformans* reste donc à élucider, mais il semble être lié à la composition de la paroi en polysaccharides qui diffère de celle des autres champignons (Maligie et Selitrennikoff, 2005).

Certaines espèces de levures et de champignons filamenteux sont capables de croître en présence de fortes concentrations en échinocandines, bien supérieures à la CMI (Stevens *et al.*, 2005; Perlin, 2007). 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 (1-3)-glucanes et à la modification de la structure de la paroi qui en résulte (Stevens *et al.*, 2006; Cota *et al.*, 2007). 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 *Candida glabrata* (Chamilos *et al.*, 2007). 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 (Kanafani et Perfect, 2008).

CHAPITRE V

METHODOLOGIE D'EVALUATION DE LA SENSIBILITE- RESISTANCE *IN VITRO* AUX ANTIFONGIQUES

I. INTRODUCTION.

La recherche d'antifongiques passe généralement par l'établissement *in vitro* d'antifongigramme vis-à-vis de souches fongiques cibles. Cette étude doit être conduite en rapport avec une détermination de la sensibilité des champignons pathogènes aux antifongiques utilisés en thérapeutique selon des techniques rapides, précises et normalisées [49].

II. DEFINITION DE L'ANTIFONGIGRAMME.

L'Antifongigramme est un test qui a pour but de déterminer la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. Par définition, la Concentration Minimum Inhibitrice 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. La fiabilité d'un antifongigramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés [47].

III. INDICATIONS DE L' ANTIFONGIGRAMME [6, 53,58]

L'étude de la résistance de certaines espèces, ou souches, aux antifongiques a montré l'utilité de l'antifongigramme pour tester le degré de la sensibilité *in vitro* des champignons aux antifongiques. Toutefois, l' antifongigramme ne doit pas être considéré comme un test systématique utilisé dans les tous cas de résistance. L'antifongigramme est principalement indiqué dans les cas suivants :

- Des infections profondes ou septicémiques ou dans les localisations cutanéomuqueuses secondaires, associées à une diffusion systémique.
- Des évolutions cliniques défavorables ou en cas d'échec thérapeutique malgré un traitement adapté et bien conduites
- Des levures isolées de malades immunodéprimés ou hospitalisés dans les services à risque tels que le service des réanimations médicales, chirurgicales, d'oncohématologie, de transplantation d'organes, de néonatalogie etc.

Pour les mycoses superficielles, chez la personne non immunodéprimée, l'indication de l'antifongogramme est réservée aux souches isolées de lésions récidivantes et pour lesquelles on soupçonne un problème de résistance au traitement. Ce cas de résistance ne se manifeste que rarement car les topiques sont fortement concentrés en antifongiques.

IV. FIABILITE DES TESTS DE SENSIBILITE AUX ANTIFONGIQUES (OU ANITIFONGIGRAMMES) [50,58].

Il est évident que la réalisation des tests de sensibilité aux antifongiques présente un intérêt indiscutable pour l'identification des champignons présentant une résistance et la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une souche fongique mais surtout prédire l'évolution clinique sous traitement. Toutefois, leur fiabilité se trouve limitée par diverses difficultés : parmi lesquelles on peut citer :

- Il faut tout d'abord garder en mémoire le fait que les champignons sont des eucaryotes. Leur biologie est par conséquent beaucoup plus complexe que celle des bactéries et la compréhension des phénomènes de résistance aux agents anti-infectieux est encore incomplète.

- Les résultats de l'antifongigramme obtenus *in vitro* dépendent de nombreux facteurs concernant l'antifongique lui-même (caractéristiques physico-chimiques très différentes dans les trois classes d'antifongiques : polyènes, azolés, fluoro-pyrimidine), la méthode (méthode de macro-dilution ou de micro-dilution, méthode de diffusion en gélose), les conditions opératoires (pH et composition du milieu, température et durée d'incubation, densité de l'inoculum), le stade sous lequel le champignon est testé (blastospore / pseudo-mycélium pour les levures, spore/mycélium pour les moisissures). Ces variations pénalisent lourdement l'interprétation et la reproductibilité des résultats, non seulement d'un laboratoire à l'autre, mais aussi au sein d'un même laboratoire. En ce qui concerne l'amphotéricine B, l'influence des conditions opératoires est relativement limitée et pour la 5-fluorocytosine, ces paramètres sont actuellement bien maîtrisés. En revanche, pour les azolés, ces variables ont une incidence majeure sur les résultats. Jusqu'à ces dernières années, les quelques études qui y ont été consacrées n'ont pas encore permis de résoudre ces difficultés. C'est pourquoi, pour ces antifongiques, les résultats obtenus par les méthodes actuelles sont encore de valeur très incertaine.

- Enfin, il est fréquent de constater le manque de corrélation entre les résultats obtenus *in vitro et in vivo*. Etant donné les limitations liées aux tests *in vitro* concernant surtout les azolés, des efforts considérables ont été réalisés en recherche clinique pour développer des modules d'infections fongiques expérimentales. Actuellement, ceci constitue le moyen le plus fiable pour évaluer et prédire l'efficacité et la tolérance d'un antifongique avant son administration chez l'homme.

V. TECHNIQUES D'ANTIFONGIGRAMME [6, 53, 55].

V. 1. Les techniques d'antifongigramme de références.

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 comité de standardisation des techniques biologiques à utilisation médicale (National Committee for Clinical Laboratory Standards : NCCLS). La principale difficulté rencontrée a été la définition de la concentration minimale inhibitrice pour les azolés. Celle-ci est particulièrement délicate en raison de l'inhibition partielle de croissance caractéristique des azolés qui se traduit par la persistance d'un voile de croissance même aux fortes concentrations d'antifongiques. Ceci explique, qu'avec les azolés, les concentrations minimales inhibitrices soient souvent supérieures aux concentrations atteignables *in vivo*.

En 1992, les Américains, après dix années de recherche au sein du Comité National de Standardisation des laboratoires cliniques dit « NCCLS »(National Committee for Clinical Laboratory Standards), ont défini les paramètres permettant de déterminer la sensibilité des levures (*Candida spp*, *Cryptococcus neoformans*) aux principaux antifongiques systémiques, les Américains ont proposé la première technique de référence, officialisée en 1997 sous l'appellation M27-A , il s'agit d'une macrométhode longue et laborieuse réalisée initialement en tubes avec une détermination visuelle des concentrations minimales inhibitrices. Pour palier à la lourdeur de la mise en œuvre de cette technique, le NCCLS a proposé une microméthode adaptée pour une utilisation en microplaques avec une lecture spectrophotométrique des concentrations minimales inhibitrices. Par la suite, une version dite M38-A a été définie pour tester la sensibilité des champignons filamenteux (tableau 8).

Tableau 8 : Paramètres techniques de la macro et microdilution du CLSI [103]

	Levures (Document M27-A2)	Filamenteux (Document M38-A)
Format	Macrodilution Microdilution	Microdilution
Organismes	<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp., <i>Scedosporium</i> spp.
Milieu	RPMI-MOPS	RPMI-MOPS
Préparation inoculum	Spectro	Spectro
Taille inoculum	0.5 - 2.5 x 10 ³ UFC/ml	0.4 – 5 x 10 ⁴ UFC/ml
Incubation	35°C 48h / <i>Candida</i> spp. 72h / <i>Cryptococcus</i> spp.	35°C 24h / <i>Rhizopus</i> spp. 48h / <i>Aspergillus</i> spp. et <i>Fusarium</i> spp. 72h / <i>Scedosporium</i> spp.
Lecture	Visuelle	Visuelle
Critère de CMI	CMI-0 / AMB CMI -2 / 5FC et azoles	CMI -0 / AMB CMI-2 / 5FC et azoles

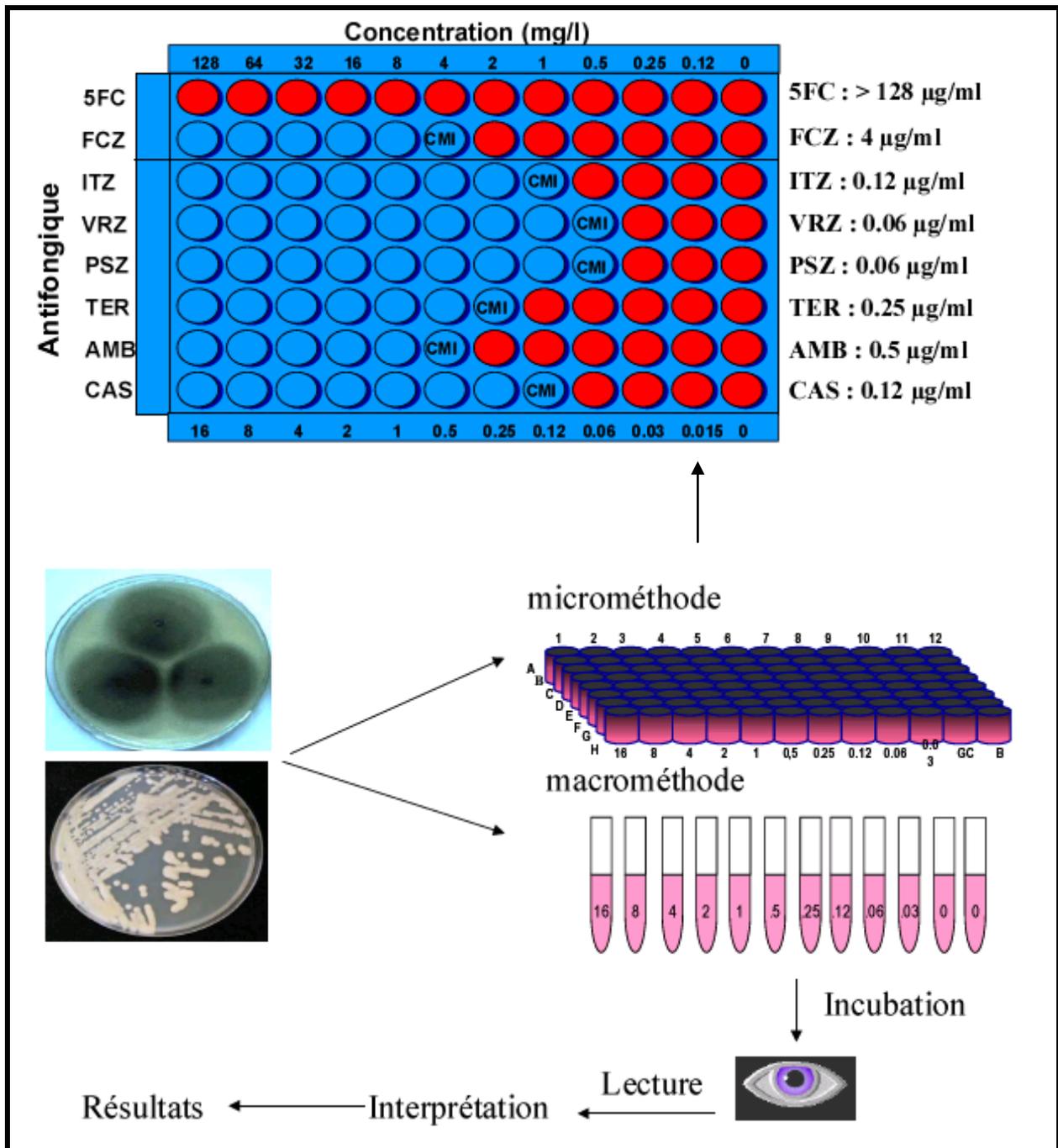


Figure 22 : Principe de la dilution en milieu liquide [103].

Récemment, en 2002, les européens ont proposé une nouvelle technique de référence dite ASFT-EUCAST (Antifungal Susceptibility Testing - European Committee on Antimicrobial Susceptibility). Cette nouvelle technique qui se base sur l'ancienne technique NCCLS M27-A, a apporté des modifications dont on peut citer : une augmentation de 2% en dextrose du milieu et une lecture à 24h en spectrométrie pour définir une concentration minimale inhibitrice à 50% d'inhibition par rapport au témoin, permettant ainsi une meilleure appréciation des seuils et une meilleure reproductibilité. Ces techniques de référence, dont il n'existe pas de version commercialisée, restent réservées à des laboratoires spécialisés (tableau 9).

Tableau 9 : Paramètres techniques du CLSI et EUCAST [103].

Paramètre	CLSI - 2002 (M27-A2)	EUCAST - 2003 (E.Dis 7.1)
Format	Microdilution (Macrodilution)	Microdilution
Milieu de culture	RPMI + MOPS, pH 7.0	RPMI + MOPS + 2% glucose, pH 7.0
Inoculum final	0,5 à 2,5 x10 ³ UFC /ml	0.5 to 2.5x10 ⁵ UFC /ml
Incubation	35°C, 48h	35-37°C, 24h
Lecture	Visuelle	Spectrophotométrique
Détermination des CMI	Azols et 5FC : 50% d'inhibition	Azols et 5FC : 50% d'inhibition
	Amphotéricine B : 100% d'inhibition	

Avantages et inconvénients des techniques de références.

➤ Avantages

- Méthodes de références.

➤ Inconvénients

- Non commercialisées, réservées à des laboratoires spécialisés.

- Techniques lourdes ne sont pas adaptées au laboratoire de routine.

V. 2. Les techniques d'antifongigrammes commercialisées.

Les tests de sensibilité aux antifongiques commercialisés doivent être validés par rapport à la technique de référence américaine NCCLS. Pour cela, on distingue deux grands groupes de Test : Tests validées par la méthode NCCLS et Tests non validées par la méthode NCCLS.

V.2.1 Tests validés par la technique de référence NCCLS [80].

Les tests validés par rapport à la méthode de référence sont au nombre de deux : E-test et Fungitest.

V.2.1.1. E-test [53, 64].

C'est une méthode dite par dilution-diffusion très largement utilisée, elle est basée sur l'utilisation de bandelette en plastique mince, inerte et non poreuse de dimension 5 x 60 mm. Un seul côté de la bandelette est étalonné avec une échelle de lecture de la concentration minimale inhibitrice en mg/ml et un code à deux lettres qui désigne l'identité de l'antifongique. L'autre côté de la bandelette est imprégné d'un gradient de concentration exponentielle prédéfinie de l'antifongique à tester, qui est déposé secondairement sur la gélose. Ce gradient couvre des valeurs très étendues de 0,06 à 256 µg /ml pour le Fluconazole et de 0,002 à 32 µg /ml pour la 5-FC, le kétoconazole, l'amphotéricine B et l'itraconazole.

Quand la bandelette est appliquée sur la plaque d'agar inoculé, il y a une libération immédiate de l'antifongique de la surface en plastique vers la matrice d'agar. Un gradient de concentrations prédéfinis, continue et stable de l'antifongique est créé directement sous la bandelette. Après l'incubation, selon laquelle la croissance devient visible, une ellipse symétrique d'inhibition centrée le long de la bandelette est perçue permettant de lire directement la concentration minimale inhibitrice efficace (ellipse d'inhibition), à l'aide d'une échelle de lecture sur une l'autre face de la bandelette.

Réactifs [64].

Les réactifs suivants sont disponibles sous forme de 100 unités par paquet :

Agent	Code	Fourchette de CMI µg /ml
Amphotéricine B	AP	0.002 - 32
Flucytosine	FC	0.002 - 32
Fluconazole	FL	0.002 - 256
Itraconazole	IT	0.0016 - 32
Kétoconazole	KE	0.002 - 32

Précautions et avertissements [64].

1. E-test est destiné seulement pour le diagnostic *in vitro*.
2. Bien que la procédure utilisée pour obtenir CMI soit simple, l'usage correct de l'E-test nécessite un jugement professionnel d'un opérateur qualifié et spécialisé dans les techniques de test de sensibilité aux antifongiques.
3. Des procédures aseptiques doivent être respectées à tout moment lors de l'ensemencement du spécimen champignon. Les plaques d'agar doivent être stérilisées avant et après usage.

Stockage [64].

-Tous les paquets non ouverts doivent être stockés à -20°C jusqu'à la date de péremption.

-Les bandelettes non utilisées stockés à -20°C dans des tubes de stockage à air comprimé ou dans un conteneur avec déshydratant, peuvent être utilisées jusqu'à la date de péremption (Figure 23).



Figure 23: Stockage des bandelettes [61].

Manipulation [64].

- Le paquet ou conteneur de stockage doivent être manipulés avec prudence pour éviter toute présence ou pénétration d'humidité.
- Retirez le paquet ou conteneur de stockage du congélateur (-20°C) pendant environ 20 minutes pour l'équilibrer à la température ambiante.
- La condensation d'humidité sur la surface extérieure doit s'évaporer avant l'ouverture.
- Inspecter le paquet et conteneur de stockage pour toute possibilité d'existence de trous ou de fissures.
- Ne pas utiliser les bandelettes si le paquet a été endommagé.
- Ne pas toucher la surface de la bandelette contenant le gradient d'antifongique, soit le côté sous l'échelle de la CMI.

- Placer les bandelettes dans un plateau applicateur E-test ou dans le couvercle d'une boîte de Pétri sec jusqu'à l'utilisation comme décrit dans le cadre d'application.

Matériel [64].

- **Matériel fourni**

-100 Bandelettes E-test.

- Une notice.

- **Matériel non fourni**

-Plaques d'agar avec les médias appropriés (profondeur de $4 \pm 0,5$ mm).

- Solution Saline stérile (0,85% NaCl) pour la préparation d' inoculum.

- Ecouillons stériles,

- Tampons,

- Tubes à essai,

- Pipettes,

-Pinces,

-Applicateur E-test,

-Modèle et ciseaux,

-Etalon standard de McFarland 0,5 McFarland 0.5 et 1 turbidité normes,

-Incubateur (35°C),

-Contrôle de Qualité souches,

-Conteneurs de stockage avec déshydratant.

Préparation du milieu [64].

RPMI 1640 bouillons + MOPS + 2% Glucose + 1,5% agar

La préparation du milieu est obtenue en rajoutant le Glucose et l'agar au RPMI 1640 selon les proportions suivantes : 2% Glucose et 1,5% agar.

La préparation d'un volume de 1 litre du milieu nécessite 46,19 grammes de RPMI 1640 (contenant 0.165M MOPS et L-glutamine), 15 grammes de Bacto agar et 20 grammes de Glucose.

1. Dissoudre la poudre RPMI dans 500 ml d'eau déionisée.
2. Stériliser le milieu avec un filtre de 0,2 mm de diamètre.
3. Dissoudre le glucose et Bacto agar dans 500 ml d'eau désionisée. Stériliser par autoclave pendant 15 minutes sous une pression de 15 psi et une température d'environ 121°C et refroidir ensuite à une température d'environ 50°C.
4. Chauffer doucement la solution stérile RPMI + MOPS à une température d'environ 45°C, puis on la mélange avec la solution refroidie de glucose-agar en ajustant le pH à 7,0.
5. Verser le volume approprié en boîtes de pétri stérile pour parvenir à une profondeur de la gélose de $4 \pm 0,5$ mm après solidification.

Préparation de Inoculum [64]

Homogénéiser les colonies de *Candida* bien isolé d'un jour au lendemain de la plaque Sabouraud Dextrose agar dans 0,85% de NaCl pour atteindre 0.5 McFarland de turbidité. Pour *Cryptococcus neoformans*, l'utilisation des colonies de 48 à 72 heure pour parvenir à une 1 McFarland de turbidité

Inoculation [64].

Incliner un écouvillon stérile non toxique dans la suspension d'inoculum et appuyer sur le coton imbibé contre les parois interne du tube. Ensemencer à l'écouvillon la surface totale de l'agar d'une manière uniforme selon une rotation de 90° dans trois directions. Ceci permet d'absorber l'humidité

excessive durant 10-15 minutes afin que la surface de l'agar soit complètement sèche avant d'appliquer la bandelette du E-test (Figure 24).

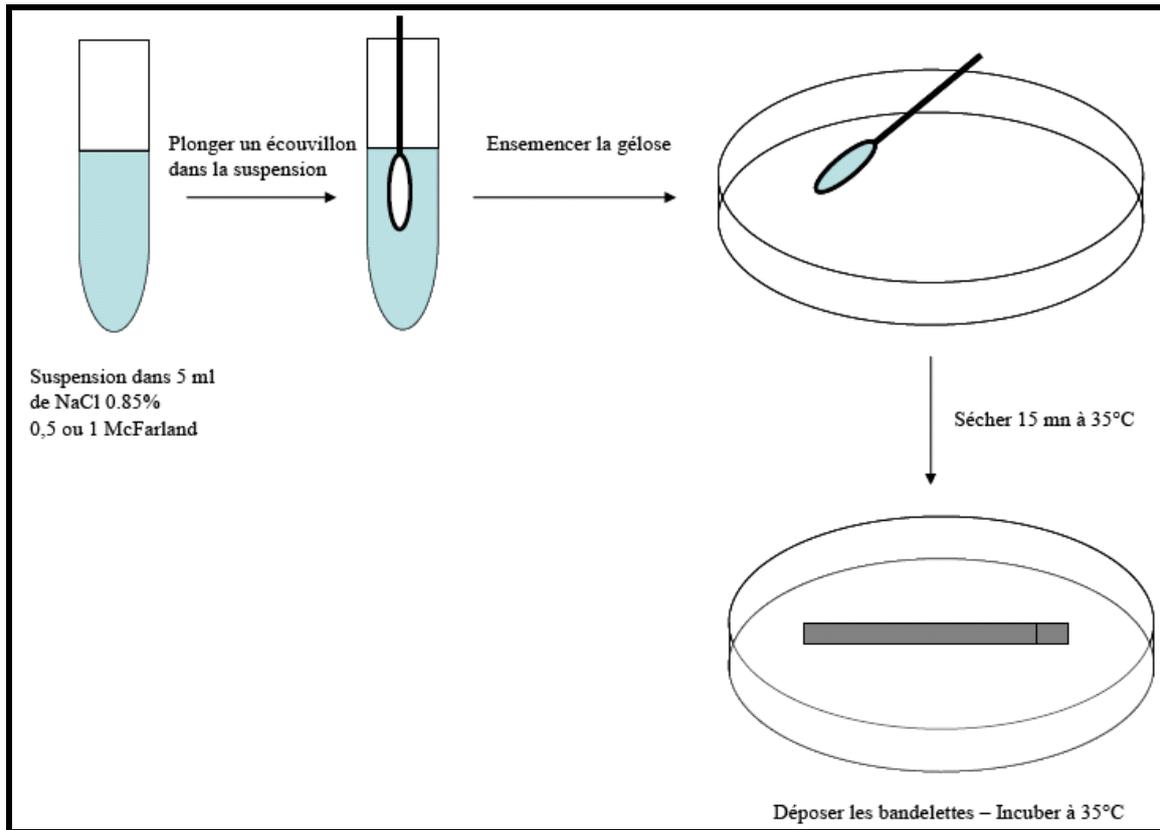


Figure 24 : Inoculation de la boîte de pétri [104].

Les étapes de la réalisation du E-test [64]:

- Ouvrir le paquet E-test avec une paire de pinces ou avec vos doigts.
- Retirez le nombre requis de bandelettes E-test et les placer sur une surface propre et sec ou dans l'applicateur E-test (figure 25).

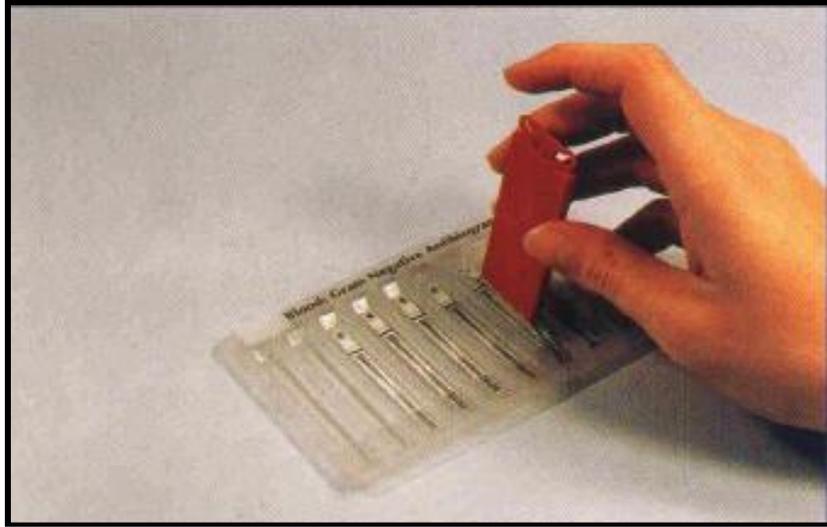


Figure 25: L'applicateur E-test [61].

-Appliquer les bandelettes à la surface d'agar inoculé, en utilisant un applicateur E-test.

-S'assurer que l'échelle des CMI est confrontée vers le haut, à savoir vers l'ouverture de la plaque, et que la concentration maximale est plus proche de la jante de la plaque (figure 26).

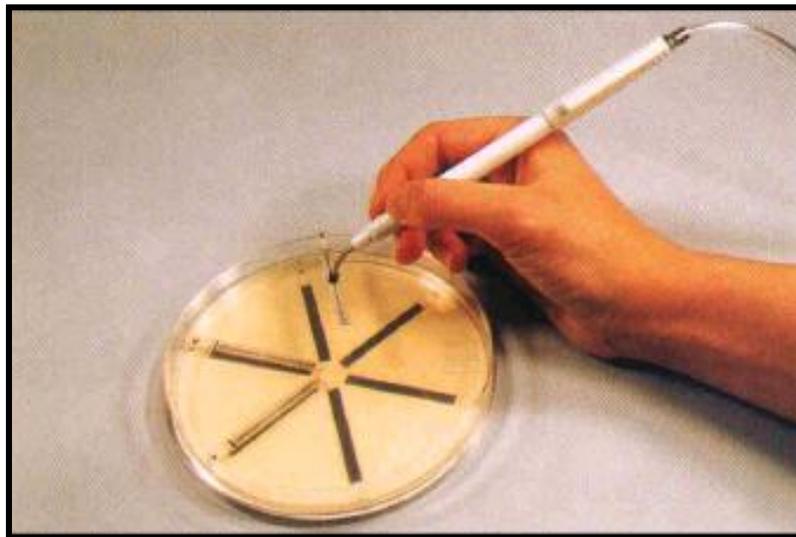


Figure 26: Technique d'application des bandelettes [61]

-Assurez-vous que toute la longueur de la bandelette est en contact complet avec la surface d'agar. Si elle est renversée ou mal placée, aucune inhibition ne sera formée parce que l'antifongique ne sera pas diffusé à travers la bandelette en plastique non poreuse.

-S'il y a des poches d'air, supprimer les en appuyant doucement sur la bandelette avec une paire de pinces sans la déplacer, en partant de la concentration minimale.

-Une fois la bandelette est appliquée il ne faut pas la déplacer en raison de la libération instantanée de drogue dans l'agar.

-Utiliser un gabarit pour un emplacement optimal des bandelettes sur la plaque d'agar. En utilisant un gabarit on peut placer quatre à six différentes bandelettes E-test sur 150 mm de la plaque d'agar. Pour la détermination d'une seule valeur de CMI, on peut utiliser un à deux bandelettes E-test sur 90 mm de la plaque d'agar (figure 27).

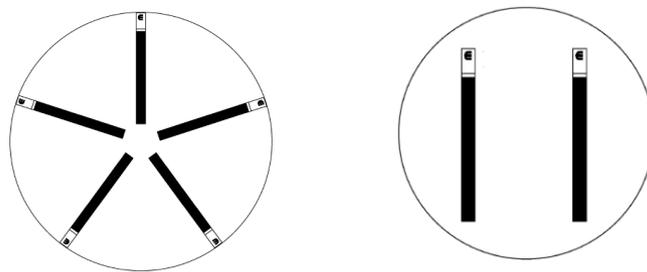


Figure 27 : gabarit E-test

L'incubation

Incuber les plaques d'agar à 35°C pendant 24 à 48 heures pour différentes *Candida spp.* et 48 à 72 heures pour *Cryptococcus neoformans* [64].

Pour les champignons filamenteux l'incubation est réalisée dans une étuve à 37 °C pendant 24, 48 puis 72 heures et une lecture journalière est effectuée [63]

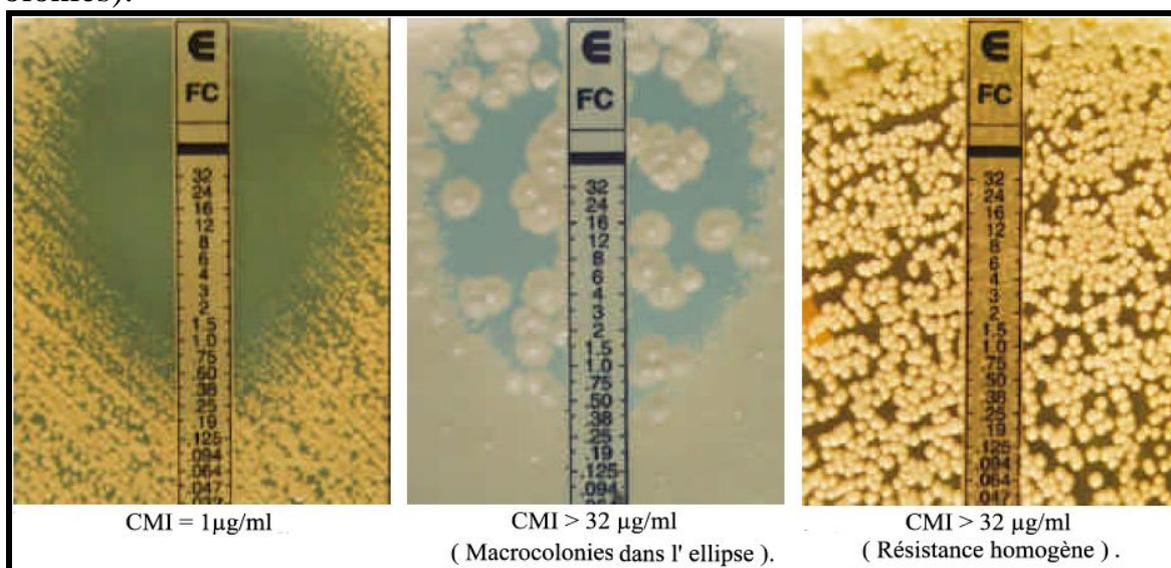
L'interprétation [64]

- Lecture de la concentration minimale inhibitrice (CMI).

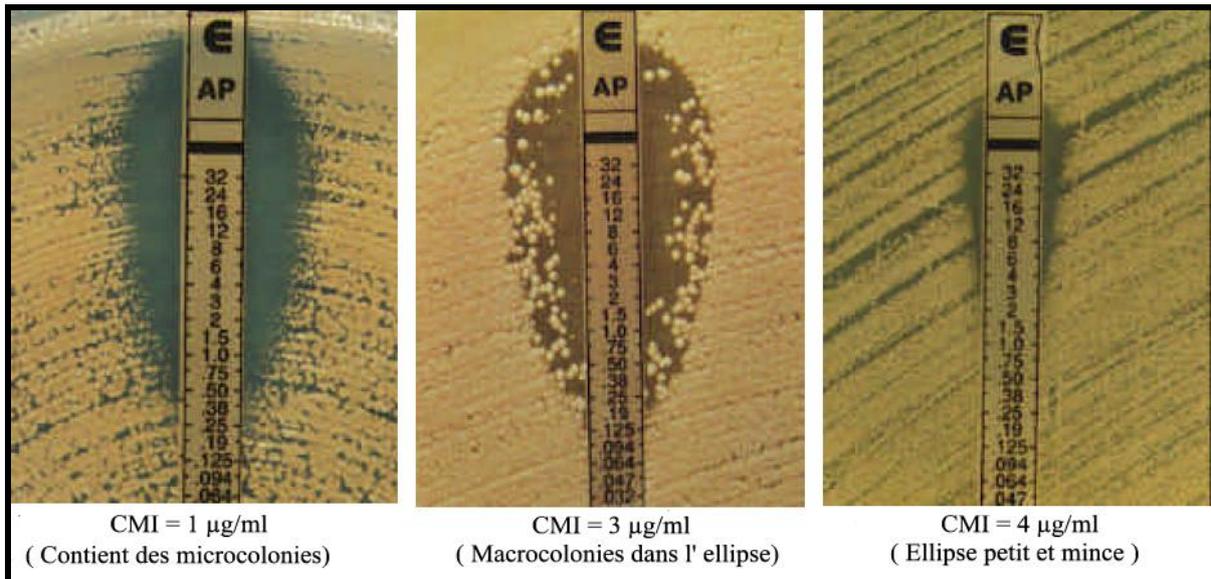
Après l'écoulement de la durée nécessaire à l'incubation où la croissance devient distinctement visible et si le point final est clair, on lit la valeur de la CMI au point d'intersection entre la zone d'inhibition et la bandelette du E-test. D'autre part, lorsque différentes combinaisons croissance-inhibition sont observées, on utilise les illustrations disponibles dans le guide de lecture du E-test pour sélectionner correctement le point de final de la CMI. Lorsque la croissance se produit tout au long de la bandelette c'est-à-dire, aucune ellipse d'inhibition n'est observée, la CMI devrait être déclaré supérieure à la plus forte valeur indiquée sur l'échelle de la CMI. Lorsque l'ellipse d'inhibition est en dessous de la bandelette c'est-à-dire il n'y a pas d'intersection entre la bandelette et la zone d'inhibition, la CMI doit être déclarée inférieure à la plus petite valeur sur l'échelle de la CMI.

Guide de lecture E-test pour les levures.

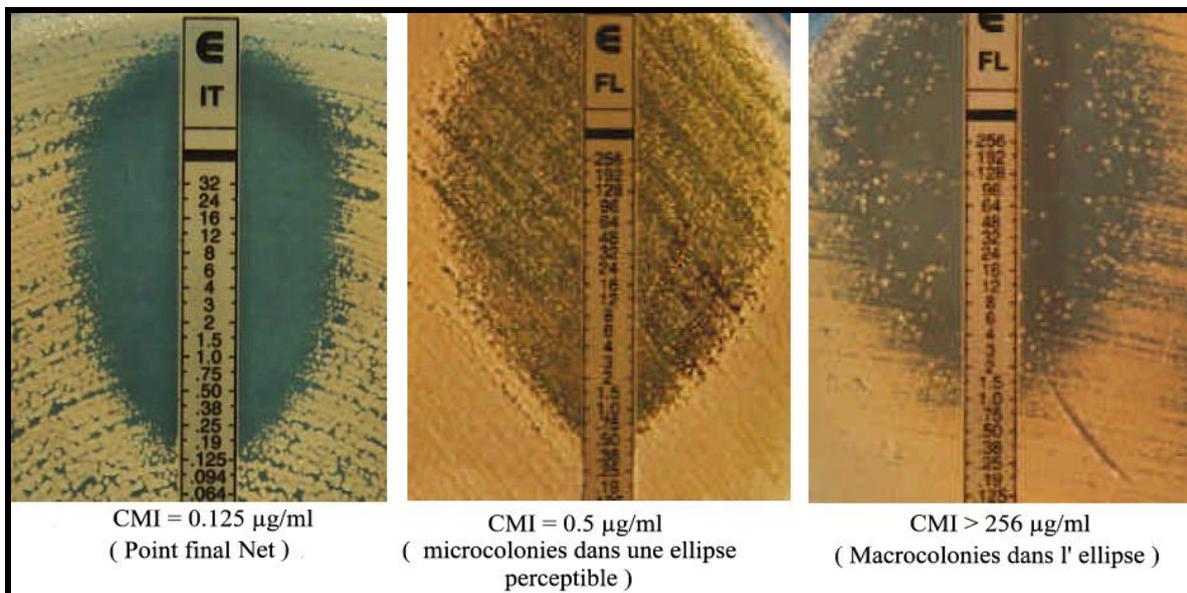
- **Flucytosine** (lire à peu près une inhibition complète, ignorant petites micro-colonies).



- **Amphotéricine B** (Lire à l'inhibition complète de toute croissance).



- **Azoles** (lire le premier point d'inhibition significatif ou correspondant à 80% d'inhibition).



Avantages et inconvénients :

➤ **Avantages :**

-De nombreuses études comparatives montrent une bonne corrélation par rapport à la méthode de référence. CMI proches de celles obtenues avec la technique de référence NCCLS

-Cette méthode permet de tester tous les antifongiques systémiques vis-a-vis de souches de *Candida*, de *Cryptococcus neoformans*, d'*Aspergillus*, de *Fusarium* et les mucorales.

-Elle permet de tester les antifongiques les plus récents comme le voriconazole.

➤ **Inconvénients :**

Une lecture et une interprétation délicates en raison de la présence relativement fréquente de macro ou de microcolonies dans l'ellipse d'inhibition surtout pour les azolés et le délai de lecture peut être considéré comme long : 48 h pour les *Candida*, 72 h pour *Cryptococcus neoformans*.

V.2.1.2 Fungitest

Cette technique évalue la croissance des levures en milieu liquide et en présence de six antifongiques testés à deux concentrations différentes.

Les six principes actifs utilisés dans cette technique sont les suivants :

5-fluorocytosine, amphotericine B, miconazole, kétoconazole, itraconazole et fluconazole [53].

La microplaque Fungitest comporte 16 puits dont deux sont réservés pour les témoins négatifs et deux autres pour les témoins positifs, alors que les 12 puits restant contiennent les six antifongiques cités précédemment suivant deux concentrations différentes sous forme déshydratées. [59]

Cette méthode est dérivée de la dernière recommandation du NCCLS, le milieu de culture utilisé est RPMI glucosé à 2% et tamponnée. A ce milieu on rajoute indicateur d'oxydoréduction qui traduit la croissance des levures par un virage du milieu du bleu au rose [60] (figure 28).

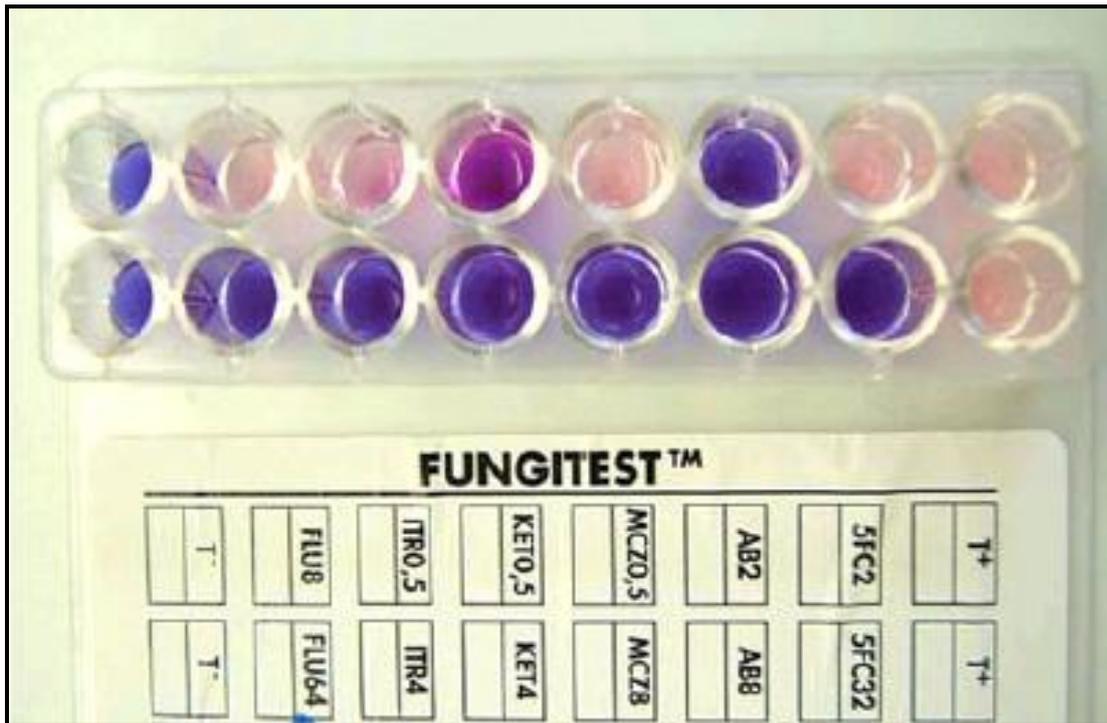


Figure 28: Microplaque FUNGITEST [62]

La préparation de l'inoculum [59].

On prépare une suspension de cellules en homogénéisant deux colonies bien isolées cultivées en milieu sabouraud pendant 24 à 48 heures dans 3 ml d'eau distillée stérile pour atteindre une opacité (turbidité) correspondant à 1.0 MacFarland standard ou 3×10^3 UFC/ ml; 100 μ l de cette suspension est ajouté à 1.9 ml d'eau distillée stérile, et cette solution obtenue est diluée par la suite en ajoutant 20 μ l à 3 ml du milieu préparé RPMI 1640 en suspension. Ceci nous

donne une concentration finale de l' inoculum de 10^3 UFC/ ml. Les microplaques sont inoculées en plaçant 100 μ l de la suspension appropriée dans chaque puit (figure 29).

Chaque antifongique est testé en deux concentrations choisies pour distinguer les isolats résistants et ceux qui sont sensibles. Les concentrations des drogues sont comme suit :

- 5-Fluorocytosine : 2 et 32 μ g/ml
- Amphotéricine B : 2 et 8 μ g/ml
- Miconazole : 0,5 et 8 μ g/ml
- Kétoconazole : 0,5 et 4 μ g/ml
- Itraconazole : 0,5 et 4 μ g/ml
- Fluconazole : 8 et 64 μ g/ml

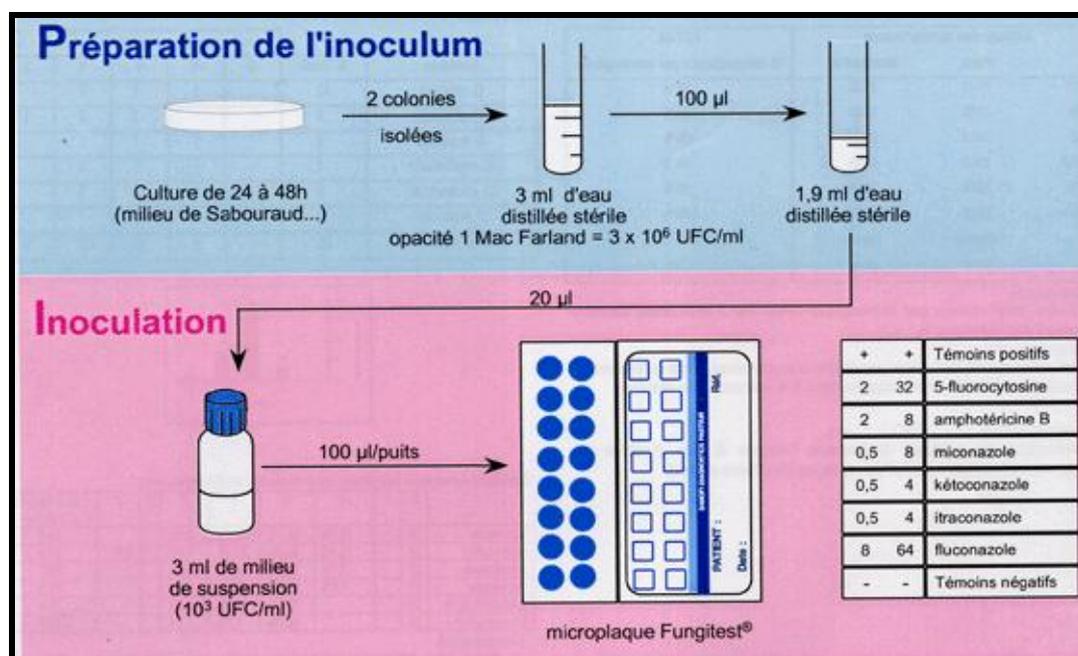


Figure 29: Schéma illustrant la technique de préparation de l'inoculum [60] L'incubation [59].

Les plaques Fungitest sont incubées à une température de 37° C pendant 48 heures pour *Candida. spp.* ou à une température de 30° C pendant 72 heures pour *Cryptococcus neoformans* (Figure30).

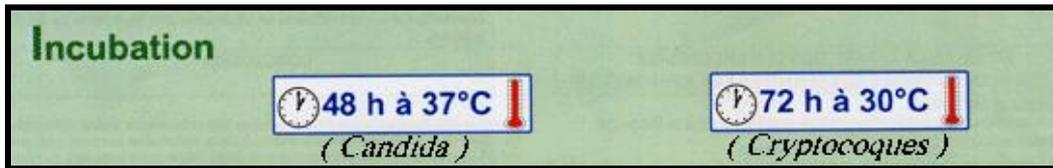


Figure 30: Schéma illustrant l'incubation [60]

L'interprétation [104]:

L'interprétation se fait en fonction de la couleur des 2 cupules pour chaque antifongique (Figure31).

Bleu – Bleu : absence de croissance : souche inhibée par l'antifongique

Rose - Bleu : faible croissance : souche intermédiaire

Rose - Rose : croissance : souche non inhibée par l'antifongique *in vitro*

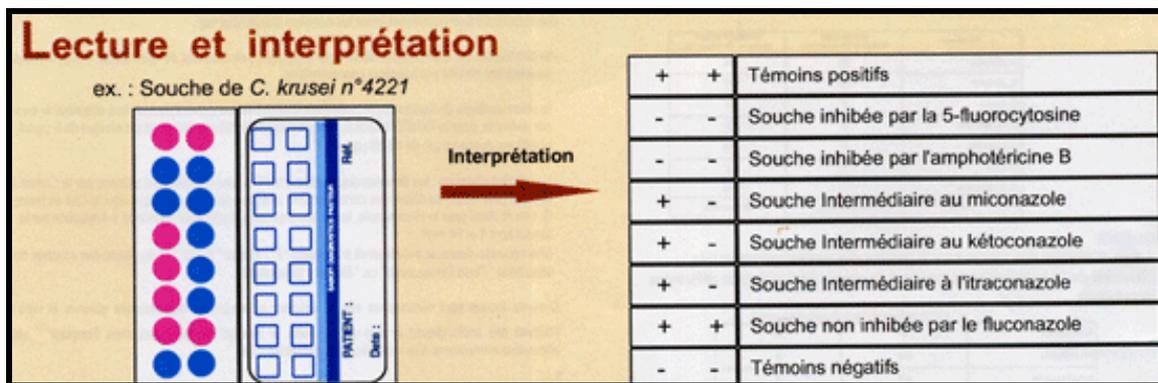


Figure 31: Schéma illustrant un exemple de lecture et de l'interprétation de la plaques Fungitest [60]

Avantages et inconvénients :

➤ *Avantages :*

- Une bonne condition de standardisation [6].
- Une bonne corrélation par rapport à la méthode de référence NCCLS pour les souches trouvées sensibles par cette dernière [53].
- Elle permet de doser les triazolés [6].

➤ *Inconvénients :*

- La corrélation est moins bonne pour *Candida glabrata*. [53].
- Une faible capacité du Fungitest pour détecter les souches résistantes : une proportion importante de souches de *Candida glabrata* intermédiaires ou résistantes par la technique M27 du NCCLS sont retrouvées sensibles. De plus, les valeurs des concentrations critiques sont différentes de celles du NCCLS [53].
- Elle dose que deux valeurs d'antifongiques [6].

V.2. Tests non validés par la technique de référence NCCLS.

Parmi les tests commercialisés mais non validés par rapport à la technique de référence NCCLS, nous citons : ATB-Fungus, Néo-Sensitabs et la méthode des disques.

V.2.1. ATB-Fungus [53, 65,104]

Cette technique permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et des *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques en milieu semi-liquide dans des conditions très proches de la technique de référence de micro-dilution.

La galerie comporte 16 paires de cupules, la première sans antifongique servant de témoin de croissance. Les 15 paires suivantes contiennent 5

antifongiques à concentrations croissantes permettant de déterminer des CMI (Figure 32).

-8 cupules pour la 5-Fluorocytosine : 0,5 à 64 μ g /ml

-6 cupules pour l'Amphotéricine B: 0,5 à 16 μ g /ml

-10 cupules pour le Fluconazole : 0,25 à 128 μ g /ml

-6 cupules pour l'Itraconazole: 0,125 à 4 μ g /ml

-2 cupules témoins sans antifongiques

Pour déterminer la CMI, on cherche et on quantifie dans chaque cupule la croissance des champignons par lecture visuelle. Cette appréciation visuelle peut différer d'une personne à l'autre, d'où la nécessité d'un opérateur qualifié dans la lecture de CMI.

La figure représente une galerie ATB FUNGUS2® de bioMérieux SA, modèle précédant l'ATB FUNGUS3®. La principale différence entre ces deux générations de galerie ATB FUNGUS2® est la présence d'un cinquième antifongique pour l'ATB FUNGUS3®, soit le voriconazole.

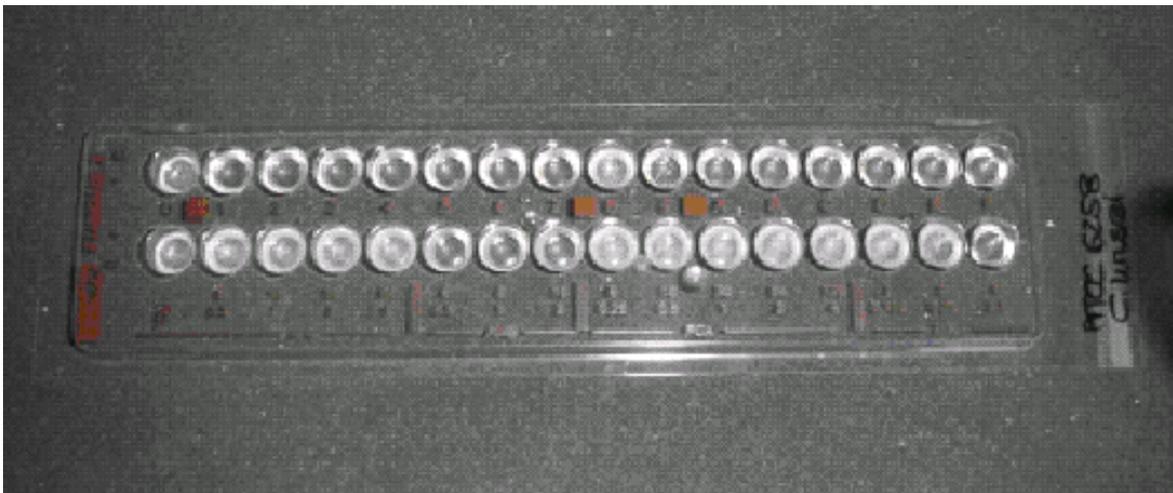


Figure 32: Galerie ATB FUNGUS2®, biomérieux SA Marchand S., 5(2004-2005).

Matériel [65]

➤ Composition d'un kit

- 25 galeries en emballage individuel avec déshydratant
- 25 couvercles d'incubation
- 25 ampoules d'ATB F2 Medium
- 25 fiches de résultats
- 1 notice

➤ Matériel non fourni

- NaCl 0.85% 3 ml
- Ecouillons
- Pipette électronique ATB 135 µl avec les embouts
- Pipette calibrée 20 µl et les embouts

Mode opératoire [65]

1. A partir d'une culture fraîche, prélever quelques colonies à l'aide d'un écouillon stérile et les dissoudre dans une ampoule de 3 ml de NaCl 0.85%, afin de réaliser une suspension d'opacité équivalente à l'étalon 2 MacFarland.
2. Contrôler la pureté de l'inoculum en l'isolant sur une gélose non sélective.
3. Transférer 20 µl de cette suspension à l'aide d'une pipette calibrée dans l'ATB Medium 1, homogénéiser.
4. Inoculer la galerie en distribuant 135 µl de la dilution dans chaque cupule à l'aide de la pipette électronique ATB. La concentration est d'environ 4×10^3 levure/cupule (Figure 33).
5. Mettre le couvercle
6. Incuber 24 heures à 35°C pour les *Candida* à l'étuve O₂ et 48 heures à 35°C pour les *Cryptococcus neoformans* à l'étuve O₂.

Pour les *Candida* dont la croissance dans les cupules témoins est insuffisante, incuber dans les mêmes conditions pendant 24 heures.

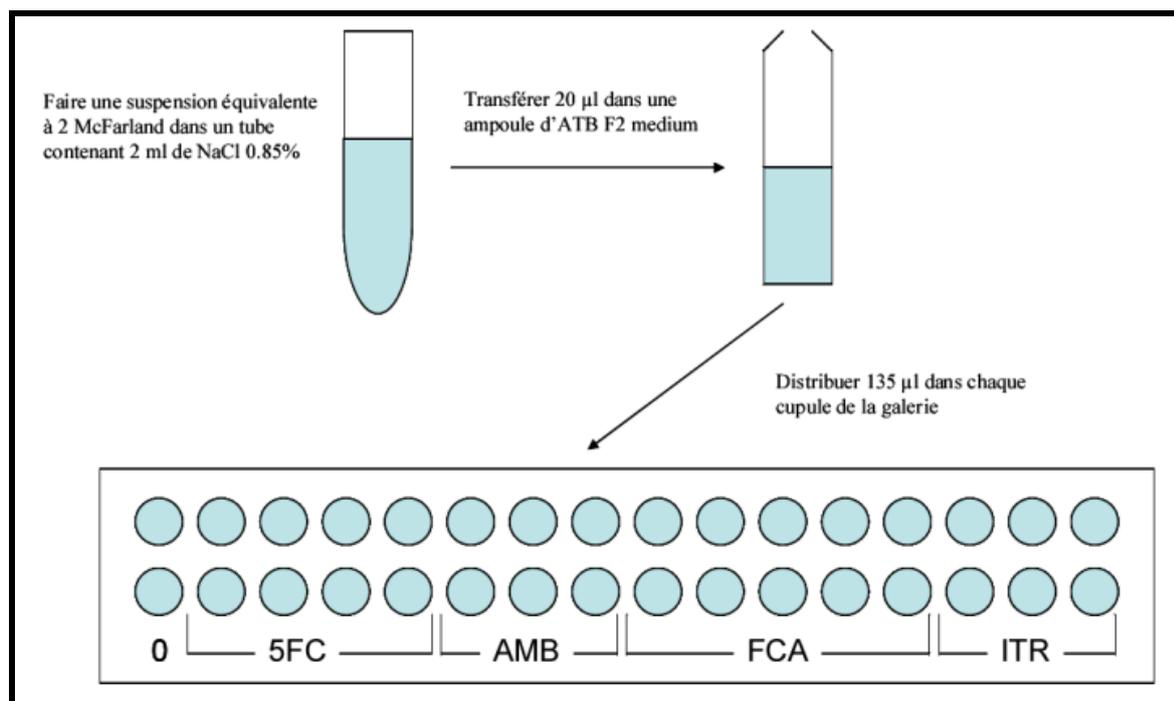


Figure 33: Schéma illustrant le mode opératoire de la réalisation de la galerie ATB FUNGUS2[®] [104].

Lecture et interprétation [65].

Pour faciliter la lecture, placer la galerie sur un fond noir. Pour chaque antifongique, commencer la lecture par la concentration la plus faible et noter un score de croissance pour chacune des cupules comparativement aux cupules témoins (tableau 10). L'absence de croissance dans l'une ou l'autre, ou dans les 2 cupules témoins invalide la galerie.

Tableau10 : Scores attribués à chaque observation de la croissance.

	Score
Absence de réduction de croissance	4
Légère réduction de croissance	3
Réduction marquée de croissance	2
Très faible croissance	1
Absence de croissance	0

Avantages et inconvénients [65].

➤ **Avantages**

- Le matériel dont on a besoin est fourni dans le kit, sauf le NaCl 0.85%
- Les CMI obtenues sont précises, grâce à plusieurs concentrations d'antifongiques différentes.
- L'interprétation des résultats est facile par rapport à l'E-test.

➤ **Inconvénients**

- Préparation assez longue comprenant plusieurs étapes.
- La lecture de la quantification de la croissance est relativement difficile au début et peut varier selon les personnes. Le résultat dépend de notre jugement.
- Parfois résultat peu clair. Le problème provenait certainement d'une mauvaise préparation ou d'une incubation inadéquate.
- Le temps d'incubation est de 24 heures pour toutes les espèces, sauf *Candida glabrata* (48 heures).
- Après 48 heures, les cupules de la galerie sont parfois sèches et difficiles à interpréter.
- Le contenu d'un kit est de 25 galeries et la date de péremption est de 8 mois.
- Le kit ne sera certainement pas écoulé durant ce laps de temps de 8 mois.

V2.2. Néo-Sensitabs [102, 105]

C'est une simple méthode de diffusion en gélose utilisant des comprimés pour déterminer la sensibilité des champignons aux antifongiques. Un grand nombre d'antifongiques est disponible en comprimés; l'Amphotéricine B (10 ug), Kétoconazole (15 ug), l'Itraconazole (8 µg), Fluconazole (25 µg), le Voriconazole (1,0 µg), 5-Fluorocytosine (1 et 10 µg), Clotrimazole (10 µg), le Miconazole (10 µg), Econazole (10 µg), Natamycine (10 µg) et Nystatine (50 µg).

Encore une fois, cette technique présente des difficultés au niveau du choix du milieu à utiliser et de l'interprétation des points finaux. La plupart des utilisateurs ont amélioré les performances de cette technique par la modification de l'agar RPMI-1640 qui est complété avec 0,2% de glucose et l'adoption des directives de base du CLSI pour rendre ce test plus standardisé. Toutefois, des études récentes ont utilisé l'agar Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5 mcg / 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 (Figure 34).

Le test Néo-Sensitabs est une méthode facile à mettre en place et montre un potentiel pour le dépistage d'un grand nombre de souches résistantes. Toutefois, les diamètres des zones d'inhibition ne permettent pas de différencier entre souche sensible et souche sensible-dose –dépendante, ainsi qu'une mauvaise corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI. Pour cela, les souches résistantes doivent être confirmées en utilisant une méthodologie appropriée de la CLSI.

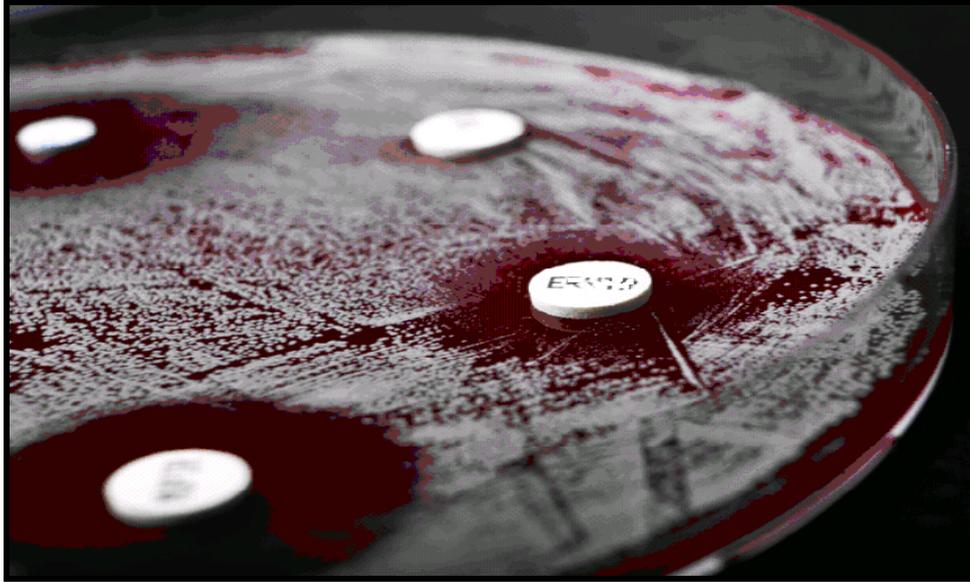


Figure 34: schéma illustrant le test Néo-Sensitabs

Préparation de l'inoculum :

❖ Les levures (*Candida* et *Cryptococcus*)

- Mise en culture dans le milieu d'agar Sabouraud Dextrose, les levures sont incubées pendant 24-48 heures à une température de 35 ° C pour obtenir une culture pure.
- Utiliser un écouvillon stérile pour créer des vortex dans les colonies et assurer une suspension homogène (pas de cellules agglomérées).

❖ Les champignons filamenteux

- Mise en culture dans un milieu d'agar Potato dextrose slopes, la plupart des champignons filamenteux sont incubés pendant 7 jours à une température de 35 ° C , à l'exception *Fusarium spp.* qui doit être incubé pendant 2 jours à une température de 35 ° C puis pendant 5 jours à une température de 25 °C pour assurer la sporulation maximale.
- Utilisation d'une pipette Pasteur stérile de se laver délicatement la surface de la colonie avec de l'eau distillée stérile ou de sérum

physiologique (pour l'*Aspergillus* utiliser une goutte de Tween 20 comme un agent émulsifiant pour aider les conidies à se disperser).

- Pour les filamenteux, qui ne sporulent pas abondamment, ajouter une goutte de l'agent émulsifiant Tween 20 à l'eau distillée stérile puis casser ces champignons au vortex avec perles de verre pour avoir une solution appropriée. Laisser la suspension au repos pendant quelques minutes afin que les grands segments hyphes aient le temps de s'installer, puis utiliser la couche homogène absolue pour obtenir la densité désirée de l'inoculum.

Inoculation des plaques

- Mélanger jusqu'à ce que les levures ou les conidies soient régulièrement réparties dans la suspension.
- Utiliser une pipette multi-canal. Ceci est important pour permettre une répartition uniforme de l'inoculum, évitant de sauter les puits et pour réduire la formation des bulles d'air.
- Incuber les plaques en chambre humide, si elles ne sont pas scellées.

La lecture des CMI

- Chercher le point final en comparant toujours la croissance des puits avec le puit de contrôle, s'assurer de la valeur du score
- Le saut des puits peut avoir lieu en raison de: (a) un inoculum incompatible déversé dans des puits, (b) mauvaise habitude de croissance de l'organisme, et (c) une erreur de fabrication lorsque le médicament déversé dans des puits. Répéter le test si 2 ou plus de puits sont sautés.

- Pour traîner les isolats vérifier la densité de l'inoculum, répéter l'essai et lire à 24 heures.
- En cas de doute, ou le résultat est inattendu, refaire le test.

Avantages et inconvénients.

➤ *Avantages*

- Simple méthode de diffusion en gélose.
- Grand nombre d'antifongiques est disponible en comprimés.
- Amélioration des performances de cette technique par la modification de l'agar RPMI-1640 qui est complété avec 0,2% de glucose.

➤ *Inconvénients*

- Difficultés au niveau du choix du milieu à utiliser et de l'interprétation des points finaux.

V.2. 3. Méthode des disques [53].

Cette méthode, par diffusion, utilise des disques dont la charge en principe actif est variable selon l'antifongique testé sont déposés sur un milieu de culture gélosé,ensemencé par inondation ou écouvillonnage. l'antifongique diffuse dans la gélose créant une zone d'inhibition de croissance du germe autour du disque, en fonction du diamètre de cette zone d'inhibition les souches peuvent être classées en sensibles (aucune pousse), intermédiaires (pousse dans la cupule faiblement dosée en antifongique)ou résistantes (pousse dans les deux cupules) (Figure 35).



Figure 35: Méthode des disques [62]

Cette technique permet d'évaluer les espèces de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* et les champignons filamenteux sporulés tels *Aspergillus fumigatus*.

Le panel des antifongiques comprend :

- 5-fluorocytosine : 1 ou 10 μg /disque.
- Amphotéricine B : 100 μg / disque.
- Nystatine : 100 UI/disque.
- Imidazolé : 50 μg /disque (miconazole, éconazole, clotrimazole, kétoconazole).

C'est une technique ancienne, d'emploi facile, mais pour laquelle aucune étude comparative n'a été réalisée avec la méthode NCCLS. Elle ne permet pas d'évaluer les triazolés. Certains imidazolés proposés ne sont utilisés qu'en topique, il n'y a donc pas d'intérêt à les tester, sauf dans le cas de mycoses superficielles récidivantes. En effet, les concentrations atteintes avec les antifongiques locaux sont largement supérieures à celles nécessaires pour être efficaces.

Avantages et inconvénients.

➤ **Avantages**

- Facile d'emploi.
- Permet d'évaluer les espèces de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* et les champignons filamenteux sporulés tels *Aspergillus fumigatus*.

➤ **Inconvénients**

- Technique ancienne.
- Aucune étude comparative n'a été réalisée avec la méthode NCCLS.
- Elle ne permet pas d'évaluer les triazolés.

V.3. L'antifongigramme automatisé [65, 66].

Les méthodes traditionnelles de test de sensibilité aux antifongiques sont lentes et requièrent beaucoup de travail, alors que le délai de mise en place d'une thérapie antifongique peut influencer considérablement les résultats pour le patient. Deux récentes études ont démontré que des retards de 12 à 24 heures dans le début d'un traitement antifongique efficace ont entraîné un taux de mortalité 2 à 3 fois supérieur en comparaison avec des patients ayant reçu le traitement plus rapidement.

Grâce à la technologie VITEK₂[®], l'antifongigramme est devenu automatisé, standardisé et rapide, les résultats sont disponibles en 13 heures seulement. Le Vitek₂[®] dispose d'un système automatisé capable de traiter la majorité des tests de routine avec un compte rendu des résultats fiable et rapide. Il détecte des résistances même faiblement exprimées. Plus de 330 espèces microbiennes peuvent être identifiées grâce à une base de données optimisée (Figure 36).



Figure 36: L'automate Carte Vitek AST-YS01[®].

Principe

Cette technique permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et des *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques en milieu semi-liquide.

La carte VITEK[®]2 comprend 64 cupules réactionnelles comprenant quatre antifongiques dont le fluconazole, le voriconazole, la flucytosine et l'amphotéricine B à quatre concentrations différentes.

La lecture s'effectue à 660 nm. L'analyse du taux de croissance est effectuée toutes les 15 minutes en cinétique. Puis, pour chaque antibiotique, un algorithme spécifique convertit les valeurs brutes (RTU) en CMI calculée. Pour calculer les CMI, l'automate contrôle le remplissage des cupules, puis vérifie les valeurs brutes. Il élimine les valeurs brutes aberrantes liées au bruit de fond et aux souches difficiles à mettre en suspension.

Ensuite, il détermine la durée d'incubation de la carte. Dans la cupule contrôle, il évalue la vitesse de croissance du germe. La lecture s'arrêtera si la croissance dans tous les puits est suffisante. Celle-ci sera considérée comme la plus haute pouvant être mesuré pour cet antibiotique.

Enfin, les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R (sensible-intermédiaire-résistant) en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités.

Matériel

- Composition d'un kit
 - 20 cartes en emballage individuel avec déshydratant
 - 1 notice
- Matériel non fourni
 - NaCl 0.85%
 - Tube en plastique stérile pour la dilution
 - Ecouillons

Mode opératoire

A partir d'une culture fraîche sur COS, prélever quelques colonies à l'aide d'un écouillon stérile et les dissoudre dans environ 3 ml de NaCl 0.45%, afin de réaliser une suspension d'opacité équivalente à l'étalon 2 MacFarland.

Contrôler la pureté de l'inoculum en l'isolant sur une gélose non sélective. Tout d'abord, il faut placer le portoir sur la station satellite qui est un poste de travail nous permettant de programmer les analyses à effectuer, le nom du germe etc. Le tube contenant la suspension est alors placé sur le portoir. Le code barre de la carte AST-YS010 est scanné, puis la carte est introduite dans le tube.

Un tube vide est ajouté à côté du tube contenant la suspension. Le Vitek2® se charge automatiquement de la dilution à effectuer avec du NaCl 0.45%. Il homogénéise la suspension par aspiration et refoulement, puis il inocule les cartes. Pour finir, les cartes sont isolées de l'extérieur et l'analyse commence. Il n'y a ainsi pas de risque de contamination pour le personnel.

BioMérieux® assure des résultats dans les 13 heures pour les *Candida* et 20 heures pour les *Cryptococcus neoformans*.

Incubation et lecture.

Le système de transport place le porte-cassette de telle sorte qu'un mécanisme met chaque carte dans l'emplacement du carrousel, où elles restent pendant toute la durée de l'analyse.

Le carrousel, qui a une capacité de 60 cartes, tourne toutes les 15 minutes de façon à placer chaque carte en position de lecture. La tête de lecture déplace la carte à travers les blocs optiques. Après la lecture, la carte reprendra sa place dans le carrousel où l'incubation à 35,5°C se poursuit jusqu'à la lecture suivante.

Avantages et inconvénients de la carte Vitek AST-YS01®

➤ *Avantages*

- La préparation est simple et rapide.
- Facilité de stockage et d'élimination des déchets.
- Code barre individuel (reconnaissance du type de carte, traçabilité, carte périmée rejetée par le système).
- Tout le matériel est fourni, soit la carte. Il manque juste le NaCl pour faire la suspension.
- Les temps d'incubation prescrits sont plus ou moins corrects pour toutes les espèces de *Candida* ainsi que pour le *Cryptococcus neoformans*.
- Résultats rapidement disponibles.
- Méthode standardisée et automatisée.
- Reproductibilité excellente.

-Le contenu du kit est de 20 cartes et la date de péremption est de 14 mois, donc adapté à la consommation en routine.

➤ ***Inconvénients.***

-Il manque l'itraconazole par rapport à la galerie ATB FUNGUS3®.

VI. ASSOCIATIONS D'ANTIFONGIQUES [33].

Il peut être nécessaire d'associer plusieurs antifongiques pour augmenter la force du traitement ou prévenir l'émergence de mutants résistants. Afin d'élargir le spectre d'action, une association synergique peut être constituée de 5-fluorocytosine avec l'amphotéricine B ou un azolé.

VI.1. Objectifs et risques des associations [84, 85].

Les objectifs des associations antifongiques sont multiples : l'élargissement du spectre pour couvrir des champignons intrinsèquement résistants ou de sensibilité diminuée aux antifongiques ; l'augmentation de l'efficacité, par l'utilisation de modes d'actions ou propriétés pharmacocinétiques différentes ou par le biais de l'augmentation de la pénétration ou l'inhibition de la sortie d'une substance par une autre et la prévention de l'émergence de résistances sous traitement.

Cependant, ces associations ne sont pas dépourvues de risques tels que les cumuls des toxicités de plusieurs classes médicamenteuses ; majoration des interactions médicamenteuses ; risques d'antagonisme *in vivo* malgré une compatibilité *in vitro*, et, en outre, les bénéfices cliniques potentielles qu'elles peuvent apporter ont un coût.

VI.2. Techniques d'étude des associations d'antifongiques [99].

La standardisation des techniques d'études des associations antifongiques au laboratoire aide à établir des corrélations *in vitro*–*in vivo*, même si celles-ci

sont encore mal évaluées. L'étude des associations *in vitro* repose principalement sur la méthode de l'échiquier en milieu liquide réalisée soit en macro-méthode soit en micro-méthode avec mesure du FIC index. D'autres techniques en milieu liquide ont également été utilisées tel que la méthode cinétique. Des techniques de diffusion en gélose sont rarement utilisées à titre d'exemple méthode de diffusion à angle droit, méthode des disques et E-test. De même que les techniques qui permettent de suivre l'activité antifongique au cours du temps, la mesure de l'effet post-antifongique, la mesure de l'inhibition de la pousse du pseudo-mycélium chez *Candida albicans* ou encore l'estimation de l'atteinte morphologique du mycélium chez *Aspergillus fumigatus* (Tableau 7).

Tableau 7 : Comparaison des techniques d'étude des associations d'antifongiques *in vitro*.

Technique	Avantages	Inconvénients
Diffusion en gélose	-gamme continue de concentrations possible. - système commercialisé (E-test)	- qualitatif -lecture sur quelques mm -concentration difficile à définir pour l'association
Echiquier en milieu liquide	- quantitatif -basée sur une technique standardisée (NCCLS) -lecture automatisable	- gamme discontinue de concentrations -problème de reproductibilité (nécessité de répétition)
cinétiques	- quantitatif -explore autres paramètres (fongicide, vitesse de fongicide)	- pas de standardisation -peu de concentrations étudiées à la fois

VI.3. Associations d'antifongiques [11, 35, 95, 100, 101].

La sensibilité *in vitro* des associations est évaluée par la méthode de l'index FIC (Fractional inhibitory concentration) utilisant la technique de microdilution M38-P, proposée par le NCCLS (National committee for clinical and laboratory standards).

Cet index est calculé de la manière suivante : $FIC = (Ac/Aa) + (Bc/Ba)$, Ac et Bc sont les CMI des drogues A et B en association, Aa et Ba les CMI des deux drogues seules. L'association est:

- synergique, si l'index FIC est $\leq 0,5$;
- additive, si $FIC > 0,5$ et ≤ 1 ;
- indifférente, si $FIC > 1$ et ≤ 2 ;
- antagoniste, si $FIC > 2$.

Les experts ont souligné d'une part les limites du score microbiologique utilisé, les résultats de l'index FIC étant très dépendants des techniques (modèle choisi *in vitro* et critères analysés) et, d'autre part, le problème de définition des termes "additif" et "indifférent". Ils ont présenté une revue de la littérature des études publiées sur les associations. L'association de la flucytosine avec une autre molécule (amphotéricine B ou 5-Fluorocytosine) est généralement favorable.

En effet la bithérapie antifongique classique repose sur l'association de l'amphotéricine B conventionnelle et de la 5-Fluorocytosine a montré une efficacité documentée au cours de l'infection par le VIH ou non, des candidoses systémiques sévères, et plus ponctuellement de certaines localisations de l'aspergillose invasive. Plus récemment, certains auteurs américains ont proposé l'association du fluconazole à la 5-Fluorocytosine dans le traitement de première

intention de la cryptococcose neuroméningée des patients infectés par le VIH. De même, l'association d'un dérivé azolé et de la 5-Fluorocytosine est parfois proposée dans le traitement de la chromoblastomycose.

L'association polyènes et azolés est théoriquement antagoniste *in vitro*. Les azolés déplètent la membrane fongique en ergostérol, qui est le site de fixation de l'Amphotéricine B. Selon les champignons, la molécule d'azolé et la séquence d'administration des 2 drogues dans le temps, les résultats *in vitro* ou *in vivo* divergent.

La précaution usuelle incitant à ne pas prescrire simultanément l'amphotéricine B et un dérivé azolé, en raison d'un effet antagoniste, n'a en fait jamais été démontrée chez l'Homme. Aucune étude ne permet en revanche de recommander une telle association, mais quelques études *in vitro* sont en faveur d'une synergie avec l'amphotéricine B et certains triazolés. L'expérience clinique acquise (amphotéricine B et itraconazole) dans le traitement de l'aspergillose invasive et (triple association amphotéricine B, 5-Fluorocytosine et fluconazole) dans le traitement de la cryptococcose ne montre pas d'effet délétère notable.

L'association terbinafine et azolés est presque toujours favorable *in vitro*. De même l'association de l'échinocandine avec les polyènes ou les azolés. L'inhibition de la synthèse du glucane de la paroi fongique par l'échinocandine pourrait faciliter l'action de drogues agissant sur la membrane cellulaire du champignon (polyènes, azolés).

En conclusion, l'exploration des associations thérapeutiques dans les IFI n'en est qu'à ses débuts. Les études *in vitro* et les expérimentations chez l'animal

sont encore rares et parfois contradictoires, les essais thérapeutiques sont quasi absents.

VII. INTERPRETATION DE L'ANTIFONGIGRAMME [6, 54,55].

L'analyse des résultats des tests de sensibilité aux antifongiques montre qu'ils sont influencés par plusieurs facteurs. Plus particulièrement, le manque de standardisation de ces techniques rend difficile leur interprétation qui dépend du point final, de la composition et du pH des milieux utilisés, de la taille de l'inoculum, de la durée et de la température d'incubation et de l'antifongique.

La composition du milieu utilisé dans les antifongigrammes ne doit pas contenir des substances qui interfèrent avec les antifongiques à tester en modifiant la valeur des CMI. Ainsi, l'utilisation du MOPS-tris (acide morpholine-propane-sulfonique) comme tampon dans le milieu synthétique SAAMF (Synthetic Amino Acid Medium Fungal) engendre l'antagonisme de la 5-Fluorocytosine avec les purines et les pyrimidines contenues dans le milieu synthétique. Les stérols du milieu synthétique peuvent souvent interférer sur les polyènes et agissent indirectement sur la valeur de la CMI.

Le pH du milieu peut être aussi une source de difficultés dans l'interprétation de l'antifongigramme car les milieux acides entraînent une augmentation des CMI d'amphotéricine B et des azolés, mais abaissent celles de la 5FC ainsi que la croissance des organismes testés qui peut en être affectée. Pour cette raison le NCCLS propose un milieu synthétique RPMI 1640 tamponné à pH 7,0 par le MOPS comme milieu de référence. Des résultats similaires peuvent être obtenus avec d'autres milieux, comme le milieu synthétique HR et le milieu de casitone qui représente également une bonne alternative pour évaluer la sensibilité des levures au fluconazole.

La technique utilisée pour la préparation d'inoculum ainsi que par sa taille peut également influencé sur la valeur de la CMI. *Paller et coll.* (1988), ont comparé quatre techniques de préparation d' inoculum et ont montré que la spectrophotométrie est la technique la plus standardisable [56].

La taille idéale de l'inoculum à utiliser est de l'ordre de 0,5 Mc Farland à 530 nm.

La durée d'incubation doit être choisie en fonction de la vitesse de croissance de la souche. L'allongement de la période d'incubation tend à augmenter la valeur de la CMI. Pour une durée d'incubation de 24 à 48 heures, les azolés sont fortement modifiés en comparaison avec l' amphotéricine B qui est peu affecté. Le NCCLS recommande une incubation de 48 heures pour *candida*. AB Biodisk recommande la détermination des CMI à 24 heures par la méthode E-test sous une température l'incubation idéale de 35° C.

La détermination du point final est la source la plus significative de variations interlaboratoires pour les azolés et la 5-Fluorocytosine. Espinel-ingroff,(1992) et Fromtling, (1993) ont montré que « la décroissance prononcée de la turbidité par rapport au témoin », soit une inhibition de 80 % de la croissance fongique, donne une détermination du point final la plus reproductible et la plus concordante avec les modèles *in vivo*. La turbidité est généralement déterminée à l'aide de la spectrophotométrie et nécessite un équipement très spécifique.

Les antifongiques présentent des caractères physico-chimiques qui rendent difficile leur évaluation *in vitro*. En effet, certains antifongiques ne sont pas solubles dans l'eau d'où la nécessité d'employer des solvants ce qui peut représenter une source de difficulté dans l'interprétation de l'antifongigramme.

Ainsi, il est important que les différentes dilutions soient effectuées dans des solutions adéquates évitant la précipitation du principe actif [57]. Le NCCLS suggère que l'amphotéricine B et Kétoconazole soient dissoutes dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO).

Par ailleurs, il ne faut pas oublier que, selon les molécules, la concentration de l'antifongique au site de l'infection peut être très différente. Par exemple, la concentration du fluconazole (molécule hydrosoluble) dans le liquide céphalorachidien, l'urine, et la salive est un bon reflet de sa concentration plasmatique. En revanche, pour l'itraconazole (molécule lipophile), on obtient une forte concentration tissulaire (osseuse) bien supérieure à la concentration plasmatique. Les seuils permettant de définir la sensibilité ou la résistance n'ont été définis que pour quelques antifongiques systémiques, l'utilisation d'associations n'étant pas prise en compte.

Pour les molécules fongicides *in vitro*, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible pour laquelle toute croissance est absente. En ce qui concerne les molécules fongistatiques, pour la technique NCCLS, la CMI est définie par 80% d'inhibition; ceci correspond à la concentration d'antifongique la plus faible pour laquelle l'opacité du milieu est identique à celle du témoin dilué au 1/5. Pour les techniques où la CMI est définie à partir d'un gradient d'antifongique qui diffuse dans un milieu gélosé comme le E-test, l'effet fongistatique peut se manifester par un léger voile où une repousse à l'intérieur de l'ellipse qui définit la CMI. Dans ce cas, les colonies à l'intérieur de l'ellipse sont plus petites et pigmentées à la différence des colonies qui définissent l'ellipse permettant la lecture de la CMI.

Pour les levures, certains antifongiques sont fongicides *in vitro* telles que l'amphotéricine B et la caspofungine, alors que d'autres sont fongistatiques tels que le fluconazole, l'itraconazole et le voriconazole.

Pour les filamenteux, l'amphotéricine B et le voriconazole sont fongicides *in vitro* tandis que l'itraconazole et la caspofungine sont fongistatiques. D'autres propriétés et paramètres liés à l'antifongique influencent sur l'analyse des résultats de l'antifongogramme dont on peut citer : la toxicité, la voie d'administration, les propriétés pharmacocinétiques, les interactions médicamenteuses et enfin la capacité à parvenir sur le site de l'infection.

En conclusion, tous ces paramètres étudiés présentent des difficultés dans l'interprétation de l'antifongogramme et compliquent toute corrélation *in vitro* – *in vivo*.

DISCUSSION

L'augmentation de fréquence des infections fongiques invasives s'est accompagnée d'une prescription accrue d'antifongiques, polyènes et surtout azolés, avec pour conséquence le développement de résistance. Si les infections candidosiques restent les plus fréquentes, on observe une augmentation des infections aux espèces *Aspergillus* et à des *Candida non albicans*, résistantes au fluconazole. De nouveaux pathogènes, particulièrement résistants, commencent à apparaître comme *Fusarium*, *Scedosporium prolificans* et *Aspergillus terreus*. Les études épidémiologiques ont permis d'identifier les facteurs de risque associés à la résistance aux antifongiques. La pression de sélection due à une prescription accrue des azolés est un facteur essentiel. L'immunodépression profonde et une neutropénie prolongée jouent également un rôle primordial. La connaissance des mécanismes moléculaires de la résistance, particulièrement pour les azolés, a considérablement progressé. Une surexpression des gènes contrôlant l'efflux des drogues, des altérations dans la synthèse de l'ergostérol et une diminution d'affinité pour leur cible enzymatique est les principaux mécanismes de résistance des azolés [36].

Les nouveaux antifongiques, triazolés de deuxième génération et les inhibiteurs de synthèse des glucanes ont des caractéristiques qui permettent d'espérer une efficacité contre certains germes résistants. De nouvelles stratégies sont en cours d'exploration, notamment les associations d'antifongiques et l'adjonction de traitements immunostimulants (cytokine).

Les tests de sensibilité aux antifongiques ont un rôle limité dans la plupart des infections à levures. Ils ne devraient être réalisés que lors d'infections profondes, quand l'évolution ou le pronostic sont incertains, ou lors d'échecs

thérapeutiques [69]. Les tests utilisables sont les micro-méthodes en milieu liquide M27-A mises au point par les comités de standardisation américain (NCCLS) ou européen (EUCAST) que seuls les laboratoires spécialisés peuvent mettre en œuvre [70], en raison de sa complexité, ce test n'est que rarement réalisé. Cependant, seuls les tests commerciaux dont la corrélation avec la méthode NCCLS a été validée doivent être utilisés notamment les bandelettes commercialisées type E-test qui permettent de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antifongiques. Les seules résistances connues avec une fréquence non négligeable sont celles concernant la résistance à la 5-fluorocytosine et au fluconazole. *Candida albicans* reste l'espèce la plus sensible au fluconazole, suivie de *Candida tropicalis*, puis de *Candida glabrata*, résistante pour 20 % des isolats et de *Candida krusei* qui est génétiquement résistante. Ainsi, une identification précise de l'espèce fongique permet de prévoir sa sensibilité aux azolés [69].

Candida glabrata, qui peut devenir résistant au fluconazole, constitue une cause fréquente de candidémie. La présente étude a été effectuée pour déterminer la portée des résistances croisées aux nouvelles molécules azolées d'isolats de *Candida glabrata* observée dans le cadre d'infection chez des receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) traités par dérivés azolés. Sept cas de candidose invasive due à *Candida glabrata* se sont produits chez des receveurs de GCSH traités par dérivés azolés entre janvier 2000 et décembre 2004. Les caractéristiques de ces cas ont été identifiées. Lors de cette étude, des isolats à colonisation séquentielle et invasifs ont été examinés pour déterminer les sensibilités au fluconazole, à l'itraconazole et au voriconazole, ainsi que les corrélations moléculaires par analyse du

polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP). Vingt-trois isolats de *Candida glabrata* ont été recueillis chez quatre patients ayant développé une candidémie sous fluconazole et trois patients ayant développé une candidémie sous voriconazole. Les CMI du fluconazole, de l'itraconazole et du voriconazole pour ces isolats étaient respectivement $\geq 64 \mu\text{g/ml}$, $2 \mu\text{g/ml}$ et $1 \mu\text{g/ml}$. Les coefficients de corrélation de Kendall ont démontré des associations significatives entre les CMI du voriconazole et celles du fluconazole et de l'itraconazole. Les isolats colonisants et invasifs qui présentaient des sensibilités variables avaient des profils RFLP similaires. Ces observations suggèrent que *Candida glabrata* présente une résistance croisée élevée cliniquement significative entre les dérivés azolés les plus anciens (fluconazole et itraconazole) et le voriconazole. La prudence s'impose donc si on envisage de traiter par voriconazole une candidémie à *Candida glabrata* chez des patients ayant déjà été lourdement exposés aux dérivés azolés [113].

Candida krusei, se trouve de plus en plus impliquer dans les mycoses systémiques par sa résistance au fluconazole. Ce dernier s'installe avec prédilection particulière chez les malades neutropéniques. D'origine probablement gastro-intestinale, cette levure est à l'origine de 2 à 25 % des fongémies. La présentation clinique la plus commune des septicémies à *C. krusei* est faite de fièvre résistante aux antibiotiques et au fluconazole.

Voici un cas de mycose systémique à *Candida krusei* qui n'a été fortement suspecté qu'après l'échec d'un traitement probabiliste au fluconazole. Une patiente de 28 ans était traitée par corticothérapie pour un lupus érythémateux disséminé depuis 1993. Elle a été hospitalisée en décembre 2004 pour une fièvre à 39°C avec altération de l'état général. L'examen clinique n'a rapporté que des

lésions buccales érythémateuses. Le bilan biologique a montré une pancytopénie avec un taux de polynucléaires neutrophiles à 700 éléments/mm³, une vitesse de sédimentation à 87 mm et une CRP à 21 mg/l. Devant cette situation, la patiente a été mise sous « protocole » probabiliste : céfotaxime (4 g/j) + gentamycine (160 mg/j) + fluconazole (150 mg/j). Après quatre jours de traitement, l'évolution était défavorable avec apparition des signes de choc septique. La patiente a été transférée en réanimation et un examen mycologique pour la recherche et la confirmation d'une origine fongique de ce sepsis a été entrepris. *Candida krusei* a été isolé et identifié au niveau du prélèvement vaginal, des urines et des lésions buccales mais pas au niveau sanguin. La patiente a été mise sous amphotéricine B après arrêt de fluconazole, son état s'est bien amélioré après 48 heures de traitement. La guérison a été confirmée par la stérilité des mêmes types de prélèvements, prouvée par des examens mycologiques de contrôle.

L'introduction du fluconazole dans l'arsenal thérapeutique des infections fongiques serait à l'origine de l'augmentation récente de l'incidence de *Candida krusei*. Wingard et *al.* l'ont bien montré. Le traitement d'épreuve efficace à base d'amphotéricine B d'un sepsis, permettrait de conclure à la présence d'un *Candida krusei*. Cela est intéressant du moment que la sensibilité des hémocultures ne dépasse pas les 50 %. Pour essayer de minimiser les risques d'un traitement (toxique) à tort ou de passer à côté d'une fongémie à *Candida*, il serait judicieux de répéter les hémocultures et encore davantage et d'insister si des données cliniques, biologiques et thérapeutiques penchent vers la candidose [114]. Devant cet arsenal des données mycologiques et de résistances vis-à-vis des différents antifongiques, une identification complète de la levure en cause

peut éviter le passage obligatoire par l'antifongogramme connaissant le profil de résistance de cette dernière mais cette approche reste limitée pour le traitement initial et de sa disponibilité. Maintenant pour la détection de nouvelle résistance, l'antifongogramme reste un moyen d'orientation très important. En l'absence de données fiables sur les corrélations clinicobiologiques, la détermination de la sensibilité aux antifongiques de la souche isolée ne fait pas encore partie de l'arbre décisionnel thérapeutique. Les tests standardisés sont peu nombreux et les résultats doivent donc être considérés avec beaucoup de prudence.

La grande majorité des isolats cliniques de *Cryptococcus neoformans* est sensible aux antifongiques conventionnels, amphotéricine B, 5-fluorocytosine et triazolés (fluconazole, itraconazole). La résistance initiale des souches à la 5-fluorocytosine est exceptionnelle, mais elle peut, en revanche, apparaître en cas de monothérapie qui est donc fortement déconseillée. Une diminution de sensibilité à cet antifongique en cours de traitement aurait été corrélée à un risque de rechute. Il existe peu de cas où la découverte de CMI élevée de l'amphotéricine B a été corrélée à un échec thérapeutique, mais cela est potentiellement dû à des problèmes techniques en raison de l'étroite gamme des CMI observées avec les méthodes utilisées. Les cinétiques de fongicidie (*time-kill curves*) pourraient mettre en évidence une tolérance à l'amphotéricine B pour les souches isolées de patients en échec thérapeutique, mais cette technique n'est pas utilisable actuellement en routine. La majorité des souches cliniques a une sensibilité normale vis-à-vis des azolés et en particulier du fluconazole. Les échecs thérapeutiques ou les rechutes ont parfois été associés à des diminutions de sensibilité au cours du temps. Cependant, une équipe a clairement démontré que l'existence d'une corrélation entre efficacité thérapeutique et CMI du

fluconazole dépendait de la méthode utilisée pour la détermination des CMI, ce qui rend difficile l'interprétation des résultats individuels en l'absence d'étude préalable. Cela prouve en tout cas que les CMI déterminées pour les souches de *Cryptococcus neoformans* ne sont pas des valeurs absolues. En l'absence d'études complémentaires, leur interprétation doit être faite en fonction des données établies avec la même technique dans le même laboratoire pour les souches de la même espèce et non en fonction de données publiées. Cela implique probablement de faire appel à des laboratoires spécialisés dans ces techniques.

Les champignons filamenteux comme *Aspergillus fumigatus* présentent des problèmes différents. Ces organismes possèdent des conidies rondes, petites, facilement comptables. Cependant, dans les formes invasives, il existe une forme filamenteuse qui ne peut être comptée avec précision et cause de l'adhérence rapide des hyphes aux surfaces. En raison de ces difficultés, de nombreuses études sur les moisissures publiées à ce jour ont débuté avec un inoculum de conidies et sont évaluées sur la présence ou l'absence de croissance des hyphes. Un défaut de croissance dans de telles études peut être dû à l'inhibition de la germination plutôt qu'à celle de l'hyphes et il n'est pas certain que de telles approches corréleraient avec la réponse clinique. Les tests de sensibilité aux *Aspergillus* sont revus récemment ; un procédé reproductible s'avère difficile et semble lié à l'utilisation de conidies.

Le Pitre (SFMM, Angers 1995) évalue un nouvel antifongogramme pour l'étude de la sensibilité des *Aspergillus sp.* à l'itraconazole et à l'amphotéricine B. Il s'agit de déterminer la CMI des antifongiques sur *Aspergillus sp.* par l'emploi de bandelettes de plastiques contenant un gradient exponentiel

d'itraconazole et à d'amphotéricine B (E-test). Les résultats préliminaires comparés à ceux obtenus en méthode de microdilution sont prometteurs. De même que pour *Candida albicans*, il est possible de réaliser des tests de sensibilité sur *Aspergillus sp.* en mesurant la respiration mitochondriale par la détermination de la réduction du MTT en formazan [54].

La résistance aux azolés est inhabituelle chez *Aspergillus sp.* l'intérêt de l'utilisation de dérivés azolés dans le traitement des infections à *Aspergillus* a été établi *in vitro et in vivo* en 1984. Il a été le premier produit actif par voie orale contre l'aspergillose invasive. En 1996, un nouvel agent, le voriconazole a montré des propriétés anti-*Aspergillus*. Le voriconazole constitue désormais le traitement de première intention de l'aspergillose invasive.

Voici le cas d'un patient ayant reçu un traitement à long terme par itraconazole et voriconazole pour une aspergillose intra-cavitaire bilatérale chronique, avec des aspergillomes dont les isolats d'*Aspergillus fumigatus* ont développé une résistance simultanée à l'itraconazole et au voriconazole. Une nouvelle mutation (G138C) du gène cible (*cyp51A*) codant pour la 14- α déméthylase a été détectée. Le patient a présenté une réponse à l'administration intraveineuse de caspofungine, qu'il a reçu six fois par semaine, sans apparition de résistance en 9 mois.

Le premier cas publié de souche d'*Aspergillus fumigatus* résistante à l'itraconazole date de 1997. Une revue de synthèse sur l'utilisation des dérivés azolés dans les infections à *Aspergillus fumigatus* réalisée en 1998 a conclu que la résistance aux azolés *in vitro* était peu fréquente et que les CMI de l'itraconazole étaient moitié moindres que celles du voriconazole ($p < 0,01$). Dans une étude hollandaise, 3 isolats d'*Aspergillus fumigatus* sur 114 étaient

résistants à l'itraconazole mais avaient tous des CMI faibles pour le voriconazole. Les cas de résistance au voriconazole sont peu nombreux et une revue des publications disponibles suggère que le voriconazole reste un agent utile, notamment dans les situations de résistance à l' itraconazole. Sept isotats présentant des résistances à plusieurs dérivés azolés ont été décrits récemment chez un groupe de patients fortement immunodéprimés. Warris et *al.*, pour leur part, on décrit un seul isolat résistant à plusieurs dérivés azolés mais le mécanisme de résistance n'a pas été déterminé. Nous pensons qu'il s'agit du premier cas de ce qui semble être une résistance à plusieurs azolés dans les isolats d'*Aspergillus fumigatus* issus d'un même patient [112].

En l'absence de techniques standardisées concernant la sensibilité des champignons filamenteux aux antifongiques, il est difficile d'évaluer et de comparer les résultats publiés. Depuis 1998 cependant, un document de référence a été publié par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) pour proposer une standardisation ; cette technique longue et difficile paraît bien corrélée pour l'amphotéricine B et pour l'itraconazole avec la méthode de l'E-test (Laboratoires AES) beaucoup plus facile d'utilisation dans un laboratoire hospitalier. Il apparaît clairement que les *Fusarium* sont résistants *in vitro* à la flucytosine, aux triazolés de première génération (fluconazole, itraconazole). La sensibilité à l'amphotéricine B est réduite avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées aussi bien pour l'amphotéricine B conventionnelle que pour ses formes liposomales. Parmi les nouvelles molécules, le voriconazole apparaît prometteur ; il existe cependant une variabilité dans les CMI obtenues en fonction de l'espèce, *Fusarium solani* étant l'espèce la moins sensible. Parmi les autres dérivés

azolés en cours d'évaluation, le posaconazole est sans doute le plus efficace. En revanche, la caspofungine n'exerce aucune activité vis-à-vis des *Fusarium*. *In vivo* Aucun consensus ne peut être dégagé de l'analyse de la littérature. Dans tous les cas, les facteurs de l'hôte (neutropénie avant tout) priment sur la thérapeutique antifongique. Seuls les patients recouvrant une production médullaire correcte (13 cas) répondaient au traitement dans une série de 38 cas. Les perfusions de granulocytes ont paru décevantes. En revanche, l'intérêt des facteurs de croissance granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) raccourcissant la période d'aplasie paraît inconstatable dans la survenue de la guérison. Dans les atteintes localisées, le rôle de la chirurgie est souligné. La majorité des patients se trouvent déjà sous antifongothérapie prophylactique (amphotéricine B, fluconazole) ou empirique au moment du diagnostic, limitant les possibilités d'interprétation. La mise récente sur le marché de nouvelles molécules ou des formulations lipidiques d'amphotéricine B tend à modifier les schémas thérapeutiques. Avant leur apparition, les séries rapportent une mortalité globale de 50 à 70 %. Malgré les CMI « limites » vis-à-vis de l'amphotéricine B, la série de fusarioses incluses dans une étude thérapeutique prospective confirme l'intérêt de l'Abelcet[®], y compris dans des cas résistants aux traitements conventionnels. Parmi 12 cas documentés, le taux de réponse, partielle ou complète, était de 89 %, bien supérieur à ce qui est noté dans les autres séries ou les revues de la littérature. Le voriconazole paraît également prometteur : une analyse récente de 21 cas compassionnels met en évidence un succès de 43 %. Depuis, plusieurs cas de succès thérapeutique avec le voriconazole ont été rapportés [111].

L'émergence des souches résistantes aux antifongiques, ainsi que l'élargissement des possibilités thérapeutiques par le développement de nouveaux antifongiques a créé une demande accrue de tests de sensibilité par les cliniciens. La diversité de ces tests de sensibilité pose pour les biologistes particulièrement, un problème de choix d'une méthode de routine fiable parmi les méthodes d'antifongigramme existantes, commercialisées ou non. L'absence de standardisation de ces techniques explique la mauvaise reproductibilité interlaboratoires, même intralaboratoire ainsi que le problème de corrélation *in vitro/in vivo*.

Une étude épidémiologique multicentrique française conduite en octobre 2004 par le Collège de Bactériologie, Virologie, Hygiène est effectuée pour faciliter le choix par les biologistes d'une méthode de routine d'antifongigramme pour *Candida sp.* La susceptibilité *in vitro* à l'amphotéricine B, à la 5-fluorocytosine, au fluconazole, à l'itraconazole, au voriconazole et à la caspofongine a été déterminée sur 46 isolats de *Candida sp.* Les souches isolées comportaient vingt-trois pour *Candida albicans*, douze pour *Candida glabrata*, cinq pour *Candida tropicalis*, trois pour *Candida parapsilosis*, un pour *Candida krusei*, un pour *Candida kefyr* et un pour *Candida guilliermondii*. Les CMI ont été mesurées par la méthode M27-A2 (CLSI) et EUCAST, et deux méthodes commerciales E-test et ATB Fungus ₂. Une analyse statistique comparative des CMI obtenues pour savoir si les résultats obtenus par les quatre techniques pouvaient être considérés comme équivalents a été effectuée pour chacune des espèces et pour chacun des antifongiques testés avec des tests non paramétriques : tests de Friedman et tests des signes. Les résultats des quatre techniques peuvent être considérés comme équivalents pour tester la sensibilité de *Candida*

glabrata vis-à-vis de l'amphotéricine B, de *Candida albicans* vis-à-vis du FCZ, de *Candida tropicalis* ou *Candida parapsilosis* vis-à-vis du fluconazole ou voriconazole [108].

Une enquête rétrospective effectuée à l'aide d'un formulaire de questions, portant sur l'année 2002, a été proposée aux membres du réseau de 209 microbiologistes du Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH), répartis dans 193 hôpitaux non universitaires couvrant géographiquement l'ensemble du territoire français, à pour but d'évaluer l'activité de mycologie au sein de la microbiologie, la quantité d'antifongigrammes réalisés, leurs indications, les méthodes utilisées, les molécules testées, l'interprétation des résultats, les difficultés et les attentes des microbiologistes concernant cette partie de leur activité. Parmi les hôpitaux du ColBVH, (32 %) ont répondu à l'enquête, ce qui représente environ 40 000 lits. L'activité mycologique est variable d'un centre à l'autre. En moyenne, les isolements fongiques représentent 10,8 % des isolements microbiens, et les antifongigrammes représentent 2 % des études de sensibilité ; l'antifongigramme est pratiqué dans 11,3 % des cas, contre 68,4 % des cas pour l'antibiogramme (ATB), soit en moyenne 82 antifongigramme par hôpital en 2002. 38% des répondants ne réalisent pas d'antifongigramme dans leur laboratoire : 26 % les transmettent à un laboratoire spécialisé, 12 % n'en pratiquent jamais. Parmi les 88 % de répondants qui pratiquent ou transmettent au moins un antifongigramme par an. Les espèces testées appartiennent essentiellement au genre *Candida*.

L'antifongigramme est effectué en fonction de divers critères biologiques ou cliniques variés, souvent à la demande du clinicien. Les méthodes les plus utilisées sont l'ATB Fungus bioMérieux® (56 %) et le E-test® AB Biodisk (41

%), ou une combinaison de deux ou plusieurs méthodes (38 %), conditionnant le choix des antifongiques testés en première intention : amphotéricine B dans 93 % des cas, fluconazole dans 49 % des cas. Les résultats sont interprétés en sensible–intermédiaire–résistant dans 98 % des cas. Un contrôle de qualité est utilisé, à intervalles réguliers, par 31 % des laboratoires. Seules les souches issues d'hémocultures sont conservées par la majorité des centres. Quarante-cinq pour cent des répondants sont fortement demandeurs de recommandations consensuelles concernant les indications, la réalisation et l'interprétation de l'antifongigramme et 98 % sont disposés à participer, de diverses façons, à un travail au sein du ColBVH sur ce thème [107].

Une étude multicentrique a été réalisée dans le cadre du Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (Col BVH) dans 95 hôpitaux a pour but de savoir quelles techniques étaient utilisées par les laboratoires de biologie hospitalière et d'évaluer les résultats obtenus. Les centres participants ont réalisé une identification et un antifongigramme de deux souches de référence : *Candida krusei* ATCC 6258 et *Candida parapsilosis* ATCC 22019, selon leur pratique habituelle. 29 % des laboratoires participants n'ont pas réalisé d'antifongigramme, 71 % des participants ont testé au moins une molécule, mais 17 % ont testé seulement 4 molécules amphotéricine B, 5-fluorocytosine, fluconazole et itraconazole. 46 % des laboratoires ont utilisé l'ATB fungus bioMérieux[®], 25 % le Fungitest bioRad[®], 16 % les E-test, et 6 % les disques Eurobio[®]. La comparaison entre les CMI obtenues pour l'antifongigramme par rapport aux CMI des 2 souches déterminées par la microméthode du NCCLS (document M27-A2) souligne une grande variabilité des CMI observées et la

nécessité de recommandations consensuelles sur le choix des techniques considérées comme valides en routine et leur interprétation [109].

La corrélation entre sensibilité *in vitro* et *in vivo* a été étudiée sur des modèles animaux. Celle-ci a tout d'abord été clairement démontrée pour la flucytosine sur un modèle murin de candidose disséminée alors que pour les azolés et l'amphotéricine B, les résultats n'étaient pas aussi probants. Des études récentes, pour lesquelles les tests de sensibilité étaient basés sur la technique de référence NCCLS, ont démontré une bonne corrélation *in vitro in vivo* sur un modèle murin de candidose disséminée infecté par *Candida albicans*, *Candida krusei* et *Candida lusitaniae* et traitée par fluconazole, flucytosine, amphotéricine B. De même, une bonne corrélation *in vivo in vitro* sur un modèle de cryptococcose murine traitée par fluconazole a été constatée. Il est probable que les résultats discordants d'autres études soient en relation avec une absence de standardisation des tests de sensibilité. Chez les malades neutropéniques sous prophylaxie par fluconazole, l'émergence de *Candida krusei*, résistant constitutionnel au fluconazole, a été constatée. De même, chez des malades sidéens, les échecs du fluconazole au cours de candidoses oropharyngées ont pu être mis en relation avec une résistance *in vitro* par la technique NCCLS. Cette corrélation *in vivo in vitro* a également été mise en évidence au cours d'une cryptococcose résistant au fluconazole [110].

La corrélation *in vivo in vitro* a d'abord été démontrée à l'aide de modèles animaux. Chez l'homme, celle-ci a été observée chez les malades sidéens souffrant de candidoses oropharyngées en échec thérapeutique. C'est à partir de ces observations, complétées de données obtenues à partir de quelques candidoses disséminées de malades non neutropéniques, qu'ont été définis, par la

méthode NCCLS, les seuils de CMI correspondant à la résistance *in vitro*. Cette corrélation a pu être également observée chez des patients neutropéniques pour lesquels une prophylaxie par fluconazole avait entraîné l'émergence de *Candida krusei*, espèce constitutionnellement résistante à cet antifongique. Plus généralement, en fonction des espèces de *Candida* et même des espèces

Aspergillus sp., des profils moyens de sensibilité *in vitro* ont pu être établis. Grâce à ces données, avant l'obtention de l'antifongigramme, en fonction de l'espèce identifiée par le laboratoire, le clinicien peut déjà orienter sa thérapeutique [55]. En conclusion, le choix de l'antifongique est plus question de ces effets indésirables que des problèmes posés par la résistance de l'élément fongique sachant que la notion sensibilité *in vitro in vivo* reste toujours controversée.

CONCLUSION

La prolifération des infections fongiques profondes dues à l'émergence de nouvelles espèces résistantes tels que les levures du genre *Candida*, *Cryptococcus*, et les espèces filamenteux du genre *Aspergillus*, les mucorales, *Fusarium*, *Scedosporium* et le développement de nouveaux antifongiques qui ont élargi le spectre thérapeutique, exige aujourd'hui la réalisation des tests de sensibilité standardisés et corrélés à l'efficacité clinique.

La diversité des tests de sensibilité pose pour les biologistes particulièrement, un problème de choix d'une méthode de routine fiable parmi les méthodes d'antifongigramme existantes, commercialisées ou non. L'absence de standardisation de ces techniques explique la mauvaise reproductibilité interlaboratoires, voire même intralaboratoire ainsi le problème de corrélation *in vitro in vivo*.

Compte tenu des paramètres annexes inhérents au patient : fonction immunitaire, localisation du foyer infectieux, présence de matériel étranger (sonde, cathéter, prothèse...), ou à l'antifongique (diffusion, pharmacocinétique, interactions médicamenteuses), se baser uniquement sur le résultat du test *in vitro* pour anticiper un succès est donc aléatoire.

Pour conclure, on doit considérer que la finalité ultime de l'antifongigramme est de détecter les échecs potentiels plutôt que les succès potentiels.

RESUMES



Titre : Place de l'antifongogramme dans la prise en charge des infections fongiques.

Auteur : BOUROUDA Nadia

Mots clés : champignon – infection – antifongique - antifongogramme

RÉSUMÉ

Le but théorique des tests de sensibilité aux antifongiques est de prévoir la réponse du malade au traitement antifongique. Une souche sensible devrait permettre d'envisager un succès thérapeutique alors qu'une souche résistante doit être considérée comme une cause menant à un éventuel échec thérapeutique. A travers ce travail, nous envisageons de montrer la place exacte qu'occupe l'étude de la sensibilité aux différents antifongiques et son impact réel sur la prise en charge des infections fongiques.

Actuellement, on distingue deux techniques d'antifongogrammes dits de référence (CLSI, EUCAST) qui sont lourdes et mal adaptées à une utilisation de routine, pratiquées uniquement par des laboratoires spécialisés ainsi que plusieurs autres tests commercialisés parmi lesquelles on trouve le E-test et le Fungitest qui offrent une meilleure corrélation avec la méthode CLSI.

L'antifongogramme est prometteur, du moins en ce qui concerne *Candida sp.* et *Cryptococcus neoformans*, mais restent toujours un outil de recherche à cause de l'absence de méthodes standardisées et fiables ainsi que le manque de corrélation *in vitro/ in vivo*. On a constaté aussi quelques résultats prometteurs pour les tests de sensibilité des filamenteux mais les travaux actuels en sont toujours à un stade embryonnaire.

Une grande variabilité des résultats dans les tests de sensibilité souligne la nécessité d'établir des recommandations pour les indications, le choix des méthodes et l'interprétation des valeurs de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques.

Title : Place of antifongigramme in support of fungal infections
Author : BOUROUDA Nadia
Keywords : fungus – infection – antifungal - antifongigramme

SUMMARY

Like all parts of human body, scalp is exposed to factors that may be harmful. Thus, some people may find themselves inadvertently with anomalies such as the mycoses of the scalp.

The retrospective study realized in the Laboratory of Parasitology and Medical Mycology of children's Hospital of Rabat over a period of 15 years from 1993 till December 2007, helped to draw up the cartography of the mycoses of the scalp according to diverse criteria among which the sex, the age and the sort in cause of the infringement.

During this study, 2962 mycological takings at the level of the scalp were made with the aim of confirming or countering the fungal origin of the infection. The mycological analysis confirms the cases of mycoses of the scalp in 61% of the total of the takings made at this level. So, dermatophytes, turns out to be the most involved in the mycoses of the scalp with a total of 1299 cases is (72 %). The yeasts *Pityrosporum* come in second place with a total of 288 cases or (27%), while the yeasts *Candida* (species *Candida albicans*) represent only 20 cases or (1%).

The main clauses dermatophytes identified as causal agent are *Trichophyton violaceum* (54, 17 %), followed by *Microsporum canis* (9, 50 %) of all the positive cultures. Quant to the inflammatory ringworm are by far the least frequent (3,27 %) the principal agent of which is *Trichophyton mentagrophytes*, they remain the privilege of the persons living in rural areas.

The comparison with previous surveys showed that microsporiasis which were almost absent are in full progression, whereas ringworm favosa are in net regression.

Our study shows that the attack rate among women is similar than men with a sex-ratio the M/F= 1,14. As for the age distribution, the highest incidence was recorded among the age group under 10 years.

عنوان الأطروحة رقم 25 : مكانة الأنتفنجرام لدعم التعفونات الفطرية

الكاتب: بوروسا نادية

الكلمات الأساسية: فطر — تعفن مصاد فطري انتفنجرام

ملخص

إن فروة الرأس الأشخاص قد يصابون ب، كجميع أعضاء الجسم تتعرض للأمراض، و هكذا نرى أن بعض بعض الأمراض الفطرية.

الدراسة التي أجريت في مختبر علم الفطريات والطبليات الطبية بمستشفى الأطفال ابن سينا بالرباط على مدى 15 عاما من 1993 إلى ديسمبر 2007 ، مكنت من إنشاء ورسم خرائط الأمراض الفطرية لفروة الرأس وفقا لمعايير مختلفة كالجنس والعمر والأنواع المسببة للمرض . خلال هذه الدراسة ، تم أخذ 2962 عينة فطرية من فروة الرأس من أجل تأكيد أو نفي مصدر العدوى الفطرية.

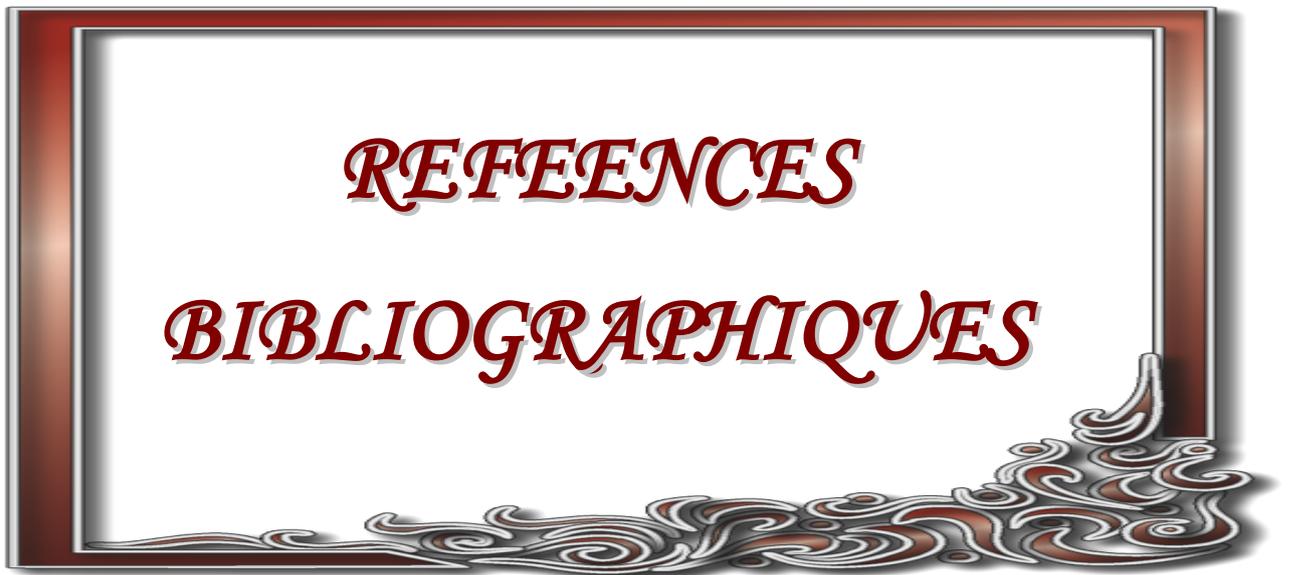
و لقد أكد التحليل أن حالات الإصابة بالمرض الفطري لفروة الرأس تمثل 61 بالمائة من إجمالي العينات التي أخذت على هذا المستوى. وهكذا، تبين لنا أن معظم الإصابات بالفطريات الجلدية تمثل 1299 حالة ما يعادل (72 بالمائة).

و أن الخمائر من نوع بيتروسبوروم تأتي في المرتبة الثانية بمجموع 288 حالة ما يعادل (27 بالمائة)، في حين الخمائر كانديدا (نوع كانديدا أ لبيكانس) لم تمثل سوى 20 حالة ما يعادل (1 بالمائة). و لقد تبين لنا خلال هذه الدراسة أن تريكوفيتون فيولاسوم يعتبر من أهم الأنواع الرئيسية المسببة للمرض بنسبة تعادل (54.17 بالمائة) ، تليها ميكروسبوروم كانيس بنسبة (9.50 بالمائة) من مجموع العينات الإيجابية. تريكوفيتون مانتاكروفيت الأقل تمثيلا بنسبة (3.27 بالمائة) و هي المسبب الرئيسي للسعفة الالتهابية لجلد الشعر (التي تصيب بالأخص سكان البوادي). مقارنة مع دراسات استقصائية سابقة تبين أن الميكروسبوريات التي كانت شبه مجهولة تتكاثر شيئا فشيئا وأن سعفة فافيك في تراجع ملموس .

و بينت الدراسة أن معدل الإصابة عند الرجال مماثل لمعدل الإصابة عند النساء، وبقسمة الجنس الذكري على الأنثوي حصلنا على معدل 1,14 ، وأما بالنسبة للتوزيع العمري فنسبة الإصابة الأعلى هي التي سجلتها الفئة العمرية دون العشر سنوات.

REFEENCES

BIBLIOGRAPHIQUES



[1] :N. Contet-Audonneau, D. Chabasse, C. Guiguen.

Mycologic. CD-Rom de mycologie médicale. Nancy: Fancemed- Logitel, 1998.

[2] :S. Djelouat

La mycologie médicale : généralités, <http://knol.google.com/k/salim-djelouat/la-mycologie#>

[3] : L. Million.

ANTIFONGIQUES, Traitement des mycoses invasives, DIU chimiothérapie anti-infectieuse, décembre 2006, http://medecinepharmacie.univ-fcomte.fr/cours_enligne/DU/chimiotherapie_anti-infectieuse/antifongiques_Millon.pdf

[4] : P. Pavese.

Antifongiques, Intérêt des associations, www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/du-grenoble/assAF-DUatbGrenoble07-pavese.pdf

[5]:DA. Sutton, AW. Fothergill , MG. Rinaldi.

Guide to clinically significant Fungi. Baltimore : Williams and Wilkins, 1998: 1-471.

[6]: D. Chabasse, C. Guiguen, N. Contet-Audonneau.

Mycologie médicale. Collection abrégée. Paris: Masson. 1999.

[7] : Sans noms.

Antifongiques, Encyclopédie Vulgaris-Médical, www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/antifongique-8607.html

[8] : B. Dupont, E. Drouhet.

Antifongique. Editions technique-EMC-Maladies infectieuses-8004 M 10, 9-1990,15p

[9] : B. Dupont, E. Drouhet.

Principaux antifongique, Editions Technique, EMC-Maladies infectieuses, 1990, pp.252-265

[10] : R.Bouhsain.

Thèse Numéro5/2000, Les mycoses superficielles et leurs traitements.

[11]: O.Lortholary, M .Tod, B.Dupont.

Antifongique, encyclopédie medico-chirurgicale 8-004-M-10, Elsevier, Paris, 1999.

[12]: CJ. Alexopoulos, CW. Mims, M. Blackwell.

Introductory mycology. New York : John Wiley, 1996.

[13]: G.S. De Hoog, J. Guarro.

Atlas of clinical Fungi. Baarn: Central bureau Voor Schimmelcultures. The Netherlands, Universitat Rovira i Virgile, Reus, Spain, 1995.

[14]: KJ. Kwon-Chung, JE. Bennet.

Medical mycology. Philadelphia : Lea and Febiger, 1992.

[15]: DA. Sutton, AW. Fothergill , MG. Rinaldi.

Guide to clinically significant Fungi. Baltimore : Williams and Wilkins, 1998:
1-471.

[16] : R.Chhermeue, J. Bussieras.

Aspergilloses aviaires, in : Abrégé de parasitologie vétérinaire : mycologie. Editions Unite de parasitologie - mycologie de l'ENVA, 1993, 11-54.

[17]: R.Agerer.

Das System der Pilze aus neuerer Sicht-In : Blackwell Verlag. Mycoses, 2003, 46
(Suppl. 1), 2 - 14

[18] : F. Botterel.

Démarche diagnostique et prise en charge des infections fongiques chez les patients immunodéprimés. ANTIBIOTIQUES, ELSEVIER MASSON SAS, 2007 ; 9 : 34-43

[19] : www.ateliersante.ch/candida.htm

[20] : M. Develoux, S. Bretagne.

Candidose et levures diverses. EMC-Maladies Infectieuses 2005 ; 5 :119-139

[21]: V. Kremery, A. J. Barnes.

Non-albicans candida spp causing fungaemia , pathogenicity and antifungal resistance. J. of Hospital Infection 2002 ; 50 :243-260

[22] : M. Pittet.

Candidémie et candidose généralisée. Ency. Med. Chir. 2000 ; 36 ;983-D-10 ;13p.

[23] : P. Germaud.

Aspergillus et système respiratoire. EMC-Traité de médecine Akos 2005 ; 6-0925 :9p.

[24] : B.Dupont.

Choix et emploi des médicaments antifongiques. La revue du praticien 2001 ; N° 7 ; 51 : 752-756

[25] : D.Chabasse.

Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médical ; mars 2002 ; n° 25

[26] : O.Morin.

Aspergillus et Aspergillose : Biologie. Ency. Med. Chir. 2003 ;8-600-A-10 :7p.

[27] : D.Caillot, I.Lafon, E.Ferrant, M.Barry, F.Dalle, B.Cuisenier.

Aspergilloses invasives, 2008 Elsevier Masson SAS. 8-600-A-20

[28] : B. Dupont.

Aspergilloses invasives-Actualités thérapeutiques .Réan.2003; 12:221-226

[29] : A .Datry, M. Thellier.

Biologie et pouvoir pathogène des champignons ; la revue du praticien, mycoses viscérales, 2001, 51,713-717.

[30]:PH.Dorosz.

Guide pratique des médicaments, 18 éditions, 1998.

[31]: DL. Hawksworth, BC. Sutton, GC. Ainsworth.

Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1995.

[32] : B.Dupont, E.Drouhet.

Antifongiques, Editions techniques antifongiques, encycl.Méd. Chir.(Paris-rance).Maladies infectieuses, 1990 ;800 4M-10-9-15p.

[33] : Sans noms.

Antifongiques systémiques, Fiche Pharmacothérapeutique pratique Actualités pharmaceutiques n° 483, Mars 2009.

[34] : K.Chemlal, P. Yeni.

Antifongiques, Encyclopédie Pratique de Médecine 5-0220, Elsevier, Paris.

[35] : F.Granier.

Les traitements antifongiques, Dossier Infectiologie, Presse Med. 2002; 31: 1785-1791, Masson, Paris.

[36] : F.Granier.

Antifongiques : Classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. Antibiotiques, 2003 ; 5 :39-48, Masson, Paris.

[37] : P.Delaunay, C. Fissore.

Interactions médicamenteuses des antifongiques systémiques, Journal de Mycologie Médicale 16 (2006) 152–158.

[38] : M. Mallié, JM.Bastide.

Nouveaux antifongiques et leurs stratégies de recherche, Revue Française des Laboratoires, avril 2001, N ° 332 ; Elsevier, Paris.

[39] : NC.Audonneau , JL. Schmutz.

Antifongiques et mycoses superficielles, Revue Française des laboratoires, avri12001, N ° 332 ; Elsevier, Paris.

[40] : M.[Mallie](#) , S.Bertout.

Casporfungine et mycoses à champignons rares : activité in vitro et in vivo chez l'animal et chez l'homme. Journal de mycologie médicale. 2007, vol. 17, no 1, pp. 25 – 32.

[41] : M.Mallie.

Activité antifongique in vitro et in vivo (modèles animaux) du posaconazole. Journal de mycologie médicale. 2006, vol. 16.

[42] : H.Dupont.

Levures en réanimation. 49^{ème} Congrès national d'anesthésie et de réanimation. La collection de la SFAR. 2007 :415-433.

[43] : G.Rene, N.Thierry.

Antifongique et antifongigramme.le cahier scientifique, supp 224 février 1999 : 26-29.

[44] : J.Reynes.

Les résistances aux antifongiques : la revue du praticien 1997 ;47 :1748-1752 .

[45] : H.Koenig.

Guide de mycologie médicale. Edition Ellipses.1995.

[46] : L.Nicolas, B.Pierre.

Infection à dermatophytes de la peau glabre et des plis .la revue du praticien.2000 ;(50) :655-660.

[47] : E. Forget, CH.Chochillon.

<http://www.pharmacie.univ-paris5.fr/IMG/pdf/antifongigramme.pdf>

[48] : Glossaire de Bactériologie

<http://coproweb.free.fr/gbearemi/dico/glossindex.htm>

[49] : R. Steiman, F. Seigle-Murandi et L. Sage

L'antifongigramme des dermatophytes. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.1988, 139, 485-491

[50] : R.Grillot.

Tests de détermination de sensibilité aux antifongiques:actualités et perspectives. Réan. Urg., 1996 ,5 (4bis spécial),13S- 17S.

[51]: KJ. Kwon-Chung, JE. Bennet.

Medical mycology. Philadelphia : Lea and Febiger, 1992.

[52]: D. Chabasse.

Classification des champignons d'intérêt médical ; **EMC, maladies infectieuses 2008.**

[53] : MD.Linas, S. Cassaing.

Méthodes d'évaluation in vitro des antifongiques: étude comparative des différents tests ; Revue Française des Laboratoires, avril 2001, N° 332

[54]:A. Datry, J.Carriere, M.Lepitre, H. Groussin, C. Silberstien et M. Danis.

Analyse critique des tests de sensibilité in vitro aux antifongiques. Méd Mal Infect. 1995 ; 25, 6-13.

[55] : Sans noms.

Antifongigramme : Technique et interprétions ;Biotribune Octobre 2005 n°16 ;page 25 ,26 , 27.

[56]: M. A.Pfaller, L.Burmeister, M.S.Barlett, M.G. Rinaldi.

Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation .J Clin Microbiol.1988; 26:1437-41.

[57]: M.Plempfer, E.Regel, K.H.Buchel.

Antimycotic efficacy of bifonazole in vitro and in vivo.Arzneim Forsch.1983; 33:517-23.

[58]: JD.Cavallo.

Médecine et armées, revue du service de santé de armés T 35-n°2-Avril 2007.

[59]: KG.Davey, AD. Holmes, EM. Johnson, A. Szekely, and DW. Warnock.

Comparative Evaluation of FUNGITEST and Broth Microdilution Methods for Antifungal Drug Susceptibility Testing of *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology, April 1998, p. 926-930, Vol. 36, No. 4.

[60] : Galerie FUNGITEST : PROTOCOLE.Sanofi PASTEUR.

mycologie.euro-bioweb.eu.com/pages/fungitest.html

[61] : A.Paugam.

Rôle du laboratoire dans l'utilisation des antifongiques .laboratoire de mycologie C.H.U. Cochin, Paris.

[62] : MF. Biava.

Mycologie médicale intérêt et limite de diagnostic .M.C.U.-P.H. C.H.U. Nancy service de Parasitologie et Mycologie.

[63] : C. Kauffmann-Lacroix, F.Witthuhn, X.Dufour, J.M. Klossek, M. Charron et M.H. Rodier.

Étude par la technique du E-test de la sensibilité aux antifongiques de souches de champignons filamenteux isolées des voies aériennes supérieures. J Mycol Med .2004; 14: 75-77

[64]: Sans noms.

E-test for antifungal susceptibility testing for *in vitro* diagnostic use in the USA, for investigational use only. WWW.abbiotest.com

[65] : G. Ariane.

Comparaison de méthode de deux antifongogramme : ATB FUNGUS3® et Carte Vitek AST-YS01®. ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion, travail de diplôme 2008-2009.

[66] : Sans noms.

Antifongique VITEK® 2 - bioMérieux France. www.biomerieux.fr.

[67] : M.Develoux, S.Bretagne

Candidoses et levures diverses. 2005 Elsevier 8- 602 -A -10.

[68] : V.Letscher-Bru.

Candidoses EMC Biologie clinique [90-35-0065] (2003)

[69] : M .Develoux, S.Bretagne

Candidoses et levures diverses. EMC-Maladies Infectieuses 2005 ; 5 :119-139

[70] : D.Chabasse.

Cryptococcose EMC 2003 Elsevier Masson SAS Biologie clinique [90-35-0075] (2003).

[71] : C. Guiguen.

Agents des mucormycoses Biologie clinique [90-35-0020] (2002)

[72] : J.Chandenier.

Agents des zygomycoses tropicales (conidiobolomycose et Basidiobolomycose) Biologie clinique [90-35-0050] (2002).

[73] : D.Chabasse, M.Pihet, J.-P.Bouchara.

Les moisissures opportunistes : émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine revue générale Revue Francophone des Laboratoires, mai 2005, N° 373

[74] : O. Morin.

Aspergilloses Biologie clinique [90-35-0055] (2002)

[75] : Ch. Hennequin.

Agents des hyalohyphomycoses à *Fusarium*, *Acremonium* et *Scedosporium*
Biologie clinique [90-35-0015] (2002)

[76]: B-L. Albert Bernard

Thèse N° 29/2000. Les nouveaux antifongiques : revue de la littérature et étude clinico-biologique de la Naftifine au Gabon et de la Terbinafine au Maroc

[77] : S. Brun, J.-P. Bouchara, D. Chabasse

Diagnostic au laboratoire de mycoses profondes. Revue Française des Laboratoires 2004 ; N° 359 : 33-39

[78] : H. Koenig.

Rôle du laboratoire dans le diagnostic des mycoses viscérales. Rev. Du Prat. 2001 ; 51 : 719-723

[79] : P. Rispail.

Bases et principes du diagnostic biologique des mycoses 1er cycle – PCEM2 – MB7 – Parasitologie – M3 – Diagnostic biologique des mycoses février 2008.

[80] : V. Letscher-Bru.

Antifongigramme et CMI Biologie clinique [90-60-0025] (2003).

[81] : S. Alfandari.

Associations d'antifongiques : rationnel, données cliniques, indications.
Infections Fongiques Sévères : Actualités, Lyon, 16 juin 2009.

[82] : F. Ajana.

Les anti-fongiques systémiques Quoi de neuf ? Service Universitaire et Régional des Maladies Infectieuses et du Voyageur ; Le 8/03/2005

[83] : A. Datry, M. Thellier, B. Traoré, O. Alfa Cissé, M. Danis.

Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques : antifongigramme, point sur les résistances, données pharmacologiques Ann Fr Anesth Réanim 2001 ; 20 : 389-93. 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier.

[84] : [J. Gellen-Dautremer](#), [F. Lanternier](#), [E. Dannaoui](#), [O. Lortholary](#)

Associations antifongiques dans les candidoses et aspergilloses invasives
Export. Reanimation, Vol. In Press, Uncorrected Proof .

[85] : S. Bretagne.

Associations d'antifongiques : D'antagonisme à synergie. Journal de mycologie médical. Vol 14, N° 4-C2 décembre 2004 PP. 226-230.

[86] : Th. Noël.

Mécanismes de résistance aux antifongiques Cours de Mycologie médicale, 2005-2006 Institut Pasteur.

[87] : Sans noms.

Traitements antifongiques en dermatologie, cours de dermatologie. www.Medix.free.fr.

[88] : S. FAURE.

Antifongiques systémiques, pharmacothérapie pratique. 21 avril 2009.
Elsevier Masson sas.

[89] : S. Carle, B.Pharm, M.Sc. pharmacienne.

Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. Pharmactuel Vol.
36 No 1 Janvier-Février 2003.

[90] : A. Datry, E. Bart-Delabesse

Caspofungin: mode of action and therapeutic applications La revue de médecine
interne 27 (2006) 32–39.

[91] : M. Tod.

Pharmacocinétique et pharmacodynamie des antifongiques systémiques. Hôpital
Cochin.

[92] : P. Delaunay, C. Fissore.

Systemic antifungal drug interactions; general review. 2006 Elsevier Masson
SAS. 10.1016/j.mycmed.2006.06.002.

[93] : Sans noms.

Les antifongiques à l'ICAAC. Congrès de la Nouvelle-Orléans ; IT N°44 -
Avril 1997. Adapté d'après l'article de Theo Smart dans Treatment
Issues (GMHC), vol.10, N°10, Octobre 1996.

[94] : Sans noms.

Médicament émergent acétate de caspofungin. N°17 SEPTEMBRE
2001.L'Office canadien de coordination de l'évaluation des technologies de la
santé (OCCETS). (www.ccohta.ca)

[94] : A.Delahaye.

Généralités sur les champignons microscopiques.

<http://www.arnobio2.com>

[95] : S. Bretagne.

Nouveaux antifongiques et nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'aspergillose et candidoses invasives, vol 7, N° 1-février 2005 pp.5-15.

[96]: P. Montravers, V. Chterev, P. Augustin, L. Etchegoyen

New therapeutic approaches for fungal infections: The place of new molecules ; doi:10.1016/j.antib.2007.12.003 ; Elsevier Masson SAS.

[97] : B. Dupont.

Les nouveaux antifongiques Table ronde. Nouveaux anti-infectieux. Arch Pidiatr 1996;3 (Suppl I):306s-308s © Elsevier, Paris

[98] : E.Dannaoui.

Principaux antifongiques systémiques Classification, mécanismes d'action, et de résistance, spectre, indications. DIU Stratégies Thérapeutiques en Maladies Infectieuses, Novembre 2009

[99] : E. Dannaoui, O. Lortholary, F. Dromer.

Techniques d'étude des associations d'antifongiques *in vitro* et *in vivo* chez l'animal. Journal de Mycologie Médicale. Vol 13, N° 2 - **juin 2003**. pp. 73-85.

[100] : SR. Hosein.

Traitement Sida : 60. Médicaments antifongiques -- mise en garde contre les associations médicamenteuses Numéro de volume : 7, Nombre de numéro : 61995 août

[101]: M. Scheven, M-L. Scheven.

Interaction between azoles and amphotericin B in the treatment of candidiasis. Clinical Infectious Diseases 1995;20:1079.

[102]: [D. Ellis.](#)

Antifungal Susceptibility Testing2010 The University of Adelaide Last Modified 11/03/2010 CRICOS Provider Number 00123M

[103] : E.Dannaoui.

Étude de la sensibilité aux antifongiques. www.Dannaoui@Pasteur.fr

[104] : Sans noms.

Techniques d'étude de la sensibilité aux antifongiques. Travaux pratiques.

[105]: [D.Ellis.](#)

Antifungal Susceptibility Testing Notes on the disk diffusion and E-Test methods. Mycology online. Testing2010 The University of Adelaide Last Modified 11/03/2010 CRICOS Provider Number 00123M.

[106] : P.vandeputte.

Mécanisme moléculaire de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de doctorat, spécialité biologie des organismes. Ecole doctorale d'Angers, 31 octobre 2008.

[107] : V. Blanc, O. Eloy , R. Sanchez , M. Mallié , Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH)

Antifungal susceptibility testing in 62 French hospitals. Elsevier, Journal de Mycologie Médicale 15 (2005) p197-210.

[108] : P. Rieu , O. Eloy , S. Bertout , M. Mallié , P. Bain , V. Blanc.

Sensitivity compared by CLSI, EUCAST, E-test and ATB Fungus 2 of strains of *Candida* sp. isolated during an epidemiological investigation on the candidemia in non university hospitals. Elsevier, Journal de Mycologie Médicale (2009) 19, P 94-103.

[109] : O. Eloy, V. Blanc, M. Mallié, J.W. Decousser, P. Pina, P.Y. Allouch, le collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH).

Identification and antifungal susceptibility testing of two strains of *Candida* in 95 french hospitals. Elsevier, Journal de Mycologie Médicale 15 (2005). p 117-126.

[110] : A. Paugam.

Intérêt de l'étude in vitro de la sensibilité des levures aux antifongiques. Revue française des laboratoires, février/mars 1996, N ° 282.

[111] : V. Lavarde, C. Hennequin

Infections à « Fusarium » Maladies infectieuses ; Elsevier 2006

[112]: S. J. Howard, I. Webster, C. B. Moore , R. E. Gardiner , S. , D. S. Perlin , D. W. Denning

Résistance d'*Aspergillus fumigatus* à plusieurs dérivés azolés. Journal de Mycologie Médicale. Elsevier Masson 17 (2007) S11-S15

[113]: A.A. Panackal, J.L. Gribskov, J.F. Staab, K.A. Kirby, M. Rinaldi and K.A. Marr

Signification clinique de la résistance croisée aux antifongiques azolés chez *Candida glabrata*. Journal de Mycologie Médicale Elsevier Masson Volume 17, Supplement 1, October 2007, Pages S16-S21.

[114]: S. Aoufi and A. Agoumi

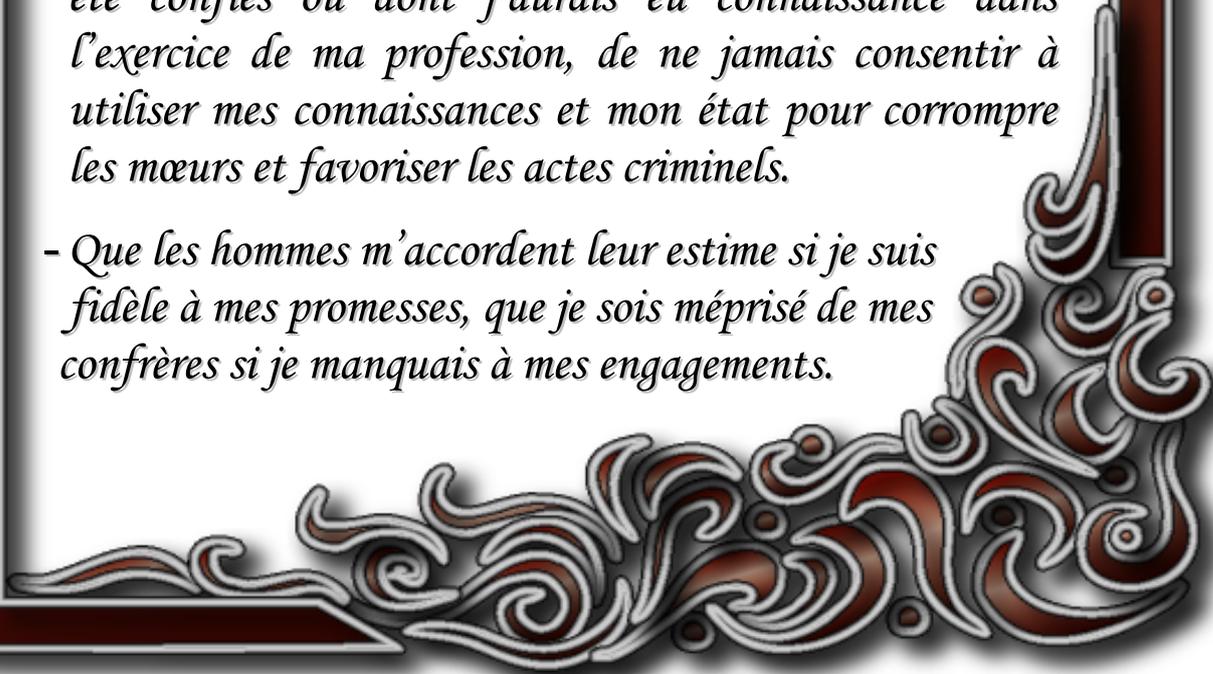
Une septicémie à *Candida krusei* : ne pas méconnaître l'examen mycologique.

[Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation](#), [Volume 26, Issue 3](#), March 2007, Pages 267-268.

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 humain.*
- D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à législation en vigueur aux règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- De ne pas 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 -

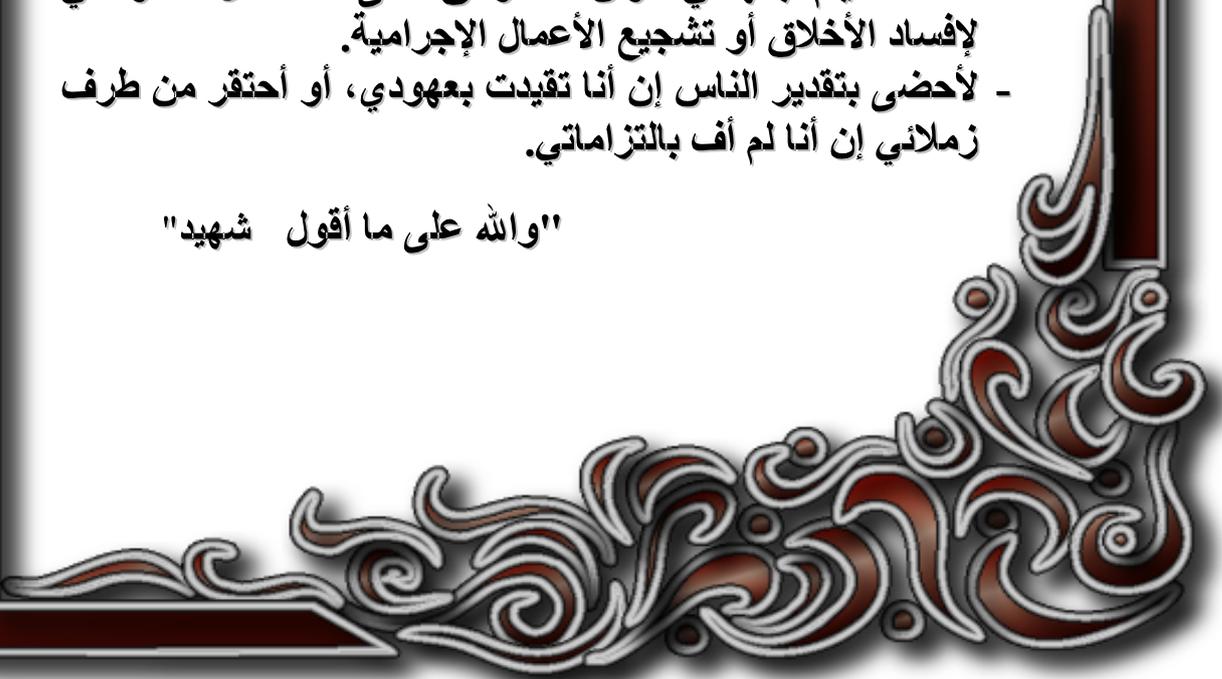
قسم الصيدلي

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

أَوْسَعُ بِاللَّهِ الْعَظِيمِ

- 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 إلي 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 بالالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة بالرباط

أطروحة رقم: 52

سنة : 2010

مكانة الأنتفنجرام لدعم التعففات الفطرية
1993 - 2007

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرف

السيدة: بوروا نادية
المزداة في: 26 غشت 1981 بالدار البيضاء
لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: فطر — تعفن مضاد فطري أنتفنجرام .

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

السيد: عبدالعزيز أكومي
أستاذ في علم الطفيليات

مشرف

السيد: الحسين تليكي
أستاذ مبرز في علم الطفيليات

أعضاء

السيد: ميمون زوهدي
أستاذ في علم الأحياء المجهرية
السيدة: أحسيسن ليلي
أستاذة مبرزة في طب الأطفال