

ANNEE: 2012

THESE N° :88

Sensibilité *in vitro* à la caspofungine de 58 souches de
Candida isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction
Mohammed V

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. Meriama HOUFAR
Née le 03 janvier 1988 à Kenitra

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES : *Candida* – Antifongogramme – Caspofungine – Sensibilité *in vitro*

JURY

Mr. I. LAHLOU AMINE

Professeur de Microbiologie

Mr. BE. LMIMOUNI

Professeur de Parasitologie-Mycologie

Mme. N. MESSAOUDI

Professeur agrégé d'hématologie Biologique

Mr. J. LAMSAOURI

Professeur agrégé de Chimie-Thérapeutique

Mr. A.DAMI

Professeur agrégé de biochimie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

سُبْحَانَكَ

لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا بِكَ مَا عَلَّمْتَنَا

إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ

(البقرة: من الآية 32)



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 AbdelmajidBELMAHI

ADMINISTRATION :

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

PROFESSEURS :

Février, Septembre, Décembre 1973

1. Pr. CHKILI Taieb Neuropsychiatrie

Janvier et Décembre 1976

2. Pr. HASSAR Mohamed Pharmacologie Clinique

Mars, Avril et Septembre 1980

3. Pr. EL KHAMLIHI Abdeslam Neurochirurgie

4. Pr. MESBAHI Redouane Cardiologie

Mai et Octobre 1981

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid Cardiologie
6. Pr. EL MANOUAR Mohamed Traumatologie-Orthopédie
7. Pr. HAMANI Ahmed* Cardiologie
8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih Chirurgie Cardio-Vasculaire
9. Pr. SBIHI Ahmed Anesthésie –Réanimation
10. Pr. TAOBANE Hamid* Chirurgie Thoracique

Mai et Novembre 1982

11. Pr. ABROUQ Ali* Oto-Rhino-Laryngologie

12. Pr. BENOMAR M'hammed
13. Pr. BENSOUDA Mohamed
14. Pr. BENOSMAN Abdellatif
15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Chirurgie-Cardio-Vasculaire
Anatomie
Chirurgie Thoracique
Physiologie

Novembre 1983

16. Pr. ALAOUI TAHIRI Kébir*
17. Pr. BALAFREJ Amina
18. Pr. BELLAKHDAR Fouad
19. Pr. HAJJAJ ép. HASSOUNI Najia
20. Pr. SRAIRI Jamal-Eddine

Pneumo-phtisiologie
Pédiatrie
Neurochirurgie
Rhumatologie
Cardiologie

Décembre 1984

21. Pr. BOUCETTA Mohamed*
22. Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil
23. Pr. MAAOUNI Abdelaziz
24. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi
25. Pr. NAJI M'Barek *
26. Pr. SETTAF Abdellatif

Neurochirurgie
Radiothérapie
Médecine Interne
Anesthésie -Réanimation
Immuno-Hématologie
Chirurgie

Novembre et Décembre 1985

27. Pr. BENJELLOUN Halima
28. Pr. BENSAID Younes
29. Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa
30. Pr. IHRAI Hssain *
31. Pr. IRAQI Ghali
32. Pr. KZADRI Mohamed

Cardiologie
athologie Chirurgicale
Neurologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
Pneumo-phtisiologie
Oto-Rhino-laryngologie

Janvier, Février et Décembre 1987

33. Pr. AJANA Ali
34. Pr. AMMAR Fanid
35. Pr. CHAHED OUZZANI Houriaép.TAOBANE
36. Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq
37. Pr. EL HAITEM Naïma
38. Pr. EL MANSOURI Abdellah*
39. Pr. EL YAACOUBI Moradh
40. Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah
41. Pr. LACHKAR Hassan
42. Pr. OHAYON Victor*

Radiologie
Pathologie Chirurgicale
Gastro-Entérologie
Pneumo-phtisiologie
Cardiologie
Chimie-Toxicologie Expertise
Traumatologie Orthopédie
Gastro-Entérologie
Médecine Interne
Médecine Interne

43. Pr. YAHYAOUI Mohamed

Neurologie

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib

Chirurgie Pédiatrique

45. Pr. DAFIRI Rachida

Radiologie

46. Pr. FAIK Mohamed

Urologie

47. Pr. HERMAS Mohamed

Traumatologie Orthopédie

48. Pr. TOLOUNE Farida*

Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNIAOUI Mohamed

Médecine Interne

50. Pr. AOUNI Mohamed

Médecine Interne

51. Pr. BENAMEUR Mohamed*

Radiologie

52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali

Cardiologie

53. Pr. CHAD Bouziane

Pathologie Chirurgicale

54. Pr. CHKOFF Rachid

Urologie

55. Pr. KHARBACH Aïcha

Gynécologie -Obstétrique

56. Pr. MANSOURI Fatima

Anatomie-Pathologique

57. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda

Neurologie

58. Pr. SEDRATI Omar*

Dermatologie

59. Pr. TAZI Saoud Anas

Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

60. Pr. AL HAMANY Zaïtounia

Anatomie-Pathologique

61. Pr. ATMANI Mohamed*

Anesthésie Réanimation

62. Pr. AZZOUZI Abderrahim

Anesthésie Réanimation

63. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM

Néphrologie

64. Pr. BELKOUCHI Abdelkader

Chirurgie Générale

65. Pr. BENABDELLAH Chahrazad

Hématologie

66. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif

Chirurgie Générale

67. Pr. BENSOUDA Yahia

Pharmacie galénique

68. Pr. BERRAHO Amina

Ophtalmologie

69. Pr. BEZZAD Rachid

Gynécologie Obstétrique

70. Pr. CHABRAOUI Layachi

Biochimie et Chimie

71. Pr. CHANA El Houssaine*

Ophtalmologie

72. Pr. CHERRAH Yahia

Pharmacologie

73. Pr. CHOKAIRI Omar

Histologie Embryologie

74. Pr. FAJRI Ahmed*

Psychiatrie

75. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*

Chirurgie Générale

76. Pr. KHATTAB Mohamed

Pédiatrie

77. Pr. NEJMI Maati

Anesthésie-Réanimation

78. Pr. OUAALINE Mohammed*

Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène

79. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH

Pharmacologie

80. Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

Décembre 1992

81. Pr. AHALLAT Mohamed

Chirurgie Générale

82. Pr. BENOUDA Amina

Microbiologie

83. Pr. BENSOUADA Adil

Anesthésie Réanimation

84. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib

Radiologie

85. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza

Gastro-Entérologie

86. Pr. CHRAIBI Chafiq

Gynécologie Obstétrique

87. Pr. DAOUDI Rajae

Ophthalmologie

88. Pr. DEHAYNI Mohamed*

Gynécologie Obstétrique

89. Pr. EL HADDOURY Mohamed

Anesthésie Réanimation

90. Pr. EL OUAHABI Abdessamad

Neurochirurgie

91. Pr. FELLAT Rokaya

Cardiologie

92. Pr. GHAFIR Driss*

Médecine Interne

93. Pr. JIDDANE Mohamed

Anatomie

94. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine

Gynécologie Obstétrique

95. Pr. TAGHY Ahmed

Chirurgie Générale

96. Pr. ZOUHDI Mimoun

Microbiologie

Mars 1994

97. Pr. AGNAOU Lahcen

Ophthalmologie

98. Pr. AL BAROUDI Saad

Chirurgie Générale

99. Pr. BENCHERIFA Fatiha

Ophthalmologie

100. Pr. BENJAAFAR Nouredine

Radiothérapie

101. Pr. BENJELLOUN Samir

Chirurgie Générale

102. Pr. BEN RAIS Nozha

Biophysique

103. Pr. CAOUI Malika

Biophysique

104. Pr. CHRAIBI Abdelmjid

Endocrinologie et Maladies Métaboliques

105. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT

Gynécologie Obstétrique

106. Pr. EL AOUAD Rajae

Immunologie

107. Pr. EL BARDOUNI Ahmed

Traumato-Orthopédie

108. Pr. EL HASSANI My Rachid

Radiologie

109. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur

Médecine Interne

110. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*

Chirurgie Cardio- Vasculaire

111. Pr. ERROUGANI Abdolkader

Chirurgie Générale

112. Pr. ESSAKALI Malika

Immunologie

113. Pr. ETTAYEBI Fouad

Chirurgie Pédiatrique

114. Pr. HADRI Larbi*

Médecine Interne

115. Pr. HASSAM Badredine

Dermatologie

116. Pr. IFRINE Lahssan

Chirurgie Générale

117. Pr. JELTHI Ahmed

Anatomie Pathologique

118. Pr. MAHFOUD Mustapha

Traumatologie – Orthopédie

119. Pr. MOUDENE Ahmed*

Traumatologie- Orthopédie

120. Pr. OULBACHA Said

Chirurgie Générale

121. Pr. RHRAB Brahim

Gynécologie – Obstétrique

122. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR

Dermatologie

123. Pr. SLAOUI Anas

Chirurgie Cardio-Vasculaire

Mars 1994

- 124. Pr. ABBAR Mohamed*
- 125. Pr. ABDELHAK M'barek
- 126. Pr. BELAIDI Halima
- 127. Pr. BRAHMI Rida Slimane
- 128. Pr. BENTAHILA Abdelali
- 129. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali
- 130. Pr. BERRADA Mohamed Saleh
- 131. Pr. CHAMI Ilham
- 132. Pr. CHERKAOUI LallaOuafae
- 133. Pr. EL ABBADI Najia
- 134. Pr. HANINE Ahmed*
- 135. Pr. JALIL Abdelouahed
- 136. Pr. LAKHDAR Amina
- 137. Pr. MOUANE Nezha

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

Mars 1995

- 138. Pr. ABOUQUAL Redouane
- 139. Pr. AMRAOUI Mohamed
- 140. Pr. BAIDADA Abdelaziz
- 141. Pr. BARGACH Samir
- 142. Pr. BEDDOUCHE Amocrane*
- 143. Pr. BENAZZOUZ Mustapha
- 144. Pr. DIMOU M'barek*
- 145. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
- 146. Pr. EL MESNAOUI Abbes
- 147. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
- 148. Pr. FERHATI Driss
- 149. Pr. HASSOUNI Fadil

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

- 150. Pr. HDA Abdelhamid*
- 151. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
- 152. Pr. IBRAHIMY Wafaa
- 153. Pr. MANSOURI Aziz
- 154. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
- 155. Pr. RZIN Abdelkader*
- 156. Pr. SEFIANI Abdelaziz
- 157. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Cardiologie
Urologie
Ophtalmologie
Radiothérapie
Ophtalmologie
Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
Génétique
Réanimation Médicale

Décembre 1996

- 158. Pr. AMIL Touriya*
- 159. Pr. BELKACEM Rachid
- 160. Pr. BELMAHI Amin
- 161. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Chirurgie réparatrice et plastique
Ophtalmologie

162. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
 163. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
 164. Pr. GAOUZI Ahmed
 165. Pr. MAHFOUDI M'barek*
 166. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
 167. Pr. MOHAMMADI Mohamed
 168. Pr. MOULINE Soumaya
 169. Pr. OUADGHIRI Mohamed
 170. Pr. OUZEDDOUN Naima
 171. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

172. Pr. ALAMI Mohamed Hassan
 173. Pr. BEN AMAR Abdesslem
 174. Pr. BEN SLIMANE Lounis
 175. Pr. BIROUK Nazha
 176. Pr. BOULAICH Mohamed
 177. Pr. CHAOUIR Souad*
 178. Pr. DERRAZ Said
 179. Pr. ERREIMI Naima
 180. Pr. FELLAT Nadia
 181. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra
 182. Pr. HAIMEUR Charki*
 183. Pr. KANOUNI NAWAL
 184. Pr. KOUTANI Abdellatif
 185. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid
 186. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ
 187. Pr. NAZI M'barek*
 188. Pr. OUAHABI Hamid*
 189. Pr. SAFI Lahcen*
 190. Pr. TAOUFIQ Jallal
 191. Pr. YOUSFI MALKI Mounia

Novembre 1998

192. Pr. AFIFI RAJAA
 193. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*
 194. Pr. ALOUANE Mohammed*
 195. Pr. BENOMAR ALI
 196. Pr. BOUGTAB Abdesslam
 197. Pr. ER RIHANI Hassan
 198. Pr. EZZAITOUNI Fatima
 199. Pr. KABBAJ Najat
 200. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Novembre 1998

Chirurgie Générale
 Parasitologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Chirurgie Générale
 Médecine Interne
 Pneumo-phtisiologie
 Traumatologie-Orthopédie
 Néphrologie
 Cardiologie

Gynécologie-Obstétrique
 Chirurgie Générale
 Urologie
 Neurologie
 O.RL.
 Radiologie
 Neurochirurgie
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Radiologie
 Anesthésie Réanimation
 Physiologie
 Urologie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Cardiologie
 Neurologie
 Anesthésie Réanimation
 Psychiatrie
 Gynécologie Obstétrique

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

201. Pr. BENKIRANE Majid*
202. Pr. KHATOURI ALI*
203. Pr. LABRAIMI Ahmed*

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

204. Pr. ABID Ahmed*
205. Pr. AIT OUMAR Hassan
206. Pr. BENCHERIF My Zahid
207. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
208. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
209. Pr. CHAOUI Zineb
210. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
211. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
212. Pr. EL FTOUH Mustapha
213. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
214. Pr. EL OTMANY Azzedine
215. Pr. GHANNAM Rachid
216. Pr. HAMMANI Lahcen
217. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
218. Pr. ISMAILI Hassane*
219. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
220. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
221. Pr. TACHINANTE Rajae
222. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida

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

Novembre 2000

223. Pr. AIDI Saadia
224. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
225. Pr. AJANA Fatima Zohra
226. Pr. BENAMR Said
227. Pr. BENCHEKROUN Nabiha
228. Pr. CHERTI Mohammed
229. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma
230. Pr. EL HASSANI Amine
231. Pr. EL IDGHIRI Hassan
232. Pr. EL KHADER Khalid
233. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
234. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
235. Pr. HSSAIDA Rachid*
236. Pr. LACHKAR Azzouz
237. Pr. LAHLOU Abdou

Neurologie
Dermatologie
Gastro-Entérologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Cardiologie
Anesthésie-Réanimation
Pédiatrie
Oto-Rhino-Laryngologie
Urologie
Rhumatologie
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Anesthésie-Réanimation
Urologie
Traumatologie Orthopédie

238. Pr. MAFTAH Mohamed*
239. Pr. MAHASSINI Najat
240. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
241. Pr. NASSIH Mohamed*
242. Pr. ROUIMI Abdelhadi

Décembre 2001

243. Pr. ABABOU Adil
244. Pr. AOUAD Aicha
245. Pr. BALKHI Hicham*
246. Pr. BELMEKKI Mohammed
247. Pr. BENABDELJLIL Maria
248. Pr. BENAMAR Loubna
249. Pr. BENAMOR Jouda
250. Pr. BENELBARHDADI Imane
251. Pr. BENNANI Rajae
252. Pr. BENOUACHANE Thami
253. Pr. BENYOUSSEF Khalil
254. Pr. BERRADA Rachid
255. Pr. BEZZA Ahmed*
256. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
257. Pr. BOUHOUCHE Rachida
258. Pr. BOUMDIN El Hassane*
259. Pr. CHAT Latifa
260. Pr. CHELLAOUI Mounia
261. Pr. DAALI Mustapha*
262. Pr. DRISSI Sidi Mourad*
263. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira
264. Pr. EL HIJRI Ahmed
265. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
266. Pr. EL MADHI Tarik
267. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
268. Pr. EL OUNANI Mohamed
269. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil
270. Pr. ETTAIR Said
271. Pr. GAZZAZ Miloudi*
272. Pr. GOURINDA Hassan
273. Pr. HRORA Abdelmalek
274. Pr. KABBAJ Saad
275. Pr. KABIRI EL Hassane*
276. Pr. LAMRANI Moulay Omar
277. Pr. LEKEHAL Brahim
278. Pr. MAHASSIN Fattouma*
279. Pr. MEDARHRI Jalil
280. Pr. MIKDAME Mohammed*

Neurochirurgie
Anatomie Pathologique
Pédiatrie
Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
Neurologie

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

281. Pr. MOHSINE Raouf
 282. Pr. NABIL Samira
 283. Pr. NOUINI Yassine
 284. Pr. OUALIM Zouhir*
 285. Pr. SABBAH Farid
 286. Pr. SEFIANI Yasser
 287. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
 288. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie
 Urologie

Décembre 2002

289. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 290. Pr. AMEUR Ahmed *
 291. Pr. AMRI Rachida
 292. Pr. AOURLARH Aziz*
 293. Pr. BAMOU Youssef *
 294. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 295. Pr. BENBOUAZZA Karima
 296. Pr. BENZEKRI Laila
 297. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 298. Pr. BERNOUSSI Zakiya
 299. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
 300. Pr. CHOHO Abdelkrim *
 301. Pr. CHKIRATE Bouchra
 302. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 303. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 304. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 305. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 306. Pr. EL MANSARI Omar*
 307. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 308. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 309. Pr. HADDOUR Leila
 310. Pr. HAJJI Zakia
 311. Pr. IKEN Ali
 312. Pr. ISMAEL Farid
 313. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 314. Pr. KRIOULE Yamina
 315. Pr. LAGHMARI Mina
 316. Pr. MABROUK Hfid*
 317. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 318. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 319. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 320. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 321. Pr. OUJILAL Abdelilah
 322. Pr. RACHID Khalid *
 323. Pr. RAISS Mohamed

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

324. Pr. RHOUE Hakima
325. Pr. SIAH Samir *
326. Pr. THIMOU Amal
327. Pr. ZENTAR Aziz*
328. Pr. ZRARA Ibtisam*

Néphrologie
Anesthésie Réanimation
Pédiatrie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

329. Pr. ABDELLAH El Hassan
330. Pr. AMRANI Mariam
331. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas
332. Pr. BENKIRANE Ahmed*
333. Pr. BENRAMDANE Larbi*
334. Pr. BOUGHALEM Mohamed*
335. Pr. BOULAADAS Malik
336. Pr. BOURAZZA Ahmed*
337. Pr. CHAGAR Belkacem*
338. Pr. CHERRADI Nadia
339. Pr. EL FENNI Jamal*
340. Pr. EL HANCHI ZAKI
341. Pr. EL KHORASSANI Mohamed
342. Pr. EL YOUNASSI Badreddine*
343. Pr. HACHI Hafid
344. Pr. JABOUIRIK Fatima
345. Pr. KARMANE Abdelouahed
346. Pr. KHABOUZE Samira
347. Pr. KHARMAZ Mohamed
348. Pr. LEZREK Mohammed*
349. Pr. MOUGHIL Said
350. Pr. NAOUMI Asmae*
351. Pr. SAADI Nozha
352. Pr. SASSENOU ISMAIL*
353. Pr. TARIB Abdelilah*
354. Pr. TIJAMI Fouad
355. Pr. ZARZUR Jamila

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

356. Janvier 2005

357. Pr. ABBASSI Abdellah
358. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
359. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
360. Pr. ALLALI Fadoua
361. Pr. AMAR Yamama
362. Pr. AMAZOUZI Abdellah
363. Pr. AZIZ Nouredine*
364. Pr. BAHIRI Rachid
365. Pr. BARKAT Amina

Chirurgie Réparatrice et Plastique
Chirurgie Générale
Microbiologie
Rhumatologie
Néphrologie
Ophtalmologie
Radiologie
Rhumatologie
Pédiatrie

366. Pr. BENHALIMA Hanane
 367. Pr. BENHARBIT Mohamed
 368. Pr. BENYASS Atif
 369. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
 370. Pr. BOUKLATA Salwa
 371. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
 372. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
 373. Pr. EL HAMZAOUI Sakina
 374. Pr. HAJJI Leila
 375. Pr. HESSISSEN Leila
 376. Pr. JIDAL Mohamed*
 377. Pr. KARIM Abdelouahed
 378. Pr. KENDOSSI Mohamed*
 379. Pr. LAAROUSSI Mohamed
 380. Pr. LYAGOUBI Mohammed
 381. Pr. NIAMANE Radouane*
 382. Pr. RAGALA Abdelhak
 383. Pr. SBIHI Souad
 384. Pr. TNACHERI OUZZANI Btissam
 385. Pr. ZERAIDI Najia

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*
 425. Pr. AKJOUJ Said*
 426. Pr. BELGNAOUI Fatima Zahra
 427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*
 428. Pr. BENCHEIKH Razika
 429. Pr. BIYI Abdelhamid*
 430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine
 431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*
 432. Pr. CHEIKHAOUI Younes
 433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas
 434. Pr. DOGHMI Nawal
 435. Pr. ESSAMRI Wafaa
 436. Pr. FELLAT Ibtissam
 437. Pr. FAROUDY Mamoun
 438. Pr. GHADOUANE Mohammed*
 439. Pr. HARMOUCHE Hicham
 440. Pr. HANAFI Sidi Mohamed*
 441. Pr. IDRIS LAHLOU Amine
 442. Pr. JROUNDI Laila
 443. Pr. KARMOUNI Tariq
 444. Pr. KILI Amina
 445. Pr. KISRA Hassan
 446. Pr. KISRA Mounir

Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Ophtalmologie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Biophysique
 Microbiologie
 Cardiologie
 Pédiatrie
 Radiologie
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Chirurgie Cardio-vasculaire
 Parasitologie
 Rhumatologie
 Gynécologie Obstétrique
 Histo-Embryologie Cytogénétique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique

Dermatologie
 Radiologie
 Dermatologie
 Hématologie
 O.R.L
 Biophysique
 Chirurgie - Pédiatrique
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Chirurgie Cardio – Vasculaire
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique

447. Pr. KHARCHAFI Aziz*
 448. Pr. LAATIRIS Abdelkader*
 449. Pr. LMIMOUNI Badreddine*
 450. Pr. MANSOURI Hamid*
 451. Pr. NAZIH Naoual
 452. Pr. OUANASS Abderrazzak
 453. Pr. SAFI Soumaya*
 454. Pr. SEKKAT Fatima Zahra
 455. Pr. SEFIANI Sana
 456. Pr. SOUALHI Mouna
 457. Pr. TELLAL Saida*
 458. Pr. ZAHRAOUI Rachida

Médecine Interne
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 Pneumo – Phtisiologie
 Biochimie
 Pneumo – Phtisiologie

Octobre 2007

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid
 461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *
 462. Pr. BAITE Abdelouahed *
 463. Pr. TOUATI Zakia
 464. Pr. OUZZIF Ezzohra *
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
 469. Pr. EL ABSI Mohamed
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad *
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 473. Pr. GHARIB Nouredine
 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
 475. Pr. ISMAILI Nadia
 476. Pr. MASRAR Azlarab
 477. Pr. RABHI Monsef *
 478. Pr. MRABET Mustapha *

 479. Pr. SEKHSOKH Yessine *
 480. Pr. SEFFAR Myriame
 481. Pr. LOUZI Lhoussain *
 482. Pr. MRANI Saad *
 483. Pr. GANA Rachid
 484. Pr. ICHOU Mohamed *
 485. Pr. TACHFOUTI Samira

Anatomie pathologique
 Anesthésie réanimation
 Anesthésier réanimation
 Anesthésie réanimation
 Anesthésie réanimation
 Cardiologie
 Biochimie
 Biochimie
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie cardio vasculaire
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie
 Hématologie biologique
 Médecine interne
 Médecine préventive santé publique
 et hygiène
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Virologie
 Neuro chirurgie
 Oncologie médicale
 Ophtalmologie

486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine
 487. Pr. MELLAL Zakaria
 488. Pr. AMMAR Haddou *
 489. Pr. AOUIFI Sarra
 490. Pr. TLIGUI Houssain
 491. Pr. MOUTAJ Redouane *
 492. Pr. ACHACHI Leila
 493. Pr. MARC Karima
 494. Pr. BENZIANE Hamid *
 495. Pr. CHERKAOUI Naoual *
 496. Pr. EL OMARI Fatima
 497. Pr. MAHI Mohamed *
 498. Pr. RADOUANE Bouchaib*
 499. Pr. KEBDANI Tayeb
 500. Pr. SIFAT Hassan *
 501. Pr. HADADI Khalid *
 502. Pr. ABIDI Khalid
 503. Pr. MADANI Naoufel
 504. Pr. TANANE Mansour *
 505. Pr. AMHAJJI Larbi *

Ophtalmologie
 Ophtalmologie
 ORL
 Parasitologie
 Parasitologie
 Parasitologie
 Pneumo phtisiologie
 Pneumo phtisiologie
 Pharmacie clinique
 Pharmacie galénique
 Psychiatrie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Radiothérapie
 Réanimation médicale
 Réanimation médicale
 Traumatologie orthopédie
 Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes
 Pr. AZENDOUR Hicham *
 Pr. BELYAMANI Lahcen *
 Pr. BOUHSAIN Sanae *
 Pr. OUKERRAJ Latifa
 Pr. LAMSAOURI Jamal *
 Pr. MARMADE Lahcen
 Pr. AMAHZOUNE Brahim *
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim *
 Pr. BOUNAIM Ahmed *
 Pr. EL MALKI Hadj Omar
 Pr. MSSROURI Rahal
 Pr. CHTATA Hassan Toufik *
 Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. EL OUENNASS Mostapha

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

Pr. ZOUHAIR Said*
 Pr. L'kassimiHachemi*
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. MESKINI Toufik
 Pr. KABIRI Meryem
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *
 Pr. BASSOU Driss *
 Pr. ALLALI Nazik
 Pr. NASSAR Ittimade
 Pr. HASSIKOU Hasna *
 Pr. AMINE Bouchra
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha *
 Pr. KADI Said *

Octobre 2010

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

Microbiologie
 Microbiologie
 Neuro-chirurgie
 Neurologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phthisiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Rhumatologie
 Traumatologie orthopédique
 Traumatologie orthopédique

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

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

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

*** *Enseignants Militaire***



DEDICACE

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,
l'amour, le respect, A ceux qui me sont les plus chers*

A ceux qui ont toujours cru en moi

A ceux qui m'ont toujours encouragé

Aussi, c'est tout simplement que...



Je dédie cette Thèse... ✍

A ma très chère maman
Fatima Bouqtibe

Le symbole du dévouement et du sacrifice, pour son amour son écoute permanente et son soutien inconditionnel. Tu représentes pour moi la bonté par excellence, la tendresse et le symbole du sacrifice, Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours aussi bien dans mes études que dans toutes les étapes de ma vie.

Tu as été ma source de motivation, le moteur de mes ambitions, qui m'a appris que le savoir est une richesse que nul ne peut voler.

Maman tu as toujours été là dans les moments les plus difficiles de ma vie, Tu m'a soutenu et protégé. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer l'amour et le respect que j'ai pour toi.

Tu as fait plus qu'une maman puisse faire pour que ces enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Puisse ce travail te témoigner mon attachement, mon amour et ma gratitude pour tout ce que tu as fait pour moi puisque je n'ai jamais su et pu te dire combien je t'aime et combien tu es précieuse a ma vie.

Que Dieu, le tout puissant, te préserver et te procure santé, longue vie et bonheur.

Vous méritez sans conteste qu'on vous décerne les prix« Mère exemplaire »

Je t'aime chère maman ♥

*A mon très cher père
Abdsalam Houfar*

Je te serai chère père reconnaissante toute ma vie, pour tout le mal que tu t'es donné pour moi à chaque étape de ma vie, pour ta patience et ton amour.

J'espère être la fille que tu as voulu que je sois, et je m'efforcerai d'être digne de ce que tu aurais souhaité que je sois. Ce titre de Docteur en pharmacie je le porterai fièrement et je te le dédie tout particulièrement.

Puisse Dieu tout puissant, vous prêter longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

*A Ma très chère sœur
Ibtissam*

*Votre aide, votre présence, votre amour ont été d'une grande importance
dans ma vie, c'est un réconfort de vous avoir à mes côtés.*

*IBTISSAM, ma douce complice, ma confidente qui me donne toujours le
coup de pouce nécessaire, tu es très précieuse à mes yeux, merci d'être toujours
fière de moi.*

*Que votre vie soit parsemée d'étincelles d'amour et que votre quotidien
regorge de bonheur*

Je t'aime sœurlette ♥

*A Ma très chère sœur
Majda et son mari joel*

*Je te dédie ce travail en témoignage de l'amour et du soutien que tu m'as
toujours donné.*

*Pour l'affection qui nous lie, pour l'intérêt que tu portes à ma vie, pour ton
soutien, ta compréhension et tes encouragements. Que ce travail soit le témoin de
la reconnaissance infinie. Je te souhaite toi et ton mari une vie pleine de bonheur
et que je sois toujours la sœur dont tu seras fier.*

*J'espère que tu trouveras dans cette thèse le témoignage de mes sentiments
les plus sincères et les plus affectueux.*

Que Dieu te protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent.

*A Mes très cher frères Badr Eddine
et Mohammed Amine*

*Je vous dédie ce travail en témoignage de toute l'affection et des profonds
sentiments fraternels pour l'épaule inconditionnelle que vous représentez pour
moi.*

Votre amour fraternel, votre soutien resteront graver dans ma mémoire.

*Puisse notre esprit de famille se fortifier au cours des années et demeure
toujours intact.*

*L'amour que je te porte cher frère Badr Eddine et Mohammed Amine est
sans égal, vos conseils et votre amour m'ont soutenu tout au long de mes études,
et vos encouragements ont été pour moi d'un grand réconfort.*

*Merci pour votre présence physique et morale à chaque fois que j'en avais
besoin*

*Que Dieu vous protège, vous assure une bonne santé et heureuse et longue
vie et consolide les liens sacrés qui nous unissent.*

Je vous adore (mes petits frères)

A ma très chère tante Nadia et à son mari Leon :

Pour moi tu représentais le sourire qui m'a aidé à surmonter les moments les plus difficiles au cours de ces années d'études. Tu m'as tant appris et m'a tant donné en me regardant avancer et réaliser. Il n'y a pas de mots susceptibles de vous exprimer ma gratitude et ma grande affection. Je vous dédie ce travail en te souhaitant toi et ton mari tout le bonheur du monde.

Que dieu te comble de bonheur, de santé, de succès et de prospérité dans ta vie et te protège

Je t'aime Tati

*A ma nièce Sarah et
Mes anges Rayane, Adam, Yaniss, et Jäafar*

*Vous êtes la fleur de notre vie, vous êtes notre bonheur éternel,
Je vous dédie ce travail en vous souhaitant longue vie, prospérité et bonne
santé.*

Je vous aime mes anges,....vous me manquer trop.

A Mes grands parents

*Aucune expression ne pourrait exprimer à leur juste valeur, la
reconnaissance, le soutien, le respect et l'estime que je vous dois.*

Puisse Dieu vous accorder santé, longue vie et prospérité.

*A mes oncles Abdellah, Hicham, Khalid
et Moustafa*

*Quoique je puisse dire à votre sujet, les mots ne seront jamais en mesure
d'exprimer ce que vous représentez pour moi.*

*Pour votre soutien et vos encouragements, je vous dédie mon travail en
témoignage de l'affection et des sentiments de paternité qui nous unissent.*

Je vous souhaite une vie pleine de joie, et de bonheur.

*Que Dieu vous garde et vous donne une longue vie avec Santé, afin de voir
vos enfants à la hauteur de vos espoirs pour eux.*

A ma tante Amina

*Une femme merveilleuse dont le seul souci est le
bonheur des siens.*

*Que dieu te garde pour nous et te préserve en bonne
santé*

A mes amies

Lamyae YACHI : La copine, l'aimable.

C'est fou ce que le destin fait surgir de nul part un être qui nous sera tant cher. Quelques jours m'ont suffi pour découvrir en toi l'alliée, la collègue et la sœur. T'avoir partie de ma vie m'était une pure grâce. Tu m'as réchauffé le cœur d'amour et de tendresse. Puisse notre amitié demeurer éternelle.

Soukaina SOLBI : La compatriote, la complice.

Les traits de notre amitié se sont tissés en toute tendresse. Les quelques années qu'on a passées ensemble seraient les plus belles de ma vie. Ton amitié me tiens tant à cœur. Puisse notre amitié demeurer éternelle.

Oumnia RHAMIRICH et Meryem BOUICH : Les joyeux moments qu'on a passés ensemble resteront gravés dans ma mémoire. Nous avons partagé tant de choses, aussi simples soient elles, nous ont uni par les innocents liens d'amitié.

Une amitié qui ne peut demeurer qu'éternelle à mes yeux,

Vous étiez de véritables AMIES, vous m'avez apporté du soutien sur tous les plans. En cette occasion, je vous exprime mon affection et mon respect et je vous dédie cette thèse en vous souhaitant une vie pleine de succès, de joie et de bonheur

*A mes consœurs et confrères pharmaciennes et pharmaciens
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de RABAT*

*Vous êtes si nombreux, vous qui m'avez marqués par votre gentillesse et
votre amabilité. Je ne vous oublierai jamais*

*En mémoire de ces quatre années de partage, je vous dédie ce travail, en
priant DIEU de réaliser tous vos rêves.*

A tous mes amis de la Faculté des Sciences de Kénitra :

Spécialement mes amies du passé et d'aujourd'hui :

Baba Jmane et Tibari Nacira

*Vous serez toujours dans mon cœur. Les moments qu'on a passés ensemble
resteront gravés éternellement dans ma mémoire. Vous étiez les copines de
l'enfance, de l'adolescence et d'aujourd'hui.*

*Je vous dédie ce travail, en mémoire de tous les instants de plaisir de joie et
d'amitié que nous avons partagés durant toutes ces années.*

*A Madame le Doyen
Monsieur le Vice-Doyen
Tout le personnel de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de RABAT*

*Il vous revient le mérite de nous avoir prodigué un enseignement profitable
et une formation complète.*

A tous mes professeurs

Particulièrement :

*Le Professeur **Badre Eddine LMIMOUNI***

*Vous nous avez humecté la mémoire de votre savoir. Tout le mérite vous
revient de nous avoir prodigué un enseignement favorable et riche en tout
attachement et en tout dévouement.*

*Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude, veuillez,
chers Professeurs, trouver dans ce travail l'expression de mon estime et de mon
profond respect.*

A tous les êtres, qui sur cette terre, cherchent à accomplir la mission, le rêve, l'ambition... De veiller sur la santé et le bien être de chacun.

A tous ceux qui s'engagent ardemment à répondre aux besoins des êtres humains, de les soulager et de leur procurer une vie meilleure.

A tous les collègues, d'hier et de demain qui tiendront ce travail entre leur mains. J'espère que vous y trouverez l'aide que vous cherchez.

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

Dans le regret de ne pouvoir tous citer, je dédis ce travail à toute personne qui a contribué de près ou de loin à sa réalisation.

Puisse Dieu faire de cet humble travail un apport, ne serait-ce que minime dans l'océan du savoir.

Remerciements

*A notre maitre et président de thèse
Monsieur le professeur
I.LAHLOU AMINE
Professeur De Microbiologie*

*A l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de
notre thèse est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde
reconnaissance pour vos qualités humaine*

*L'ampleur de vos connaissances et la rigueur de votre enseignement
ont toujours suscité notre admiration.*

Veillez trouver ici, l'expression de notre grande estime

*A notre Maître et Rapporteur de Thèse,
Monsieur Le Professeur
BADRE EDDINE LMIMOUNI
Professeur de Parasitologie – Mycologie
Chef de service du laboratoire Parasitologie – Mycologie de l'HMIMV*

*Cher maître, c'est un grand honneur pour moi de travailler sous votre
encadrement.*

*Nous vous remercions pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous
avez bien voulu diriger ce travail.*

*Vos conseils et remarques nous étaient d'un grand apport pour la réalisation
de ce travail.*

*Votre gentillesse extrême, votre compétence pratique, vos qualités humaines et
professionnelles ainsi que votre entière disponibilité nous inspirent une grande
admiration et un profond respect.*

*Veillez trouver ici, cher maître, l'expression de notre gratitude et notre
grande estime*

*A notre maitre et juge de thèse
Madame Le Professeur N.MESSAOUDI
Professeur agrégé d'hématologie biologique
Chef de service du laboratoire d'hématologie biologique de l'HMIMV*

*Je vous remercie vivement de l'honneur que vous me faites
en siégeant parmi notre jury de thèse.*

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

*Veuillez croire cher maître à l'assurance de ma grande estime
et sincère reconnaissance*

*A notre Maître et Juge de Thèse,
Monsieur le professeur
J.LAMSAOURI
Professeur Agrégé de chimie-thérapeutique*

*Nous vous sommes très reconnaissants de l'honneur que vous nous faites en
acceptant de juger ce travail.*

*Jamais nous n'oublierons le professionnalisme dont vous avez fait preuve
lors des cours de chimie thérapeutique.*

*Certes, votre sérieux, vos qualités humaines et professionnelles seront un
exemple pour nous dans l'exercice de notre profession.*

*Qu'il nous soit permis de vous exprimer notre reconnaissance et notre grand
estime.*

*A Notre Maître et juge de Thèse
Monsieur Le Professeur A. DAMI
Professeur agrégé de biochimie*

Nous sommes très sensibles par l'honneur que vous nous faites en

Acceptant de jurer notre travail.

Veillez trouver à travers ce modeste travail la manifestation de notre

Plus haute estime et de nos sentiments les plus respectueux.

SOMMAIRE

I.Introduction.....	1
II.Matériels et méthodes	6
II.1 Lieu et période de l'étude.....	7
II.2 Critères d'inclusion	7
II.3 Méthodologie	7
III.Résultats	14
III.1 Répartition des espèces isolées	15
III.2 Sensibilité in vitro à la caspofungine des espèces isolées	16
III.3 Resistances selon les sites de prélèvements	17
III.4 Sensibilité selon les espèces	20
IV.Discussion	22
IV.1 Etude de la sensibilité in vitro aux antifongiques.....	23
IV.1.1 Indications et objectifs	23
IV.1.2 Moyens d'étude de la sensibilité in vitro	25
1-Méthodes par dilution.....	26
1.1 En milieu solide	26
1.2 En milieu semi solide	26
1.3 En milieu liquide	31
2-Méthodes par diffusion.....	43
3-Méthode par dilution affusion : E-Test	51
4-La technologie Vitek	57
IV.1.3 Interprétation des résultats	62

IV.1.4 Correlation in vitro/in vivo.....	64
1. Particularité de la bonne corrélation in vitro/in vivo.....	64
2. Problème de mauvaise corrélation in vitro/in vivo.....	64
3. Facteurs compliquant la corrélation in vitro/in vivo	65
IV.1.5 Complexité de la standardisation des techniques d'antifongigramme.....	67
IV.1.6 Moyen d'étude des associations antifongiques in vitro	69
IV.1.7 Evaluation de la pratique de l'antifongigramme.....	74
IV.2 caspofungine.....	80
IV.2.1 Chimie	80
IV.2.2 Activités pharmacologiques	81
IV.2.3 Posologies et administration	84
IV.2.4 Pharmacodynamie	87
IV.2.5 Pharmacologie de la caspofungine.....	89
1. Pharmacocinétique.....	89
2. Critères pharmacocinétiques.....	91
3. Interactions médicamenteuses	93
IV.2.6 Efficacité clinique	95
IV.2.7 Tolérance de la caspofungine.....	103
1. Effets indésirables.....	104
2-Contre indications	105

IV.2.8 Données pharmaco-économiques.....	106
IV.3 Résistances.....	107
IV.3.1 Résistances aux antifongiques.....	107
1-Définition	107
2-Types de résistances	108
3-Cause des résistances aux antifongiques	111
IV.3.2 Mécanismes de résistance aux antifongiques échinocandines	113
IV.4 Données épidémiologiques.....	116
IV.4.1 Epidémiologie des résistances aux antifongiques de Candida.....	120
1. Résistances aux échinocandines	120
2. Résistance a la caspofungine	123
IV.4.2 Facteurs de risque d'émergence des résistances aux antifongiques..	124
IV.4.3 Evolution de l'épidémiologie des résistances	125
1. Intérêt de la surveillance.....	125
2-Evolution de l'épidémiologie des résistances	125
Conclusion.....	129
Résumés	
Références	
bibliographiques	



Introduction

I. INTRODUCTION

L'épidémiologie des infections fongiques invasives a changé au cours de ces vingt dernières années. Leur incidence globale a augmenté, de même que la population des patients à risque. Cette dernière comprend maintenant une longue liste de conditions médicales, tels que transplantation d'organes ou de cellules souches hématopoïétiques (CSH), cancer, thérapie immunosuppressive, sida, naissance prématurée, vieillissement et chirurgie lourde. De plus, l'étiologie de ces infections a évolué. Dans les années 1980, les levures (en particulier *Candida albicans*), étaient les principaux agents responsables de mycoses invasives. En revanche, ces dernières années, on observe plus souvent des moisissures que des levures chez certaines catégories de patients, notamment chez les receveurs de CSH. Par ailleurs, chez les patients parmi lesquels la candidose est encore la mycose invasive la plus répandue, *Candida albicans* n'est responsable que dans moins de 50% des cas. De même, parmi les moisissures, on rapporte de plus en plus de cas d'infections fongiques invasives autres que des aspergilloses, telles que des zygomycoses, des fusarioses, et des phaeohyphomycoses (moisissures noires). Les raisons exactes de tels changements ne sont pas encore clairement définies.

Dans certains cas, il semblerait que certaines pratiques médicales, telles qu'une prophylaxie antifongique, et l'utilisation de dispositifs médicaux aient influencé ces changements. Néanmoins, dans la plupart des cas, la raison semble être liée à des changements chez l'hôte lui-même, confronté à des situations d'immunodépression plus sévères ^[1].

La fréquence des infections fongiques invasives chez l'hôte immunodéprimé liée à des taux de morbidité et mortalité très élevés, font de leur traitement et de leur prophylaxie un véritable défi thérapeutique. Les infections à *Candida spp.* Sont au 3ème ou 4ème rang des septicémies diagnostiquées et les aspergilloses représentent la première cause de pneumopathies mortelles chez les patients atteints de leucémie aiguë et chez les greffés de moelle. Ces infections difficiles à diagnostiquer sont souvent réfractaires aux traitements antifongiques actuellement disponibles. Trois classes d'antifongiques systémiques sont à notre disposition pour le traitement des mycoses profondes chez l'homme : les polyènes (amphotéricine B), les dérivés

triazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole) et les analogues nucléosidiques (5-fluorocytosine). L'utilisation de ces antifongiques est cependant parfois limitée du fait de leur toxicité, de leur biodisponibilité, des interactions médicamenteuses ou de l'étroitesse de leur spectre d'action. C'est pourquoi la découverte de composés antifongiques possédant de nouveaux mécanismes d'action demeure un objectif prioritaire pour la recherche pharmaceutique. Récemment la famille peu nombreuse des antifongiques systémiques s'est agrandie avec la mise à disposition de la caspofungine, appartenant au groupe des échinocandines.

Cette nouvelle classe d'antifongiques date, en fait, des années 1970 avec la découverte en 1974 de l'échinocandine B, isolée d'une culture d'*Aspergillus sp.*. Cette molécule fut ensuite chimiquement modifiée car très hémolytique, pour donner d'une part, la cilofungine développée dans les années 1980 dont le développement fut interrompu en raison de la toxicité de son solvant et d'autre part, le LY303.366 développé par les laboratoires Eli Lilly dans les années 1990. Parallèlement, en 1989, les laboratoires Merck isolèrent un groupe d'agents chimiquement proches, produits par la fermentation de *Glarean lozoyensis* (champignon issu d'une rivière madrilène, le *Lozoya*), nommés pneumocandines car actifs sur *Pneumocystis carinii* et *Candida spp* mais appartenant elles-mêmes au groupe des échinocandines. Les premières pneumocandines, trop toxiques par leur caractère hémolytique, ont été chimiquement modifiées pour donner la caspofungine. Les échinocandines possèdent un mode d'action original : ce sont des lipopeptides cycliques inhibiteurs de la synthèse de la paroi fongique. Cette paroi représente une cible de choix car elle est présente chez la plupart des champignons pathogènes mais est inexistante chez les cellules des mammifères. Plus précisément, les échinocandines inhibent de façon non compétitive la (1,3)-b-D-glucane synthétase, un complexe enzymatique nécessaire à la formation des polymères de glucane au sein de la paroi fongique. Elles empêchent ainsi l'incorporation des glucanes et des protéines associées aux glucanes dans la paroi fongique. Le gène cible a été identifié pour *C. albicans* (CaFKS1). L'activité des échinocandines se concentre sur la synthèse d'une nouvelle paroi, avec réduction du bourgeonnement des levures et inhibition de la croissance à l'extrémité des filaments pour les champignons filamenteux. L'activité de ces molécules dépend étroitement

du pH et de l'hydrosolubilité du milieu, c'est pourquoi les premiers essais réalisés in vitro montraient une résistance de certains *Candida* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*) et des *Aspergillus spp.* à la cilofungine. Il ne s'agissait en fait que d'un artéfact technique et actuellement, certains auteurs préfèrent utiliser la détermination de la CME (concentration minimale efficace) au lieu de la classique CMI (concentration minimale inhibitrice) pour tester la sensibilité des souches aux échinocandines. Cette CME correspond à la plus faible concentration d'échinocandine induisant des altérations microscopiques du filament (filaments trapus, très bifurqués, etc.) au lieu de la plus faible concentration induisant une inhibition de pousse. Cependant, aucune méthode n'est aujourd'hui standardisée pour l'étude de la sensibilité aux inhibiteurs de la synthèse du b (1,3)-D-glucane et les résultats des tests de sensibilité réalisés in vitro ne sont pas toujours corrélés aux résultats cliniques. La première échinocandine ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché est la caspofungine (anciennement MK 0991, Caspofungine[®], Merck Research Lab.). Deux autres échinocandines sont en cours d'évaluation clinique : l'anidulafungine directement dérivée de l'échinocandine B (VER-002 ou V-échinocandine, anciennement LY 303366, Versicor Lab.) et la micafungine synthétisée après modification du produit naturel issu de la culture de la moisissure *Coleophoma empedri* (anciennement FK 463, Fujisawa Healthcare Inc.). Ces 3 molécules de grande taille sont très proches pharmacologiquement et présentent plusieurs caractéristiques communes : 1) un spectre d'activité proche, 2) une absence de résistance croisée avec les autres antifongiques, 3) une faible toxicité, 4) une forte diminution des interactions médicamenteuses (les systèmes enzymatiques mettant en jeu les cytochromes n'étant pas utilisés), 5) une hydro solubilité permettant leur administration par voie parentérale et 6) une absorption digestive faible ou nulle.^[2]

A la lumière de ces éléments, il s'est avéré intéressant de mettre en place une étude de surveillance des résistances aux antifongiques dans les services de Réanimation de l'Hôpital Ainsi les objectifs de notre étude sont :

- ✚ D'établir le profil de sensibilité phénotypique à la caspofungine des souches de *Candida* isolées à l'HMIMV.
- ✚ D'évaluer les taux de résistance à la caspofungine des souches de *Candida* isolées à l'HMIMV.

Ces objectifs nous permettront de générer des informations épidémiologiques concernant la prescription de cet antifongique.

Matériels et Méthodes

II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Lieu et période de l'étude :

Il s'agit d'une étude prospective qui s'est déroulée au sein du service de parasitologie/mycologie de l'HMIMV sur une durée de 6 mois de Mars 2012 à Août 2012.

II.2 Critères d'inclusion :

Toutes les souches de *Candida* isolées dans les services de réanimation de l'HMIMV de Rabat; à partir de différents sites corporels périphériques.

II.3 Méthodologie:

1. Prélèvement :

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

2. Culture et identification:

Sites périphériques : l'ensemencement des écouvillons ayant servi aux prélèvements se fait sur milieu Muller-Hinton. La lecture est effectuée après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

3. Lecture des résultats:

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

Colonies de couleur rose à violet → *C.albicans*

Colonies turquoise, brillantes, plates à contours réguliers – morphotype lisse (S) → *C.glabrata* → RTT *Glabrata*

Colonies turquoise très intenses, bombées, à contours réguliers – morphotype lisse (S) → *C.tropicalis*

Colonies turquoise, d'aspect sec, à contours irréguliers – morphotype rugueux (R) → *C.krusei* → *Krusei* Color

Colonies blanches → autres espèces de levures → galerie biochimique d'identification API 20 C AUX.



Figure 1 : Ensemencement et incubation des milieux de culture [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

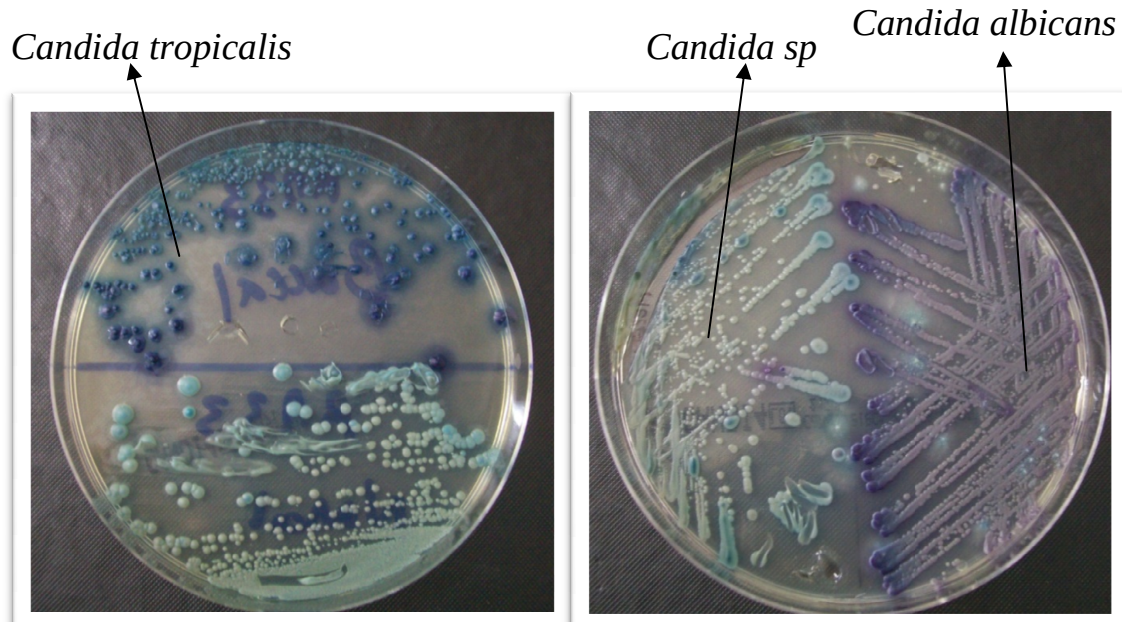


Figure 2 : Identification des espèces de *candida* sur le milieu chromogénique. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

4. Antifongigramme : profil de résistance phénotypique :

L'antifongigramme a pour but de déterminer la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation. La fiabilité d'un antifongigramme est influencée par de nombreux paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés.

Dans le traitement d'une candidose, le rôle du biologiste est d'isoler et d'identifier la souche impliquée puis de déterminer in vitro, à l'aide de tests standardisés et reproductibles, l'activité de divers antifongiques.

Dans notre étude, sur les espèces isolées et identifiées, un antifongigramme est réalisé afin d'évaluer le taux de résistance des espèces *Candida* retrouvées dans les prélèvements aux médicaments antifongiques par interprétation des valeurs de CMI obtenues. Notre démarche d'antifongigramme est réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé des bandelettes.

Intérêt clinique : Les bandelettes d'antifongigramme permettent de déterminer la sensibilité des levures du genre *Candida* aux agents antifongiques par une méthode de diffusion en milieu gélosé. Cette méthode suit une procédure standardisée publiée par le CLSI/NCCLS. Dans notre travail nous nous sommes limités à l'étude de la caspofungine. Les autres antifongiques font l'objet également d'autres travaux.

Présentation : Les bandelettes fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure et sont imprégnés d'antifongiques à des concentrations croissantes. Ces bandelettes sont clairement identifiées par un symbole comportant 3 lettres.

Les bandelettes AB Biodisk sont présentées en blister de 100 bandelettes conditionnées en containers étanches contenant un déshydratant.

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

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

Les ellipses d'inhibition, sont mesurés jusqu'aux colonies de tailles normales. En effet, il est possible d'observer sur les bords des zones d'inhibition, une inhibition partielle de la culture avec la présence de colonies de petite et de moyenne taille. Ces colonies ne correspondent pas à des mutants résistants et ne doivent pas être prises en compte pour la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

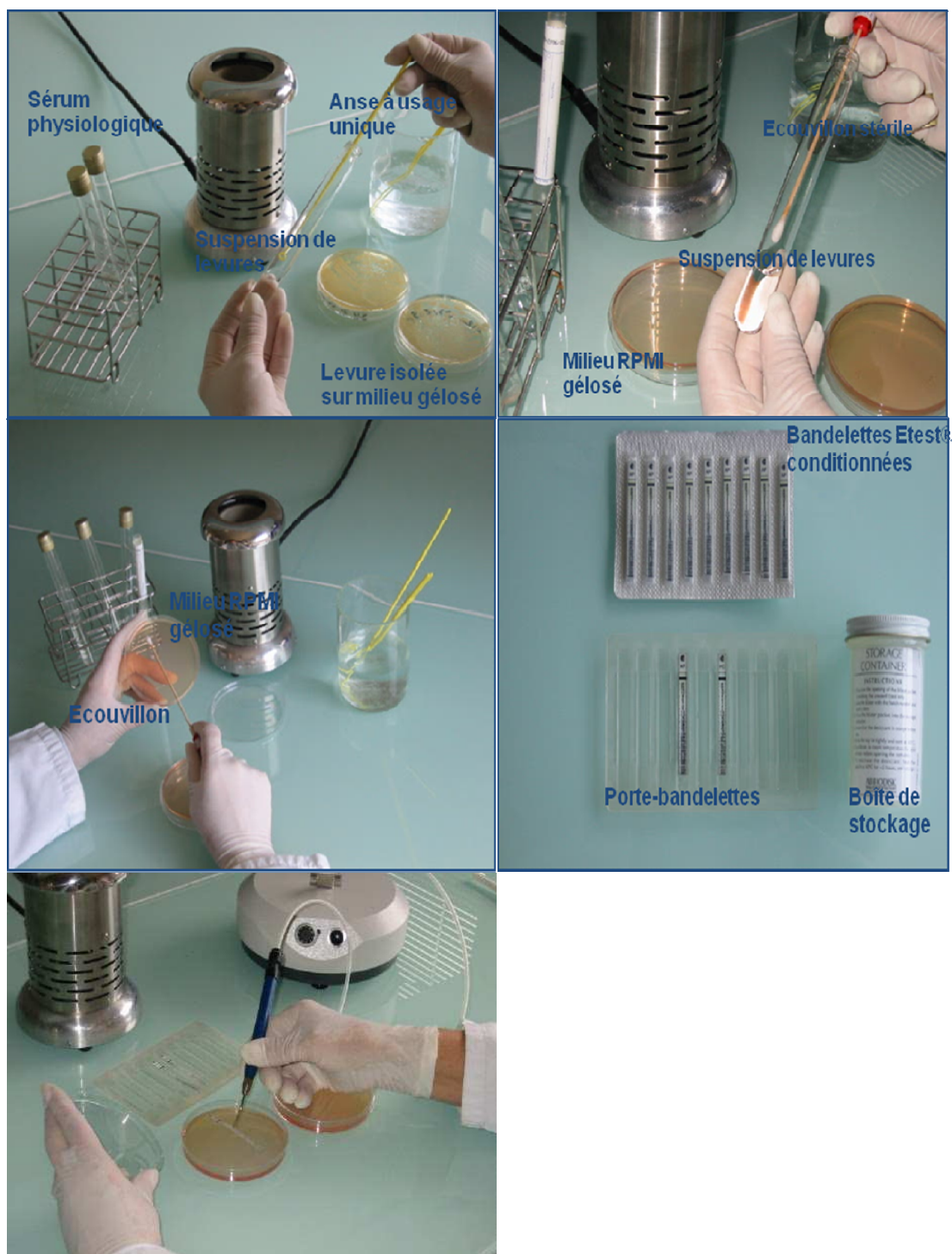
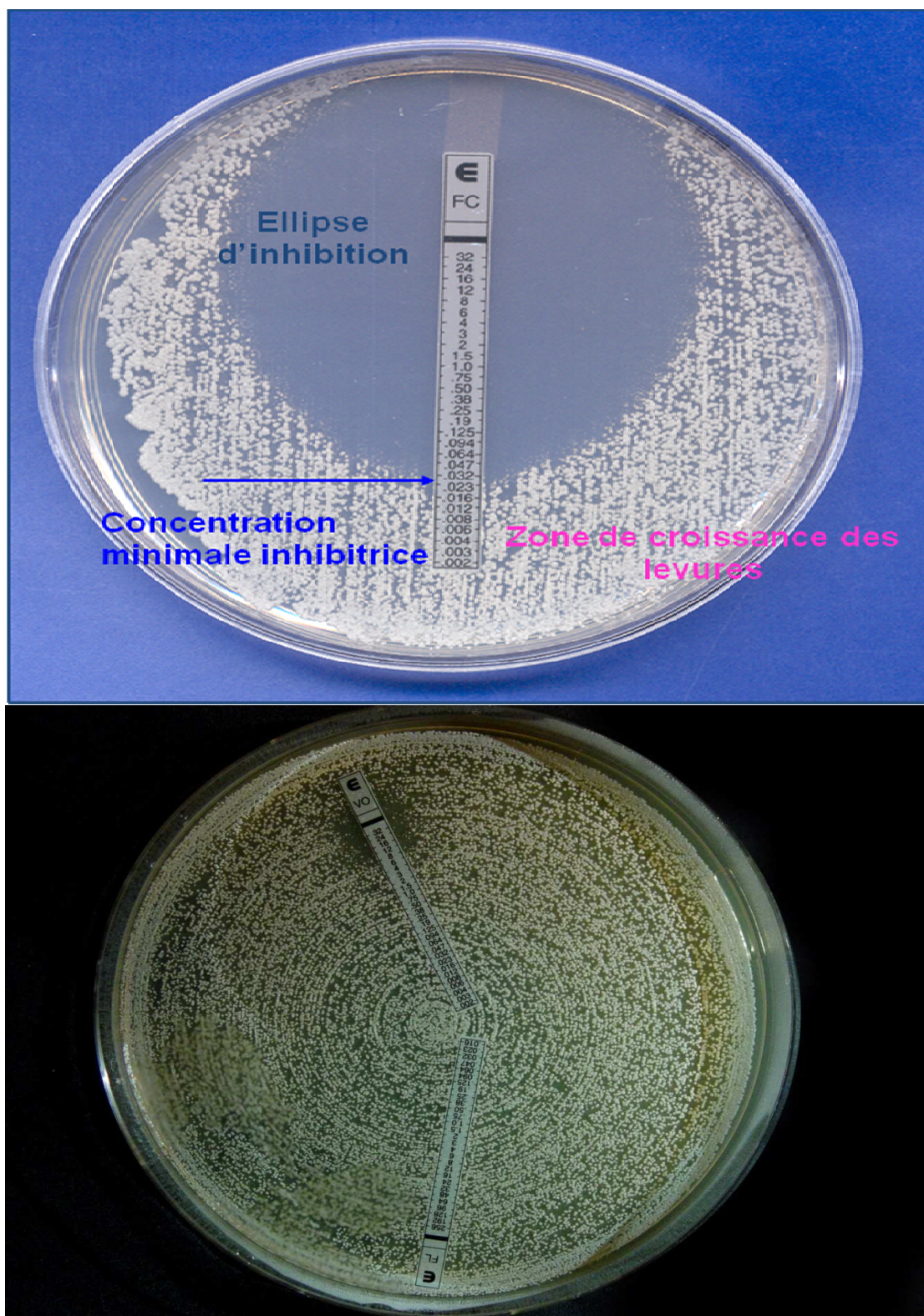
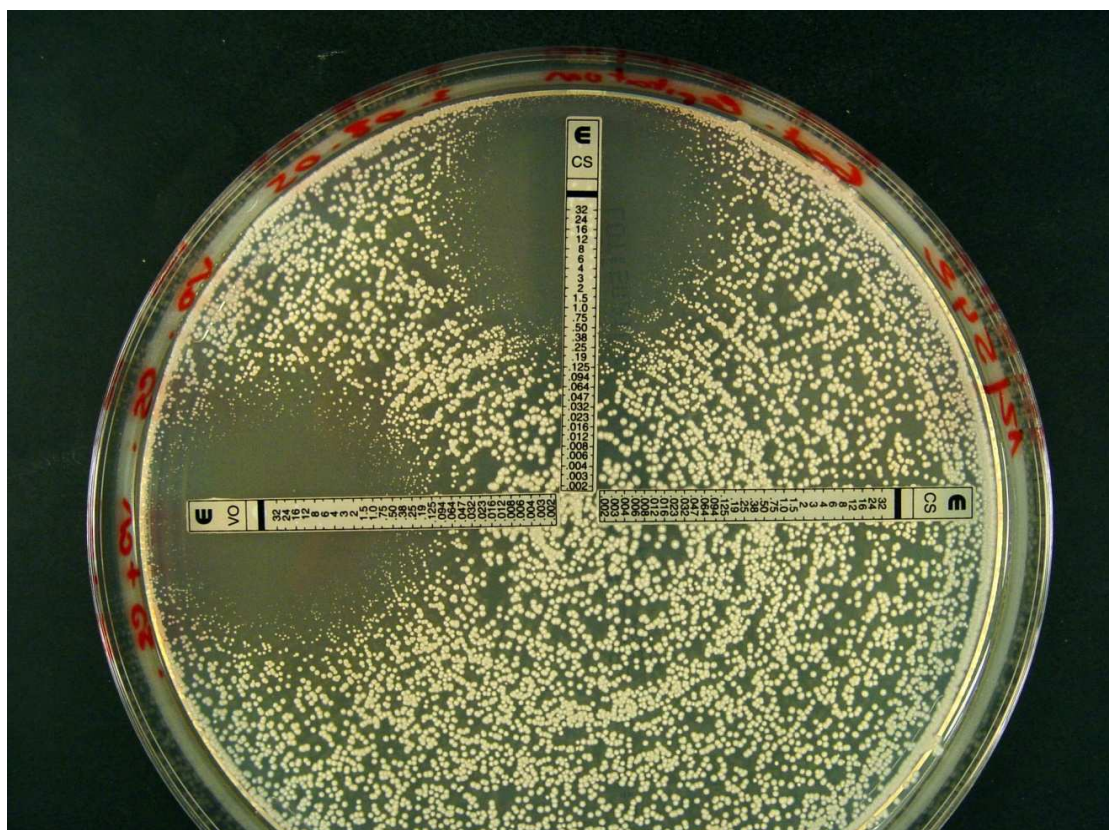


Figure 3 : différentes étapes du mode opératoire du E-Test.





CS : caspofungine ; VO : voriconazole

Résultats

III. RESULTATS

Durant la période de l'étude, 58 souches de *Candida sp* sont isolées. Quinze (15) souches à partir des prélèvements provenant du service de réanimation médical de l'Hôpital IBN SINA alors que 43 souches sont isolées à partir des prélèvements récupérés du Service de réanimation de l'HMIMV de Rabat. L'ensemble de ces prélèvements proviennent des sites périphériques : (buccal, nasal, vaginal, rectal, urinaire...).

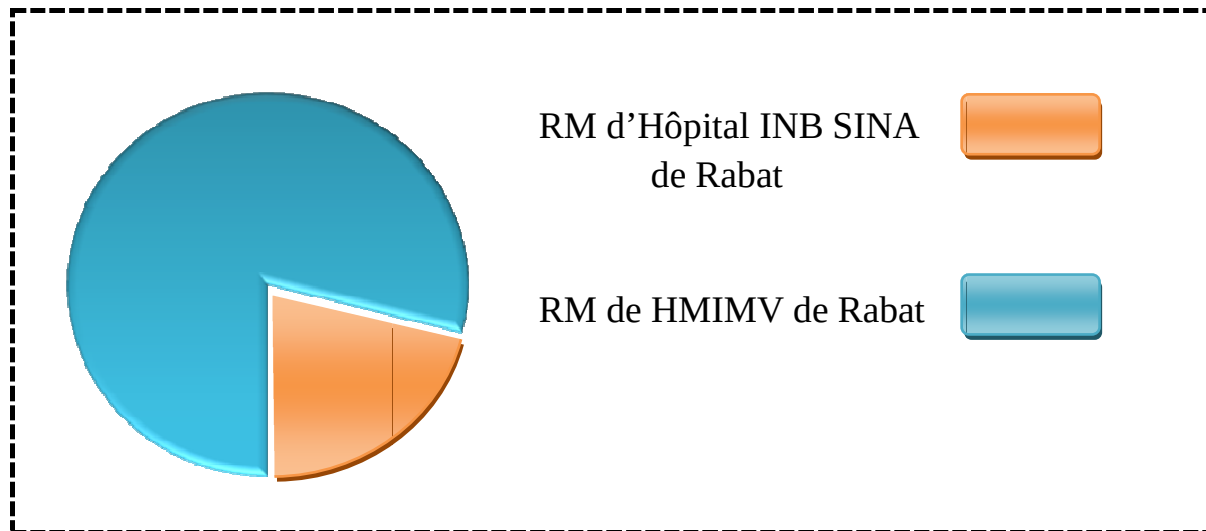


Figure 4 : Origines des prélèvements effectués

III.1 Répartition des espèces isolées :

La répartition des espèces montre une prédominance de *Candida non albicans* (36 souches) par rapport à *Candida albicans*.

Tableau 1 : pourcentage de *Candida albicans* et *non albicans* isolés

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Candida albicans</i>	22	37,93
<i>Candida non albicans</i>	36	62,06
Total	58	100%

Au total, 4 espèces différentes de *Candida* sont isolées. *Candida albicans* (22 souches) et *Candida glabrata* (23 souches) sont les deux espèces majoritaires. La répartition globale des souches isolées est retrouvée dans le tableau suivant :

Tableau 2 : répartition des différentes espèces de *Candida* isolées

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Candida glabrata</i>	23	39,65
<i>Candida albicans</i>	22	37,93
<i>Candida krusei</i>	7	12,06
<i>Candida tropicalis</i>	6	10,34
Total	58	100%

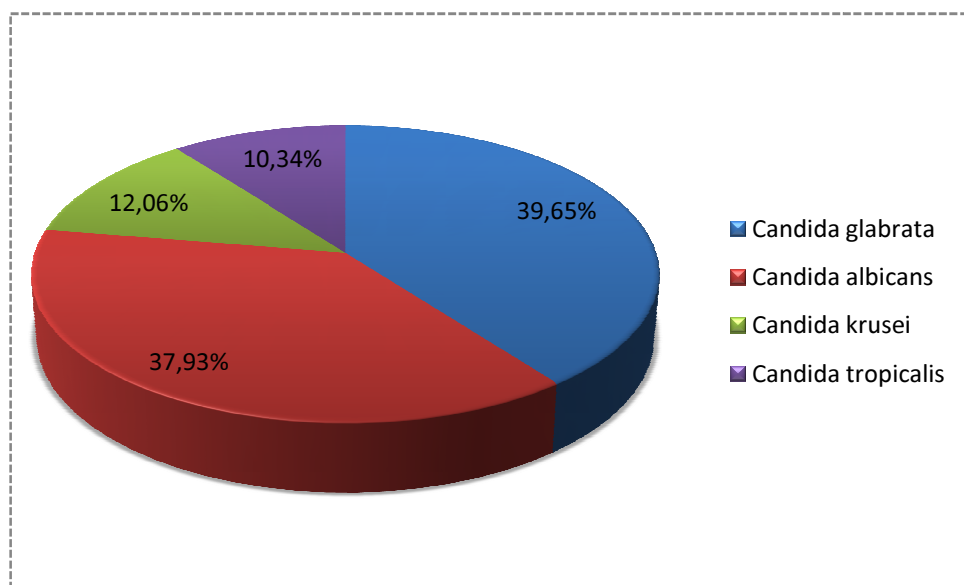


Figure 5 : répartition des différentes espèces de *Candida* isolées

III.2 Sensibilité in vitro à la Caspofungine des espèces isolées :

Les souches provenant des différents sites périphériques prélevés sont pour la plupart sensibles à la caspofungine avec un pourcentage dépassant les 77 %. Les pourcentages des souches entrant dans chaque catégorie (S, SDD, R) sont : 77,59 %, 10,34 %, 12,07%.

Tableau 3 : Pourcentage des souches entrant dans chaque catégorie (Sensibles, Sensible dose dépendante, Résistant) pour l'ensemble des souches isolées

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage
Sensibles	45	77,59
SDD	6	10,34
Résistants	7	12,07
Total	58	100 %

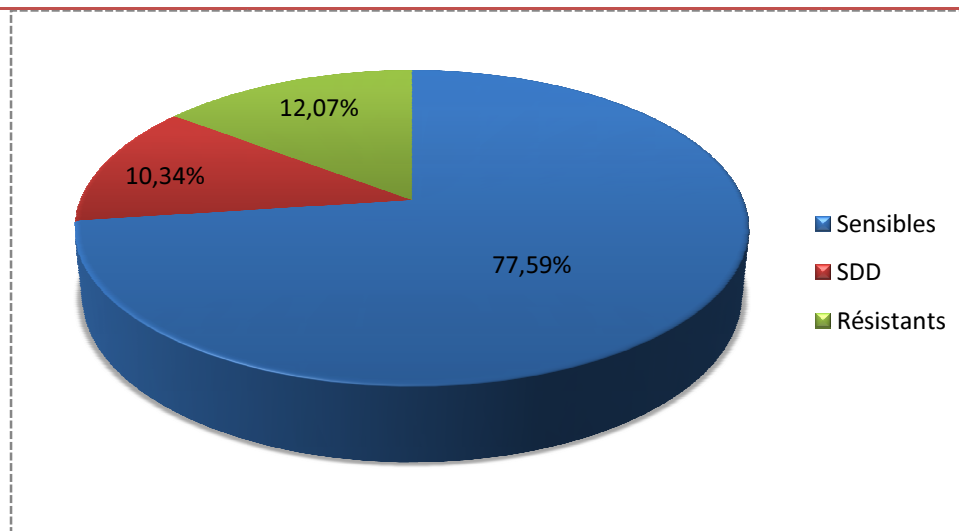


Figure 6 : taux de sensibilité des souches de Candida isolées de l'ensemble des prélèvements.

III.3 Résistance selon les sites de prélèvements :

➤ Buccal :

Des 34 Souches isolées du site buccal, 21 sont sensibles à la caspofungine tandis que 8 sont résistantes et 5 SDD.

Tableau 4 : Nombres et pourcentages des souches de Candida isolées du site Buccal

	Nombre	Pourcentage
Sensibles	21	61,77
SDD	5	14,71
Résistantes	8	23,53
Totale	34	100 %

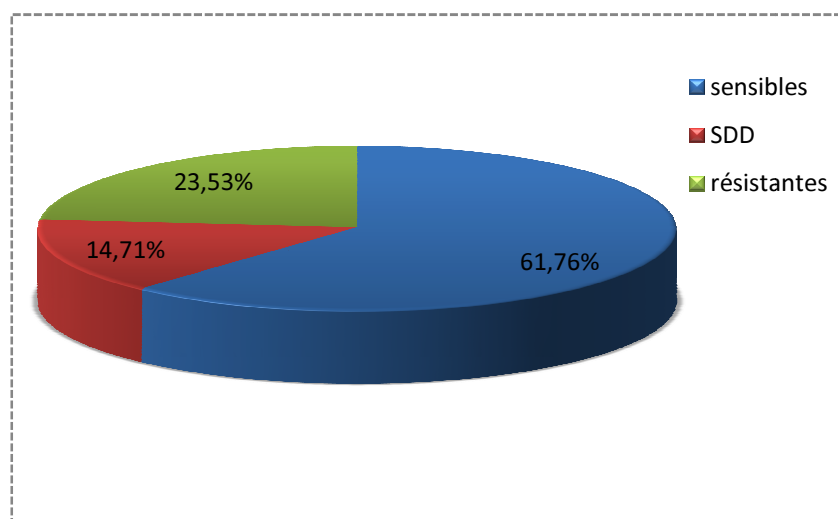


Figure 7 : Répartition clinique des souches de *Candida* isolées du site buccal

➤ **Site nasal :**

Les 9 souches isolées sont sensibles, aucune souche n'est résistante.

Tableau 5 : répartition en pourcentage des souches *Candida* isolées du site nasal

	Nombre	Pourcentage
Sensibles	9	100
SDD	0	0
Résistantes	0	0
Total	9	100 %

➤ **Urines :**

Des 8 souches isolées des urines, 7 sont sensibles, 1 SDD. Aucune souche n'est résistante.

Tableau 6 : Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées des urines

	Nombre	Pourcentage
Résistantes	0	0
SDD	1	12,5
Sensibles	7	87,5
Total	8	100

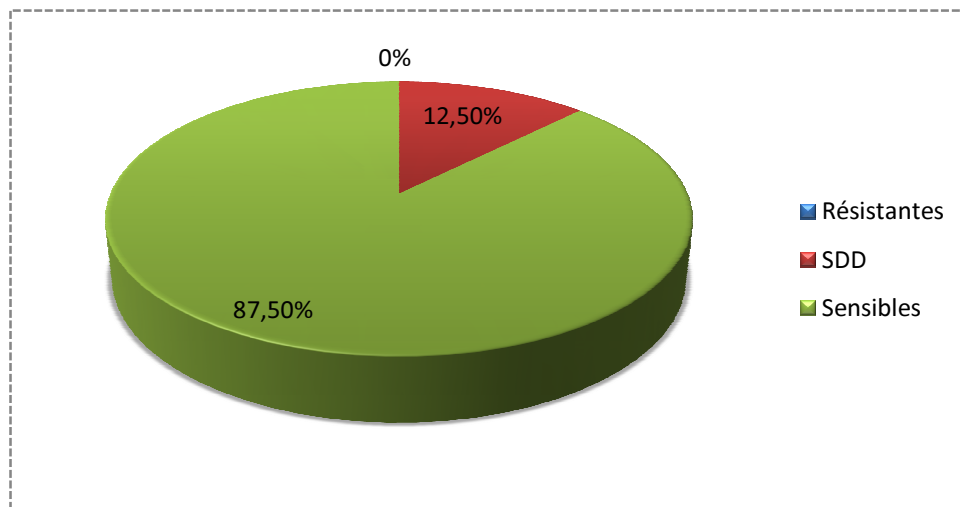


Figure 8 : taux de sensibilité des souches de *Candida* isolées des urines

➤ **Autres sites périphériques :**

Pour les autres sites périphériques prélevés (auriculaire, anal, vaginal, ...etc.), le nombre de souches sensible, SDD, résistantes est représenté dans la figure 9.

Les deux souches isolées chacune des sites auriculaire et vaginal sont sensibles, tandis que dans les 11 souches isolées du site Anal, 6 sont résistantes, 5 Sensibles et aucune souche SDD.

Tableau 7 : la répartition clinique des différentes souches isolées :

Sites	Auriculaire			Anal			Vaginal		
Catégories cliniques	S	SDD	R	S	SDD	R	S	SDD	R
Nombre de souches	1	0	0	5	0	6	1	0	0

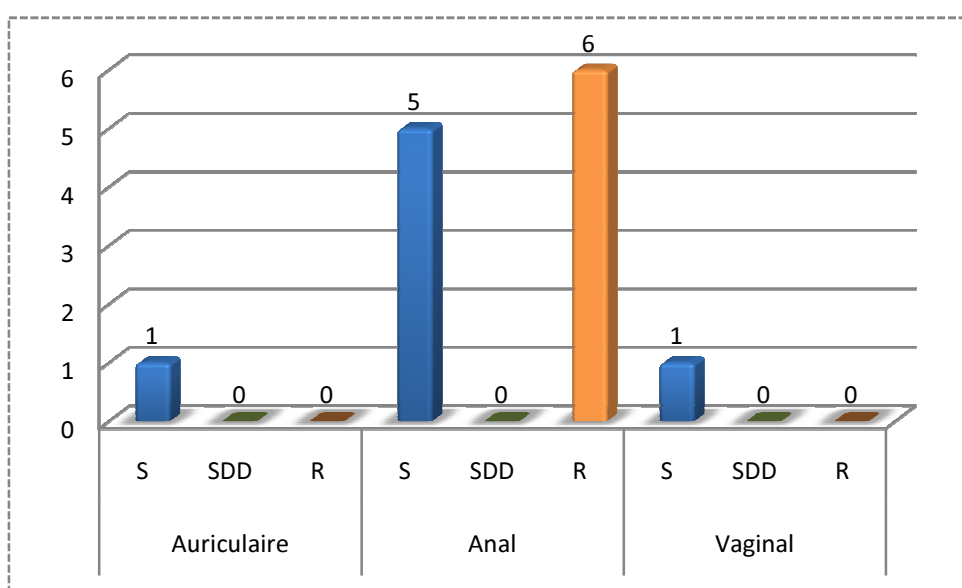


Figure 9 : répartition en catégories cliniques des souches de *Candida* isolées des sites Auriculaire, Axillaire, Rectal et Vaginal

III.4 Résistance selon les espèces :

Tableau 8 : taux de résistance à la caspofungine des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques :

Espèces	Nombre	Catégories cliniques					
		Sensibles		SDD		Résistants	
		N	%	N	%	N	%
<i>Candida albicans</i>	22	18	81,82	3	13,64	1	4,54
<i>Candida glabrata</i>	23	17	73,92	3	13,04	3	13,04
<i>Candida krusei</i>	7	6	85,71	0	0	1	14,29
<i>Candida tropicalis</i>	6	4	66,67	0	0	2	33,33
Total	58	45	77,59	6	10,34	7	12,07

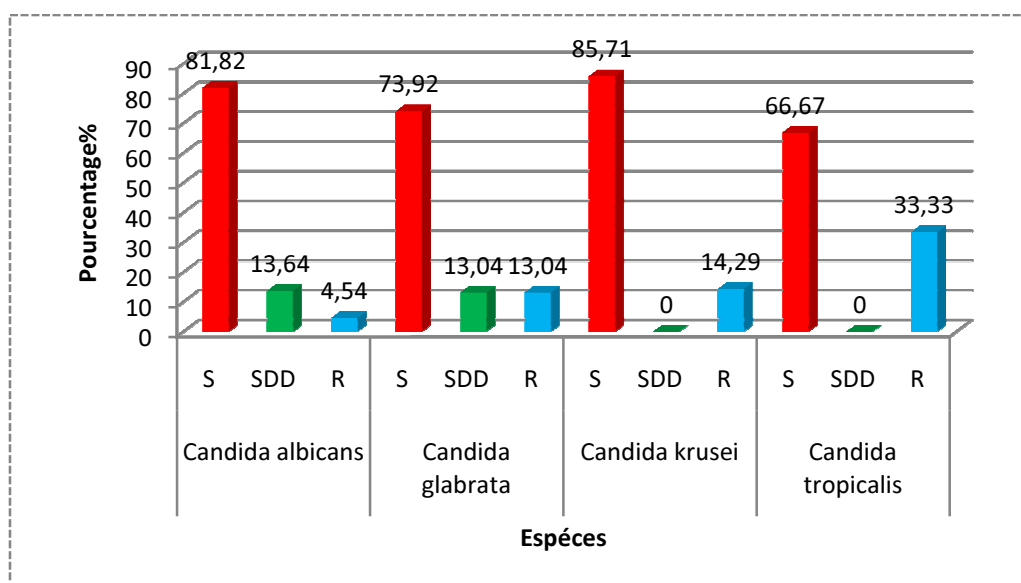


Figure 10: Taux de résistance à la caspofungine des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques

Selon la figure 10 le taux de résistance à la caspofungine est faible pour l'ensemble des espèces.

On voit clairement que la plupart des Souches étudiées sont sensibles à la caspofungine surtout pour les espèces *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. albicans*.

Discussion

IV. DISCUSSION

IV.1 Etude de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques :

IV.1.1 Indications et objectifs:

L'augmentation croissante des mycoses profondes opportunistes a nécessité l'utilisation plus large des antifongiques existants. En parallèle, des résistances ont été rapportées aux différents antifongiques. Cette évolution a logiquement entraîné la mise en œuvre systématique des tests de sensibilité *in vitro*. Malheureusement, l'antifongigramme (à l'inverse de l'antibiogramme parfaitement standardisé) a une valeur beaucoup plus discutée et une importance relative en mycologie médicale du fait d'une faible corrélation *in vitro/in vivo*. Il convient donc de bien connaître les indications des antifongigrammes et les limites de leur interprétation pour leur utilisation raisonnable.

Les indications de l'antifongigramme sont justifiées du fait de la résistance confirmée de certaines espèces, aux antifongiques existants. En effet, L'antifongigramme ne doit pas être banalisé et sélectionner ses indications est une nécessité.

Elles doivent être réservées :

- Aux infections profondes ou septicémiques ou dans les localisations cutanéomuqueuses secondaires à une diffusion systémique, afin de vérifier la sensibilité de la souche aux antifongiques systémiques;
- Aux évolutions cliniques défavorables ou en cas d'échec malgré un traitement adapté et bien conduit;
- Aux levures isolées de malades immunodéprimés ou hospitalisés dans les services à risque : réanimations médicale, chirurgicale, services d'onco-hématologie, de transplantation d'organes, de néonatalogie, quelle que soit l'origine du prélèvement. Ceci permet de vérifier si une résistance aux antifongiques n'apparaît pas secondairement ^[3].

En principe, les tests de sensibilité *in vitro* devraient permettre la mesure comparative de l'activité des antifongiques, l'évaluation de l'activité potentielle de nouvelles drogues thérapeutiques, la surveillance du développement des résistances, mais surtout prédire l'évolution clinique sous traitement.

Toujours est-il que l'étude de la sensibilité aux antifongiques au laboratoire ne répond pas parfaitement aux objectifs auxquels mycologues et médecins ambitionnent. A savoir :

- Obtenir des résultats reproductibles *in vitro* vis-à-vis d'un antifongique, qui permet de répondre à une problématique de laboratoire n'étant pas encore complètement résolue malgré les efforts entretenus et l'avènement de méthodes validées.
- Obtenir une valeur prédictive raisonnable afin de déterminer l'issue du traitement *in vivo* pour le patient mais également pour le médecin.

A la lumière de notre étude, nous avons choisi d'insister sur la surveillance épidémiologique et les activités de recherche qui restent les plus importantes.

o **Activité de surveillance épidémiologique :** jusque dans les années 1980, le nombre d'antifongiques commercialisés était restreint à quelques molécules d'activité systémique et à un certain nombre de topiques destinés au traitement d'infections superficielles à dermatophytes ou à levures. L'infection fongique systémique était considérée comme rare et très rapidement mortelle, les résistances étaient peu connues et leur impact clinique n'était pas évaluable.

Les tentatives de développement de méthodes d'évaluation de la sensibilité des champignons *in vitro*, dont le besoin n'était donc pas apparent, se sont heurtées à des difficultés techniques spécifiques, liées au fait que les champignons sont des organismes eucaryotes plus complexes que les bactéries dans leur mode de réplication comme dans leur relation avec l'hôte qu'ils colonisent ou infectent. À partir des années 1980, le nombre de patients immunodéprimés, constituant autant de patients à risque d'infection fongique, a considérablement augmenté. Ainsi 10 000 cas d'aspergillose invasive surviennent chaque année aux États-Unis et, selon les continents, les candidémies occupent entre la quatrième et la septième position parmi les bactériémies. De plus, même si *Candida albicans* reste l'agent le plus fréquemment impliqué au cours des infections fongiques systémiques, des espèces fongiques naturellement peu sensibles à certains antifongiques ont émergé. Certaines souches naturellement sensibles ont acquis des résistances, ce qui dans certains cas a pu être corrélé avec l'évolution clinique. Enfin, des variations de la distribution des espèces fongiques, tant géographiques que dans le temps,

ainsi que l'élargissement récent de l'arsenal thérapeutique compliquent le choix d'un traitement antifongique empirique et renforcent le besoin d'un outil de détection *in vitro* d'éventuelles résistances. Ainsi, la demande des cliniciens en termes de critères de choix thérapeutique s'est faite plus pressante. Parallèlement, un certain nombre de méthodes, commercialisées ou non, permettant d'évaluer la sensibilité *in vitro* des champignons aux antifongiques ont été développées.

Les questions relatives à la fiabilité, à la pertinence et aux modalités de réalisation de l'antifongigramme (ATF) sont donc revenues récemment au premier plan ^[4].

❖ **Activités de recherche :** La plupart des infections fongiques surviennent chez les patients sévèrement immunodéprimés, dont les défenses immunitaires ne peuvent contribuer à éradiquer les microorganismes dont les champignons. Afin d'améliorer le pronostic des infections fongiques extrêmement graves et sévères, il est important de se donner les moyens de développer et de tester de nouveaux antifongiques seuls ou en associations. Tester la sensibilité aux antifongiques dans un cadre de recherche est capital. En particulier pour évaluer l'activité *in vitro* de nouveaux antifongiques et des combinaisons d'antifongiques, afin de détecter des synergies mais aussi des antagonismes *in vitro*. Également, l'effet fongicide demande à être étudié, car actuellement les données manquent en termes de valeurs de laboratoire. Les modèles pharmacodynamiques et l'étude des mécanismes de résistance vont dans le sens d'une amélioration de la connaissance des microorganismes fongiques et donc de pouvoir opposer une réponse thérapeutique plus ciblée et plus efficace ^[5].

IV.1.2 Moyens d'étude de sensibilité *in vitro* des antifongiques:

La réalisation d'antifongigramme et l'évaluation des CMI est facile pour les levures, par contre elle est plus délicate pour les champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Fusarium*) car l'association de spores et de filaments forme un inoculum hétérogène difficilement standardisable. Les antifongiques étudiés seront avant tout ceux actifs dans les mycoses profondes ^[3].

1. Méthodes par dilution :

Le principe de la méthode consiste à diluer directement le produit à tester dans le milieu de culture gélosé solide ou liquide et à inoculer ce milieu avec les microorganismes par la suite. En diluant différentes concentrations du produit à tester, on peut définir la valeur la plus faible à laquelle on n'observe pas de croissance des microorganismes et donc une inhibition de la croissance : c'est la concentration minimale d'inhibition (CMI) ^[6]. Cette méthode permet donc d'évaluer qualitativement et surtout quantitativement l'activité d'une substance.

La nature du microorganisme à ensemercer sur le milieu impose une procédure d'où deux variantes de cette méthode.

1.1 En milieu solide :

La technique consiste à réaliser des dilutions dans un milieu de culture gélosé préalablement fondu et maintenu en surfusion à 45°C. L'ensemencement est réalisé soit par inondation à partir d'une suspension de microorganismes préparée de façon à ce qu'il soit le plus homogène possible, soit par dépôt ponctuel à l'aide d'un inoculateur (anse de platine). La lecture des résultats se fait visuellement par observation de la croissance ou de l'inhibition de la croissance du microorganisme antimicrobien testé par rapport à la croissance sur une boîte témoin sans extrait. ^[7]

1.2 En milieu semi-solide :

Il en existe plusieurs. Des galeries possédant en général plusieurs puits avec deux concentrations différentes d'un antifongique sont utilisées.

❖ ATB-Fungus® :

Principe :

Il 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 différentes concentrations permettant de déterminer des CMI.

Pour déterminer cette CMI, on va rechercher et quantifier dans chaque cupule une croissance par lecture visuelle. L'appréciation peut différer d'une personne à l'autre.

L'appréciation par lecture automatique n'est pas disponible au laboratoire. ^[8]

Matériel :

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 :

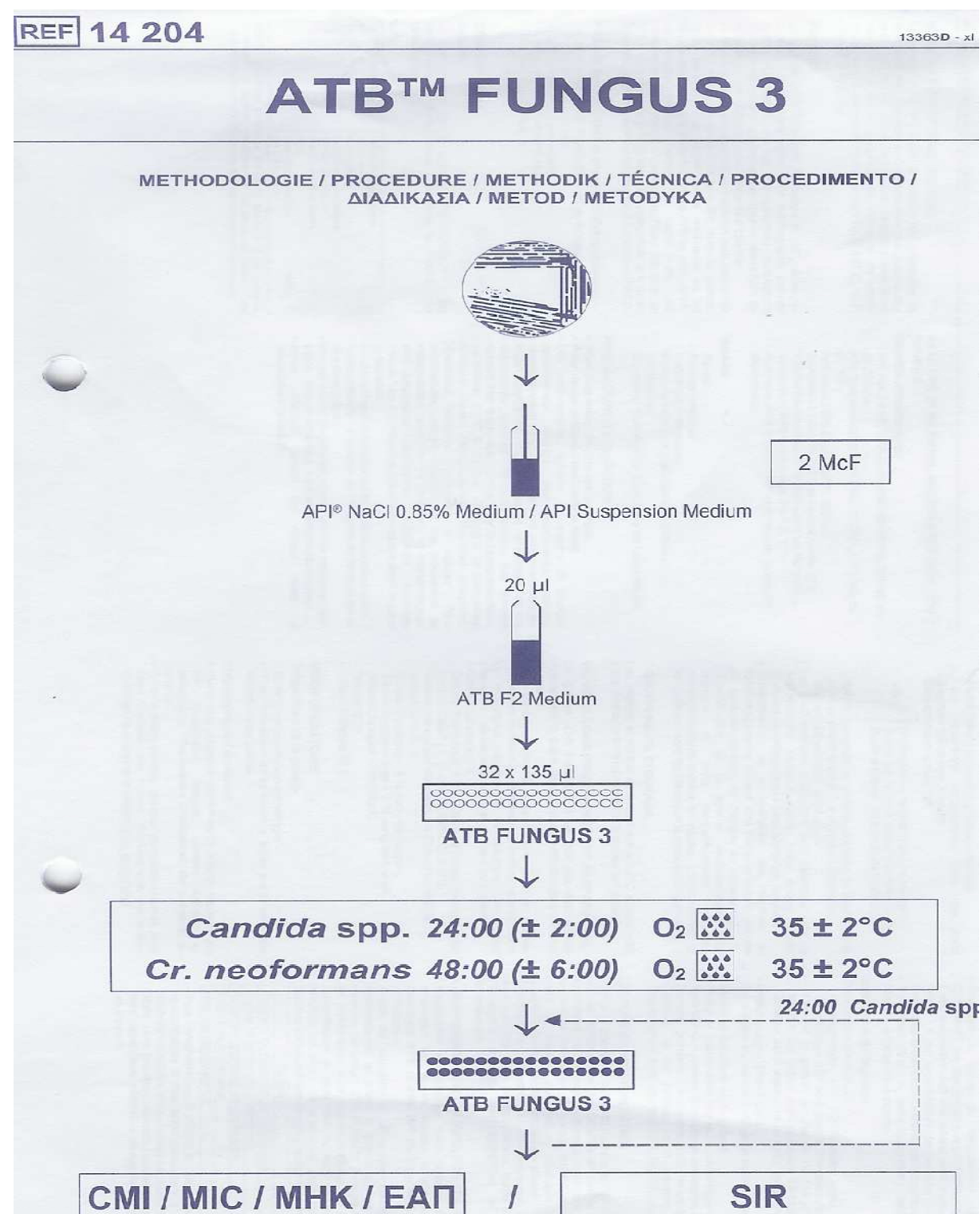
- NaCl 0.85% 3 ml
- Ecouvillons
- Pipette électronique ATB 135 µl avec les embouts
- Pipette calibrée 20 µl et les embouts

Mode opératoire :

- A partir d'une culture fraîche sur COS, prélever quelques colonies à l'aide d'un écouvillon 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.
- Contrôler la pureté de l'inoculum en l'isolant sur une gélose non sélective.
- Transférer 20 µl de cette suspension à l'aide d'une pipette calibrée dans l'ATB Medium 1, homogénéiser.
- 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 levures/cupule.
- Mettre le couvercle.
- Incuber : - 24 heures à 35°C pour les *Candida* à l'étuve O2.
- 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. ^[8]

Procédure pour l'ATB FUNGUS3®:



Lecture et interprétation:

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. L'absence de croissance dans l'une ou l'autre, ou les 2 cupules témoins invalide la galerie.

	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

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

Pour le Fluconazole, la Flucytosine, l'Itraconazole, le Voriconazole, du fait du phénomène de croissance résiduelle, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 2,1 ou 0.

Tableau 9 : Concentrations critiques des CMI (en mg/l) recommandées pour les *Candida sp* en catégories cliniques

	Sensible	Intermédiaire	Résistante
Flucytosine	≤ 4	8-16	≥ 32
Amphotericine B	Une CMI ≥ 2 suggère une résistance		
Fluconazole	≤ 8	16-32	≥ 64
Itraconazole	$\leq 0,125$	0,25-0,5	≥ 1
Voriconazole	≤ 1	2	≥ 4

Note : Le *Candida krusei* est une espèce intrinsèquement résistante au Fluconazole, le test doit être systématiquement interprété comme RESISTANT. ^[8]

Tableau 10 : Concentrations critiques des CMI (en mg/l) recommandées pour les *Cryptococcus neoformans* en catégories cliniques

	Sensible	Intermédiaire	Résistante
Flucytosine	≤ 4	8-16	≥ 32
Amphotéricine B	Une CMI ≥ 2 suggère une résistance		
Fluconazole	≤ 4	8	≥ 16
Itraconazole		Non défini	
voriconazole		Non défini	

Note : Les CMI habituellement obtenues pour le *Cryptococcus neoformans* sont 0.5 et 1 mg/l.

Ci-dessous, une galerie ATB FUNGUS2® de bioMérieux® SA, modèle précédant l'ATB FUNGUS3®.



Figure 11: Galerie ATB FUNGUS2®, bioMérieux^[9]

La principale différence entre ces deux générations de galerie ATB FUNGUS est la présence d'un cinquième antifongique pour l'ATB FUNGUS3®, soit le voriconazole.

Avantage :

- 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.
- Interprétation des résultats facilitée par rapport à l'E-test.

- Le prix est relativement bon marché, environ Fr. 140.95.- pour 25 galeries soit Fr. 5.65.- par galerie.

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 le *Candida glabrata* (48 heures).
- Après 48 heures, les cupules de la galerie sont parfois sèches et ininterprétables.
- 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.^[8]

1.3 En milieu liquide :

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

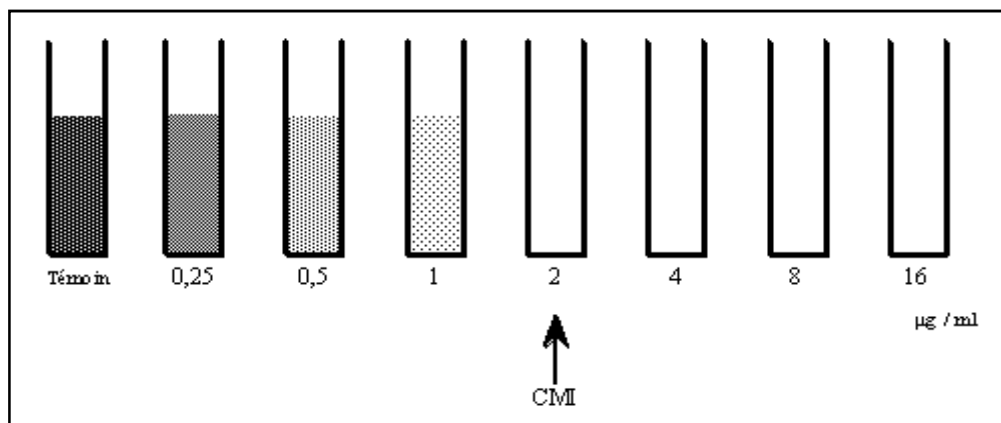


Figure 12 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

Bien que la méthode de dilution soit la plus appropriée pour les évaluations quantitatives d'activité (CMI), elle reste toutefois assez fastidieuse et longue avec les procédures de dilutions en série à faire.

Les techniques de référence pour la détermination de la sensibilité aux antifongiques s'appuient sur la méthode de microdilution en milieu liquide.

Il existe actuellement deux techniques, une développée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, anciennement NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards) qui a été validée pour les levures et les champignons filamenteux et une développée par l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) qui n'est validée actuellement que pour les levures.^[10]

Standard américain: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

Le développement de nouveaux antifongiques a élargi les possibilités thérapeutiques et a entraîné une demande de tests de sensibilité de la part des cliniciens. Ce n'est qu'en 1997 qu'un milieu de culture standardisé permettant l'étude de la sensibilité des levures a été mis en place et approuvé par le National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (actuellement appelé Clinical and Laboratory Standards Institute). Ce milieu de culture appelé NCCLS M27-A caractérisé par sa très bonne fiabilité et reproductibilité est donc devenue la référence dans l'étude de la sensibilité fongique. Il présente quelques limites : un phénomène «de traîne » pour l'étude des azolés, une appréciation imparfaite pour l'amphotéricine B et surtout une lourdeur de mise en place rendant difficile son utilisation quotidienne^[11].

Tableau 11: mise en œuvre de la méthode M27.

Méthodologie	Macrodilution en milieu liquide, volume final : 1ml
Milieu	RPMI 1 640+0,165 MOPS (pH=7,0)
Inoculum	0,5-2,5×10 ³ organismes/ml
Température d'incubation	35°C
Durée de l'incubation	48h (<i>Candida sp.</i>) ou 72h (<i>Cryptococcus neoformans</i>)
Point final	Amphotéricine B 100% de la réduction de la turbidité azolés et 5FC 80%

Pour pallier à la lourdeur de la mise en œuvre de cette technique, le NCCLS a proposé une microméthode adaptée pour une utilisation en microplaques avec lecture spectrophotométrique des CMI. Elle est bien corrélée avec la macrométhode mais elle reste une technique lourde non utilisée en routine. Ainsi, la publication de la méthode M27-A a été suivie en 1998 du Proposed Standard M38-A, qui décrit des méthodes de macrodilution et de microdilution en bouillon pour des essais de sensibilité des champignons filamenteux (*Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus oryzae*....) ^[12].

 Standards européen: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)

Le Comité européen de sensibilité aux antimicrobiens Testing (EUCAST) est un comité permanent organisé par la Société européenne de Microbiologie clinique et des maladies infectieuses (ESCMID) et les comités nationaux des valeurs seuils d'interprétation de l'Europe. EUCAST a été mis en place pour harmoniser les valeurs seuils des agents antimicrobiens et de normaliser les tests de sensibilité en Europe pour que des résultats comparables et interprétations, tant en pratique clinique et dans la surveillance de la résistance aux antimicrobiennes, peut être atteint. EUCAST a chargé le Sous-comité sur la sensibilité aux antifongiques Testing (EUCAST-Afst) de préparer des normes directives pour les tests antifongiques contre différentes espèces de champignons. EUCAST-Afst a déjà élaboré une procédure de microdilution pour la détermination des CMI antifongiques pour les espèces de levures fermentaires (document E.Dis.7.1)^[13]. Cette norme est basée sur la procédure de renvoi décrit dans le document M27-A2 du CLSI anciennement le NCCLS^[14]. En outre, l'EUCAST-AFST a mis au point une méthode pour déterminer la CMI de dilution en bouillon d'*Aspergillus spp*. Il s'agit d'une méthode de dilution qui est destiné à produire des résultats concordants avec la méthode de référence CLSI des tests de sensibilité antifongique de champignons filamenteux (document M38-A)^[15]. Le EUCAST Procédé comporte quelques modifications sur la base des études précédentes: (1) RPMI-1640 un milieu supplémenté avec du glucose à 2% p/v (RPMI 2% G) est utilisé en tant que milieu d'essai, (2) l'inoculum est préparé par comptage des conidies dans un haemocytometer; et (3) une taille d'inoculum de 1×10^5 à 5×10^5 conidies/ml est utilisée ^[16]. L'accord et la corrélation entre les

diverses méthodes n'a pas été évaluée auparavant pour un autre agent antifongique. Actuellement, deux méthodes internationales de standards pour la détermination de la sensibilité des levures et des moisissures à des agents antifongiques sont disponibles. Le premier était publié par l'Institut clinique Laboratory Standards (Anciennement Comité national pour le laboratoire clinique Normes La seconde a été développé par Sous-comité tests de sensibilité aux antifongiques des EUCAST (EUCAST-Afst) Ces deux procédures ont une grande reproductibilité inter et intra laboratoire, en distinguant des populations ayant des CMI basses et hautes à des agents antifongique. Ces deux méthodes diffèrent dans la lecture, inoculum, moyennes et micro (voir les tableaux 11 et 12).^[17]

Tableau 11 : Différences des conditions des tests de sensibilité aux antifongiques pour levure entre CLSI et EUCAST

Caractéristique	CLSI M 27 - A3	EUCAST-E.DEF.7.1
Pertinence	Levure	Levure fermentaire
Inoculum	0.5–2.5 ×10 ³ CFU ml ⁻¹	0.5–2.5 ×10 ³ CFU ml ⁻¹
Standardisation de l'inoculum	0.5x McFarland	0.5x McFarland
Milieu d'essai	RPMI 1640 0.2% glucose	RPMI 2% glucose
Tampon	MOPS	MOPS
Des plaques de microtitration	Puits en forme de U	Cupules à fond plat
Format	microdilution	Microdilution
Température	35 °C	35–37 °C
Durée d'incubation	24–48 h	24 h
Lecture	Visuellement	Photométrie
End point / inhibition	100% amphotericin B 50% azolés, candins	50% 5 FC, azolés, candins 90% amphotericin B

Tableau 12 : Différences des conditions des tests de sensibilité aux antifongiques pour champignons filamenteux entre CLSI et EUCAST

Caractéristique	CLSI M38- A2	EUCAST–E. DEF 9.1
Pertinence	Conidium and spore-forming fungi	Conidia-forming moulds
Inoculum	0.4–5 ×10 ⁴ CFU ml ⁻¹	2 to 5× 10 ⁵ CFU ml ⁻¹
Standardisation de l'inoculum	Spectrophotométrie	Hémocytomètre
Milieu d'essai	RPMI 1640	RPMI 2% glucose
Tampon	MOPS	MOPS
Des plaques de microtitration	Puits en forme de U	Cupules à fond plat
Format	microdilution	Microdilution
Température	35 °C	35–37 °C
Durée d'incubation	48 h	48 h
Lecture	Visuellement	Visuellement
End point	Pas de croissance	Pas de croissance

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

- **CMI** (mg/l) = Concentration Minimale Inhibitrice : Plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum/témoin.
- **CME** (mg/l) = Concentration Minimale Efficace : Plus petite concentration d'antifongique pour laquelle on observe des hyphes courtes, trapues et compactes/témoin.
- **CMF** (mg/l) = Concentration Minimale Fongicide : Plus petite concentration d'antifongique qui tue ≥ 99,9% de l'inoculum ou qui diminue de 3 log au moins la densité de l'inoculum/témoin ^[18].

Valeurs seuils d'interprétation : ils diffèrent d'une espèce à l'autre.

a) Pour *Candida sp.* ^[19]:

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

Tableau 13 : Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories de *Candida* vis-à-vis des antifongiques selon l'EUCAST et le CLSI

Antifongique	EUCAST			CLSI		
	Sensible	Intermédiaire	Résistant	Susceptible	SDD	Résistant
Fluconazole	≤2	4	>4	<8	16 – 32	≥4
Voriconazole	≤0,125	-	>0,125	<1	2	≥4
Caspofungine	NE	NE	NE	≤2*	NE	NE
Micafungine	NE	NE	NE	≤2*	NE	NE
Anidulafungine	NE	NE	NE	≤2*	NE	NE

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

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

Les données sont exprimées en mg/l.

b) *Aspergillus fumigatus* :

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

Tableau 14 : Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories (S, I, R) d'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des antifongiques azolés actifs

Antifongique	Susceptible	Intermédiaire	Résistant
Itraconazole	<2	2	>2
Voriconazole	<2	2	>2
posaconazole	<0,5	0,5	>2

c) Cas particulier de l'amphotéricine B :

Malgré le fait que l'amphotéricine B a été utilisé dans le domaine médical pratiqué plus de cinquante ans les valeurs seuils d'interprétations clinique de ce médicament vient d'être créé par l'EUCAST pour les cinq espèces de *Candida* et n'est pas formellement défini par le CLSI. La raison en est la faible sensibilité de la méthode de référence pour la détection de la résistance à l'amphotéricine B. L'expérience acquise à ce jour en utilisant la méthode de référence a révélé que les CMI de l'amphotericine B pour les *candidas spp* de type sauvage sont entre de 0,25 -1,0 µg /ml. En conséquence, le CLSI a conclu que, si la CMI 1.0 µg /ml, donc les isolats de *candida spp* sont résistants a l'amphotéricine B et un risque d'échec thérapeutique est donc possible. Selon l'EUCAST si la CMI de l'amphotéricine 1.0 µg /ml pour *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C.tropicalis*, un tel isolat est résistant pour le médicament en question.^[20,21]

❖ **Méthodes colorimétriques (dérivées de la méthode du NCCLS) :** Nous avons vu précédemment que la détermination des CMI pour les méthodes de dilution demande une appréciation visuelle du degré de croissance par rapport à un témoin. Cette évaluation nécessite de l'expérience. Afin de faciliter l'expression des résultats, des indicateurs colorimétriques ou des colorants fluorescents peuvent être utilisés. Il a été démontré que la détermination des CMI colorimétriques amélioré l'accord inter-laboratoires de la CMI de l'itraconazole.^[22] Ce résultat est obtenu en ajoutant l'indicateur colorimétrique bleu d'Alamar (2X, Diagnostics Trek) à 2X concentré, RPMI standard de bouillon, et par la suite les étapes décrites dans le M38-A document.

Après le temps d'incubation, les puits sont examinés pour un changement de couleur à partir de bleu (indiquant l'absence de croissance) au violet (indiquant inhibition partielle) ou rouge (indiquant croissance). Le CMI colorimétrique pour les azolés est la concentration de médicament qui montre un léger changement de couleur du bleu au violet; pour l'amphotéricine B, la concentration du médicament qui ne montre aucun changement de couleur ou le premier puits qui reste bleu.^[22]

Parmi ces méthodes colorimétriques commercialisées on citera:

❖ **Sensititre Yeast One®:** (Trek Diagnostic Systems):^[23]

Le système de sensibilité Sensititre est un produit de diagnostic in vitro destiné à tester la sensibilité des levures non-exigeantes dont *Candida sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Aspergillus sp.* et diverses autres espèces de levures à croissance rapide. Cette méthode de microdilution en milieu liquide fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de Concentration Inhibitrice Minimale (CMI) sous forme d'une plaque sèche.

Principe: Le test de sensibilité des levures Sensititre est un test de microdilution colorimétrique. Chaque plaque est dosée avec des antifongiques aux dilutions appropriées, et avec un indicateur colorimétrique. Les résultats sont lus manuellement par l'observation de la concentration antifongique la plus basse indiquant l'inhibition de la croissance (mise en évidence par l'absence de changement de couleur).

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

Tableau 15 : Antifongiques à tester par le Sensititre Yeast One

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

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

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

↳ **AutoInoculator Sensititre** : Remplacer le capuchon du tube par une tête de dosage Sensititre à usage unique, et inoculer la plaque selon le mode d'emploi de l'AutoInoculator.

↳ **Pipette manuelle** : Verser le milieu liquide dans une cuve d'ensemencement stérile et inoculer la plaque à l'aide d'une pipette appropriée.

Les plaques sont étuvées pendant 24 à 25 heures à 35°C dans une étuve à culture sans CO₂. *Cryptococcus sp.* est incubé pendant 72 heures et *Aspergillus sp.* pendant 48 à 72 h.

Lecture des résultats : Les plaques peuvent être lues visuellement sous l'éclairage normal du laboratoire, à l'aide d'un miroir de lecture présentant le dessous des cupules. La croissance des levures dans les solutions antifongiques sera mise en évidence par le virage de l'indicateur colorimétrique de croissance du bleu (négatif) au rouge (positif). Certaines levures peuvent ne pas faire virer complètement l'indicateur au rouge, mais entraînent une prise de teinte plus pourprée de l'indicateur. Certains organismes peuvent montrer une légère coloration pourpre dans le posaconazole, le voriconazole, le fluconazole, l'itraconazole et le kétoconazole.

1. Examiner la cupule de croissance positive après 24 heures d'incubation. Si la cupule de croissance est rouge, les points de virage des antifongiques peuvent être interprétés. Si la cupule est restée bleue ou seulement vaguement pourprée, ré-étuver pendant encore 24 heures et réexaminer. NE PAS LIRE LA TURBIDITE SUR LES PLAQUES YEASTONE SENSITITRE. Ne lire que le changement de couleur.
2. La CMI représente la plus faible concentration d'un antifongique qui inhibe substantiellement la croissance de l'organisme, comme le détecte le changement de couleur. Le degré de changement de couleur dans les cupules contenant l'antifongique devra être comparé à la couleur des cupules de contrôle à croissance positive.
3. Aucune croissance n'est survenue s'il n'y a pas de virage de l'indicateur bleu à n'importe quelle dilution d'un antifongique. L'organisme est sensible à la plus faible concentration de l'antifongique.

4. La CMI est enregistrée comme la plus faible concentration de l'antifongique empêchant le développement d'une cupule de croissance rouge ou pourpre, c'est à dire en premier bleue.
5. L'organisme est résistant à la plus haute concentration de l'antifongique quand la croissance est observée dans les cupules. Le point de virage auquel la CMI devrait se trouver est enregistré comme « supérieur à » (>) la plus haute concentration.
6. Pour *Aspergillus sp.* lire la CMI comme la plus basse concentration avec une couleur bleue.

Interpretation des résultats :

Tableau 15 : Illustration et interprétation des résultats des tests que l'on peut rencontrer

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

¹ Avec une technique soigneuse, ces événements sont rares.

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

❖ **Fungitest®**: Une autre alternative plus simple à l'NCCLS référence des procédures est point d'arrêt tester, dans lequel la croissance des isolats est mesurée dans les cultures contenant seulement 1 ou 2 concentrations de médicament qui distinguent la Résistance à et la sensibilité des souches. Les comparaisons du panneau de Fungitest (Sanofi Diagnostics Pasteur M, Paris, France) avec la microdilution NCCLS méthode ont montré une bonne accord entre les méthodes d'études de la sensibilité aux azolés des souches de *Candida spp.*, mais ont indiqué que le point d'arrêt procédure échoue souvent pour détecter les résistantes aux azolés. ^[22]

Principe : Cette technique permet d'étudier la croissance des levures *in vitro* en milieu liquide en présence de six antifongiques testés à deux concentrations différentes. Elle dérive de la dernière recommandation du NCCLS. Le milieu de culture utilisé est RPMI glucosé à 2% et tamponné. Il est additionné d'un indicateur d'oxydoréduction qui traduit la croissance des levures par virage de sa couleur du bleu au rose ^[24,25]

La microplaque contient 16 puits :

Deux puits réservés aux témoins négatifs, deux puits réservés aux témoins positifs et douze puits contenant les six antifongiques cités avec deux concentrations différentes sous forme déshydratées ^[26].

Antifongiques ^[26] : Les antifongiques utilisés sont :

Amphotéricine B 2 et 8 µg/ml, Fluconazole 8 et 64 µg/ml, Itraconazole 0.5 et 4 µg/ml, Kétoconazole 0.5 et 4 µg/ml, Miconazole 0.5 et 8 µg/ml, 5-Fluorocytosine 2 et 32 µg/ml

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

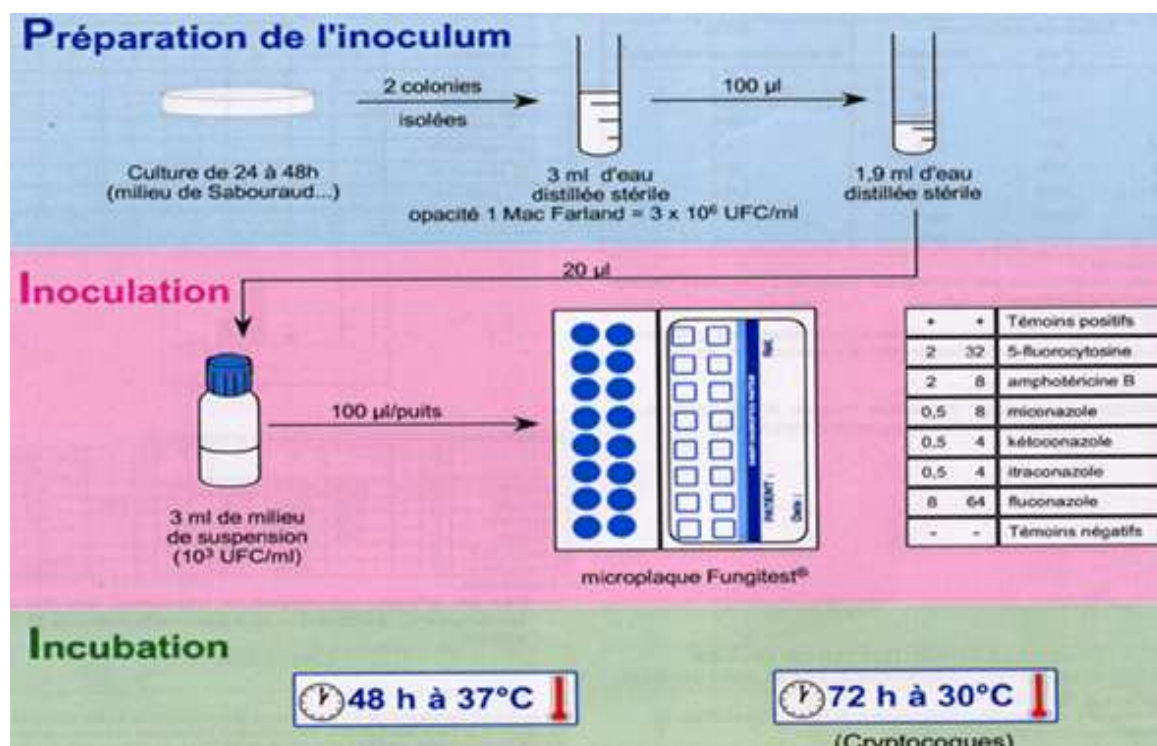


Figure 13 : Mode opératoire du Fungitest

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

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

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

Rose-Bleu : faible croissance → souche intermédiaire^[25].

Avantages : Cette technique présente une bonne condition de standardisation et a une bonne corrélation par rapport à la méthode de référence du NCCLS pour les souches trouvées sensibles^[24].

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

2. Méthode par diffusion :

Principe :

Le principe de cette méthode très utilisée en microbiologie (antibiogrammes et antifongigrammes) repose sur la diffusion du composé antimicrobien en milieu solide, dans une boîte de Pétri, à partir d'un point précis, avec création d'un gradient de concentration après un certain temps de contact entre le produit et le microorganisme.

L'effet du produit antimicrobien sur la cible est apprécié par la mesure d'une zone d'inhibition, et en fonction du diamètre d'inhibition la souche du microorganisme sera qualifiée de sensible, d'intermédiaire ou de résistante.

Dans la technique de diffusion il y a compétition entre la croissance du microorganisme et la diffusion du produit à tester ^[28].

❖ **Méthode de diffusion des disques du CLSI :** La méthode de diffusion de disques a été normalisée pour les levures par le CLSI (M44 document) ^[28,29]. La méthode emploie Mueller- Hinton agar additionné de glucose (2%) et du bleu de méthylène (0,5µg/ml). Les résultats qualitatifs peuvent être obtenus après 24 heures d'incubation, mais certains isolats à croissance lente de *C. krusei*, *C. parapsilosis* et *C. glabrata* peut nécessiter 48 heures d'incubation. CLSI M44-A2 document prend en charge une procédure établie validée que pour *Candida spp.* Et M44-S3 fournit des critères d'interprétation pour la zone caspofungine, fluconazole, voriconazole et les gammes de contrôle de qualité pour la caspofungine, le fluconazole, le posaconazole et le voriconazole ^[30].

La méthode de diffusion de disques pour la micafungine est en cours d'évaluation ^[31]. Zone critères d'interprétation pour la caspofungine et le fluconazole ont été revu et de nouvelles espèces liées à des critères ont été établis pour le fluconazole ^[32] et la caspofungine ^[31]. Selon les experts la modification des valeurs seuils d'interprétations conduit à une meilleure séparation entre les isolats de type sauvage et mutant pour les espèces de *Candida* ^[32,31]. La simplicité et le coût-efficacité du test de diffusion sur disque en font une méthode très attrayant et faites en sorte qu'elle est maintenant facilement utilisée dans les laboratoires à travers le monde ^[29].

La méthode de diffusion de disques a été évaluée également pour les champignons filamenteux non dermatophytes (CLSI M51 document) ^[33]. La méthode utilise la gélose Mueller-Hinton non supplémenté. Des résultats Qualitatifs peuvent être obtenus à partir du 16-48-heures d'incubation. CLSI M51A document fournit une méthodologie pour tester des champignons filamenteux à l'amphotéricine B, caspofungine, l'itraconazole, le posaconazole et voriconazole et M51-S1 offre une gamme de contrôle pour les cinq antifongiques. Les Points d'arrêt cliniques n'ont pas encore été établis.

Cette méthode peut être facilement mise en œuvre en routine clinique, les laboratoires de microbiologie en raison de sa simplicité et son faible coût, recommande l'utilisation de gélose Mueller-Hinton (utilisé dans la majorité des laboratoires cliniques pour les bactéries) complétée avec 0,2% de glucose et 0,5 mg/ml de bleu de méthylène. L'inconvénient, cependant, est que préparé dans le commerce les disques ne sont disponibles que pour le fluconazole et le voriconazole.

Principe :

Des disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'antifongique sont déposés à la surface du milieu semi-synthétique ou casitone préalablement ensemencé avec un inoculum calibré, préparé à partir d'une culture pure du champignon à tester. Un gradient de concentration d'antifongique s'établit autour des disques dans la gélose. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition observées autour des disques permet de déduire les Concentrations Minimum Inhibitrices (CMI) des différents antifongiques pour la souche testée et la catégorisation clinique (Sensible, Intermédiaire, Résistant).

- **Une souche sensible** est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte.

- **Une souche de sensibilité intermédiaire** est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique. En effet, ces souches :

Peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie sensible. Cependant, *in vivo*, une

partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;

Peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression n'est pas suffisante pour justifier un classement dans la catégorie résistante, mais suffisamment faible pour espérer un effet thérapeutique dans certaines conditions (fortes concentrations locales ou posologies accrues).

La catégorie intermédiaire est aussi une zone tampon qui tient compte des incertitudes techniques et biologiques.

▪ **Une souche résistante** est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée. Même si elle n'est pas encore normalisée et/ou documentée, la méthode de diffusion est sous enquête pour d'autres drogues: tels que le posaconazole vs *Candida* ^[34,35]; caspofungine vs *Candida* ^[36]; amphotéricine B, la flucytosine, et azolés ; caspofungine et micafungine vs *Aspergillus* et *Fusarium* ^[37,38]; posaconazole vs *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium* et *Fusarium* ^[39,40]; posaconazole, voriconazole , itraconazole, l'amphotéricine B, et la caspofungine vs *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, et *Scedosporium* ^[41]; itraconazole, terbinafine, voriconazole, et ravuconazole vs *Microsporum* et *Trichophyton* ^[42], et terbinafine et naftifine vs *Microsporum*, *Epidermophyton*, et *Trichophyton* ^[43]. Les résultats de ces études, en général, suggèrent un degré acceptable de corrélation entre la diffusion des disques et les dosages de la méthode de dilution de référence du CLSI.

Limites d'utilisation :

Les performances du test dépendent non seulement de l'activité des disques, mais également des facteurs tels que l'utilisation d'un inoculum standardisé, de souches de contrôle appropriées, de milieux de culture adaptés pré-tests et d'une température de stockage des disques adéquate.

❖ **Méthode de diffusion des comprimés Néo-sensitabs™**: C'est aussi une méthode simple, de diffusion sur gélose pour tester les levures (*Candida* et *Cryptococcus spp.*), qui utilise des comprimés au lieu de disque pour déterminer la sensibilité aux antifongiques des champignons. il s'agit d'un test de diffusion tablette à l'aide du milieu Mueller-Hinton complétée avec 2% de glucose (fournir une bonne croissance des levures) et 0,5 mg de bleu de méthylène / ml (fournir une meilleure définition des diamètres de la zone d'inhibition), avec 9 mm comprimés antifongiques: amphotéricine B 10 pg, 25 pg fluconazole, itraconazole 8 pg, voriconazole 1 ug, et la caspofungine 5 ug. Neo-Sensitabs test® a été effectué selon les instructions du fabricant instructions et directives M44-A [45]. Cette méthode offre des avantages à savoir l'utilisation d'un grand nombre d'antifongiques et leurs conservations à température ambiante.

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

Des études récentes ont utilisé l'agar Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5µg/mL de bleu de méthylène comme milieu et un lecteur de plaques Biomic qui permet une lecture électronique et une interprétation des 16 zones d'inhibition [45].

Antifongiques: La liste des agents antifongiques disponibles depuis le 1er janvier 2009 pour la technique de Néo-Sensitabs est représentée dans le tableau ci-dessous [46]:

Tableau 16: Antifongiques à tester par le Néo-Sensitabs

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

Mode opératoire ^[46]: A partir d'une culture fraîche de 24h, quelques colonies sont prélevées pour préparer une suspension de levures. La densité de l'inoculum préparé doit être de 0,5 McFarland. Avec un écouvillon stérile, la boîte contenant le milieu agar de Mueller-Hinton complété par du glucose à 2% et 0,5µg/ml de bleu de méthylène doit être ensemencée sur toute la surface. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24-48 heures pour *Candida*. Pour *Cryptococcus* l'incubation se fait à 30°C pendant 42-48 heures. Une durée d'incubation plus longue peut entraîner une fausse résistance contre les imidazolés. Les boîtes doivent toujours être examinées après une incubation d'une nuit et si les zones d'inhibition sont visibles, elles doivent être mesurées. Si la croissance n'est pas encore visible, les plaques peuvent être remises en incubation pendant 24 heures de plus.

Lecture des résultats ^[46]: Pour les polyènes (amphotéricine B, nystatine) la zone claire sans croissance visible est mesurée. Les colonies à l'intérieur de la zone d'inhibition doivent être considérées comme des mutants résistants.

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

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

Interprétation des résultats:

➤ **Selon les valeurs seuils du CLSI**: seul le fluconazole et le voriconazole sont inclus dans le M44-A du CLSI de la ligne directrice et l'interprétation des zones ne sont disponibles que pour le fluconazole à ce jour. Quand les CMI des points finaux sont disponibles dans le CLSI ^[47] ils sont utilisés dans le tableau ci-dessous :

L'interprétation pour les levures :

Gélose de Mueller-Hinton ,glucose ,bleu de méthylène . Inoculum McFarland 0,5 non dilué. Incubation à 35-37 °C air ambiant pendant 20-24 heures. CMI selon M27-S3 (2007)

NEO-SENSITABS	POTENCY	CODE	Zone diameter in mm			Break-points MIC µg/ml	
			S	I	R	S	R
Amphotericin B	10 µg	AMPHO	≥ 15	14-10	< 10	≤ 1	≥ 2
Fluconazole **)	25 µg	FLUCZ	≥ 19	18-15 (DD)	≤ 14	≤ 8	≥ 64
Itraconazole (11)	10 µg	ITRAC	≥ 23	22-14 (DD)	< 13	≤ 0.12	≥ 1
Ketoconazole	15 µg	KETOC	≥ 28	27-21	≤ 20	≤ 0.12	≥ 0.5
Voriconazole	1 µg	VOR.1	≥ 17	16-14 (DD)	≤ 13	≤ 1	≥ 4
Caspofungin *) (19)	5 µg	CASP5	≥ 11	-	≤ 10	≤ 2	> 2 (NS)
Posaconazole *) (9,12)	5 µg	POSAC	≥ 17	16-14 (DD)	≤ 13	≤ 1	≥ 4

*) Tentative. Il y a une résistance croisée entre la caspofungine et les autres échinocandines: anidafungin et micafungine ^[48].

**) *C.krusei* doit être signalé comme résistant au fluconazole (peu importe la zone).

L'interprétation pour les champignons filamenteux :

Muller-Hinton plaine. Incubation de 16-24 heures (*zygomycètes*), 24 heures (*Aspergillus*), 48 heures (autre *spp.*). Température: 35-37 °C.

Inoculum: préparer une suspension de colonies sporulantes dans une solution saline 0,85% ajouté 1 goutte de tween 20. Permettre aux particules lourdes se déposer durant 3-5minutes et la suspension supérieure est traitée pendant 15 secondes dans un mélangeur de type vortex. la densité de la suspension est lue sur un spectrophotomètre à 530 nm d'onde longueur et la densité optique ajustée à 0,009 à 0,13 pour *Aspergillus*.

NEO-SENSITABS	POTENCY	CODE	Zone diameter in mm			Break-points MIC µg/ml	
			S	I	R	S	R
Amphotericin B (zygomycetes only)	10 µg	AMPHO	≥ 15	-	-	≤ 1	-
Caspofungin	5 µg	CASP5	≥ 17	-	-	≤ 1	-
Itraconazole	10 µg	ITRAC	≥ 17	-	-	≤ 1	-
Posaconazole	5 µg	POSAC	≥ 17	-	-	≤ 1	-
Voriconazole	1 µg	VOR.1	≥ 17	-	-	≤ 1	-

Remarque: le milieu de base ne doit pas être complétée ni par le glucose à 2% ou 0,5% de bleu de méthylène.

➤ **Selon les valeurs seuils de l'EUCAST :**

Pour les levures : EUCAST travaille sur l'harmonisation des valeurs seuils, cependant, il n'existe aucun accord avec les valeurs seuils du CLSI. Dans les études comparant les méthodes, les erreurs d'interprétation des catégories peuvent être dues aux différences dans les valeurs seuils des CMI ^[49,50].

l'interprétation des valeurs seuils des CMI pour les levures selon l'EUCAST: MH glucose, MB agar :

MH Glucose Methylene Blue Agar Inoculum McFarland 0.5 undiluted MIC breakpoints according to EUCAST (tentative)							
NEO-SENSITABS	POTENCY	CODE	Zone diameter in mm			Break-points MIC µg/ml	
			S	I	R	S	R
Amphotericin B	10 µg	AMPHO	≥ 18	17-13	≤ 12	≤ 0.25	≥ 1
Fluconazole *	25 µg	FLUCZ	≥ 28	22-17	≤ 16	≤ 2	>4
Itraconazole (50)	10 µg	ITRAC	≥ 23	22-14	≤ 13	≤ 0.12	≥ 1
Ketoconazole	15 µg	KETOC	≥ 30	29-23	≤ 22	≤ 0.12	≥ 1
Posaconazole (52)	5 µg	POSAC	≥ 22	21-16	≤ 15	≤ 0.25	≥ 2
Voriconazole	1 µg	VOR.1	≥ 25	24-20	< 20	≤ 0.125	>0.125
Caspofungin	5 µg		≥ 14	-	≤ 13	≤ 1	>1
MIC breakpoints from EUCAST are tentative (except Fluconazole and Amphotericin B).							
* <i>C. krusei</i> should always be reported as resistant to Fluconazole.							
Fluorocytosine cannot be tested on MH GMB agar, because of content of antagonists in the medium. Use Shadomy modified agar.							

L'interprétation des valeurs seuils des CMI pour Aspergillus spp. selon EUCAST .Plaine Muller Hinton. Inc. 24 heures à 35-37 °C :

Inoculum:

Préparer une suspension de sporuler colonies en solution saline à 0,85%, ajouter 1 goutte de tween 20. Permettre aux particules lourdes de sédimenter pendant 3-5 minutes et la suspension supérieure est traité pendant 15 secondes dans un mélangeur vortex. La densité de la suspension est lue sur un spectrophotomètre à 530 nm de longueur d'onde et la densité optique est ajustée à 0,09 à 0,13 pour *Aspergillus*.

Neo-Sensitabs	Potency	Code	Zone diameter in mm			Breakpoints MIC µg/ml	
			S	I	R	S	R
Itraconazole	10 µg	ITRAC	≥ 18			≤ 1	
Posaconazole	5 µg	POSAC	≥ 24			≤ 0.25	
Voriconazole	1 µg	VOR1	≥ 18			≤ 1	

Tentative zone breakpoints (20)

Avantages : Le Néo-Sensitabs est une méthode facile à mettre en place et a un potentiel pour le dépistage d'un grand nombre de souches résistantes ^[45].

Inconvénients : Il existe une mauvaise corrélation entre les diamètres de la zone d'inhibition et la CMI, aussi ces diamètres ne permettent pas de différencier entre souche sensible et souche sensible dose dépendante. C'est la raison pour laquelle les souches résistantes doivent être confirmées en utilisant une méthodologie appropriée de la CLSI ^[45].

3) Méthode par dilution-affusion :

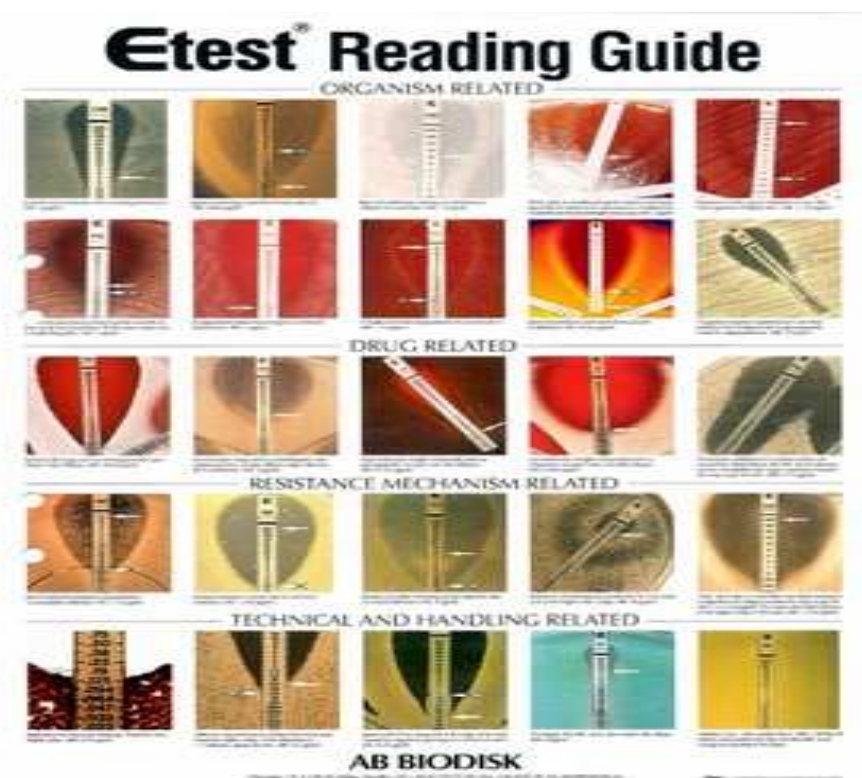
Les techniques de références sont relativement fastidieuses, donc peu applicables à une activité de routine. Les laboratoires utilisent donc des tests commerciaux de réalisation beaucoup plus simple. Les bandelettes E-Test (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) sont largement utilisées dans les laboratoires de mycologie. Ce sont de fines bandelettes présentant un gradient croissant d'antifongique, et permettant une lecture rapide de la CMI. Elles ont d'ailleurs montré une meilleure sensibilité pour détecter les espèces résistantes à l'amphotéricine B, en comparaison avec la technique de référence M27A. ^[52]

Principe : E-test est une technique quantitative de détermination de la sensibilité aux antifongiques .ce system comporte un gradient d'antifongique prédéfini, utilisé pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en µg/ml des différents antifongiques pour les champignons testés sur un milieu gélosé.

Une valeur de CMI représente la concentration minimale inhibitrice d'un antifongique qui dans des conditions expérimentales bien définies, inhibe la croissance d'un germe. La CMI est considérée comme le critère de référence pour définir la sensibilité d'un micro-organisme à un antifongique E-TEST se compose d'une mince bandelette de plastique inerte et non poreuse de 5 mm de large et 60 mm de long. un coté de ce support présente une échelle de lecture de CMI en µg/ml avec un code a deux lettres identifiant l'antifongique. Un gradient exponentiel prédéfini d'antifongique séché et stabilisé est immobilisé sur l'autre face du support, la concentration maximale se trouvant en « à » et le minimum en « b ». le gradient couvre une plage de concentrations continue de 0,002 à

32 μ g/ml ou 0,016a 256 μ g/ml ou 0,064 à 1024 μ g/ml sebn les antifongiques .cette plage correspond à 15 dilutions doubles dans une détermination de CMI traditionnelle.

Lorsqu'une bandelette Etest est appliquée sur une boîte de gélose ensemencée, l'antifongique est immédiatement libéré de la surface du support et se dépose sur la surface de la gélose. un gradient continu et exponentiel de concentrations en antibiotique se crée juste en dessous du support .après l'incubation, qui rend la croissance fongique visible, une ellipse d'inhibition symétrique, axée sur le support, se forme. Les bords de l'ellipse d'inhibition indique la valeur de CMI, exprimée en μ g/ml ;



Lecture des CMI et interprétation des résultats : les CMI sont déterminée par l'intersection des 2 ellipses d'inhibitions de la pousse fongique. La lecture est faite à 100% d'inhibition pour l'amphotéricine B, et à 80% pour les triazolés et les échinocandines. Selon les valeurs de CMI obtenues pour chaque agent antifongique, les souches de Candida ont été classés comme S, SDD / I ou R (Tableau 17).^[44]

Tableau 17 : E-test[®] critères d'interprétations ^[44]

Agents antifongiques	S (sensibles) µg/ml	SDD (sensible dose- dépendante) I (intermédiaire) µg/ml	R (résistants) µg/ml
voriconazole	≤ 1	2	≥ 4
fluconazole	≤ 8	16-32	≥ 64
itraconazole	≤ 0,125	> 0,125 and < 0,5	≥ 1
Amphotericine B	≤ 1		≥ 2
caspofungine	≤ 1		≥ 2

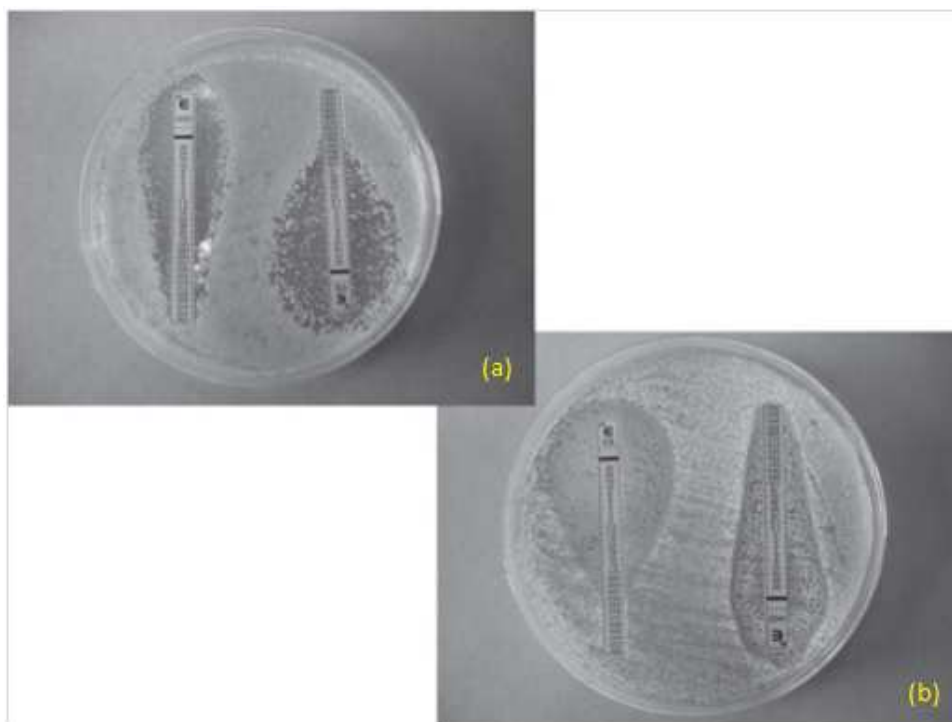


Figure 14 : Etest CMI de 0,002 lg ml⁻¹ et 0,047 lg ml⁻¹ pour la caspofungine et l'anidulafungine pour *Aspergillus fumigatus* lus à 24 h (a). Microcolonies et macrocolonies dans l'ellipse, CMIs > 8 lg/ ml⁻¹ pour les deux candins (b). ^[17]

Avantages : La méthode est standardisée et des souches de contrôle qualité sont définies.

Des études récentes montrent une bonne corrélation avec la microméthode du NCCLS. Une très bonne concordance ($\geq 96\%$) avec la méthode de référence (NCCLS) a été obtenue pour *Candida sp* ^[53] et pour les filamenteux. L'avantage particulier de l'E-test est celui de permettre la détection d'isolats résistants à l'amphotéricine B rencontrés notamment chez *C.lusitaniae* ^[54] et chez des espèces d'*Aspergillus non fumigatus* ^[55].

Inconvénients : La principale difficulté repose sur certaines difficultés de lecture, surtout pour les azolés, en raison de la présence possible de micro ou macrocolonies dans l'ellipse d'inhibition. Il s'agit d'un phénomène de traîne qui est observé chez 30 à 40% des souches de levures ^[5].

Application : étude rétrospective de cinq ans (2004-2009) : pour étudier la prévalence de *candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* et de *C. metapsilosis* au sein des candidémies au CHU de Nantes ainsi que la détermination de leur profil de sensibilité aux échinocandines par la méthode E-test :

Comme pour la caspofungine, la détermination des CMI pour la micafungine et l'anidulafungine a été réalisée sur milieu RPMI (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) à partir de cultures de 24 heures sur milieu de Sabouraud (bioMérieux) selon les recommandations du fabricant. La lecture des CMI a été effectuée à 24 heures et 48 heures par deux lecteurs indépendants en retenant comme CMI une inhibition de 80 % de la croissance fongique sans tenir compte des microcolonies pouvant survenir dans la zone d'inhibition ^[56]. Pour l'interprétation des CMI, la concentration critique de 2 µg/ml établie par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) a été utilisée : sensible ($CMI \leq 2 \mu g/ml$) ou non-sensible ($CMI > 2 \mu g/ml$) ^[57]. Les souches ATCC 22019 (*C. parapsilosis*) et ATCC 90028 (*C. albicans*) ont été incluses comme contrôles de qualités.

Résultats : Les CMI des 27 isolats déterminés par E-test vis-à-vis des trois échinocandines sont présentées dans le Tableau 18. D'un point de vue pratique, avec l'anidulafungine, de nombreuses microcolonies au sein de la zone d'inhibition ainsi que la présence d'une ellipse d'inhibition particulièrement étroite ont rendu la détermination des CMI très délicate. Ce profil n'était pas retrouvé avec la micafungine et dans une moindre mesure avec la

caspofungine (Figure 15). L'ensemble des souches présentaient des CMI relativement élevées vis-à-vis des échinocandines. Cependant, à 24 heures, tous les isolats restaient sensibles à la caspofungine et à la micafungine ($\text{CMI} \leq 2 \mu\text{g/ml}$). Une bonne concordance était notée avec les résultats des CMI obtenus à 48 heures pour ces deux antifongiques ($\text{CMI}_{50} = 0,75 \mu\text{g/mL}$, $\text{CMI}_{90} = 1,5 \mu\text{g/ml}$). Concernant l'anidulafungine, à 24 heures, à l'exception de deux isolats, la majorité des souches apparaissait sensible ($\text{CMI}_{90} = 1,5 \mu\text{g/ml}$). En revanche, une élévation significative des CMI était observée à 48 heures, 14 isolats (52 %) présentant une CMI au-dessus de $2 \mu\text{g/ml}$ en faveur d'une non-sensibilité à l'anidulafungine ($\text{CMI}_{50} = 3 \mu\text{g/ml}$, $\text{CMI}_{90} = 12 \mu\text{g/ml}$). Le séquençage du gène FKS1 révélait la présence constante de la mutation P660A, mais aucune autre mutation connue pour être associée à la résistance, ne permettant pas d'expliquer ce phénotype.

Tableau 18 : Nombre d'isolats inhibés pour chacune des concentrations d'antifongiques à 24 et 48 heures (n=27)

Nombre d'isolats inhibés pour chacune des concentrations d'antifongiques à 24 heures et 48 heures (n=27).

		Concentrations d'antifongiques (µg/mL)																
	Heures	0,125	0,19	0,25	0,38	0,5	0,75	1	1,5	2	3	4	6	8	12	16	24	32
Caspofungine	48			2	6	4	4	5	4	2								
Micafungine	24	1	6	5	12	2												
	48					10	10	4	2	1								
Anidulafungine	24		1		2	4	5	5	7	1	2							
	48					1	1	2	5	4	1	3	2	2	5	1		

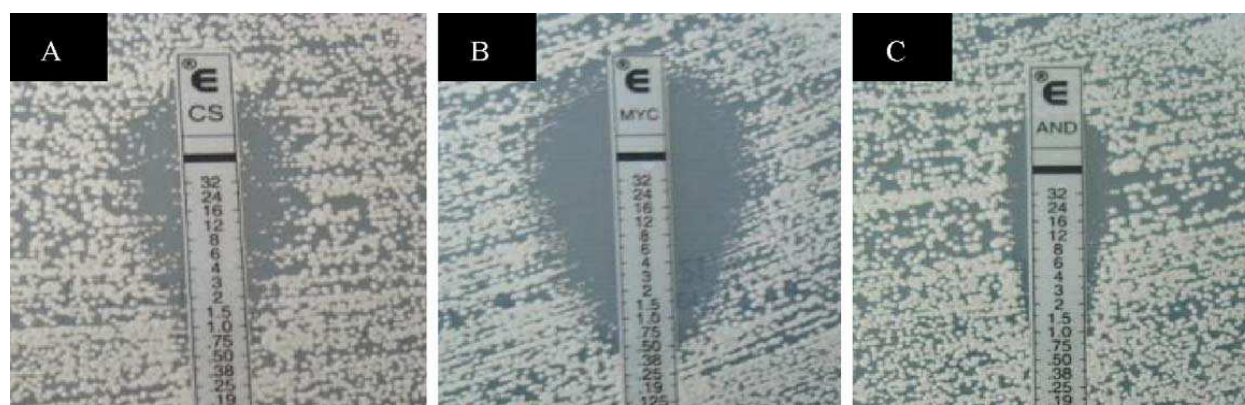


Figure 15. Différents aspects des ellipses d'inhibition observés par la méthode E-test1 pour chacun des antifongiques pour une même souche. A. Caspofungine. B. Micafungine. C. Anidulafungine

Depuis leur apparition dans l'arsenal thérapeutique, les échinocandines constituent la classe d'antifongiques de choix pour le traitement des candidémies (caspofungine, Cancidas¹, micafungine, Mycamine¹ et anidulafungine, Ecalta¹) en particulier celles dues aux espèces non albicans ^[58]. Si l'impact clinique de la moindre sensibilité in vitro des espèces du complexe *C. parapsilosis* vis-à-vis des échinocandines reste incertain et débattu, les dernières recommandations de 2009 de la Société américaine d'infectiologie (IDSA) proposent le fluconazole en alternative aux échinocandines, pour la prise en charge des candidémies à *C. parapsilosis*, l'immense majorité des isolats étant sensible à cet antifongique ^[58,59]. Dans notre étude, et en accord avec la littérature, la détermination des CMI des 27 isolats vis-à-vis des trois échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine), réalisée par E-test, a révélé une CMI relativement élevée pour l'ensemble des souches. À l'exception de l'anidulafungine, nous avons noté une relative bonne concordance entre les résultats obtenus à 24 heures et 48 heures. Toutefois, le phénotype de résistance isolée à l'anidulafungine, évoqué devant l'augmentation des CMI à 48 heures, n'a pas été confirmé au niveau moléculaire, aucune mutation associée à la résistance n'ayant été mise en évidence. Depuis, que la technique E-test n'était pas adaptée pour la détermination de la sensibilité des souches de *C. parapsilosis* à l'anidulafungine du fait d'une mauvaise concordance avec la méthode de référence en milieu liquide du CLSI (document M27-A3) qui peut conduire à une surestimation de la résistance ^[60]. Ainsi, et en dépit des difficultés rencontrées avec l'anidulafungine, en considérant la valeur critique de 2 µg/mL telle qu'établie par le CLSI, les échinocandines conservent une bonne activité vis-à-vis des isolats de *C. parapsilosis* ^[57]. Néanmoins, ce seuil critique, unique et commun aux trois échinocandines reste controversé. Il a ainsi été montré que certaines souches portant des mutations sur le gène FKS1 n'étaient pas détectées en retenant le seuil critique établi par le CLSI ^[61]. D'autres auteurs suggèrent qu'un seuil plus bas, à 0,5 µg/mL, serait plus approprié pour la micafungine et l'anidulafungine ^[62]. Il n'existe donc à ce jour aucune méthode parfaitement fiable pour déterminer la sensibilité in vitro des isolats cliniques vis-à-vis de cette famille d'antifongiques ^[61].

4) La technologie Vitek®:

Les méthodes traditionnelles de test de sensibilité aux antifongiques sont lentes et requièrent beaucoup de travail. De nouvelles méthodes à l'intention des laboratoires cliniques sont maintenant disponibles ^[65]. Grâce à la technologie Vitek2, l'antifongigramme est automatisé, standardisé et rapide. ^[66].



Figure 16 : Système automatisé Vitek2, bioMérieux

Principe : ^[8]

Cette technique permet également de déterminer la sensibilité des *Candida* et des *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques en milieu semi-liquide. Cette carte 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 mesurée pour cet antibiotique. Pour finir les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités.

Matériel : Le Vitek2[®] dispose d'un système automatisé capable de traiter la majorité des tests de routine avec un 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. Cet appareil est composé de différents éléments essentiels :

➤ *La Station Compacte Satellite (SCS) :*

Il s'agit d'un petit ordinateur destiné à récupérer les données suivantes : code à barre des différentes cartes, nom du germe, code à barre du prélèvement ou numéro du prélèvement, identité du technicien ayant effectué l'analyse permettant d'assurer une bonne traçabilité.

➤ *La cassette :*

La cassette comporte une puce mémoire utilisée pour connaître le contenu de la cassette. Cette cassette sert également au support des cartes. Le Vitek2[®] se charge automatiquement de la dilution à effectuer.

➤ *La carte Vitek AST-YS01[®] :*

La carte Vitek AST-YS01[®] comportant 64 cupules réactionnelles.

Les cartes sont inoculées avec les diverses suspensions. Le module de remplissage utilise une chambre à vide et une pompe. Lorsqu'une cassette atteint ce stade la pompe évacue l'air de la chambre. Puis, le vide est lentement rompu. L'augmentation de la pression d'air dans la chambre pousse la suspension par le tube de transfert dans les canaux et les micro-cuves de la carte. Ensuite, les tubes de transfert sont scellés. La carte et son contenu sont ainsi hermétiquement fermés.

➤ *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.



Figure 17 : La carte Vitek AST-YS01[®] [8]

Antifongiques : Les antifongiques disponibles pour ce test sont : le fluconazole, le voriconazole, la 5 flucytosine et l'amphotéricine B [8].

Mode opératoire :

- A partir d'une culture fraîche sur COS, prélever quelques colonies à l'aide d'un écouvillon stérile et les dissoudre dans environ 3 ml de Na Cl 0.45%, afin de réaliser une suspension d'opacité équivalente à l'étalon 2 Mac Farland.
- 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-YS01[®] 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 Na Cl 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.

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

Lecture des résultats et interprétation : Dans la cupule contrôle, l'automate évalue la vitesse de croissance du germe. L'analyse du taux de croissance est effectuée toutes les 15 minutes en cinétique. La lecture s'effectue à 660 nm et s'arrêtera si la croissance dans tous les puits est suffisante. Pour calculer les CMI, l'automate contrôle le remplissage des cupules, puis vérifie les valeurs brutes. Ensuite, il détermine la durée d'incubation de la carte. Pour chaque antifongique, un algorithme spécifique convertit les valeurs brutes (RTU) en CMI calculée. Pour finir, les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités ^[8].

Ci-dessous, voici un rapport de laboratoire. Nous voyons qu'il s'agit d'un *Candida albicans* et qu'il est sensible aux quatre antifongiques. Nous remarquons également les différentes CMI. Pour finir, l'automate interprète les résultats. Nous constatons également que l'analyse a duré environ 13 heures.

N° Client bioMérieux :	Rapport du laboratoire		Imprimé 6 août 2008 03:12 CEST			
Référence du système :			Impression automatique			
Nom du patient :			ID du patient :			
Groupe d'isolats : 40614915-1						
Germe sélectionné : Candida albicans						
Commentaires :						
Informations sur l'identification						
Germe sélectionné		Candida albicans				
		Entré le :	5 août 2008 14:23 CEST	Par : Système		
Commentaire sur l'ident. :						
Résultats AntibioGramme	Carte :	AST-YS01	N° de lot :	281103230	Péremption :	11 oct. 2009 13:00 CEST
	Terminée le :	6 août 2008 03:19 CEST	État :	Final	Heure de l'analyse :	12,75 heures
Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation	
Fluconazole	<= 1	S	Amphotéricine B	0,5	S	
Voriconazole	<= 0,12	S	Flucytosine	<= 1	S	
+= Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur						
Résultats AES :		Dernière modification :		23 juin 2008 17:29 CEST	Normes/Phénotype : ICHV	
Niveau de fiabilité :	Expertise non exécutée					

Figure 18 : Rapport de laboratoire et résultats de l'automate Vitek2. [ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion]

Avantages :

- La préparation est simple et rapide.
- Facilité de stockage et pour l'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 :

- Le prix est plus élevé environ Fr. 173.40.- pour 20 cartes soit Fr. 8.65.- par carte.
- Il manque l'itraconazole par rapport aux galeries disponibles.

IV.1.3 Interprétation des résultats de l'antifongigramme :

Microbiologistes et cliniciens sont toujours confrontés au défi de l'interprétation des résultats des tests de sensibilité in vitro aux antifongiques. Les Valeurs de la CMI ne sont pas toujours directement associées à la réponse aux traitements antifongiques, la CMI dépend de nombreux facteurs : l'inoculum (taille, cellules en phase stationnaire ou exponentielle de croissance,...), le milieu de culture, la température et la durée d'incubation... La discordance entre in vivo et in vitro des données est illustrée par la règle du « 90-60 » qui soutient qu'une infections causées par des souches sensibles répondre aux un traitement approprié dans 90% des cas, tandis que les infections causées par des souches résistantes à répondre dans 60% des cases.^[17]

Facteurs influençant l'interprétation de la CMI :

o **Le milieu :** Le milieu utilisé dans les tests de détermination de CMI ne doit pas contenir de substances qui interfèrent avec les antifongiques. La composition de l'agar varie en fonction des différents fabricants. Le RPMI 1640 tamponné pH 7,0 est le milieu de référence utilisé par le NCCLS qui permet de obtenir dans le cas de la caspofungine une inhibition totale par rapport à 80% d'inhibition pour le fluconazole^[3]

o **Le pH :** Le pH du milieu peut influencer la croissance des levures ou modifier l'activité de l'antifongique. À pH acide, les valeurs de CMI sont augmentées pour l'amphotéricine B, la caspofungine et les azolés, mais diminuées pour la 5-FC. Les variations de pH sont neutralisées par l'adjonction de tampon

o **L'inoculum :** L'inoculum peut également influencer les résultats. La technique utilisée pour la préparation de l'inoculum ainsi que sa taille influencent la valeur de la CMI. La méthode spectrophotométrique est la plus standardisable. Il semble que la taille idéale soit d'environ 0,5 McFarland à 530 nm ^[3].

o **L'incubation : (durée et température)** La durée d'incubation est fonction de la vitesse de croissance de la souche. L'allongement de la durée d'incubation tend à augmenter la valeur des CMI. Si les CMI de l'amphotéricine B sont peu modifiées entre 24 et 48 heures, les CMI des azolés le sont. Le NCCLS recommande une incubation de 48 heures pour les *Candida*. AB Biodisk recommande la détermination des CMI à 24 heures par la méthode E-test. La température d'incubation idéale est de 35°C ^[3]

o **L'antifongique :** Les antifongiques sont difficiles à évaluer *in vitro*, en raison de leurs caractères physicochimiques. Certains ne sont pas solubles dans l'eau d'où la nécessité d'employer des solvants. En conséquence, il est important que les différentes dilutions soient effectuées dans des solutions adéquates évitant la précipitation du principe actif. ^[3]

En conclusion, il faut dire que l'interprétation des résultats des tests de sensibilité répond à trois principes clés :

- Une CMI n'est pas une mesure chimique ou physique ;
- Les facteurs inhérents à l'hôte supplantent les résultats des tests de sensibilité pour juger de l'évolution clinique ;
- La sensibilité ou la résistance *in vitro* ne sont pas prédictives, respectivement, d'un succès ou d'un échec thérapeutique.

IV.1.4 Corrélation *in vitro/in vivo*:

1. Particularité de la bonne corrélation *in vitro/in vivo*:

Dans le passé, les tests *in vitro* des antifongiques ont été considérés comme problématiques, mais des méthodes normalisées ont maintenant été développées pour *Candida spp.* et *C. neoformans*. Pour que ses méthodes soient utiles, les résultats devraient fournir un système fiable de prédiction de la réponse au traitement pour les personnes ayant des infections. En particulier, une CMI élevée doit souvent être corrélée avec un échec thérapeutique. De nombreux rapports ont démontré que la capacité de prédire les résultats cliniques diffère d'un agent à un autre et dépend de la population étudiée. Par exemple, des CMI élevées de fluconazole sont souvent prédictives d'échec thérapeutique chez les patients immunodéprimés atteints de candidose orale, mais ne sont pas en corrélation avec les résultats cliniques chez les patients atteints de candidémies ^[14]. La situation avec d'autres agents antifongiques est encore moins claire, mais un certain nombre d'enquêtes ont rapporté que pour les CMI pour l'amphotéricine B des isolats de *Candida spp.* établis au cours du traitement prolongé avec cet agent qu'elle soit élevée ou en hausse, les CMI semblaient être en relation avec un échec thérapeutique.

Il est évident que des tests *in vitro* sont utiles dans certaines cliniques situations mais pas dans d'autres.

2. Problème de mauvaise corrélation *in vitro/in vivo* :

La corrélation entre les CMI *in vitro* et l'efficacité *in vivo* est difficile à établir en mycologie. Afin de tenter de corréler des deux, le concept de seuils (« breakpoints ») a été introduit en 1997. ^[66] Ces breakpoints sont différents en fonction de l'antifongique en question (Tableau19). La règle des « 90-60 » est souvent utilisée pour comparer le degré de corrélation des valeurs de CMI à l'évolution clinique. ^[67] Pour les souches avec des CMI basses (S), environ 90% des infections devraient répondre à la thérapeutique contre 60% des souches avec des CMI élevées (R). Par exemple, la réponse positive au traitement par fluconazole a été vue chez 92% des 403 patients avec des isolats « sensibles », 82 % des 55 patients avec des isolats « sensibilité dose dépendant » et 56% des 61 patients avec des isolats « résistants ». ^[66]

Les corrélations entre la sensibilité déterminée *in vitro* et la réponse clinique ne sont pas claires, les facteurs d'hôtes (statut immunitaire, terrain du patient) jouent donc un rôle crucial dans l'évolution clinique.

Tableau 19 : Concentrations critiques ("breakpoints") du fluconazole, de l'amphotéricine B, du voriconazole, de la caspofungine et de l'itraconazole (en mg/l) et interprétation des CMI pour les levures.(Source : Rex. Clin Infect Dis. 1997).

	Interprétation des CMI (mg/l)		
	Sensible	Sensible dose-dépendant	Résistant
Fluconazole	≤ 8	16-32	≥ 64
Amphotéricine B	≤ 1		≥ 4
Voriconazole	≤ 1	2	≥ 4
Caspofungine	≤ 1		≥ 2
Itraconazole	≤ 0.125	0.25-0.5	≥ 1

3. Facteurs compliquant la corrélation *in vitro/in vivo* :

Il est clair que le problème de corrélation *in vitro/in vivo* est éminemment complexe. Cette difficulté est liée principalement à la méthodologie d'antifongigramme (*in vitro*), aux facteurs de l'hôte, aux modèles animaux et à l'antifongique, qui constituent un ensemble de particularités compliquant très sérieusement la réalisation des études cliniques et l'interprétation des résultats de l'antifongigramme. Ce qui accentue la complexité d'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* à une situation clinique bien définie.

- La méthodologie :

Opérer en *in vitro* n'est certainement pas opérer en *in vivo* et une CMI n'est pas une valeur absolue comme l'est une mesure physique ou chimique. Quelque soit la méthode utilisée, elle mesure « une » CMI et non « la » CMI. En effet, les conditions expérimentales ont une influence considérable sur le résultat. En témoignent les observations faites au cours du développement de la méthode du NCCLS, pour les souches données connues comme sensibles (S) ou résistantes (R) d'après des modèles animaux, les valeurs de CMI obtenues peuvent être multipliées par un facteur de 2 à 16 selon le milieu et les conditions expérimentales déterminées ^[5]. L'objectif serait donc de

corriger les défauts observés pour aboutir à une méthode fiable qu'on pourra considérer comme une méthode de CMI capable de donner une probabilité d'échec thérapeutique.

- Les essais cliniques :

Outre les paramètres strictement liés à la souche infectante, de nombreux facteurs liés à l'hôte, ont un retentissement majeur en termes de succès ou d'échecs thérapeutique. Malheureusement, ils sont insuffisamment pris en compte dans les études cliniques. Ces facteurs sont liés :

- A l'hôte : maladie sous-jacente, immunodépression...
- Au site de l'infection : corps étranger, abcès...
- A la pharmacocinétique de l'antifongique employé : posologie inadaptée, pénétration insuffisante au site d'infection, interaction médicamenteuse, mauvaise observance...
- A l'agent pathogène lui-même : échappement, libération de facteurs de virulence ou toxines... ^[5].

- Les modèles animaux :

Pour palier au problème des interférences liées au patient et lorsqu'on veut corréler des résultats *in vitro* à l'évolution *in vivo*, la réalisation de modèles expérimentaux animaux constitue la solution. Néanmoins, même dans les modèles animaux des résultats sont parfois contradictoires, et ceci pourrait évidemment être un argument pour nier toute corrélation entre CMI et issue thérapeutique. Etant donné la complexité de la physiopathologie de l'invasion fongique, force est de reconnaître que les modèles animaux ne reproduisent que très imparfaitement l'infection humaine. Par ailleurs, ces modèles peuvent être éminemment complexes par les différences de pharmacodynamie et de pharmacocinétique des antifongiques chez l'animal peuvent rendre difficile l'adaptation des doses. Malgré cela, cette approche peut donner des données initiales très utiles ^[5]. D'après une revue portant sur 17 études impliquant des modèles expérimentaux animaux, 12 montraient une relation cohérente entre les données obtenues *in vitro* et l'efficacité thérapeutique, pour l'amphotéricine B, la flucytosine et divers dérivés azolés. Les progrès sont encourageants ^[67].

- L'antifongique :

Pour les antibiotiques, les relations entre données pharmacocinétiques et effets obtenus ont été largement étudiées. Cette approche pourrait à l'avenir fortement influencer les stratégies thérapeutiques antifongiques. L'objectif serait pour chaque antifongique de définir parmi ces trois paramètres celui qui tend à produire la meilleure corrélation clinique pour une souche donnée :

- ↳ Détermination du temps pendant lequel la concentration de l'antifongique dépasse la CMI ;
 - ↳ Rapport entre la concentration sérique maximale de l'antifongique et la CMI ;
 - ↳ Rapport entre l'aire sous la courbe d'exposition à l'antifongique (ASC) et la CMI.
- [5].

IV.1.5 Complexité de la standardisation des techniques d'évaluation de sensibilité des antifongiques *in vitro* :

Les tests de sensibilités des champignons aux antifongiques posent d'une part le problème de leur standardisation, mais également et de manière plus aigüe pour les thérapeutes, le problème de la relevance clinique du résultat.

Pour l'étude de la sensibilité des levures aux antifongiques, des efforts importants de standardisation ont été réalisés au cours des dernières années, notamment par le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Actuellement, la technique d'étude des CMI en microplaques est proposée. Cependant, certaines étapes de la méthode (notamment détermination de la taille de l'inoculum et lecture) peuvent rendre difficile son interprétation. De nombreux tests *in vitro* sont actuellement commercialisés ; permettant, d'étudier la CMI elle-même pour certains antifongiques (E-test, ATB fungus) ou de définir des zones de sensibilité, basse 'intermédiaire' ou haute (Fungitest, ATB fungus). Le milieu de culture optimal pour l'utilisation du E-test reste à déterminer. Quant aux antifongigrammes, ils permettent de mesurer des diamètres d'inhibition

.La relevance clinique est bonne pour les candidoses oropharyngées des patients infectés par le VIH chez lesquels une CMI élevée du fluconazole sur *C.albicans* est associée à un échec clinique. Il importe de noter que l'évaluation de l'échec thérapeutique dans ce

contexte ne bénéficie pas d'un consensus, notamment en raison des différences d'AMM. Notamment pour le fluconazole. Dans les candidoses systémiques, aucune corrélation n'a été montrée entre la CMI et le résultat thérapeutique, que ce soit avec le fluconazole ou l'amphotéricine B. il en est de même dans la prise en charge de la *cryptococcose* neuroméningée, en dehors d'une étude américaine qui montre une corrélation entre les résultats de CMI obtenus avec une technique et l'évolution clinique. Ces données contrastent avec d'autres obtenues dans des modèles murins de *cryptococcose* ou de *candidose*. Si quelques observations rapportent un échec clinique avec la présence d'une souche de champignons ayant une CMI élevée, notamment au cours de la *cryptococcose*, justifiant de ne pas modifier le traitement après l'obtention du résultat des tests in vitro, comme la présence d'un matériel étranger, le terrain sous-jacent, dans l'évaluation de l'efficacité d'un antifongique systémique.

L'étude de la sensibilité in vitro des champignons filamenteux reste purement du domaine de la recherche microbiologique. Des perspectives s'ouvrent dans le futur grâce à des résultats récemment obtenus dans un modèle expérimental d'aspergillose invasive et permettant d'apprécier in vivo la relevance d'une CMI élevée de l'itraconazole. L'étude des tests de sensibilité in vitro rest donc du domaine de la recherche clinique et de la surveillance épidémiologique.

Les Tests de sensibilité aux antifongiques (AST) ont été un outil de diagnostic pour plus de 20 ans. En dépit de cette interprétation, les résultats et la détermination de la façon dont utiliser au mieux ces résultats continue d'être la source d'une confusion considérable. Au cours des deux dernières décennies, la sensibilité aux antifongiques a connu des changements considérables. AST ont évolué à partir d'une procédure non standardisés qui générés des résultats cliniques manquante d'où de l'utilité de développer une procédure normalisée qui est bien contrôlée et qui donne des résultats fiables que les médecins peuvent utiliser pour aider à prendre des décisions cliniques difficiles. La clinique et Laboratory Standards Institute (CLSI), anciennement le NCCLS (Comité national le Clinical Laboratory Standards), a publié quatre méthodes standard pour les antifongique y compris les tests de sensibilité M27-A3^[70] pour macrodilution et microdilution pour les

levures , M38-A2 ^[71] pour les essais de microdilution pour les champignons filamenteux , M44-A ^[72] pour diffusion sur disque des levures tests et M51-P ^[73] pour les tests de diffusion sur disque des champignons filamenteux .

IV.1.6 Moyen d'étude de la sensibilité des associations d'antifongiques :

Les infections fongiques systémiques restent des pathologies graves qui s'accompagnent d'une mortalité élevée malgré le traitement. Parmi les nouvelles stratégies thérapeutiques, l'association de molécules antifongiques est potentiellement intéressante dans la mesure où de nouvelles molécules qui possèdent des mécanismes d'action différents ont été récemment mises sur le marché ou sont en cours de développement. ^[74]

Il n'existe pas actuellement de technique standardisée pour l'étude des associations d'antifongiques in vitro ou in vivo chez l'animal. de nombreuses techniques ont été utilisées telles que les méthodes de dilution en milieu liquide (macro ou micro-méthode) ou encore l'étude cinétique de la fongicide. Dans la littérature récente la technique la plus souvent utilisée in vitro est celle de l'échiquier en milieu liquide réalisée en micro-méthode. il s'agit d'une adaptation de la technique standardisée utilisée pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques seuls. Le but de ces études est de déterminer le type d'interaction entre les antifongiques qui peut être synergique, indifférent, ou antagoniste. L'interprétation des résultats rest difficiles en effet, de nombreuses méthodes d'analyse, basées sur des théories différentes, sont utilisables pour définir le type d'interaction mis en jeu.

Le plus souvent, l'interaction entre antifongiques est évaluée par la méthode de l'isobole dont la traduction mathématique est représentée par le calcul des fractions des concentrations inhibitrices. De nombreuses autres approches sont possibles, et il est à noter que des résultats parfois contradictoires sont obtenus avec les mm données en fonction de la méthode d'analyse utilisée.

De ce fait l'étude des associations d'antifongiques chez l'animal, dans des modèles expérimentaux, est intéressante car ces modèles sont probablement plus prédictifs pour les situations cliniques que les tests in vitro. En particulier chez l'animal, en plus de l'interaction propre des molécules au niveau de la cellule fongique, les caractéristiques

pharmacocinétiques et toxiques des molécules sont prises en compte. Le principal inconvénient des études chez l'animal est la longueur et le coût des expérimentations. Différents modèles animaux ont été utilisés pour tester les associations ? le plus souvent, les critères d'évaluation de l'effet antifongique sont le taux de mortalité et la charge fongique dans les organes cibles. La difficulté rest l'analyse statistique et quoi qu'il en soit des études cliniques bien conduites confirmeront l'intérêt des associations chez l'homme. ^[74]

Trois types d'effets peuvent être obtenus lors de l'association de molécules antifongiques : ^[75]

- une synergie : l'effet inhibiteur est plus grand que la somme de chacun des effets obtenus individuellement (interaction positive)
- un antagonisme : l'effet inhibiteur est inférieur à celui de chacune des molécules utilisées séparément (interaction négative)
- lorsqu'il n'y a pas d'interaction entre les deux molécules, l'effet obtenu est égal à la somme de chacun des effets obtenus individuellement (effet additif) ou est égal à l'effet de l'une des deux molécules (indifférence).

Deux buts sont recherchés lors de l'utilisation d'une association d'antifongiques :

- minimiser le risque de développement de résistances. La fréquence des mutants résistants à la flucytosine étant élevée, il faut toujours utiliser cette molécule en association.
- Rechercher une synergie avec une augmentation de l'activité fongicide. Les deux molécules pourraient alors, selon certains auteurs, être utilisées chacune à des posologies inférieures à celles des monothérapies ce qui limiterait le risque d'effets secondaires et toxiques.

L'élargissement du spectre est aussi mentionné comme indication ; l'emploi en monothérapie d'antifongiques de spectre large – échinocandines, thiazoles récents (voriconazole, posaconazole) et les formulations lipidiques d'amphotéricine B – est préférable, au moins dans les infections bien documentées. En effet, une synergie des effets toxiques est possible : l'atteinte rénale secondaire à l'emploi de l'amphotéricine B

augmente le risque de toxicité hématologique de la 5-FC éliminée par voie rénale. Le coût du traitement est fortement augmenté lors d'associations.

La démarche générale pour étudier une association d'antifongique est constituée de plusieurs étapes qui peuvent être résumées de la façon suivante :

- choix d'une technique expérimentale qui peut être une méthode de dilution en milieu liquide, une méthode de diffusion en gélose, une étude des courbes de fongicide etc.
- obtention de données numériques brutes telles que : concentrations minimales inhibitrices (CMI). Diamètre d'inhibition, nombre d'unité formant colonie (UFC) au cours du temps etc. Analyse des données grâce à l'utilisation d'une méthode soit graphique (isobologramme), soit numérique qui procède le plus souvent du calcul d'un index d'interaction.
- interprétation des valeurs numériques ou de l'index d'interaction en fonction de seuils ou de critères. Ces derniers sont le plus souvent définis par la théorie mathématique qui sous-tend la méthode utilisée mais ils peuvent également être modifiés en fonction de différents paramètres telle que la marge d'erreur intrinsèque à chaque technique expérimentale.
- conclusion sur le mode d'interaction qui permet de conclure à la présence d'une synergie, d'une additivité (ou d'une indifférence) ou d'un antagonisme.

Il est à noter qu'aucune de ces étapes n'est actuellement standardisée ce qui a pour conséquence directe qu'un grand nombre de variables peut influencer les résultats final.

L'effet d'une association de deux antifongiques peut être étudié in vitro par les mêmes méthodes que celles employées pour les antibiotiques antibactériens : la technique de l'échiquier ou des cinétiques de fongicide (Figure 19).

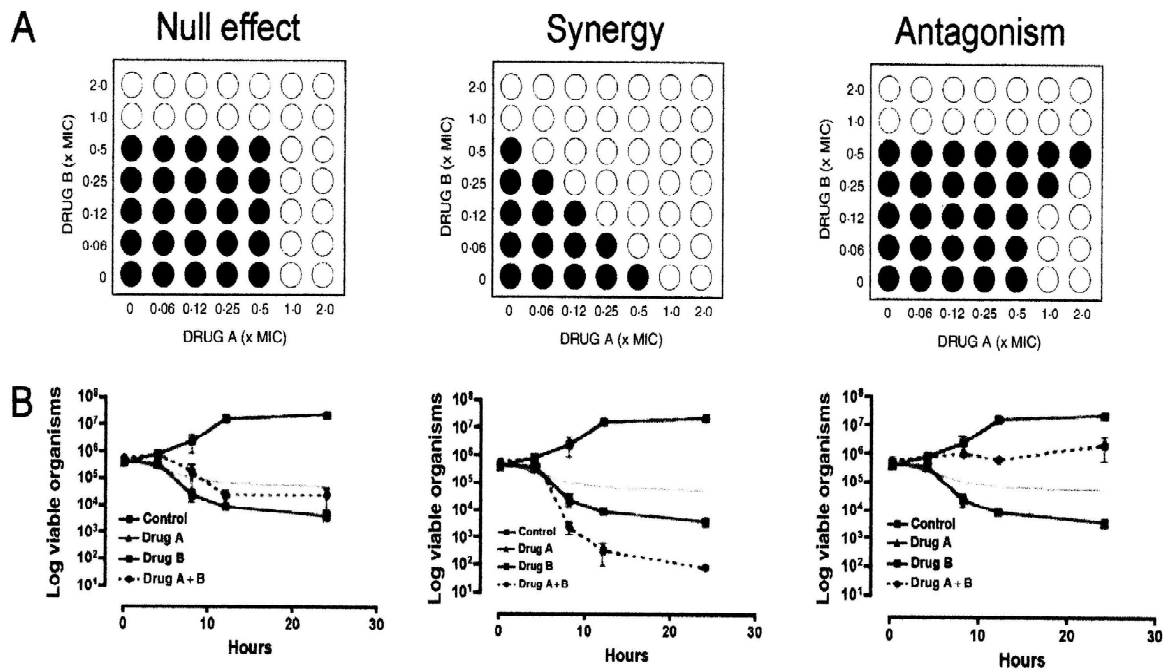


Figure 19. Évaluation de l'effet de l'association de deux antibiotiques par : (A) la technique de l'échiquier ; les cupules en noir sont celles pour lesquelles une croissance est observée (B) l'étalement des cinétiques de fongicide ^[75].

Ces techniques ne sont pas standardisées et l'extrapolation in vivo des résultats est plus qu'hasardeuse. De plus, la pharmacocinétique des molécules, en particulier la distribution, n'est pas prise en compte et il est fort possible qu'au site de l'infection il n'y ait pas d'association des deux effets antifongiques ou que le rapport des concentrations des deux antibiotiques ne soit pas optimal.

Les modèles animaux d'infection expérimentale in vivo montrent aussi de nombreuses limites : les espèces animales utilisées, les méthodes d'inoculation, les doses d'antifongiques employées et les définitions des effets ne sont là encore pas standardisés. C'est finalement l'expérience clinique, au travers des cas rapportés, qui serait le meilleur indicateur de l'intérêt ou pas de l'association. Néanmoins, pour les mycoses systémiques, plusieurs facteurs interviennent dans le succès thérapeutique : l'éventuel débridement chirurgical associé, le statut immunitaire de l'hôte, l'utilisation d'immunomodulateurs.

La correspondance entre les effets in vitro est faible. Il en est de même quand différents articles de synthèse sont comparés ^[76,77].

Globalement, la plupart des associations d'antifongiques sont indifférentes ou additives.

L'association flucytosine et amphotéricine B est synergique. Elle constitue le traitement standard vis-à-vis des levures, notamment *Cryptococcus neoformans*. Pour les autres mycètes, l'interaction n'est jamais négative mais le plus souvent additive.

L'association flucytosine et azolés donne souvent les mêmes résultats cliniques que lors d'une monothérapie avec des dérivés azolés. C'est une alternative au traitement conventionnel des *cryptococcoses* ne répondant pas bien à l'amphotéricine B.

L'association amphotéricine B et azolés devrait théoriquement être antagoniste puisque les azolés inhibent la synthèse d'ergostérol, la cible de l'amphotéricine B. Néanmoins, cet antagonisme n'a que rarement été constaté.

L'association terbinafine et amphotéricine B ne montre en général pas d'interaction positive et quelques cas d'antagonisme ont même été rapportés. Elle ne semble pas être intéressante en clinique. A l'opposé, l'association terbinafine et dérivés azolés est souvent synergique.

L'association des échinocandines avec les dérivés azolés ou avec l'amphotéricine B peut être synergique dans le traitement de l'aspergillose. Un antagonisme entre l'anidulafungine et le voriconazole ou le posaconazole a été observé pour *Candida spp. in vitro*.

In vitro, la polymyxine B, un antibiotique antibactérien a une activité fongicide sur *Cryptococcus neoformans* si elle est associée au fluconazole, l'association étant synergique ^[78].

Des recommandations concernant l'usage des associations d'antifongiques dans le traitement des mycoses systémiques de l'homme, publiées par la Société Américaine des Maladies Infectieuses (American Infectious Disease Society). Il est recommandé de réserver l'usage des associations d'antifongiques aux malades atteints de mycoses systémiques graves, en particulier lorsqu'ils sont immunodéprimés et/ou lorsque des souches résistantes sont impliquées. L'emploi séquentiel de différentes molécules :

Amphotéricine B et flucytosine initialement puis fluconazole dans la *cryptococcose* neuroméningée, une échinocandine puis du fluconazole dans les candidémies, semble être une stratégie d'avenir ^[97,80].

IV.1.7 Evaluation de la pratique de l'antifongigramme :

Le développement de nouveaux antifongiques a élargi les possibilités thérapeutiques et en conséquence créé une demande de tests de sensibilité de la part des cliniciens. Cela a remis à l'ordre du jour, tout particulièrement pour les biologistes non spécialisés, les questions de fiabilité, de pertinence et de modalités de réalisation de l'antifongigramme (ATF). Face à cette demande croissante et aux diverses techniques d'ATF utilisables, les biologistes du Collège de bactériologie virologie hygiène des hôpitaux (ColBVH) ont souhaité engager une réflexion, avec comme préalable une évaluation de la pratique de l'ATF au sein du groupe. Une enquête, portant sur l'année 2002, a donc été proposée afin d'évaluer la quantité d'identifications fongiques et d'ATF réalisés, leurs indications, les méthodes utilisées, les molécules testées, l'interprétation des résultats, ainsi que les difficultés et les attentes des microbiologistes concernant cette partie de leur activité ^[4].

Le ColBVH est un réseau de 209 microbiologistes, répartis dans 193 hôpitaux non universitaires, couvrant géographiquement l'ensemble du territoire français et dont les caractéristiques d'activité sont connues et représentatives de l'ensemble des hôpitaux généraux en France. La plupart des laboratoires de ces hôpitaux sont polyvalents, et traitent l'ensemble de l'activité de microbiologie. ^[4]

L'enquête a été réalisée à l'aide d'un questionnaire, composé de 20 questions ouvertes ou fermées, à choix unique ou multiple, visant à évaluer au sein des laboratoires du ColBVH l'activité mycologique par rapport à l'ensemble de l'activité microbiologique, les indications de l'ATF, la méthodologie utilisée, ainsi que les difficultés et attentes des microbiologistes pour la pratique de ces tests. Parmi les 193 hôpitaux du ColBVH, 62 (32 %) ont participé à l'enquête, ce qui représente une couverture d'environ 40 000 lits. La taille moyenne des hôpitaux participants est de 700 lits, avec des extrêmes allant de 145 à 1800 lits. L'activité mycologique est différente d'un centre à un autre. Pour 6691 isolements microbiens en moyenne par centre et par an, 5967 sont des isolements

bactériens et 724 sont des isolements fongiques, soit 10,8 % de l'ensemble des agents infectieux isolés au laboratoire.

Parmi les 4164 études de sensibilité réalisées en moyenne par centre et par an, les ATF représentent 2 % de l'ensemble, soit en moyenne 82 par centre et par an. Ainsi, l'ATF est pratiqué en moyenne sur 11,3 % des isolats fongiques, alors que l'ATB est réalisé sur 68,4 % des souches bactériennes isolées au laboratoire, toutes espèces microbiennes et toutes situations cliniques confondues.

Parmi l'ensemble des centres participants, 23 (38 %) ne pratiquent pas d'ATF dans leur laboratoire. Les principales raisons évoquées pour cela sont :

- un manque de recrutement de mycologie (56 %) ;
- la notion d'absence de technique valide en routine (52 %) ;
- l'absence — réelle ou ressentie — d'indications cliniques (35 %) ;
- le sentiment d'incompétence pour le choix de la méthode à utiliser et des antifongiques à tester ;
- les indications et l'interprétation de l'ATF (respectivement 17, 9, 13 et 4 %) ;
- le coût en matériel ou en personnel (9 %).

Parmi ces 23 laboratoires, 16 transmettent les ATF à réaliser à un laboratoire spécialisé (de 8 à 62 ATF sous-traités par an).

Parmi les 55 laboratoires (88 % des participants) qui font eux-mêmes ou transmettent au moins un ATF par an, 21 d'entre eux en réalisent sur des champignons autres que *Candida* sp. Mais le total de ces ATF est évalué à moins de 100 pour l'ensemble des centres en 2002 (soit environ 2 % des ATF). Tous les centres qui signalent avoir isolé une souche de *Cryptococcus* sp. en 2002 l'ont adressée au Centre national de référence des mycoses et des antifongiques. Les autres espèces pour lesquelles l'ATF a été réalisé, de façon ponctuelle, appartiennent à des genres signalés comme étant rarement isolés dans la plupart des laboratoires du réseau ColBVH. ^[4]

Concernant les indications de l'antifongigramme Hormis les sept laboratoires qui, quelle que soit l'indication potentielle, ne font ni ne transmettent aucun ATF au moment de l'enquête, la décision de réaliser l'ATF est globalement fondée sur un ensemble de

critères intégrant à la fois l'espèce de *Candida* impliquée, la nature du prélèvement, des critères microbiologiques et le contexte clinique (76 % des cas), mais aussi la demande du clinicien (23 % des cas). Aucun laboratoire ne réalise systématiquement l'ATF.

L'espèce de *Candida* n'est pas un critère décisionnel dans 27 % des cas ; elle peut constituer un critère décisionnel, en association au contexte, dans 48 % des cas et constitue le seul critère décisionnel dans 25 % des cas. Dans ces deux dernières situations, *C. glabrata* (37 %), *C. krusei* (33 %), *C. albicans* (32 %), *C. tropicalis* (26 %), *C. dubliniensis* (7 %), *C. lusitaniae* (7 %) et *C. parapsilosis* (7 %) sont cités.

La nature du prélèvement intervient dans le choix de réalisation de l'ATF. Il est toujours réalisé sur 74 % des hémocultures, 48 % des sites stériles autres que les hémocultures, 23 % des cathéters. Il n'est jamais réalisé sur 8 % des cathéters, 19 % des urines, 20 % des sites non stériles autres que cutanés et 50 % des prélèvements cutanés.

Lorsqu'il n'y a pas d'attitude systématique de réalisation de l'ATF (c'est-à-dire pour les réponses de type « souvent », « quelquefois », « rarement »), d'autres critères, issus d'une analogie avec l'interprétation qui est habituellement de règle pour caractériser une infection bactérienne, interviennent : examen direct positif (peau et sites non stériles autres que cutanés), notion de culture pure (sites stériles autres que les hémocultures, sites non stériles autres que cutanés, urines) quantification des cultures (cathéters, urines), présence de leucocytes (urines). Hormis pour les hémocultures, les critères « sur demande des cliniciens » et « en fonction des facteurs de risques » sont cités dans 30 à 40 % des cas selon le type de prélèvement, alors que la prise en compte d'un traitement antifongique en cours ou prévu n'intervient que dans 15 à 25 % des cas.

Les méthodes les plus utilisées sont l'ATB Fungus[®] bioMérieux (56 %) et le Etest[®] AB Biodisk (41%). Le Fungitest[®] Bio Rad, les comprimés Néosensitabs[®] Eurobio, la méthode du National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), les disques Bio Rad sont utilisés respectivement par 28, 8, 5 et 2 % des centres qui font l'ATF. Une combinaison de deux, voire trois méthodes (un laboratoire) est utilisée par 38 % des participants ; ces combinaisons incluent dans 73 % des cas le Etest[®] AB Biodisk et dans 60 % des cas l'ATB Fungus[®] bioMérieux. Le choix des molécules testées en première

intention étant dépendant des techniques utilisées, l'amphotéricine B, présente dans toutes les techniques, est testée dans 93% des cas alors que le fluconazole ne l'est que dans 49% des cas. Les antifongiques azolés sont testés en seconde intention dans 16 à 20% des cas. Les résultats sont interprétés en sensible intermédiaire résistant par 98 % des centres. Cette interprétation se fait dans 93% des cas selon les recommandations du fournisseur, à l'aide d'un automate dans le cas de l'ATB Fungus® bioMérieux ou selon des normes personnelles imprécises, en particulier pour les molécules dont les valeurs seuils ne sont pas définies. L'utilisation des normes du NCCLS est signalée par deux laboratoires. Un laboratoire rend des valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI) sans les interpréter.

Les taux de résistance fournis par 29 centres correspondent à 3495 ATF effectués sur leurs isolats cliniques avec leur technique. Représente ces taux pour l'espèce *C. albicans* et pour les autres. Aucun laboratoire n'utilise de souche de contrôle de qualité à chaque ATF.

Seules les souches issues d'hémocultures sont conservées par la majorité (71%). Un quart des laboratoires ne conserve aucune souche. Aucun laboratoire ne conserve toutes les souches.

Concernant les attitudes des cliniciens face à l'antifongogramme Plus de 80% des participants ressentent un sentiment d'incompétence totale ou partielle, que ce soit en ce qui concerne les indications, le choix de la méthode d'ATF, le choix des antifongiques à tester, la réalisation technique, la lecture, ou l'interprétation de l'ATF (Figure20). Le niveau d'aptitude ressenti est légèrement meilleur parmi les biologistes pratiquant l'ATF dans leur laboratoire : ils se définissent comme compétents dans 16% des cas pour l'interprétation de l'ATF et jusque dans 33% des cas pour les indications de l'ATF. Les biologistes qui ne font pas d'ATF se définissent à 100% comme partiellement compétents ou incompétents pour l'ensemble des items.

Des recommandations consensuelles concernant les points précités sont demandées par 95% des biologistes, qu'ils pratiquent ou pas l'ATF dans leur laboratoire.

Pour 65% des centres, un travail réalisé au sein du ColBVH en relation avec la Société française de mycologie médicale (SFMM) sur ce thème serait très utile pour leur pratique

quotidienne, et 98 % d'entre eux sont disposés à y participer, de diverses façons : en adhérant à un système de « contrôle qualité » (71 %), en fournissant des données épidémiologiques (68 %) ou des souches (61 %), en participant à des formations (36 %) ou encore en animant un groupe de pilotage au sein du réseau (17 %).^[4]

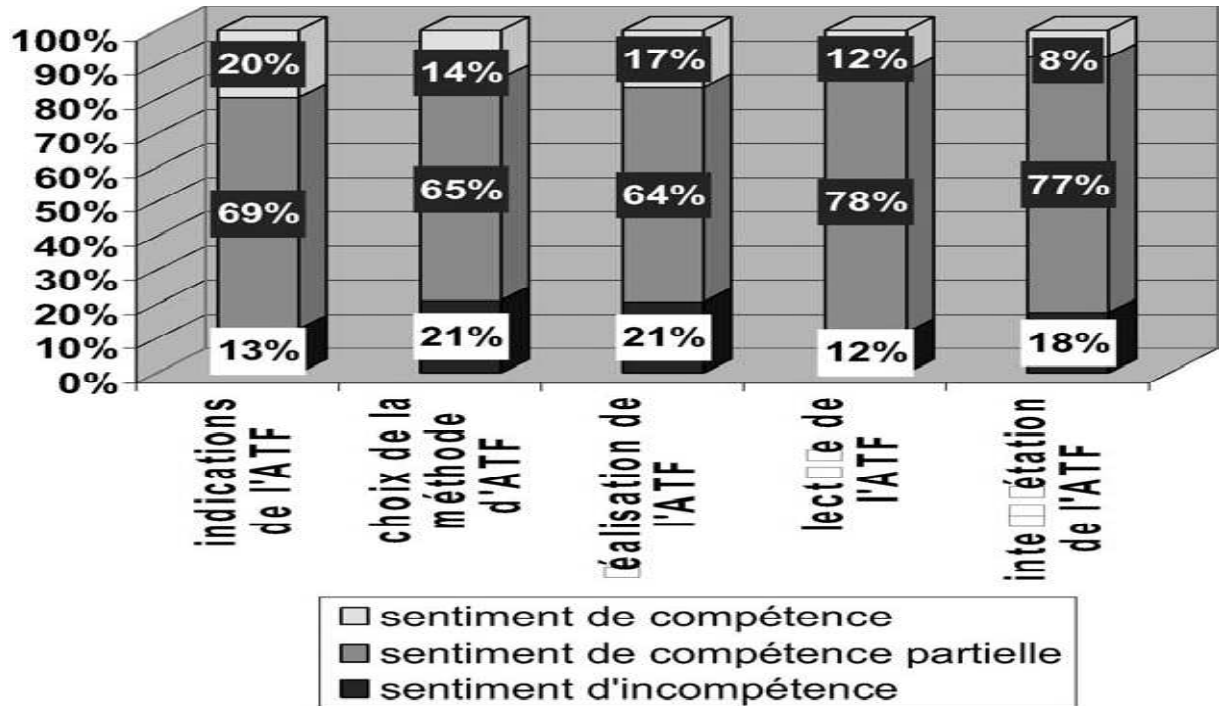


Figure 20 : Autoanalyse par les membres du réseau ColBVH de leur niveau de compétence concernant la pratique de l'ATF en 2002.

Au travers de cette enquête, un sentiment d'incompétence vis-à-vis de la pratique de l'ATF se dégage, ce qui limite sans doute son utilisation dans les hôpitaux non universitaires. Une connaissance insuffisante des méthodes disponibles et de leur validité est effectivement mise en évidence, ainsi qu'une utilisation empirique de critères biocliniques, plus ou moins pertinents, pour en définir les indications. Au-delà de l'incompétence exprimée concernant la technique et les indications, ce sont les interrogations des participants concernant la pertinence clinique de l'ATF qui apparaissent. Des données actuelles suggèrent pourtant que la règle des « 90–60 % » pourrait être applicable aux tests de sensibilité aux antifongiques dans de nombreux cas ^[81]. Même si le succès thérapeutique reste étroitement lié au statut immunitaire de

l'hôte, l'ATF peut être considéré comme un test de détection des résistances, permettant d'augmenter les posologies ou d'éviter l'usage d'une molécule avec laquelle il y aurait une perte de chance pour le patient, et constituer ainsi un apport supplémentaire dans la prise en charge de l'infection fongique. De nouvelles approches telles que la mesure de la concentration minimale fongicide, de la concentration minimale efficace ou l'utilisation de paramètres pharmacodynamiques sont régulièrement proposées ^[82,83,84,85]. La diffusion de recommandations simples, plébiscitée par 95 % des biologistes ayant répondu à l'enquête, leur permettrait d'effectuer un choix raisonné de la technique à utiliser pour évaluer in vitro la sensibilité aux antifongiques ou au contraire de décider en connaissance de cause de ne pas réaliser ce type de test. De la même façon, une clarification de la validité des raisonnements de type bactériologique, quelquefois adaptables mais pas toujours, serait bienvenue, car, de fait, ils sont utilisés non seulement par les biologistes mais également par les cliniciens. Enfin, des indications sur la façon d'utiliser les connaissances existantes concernant l'épidémiologie des infections fongiques et des résistances, apporteraient une aide supplémentaire aux biologistes, qu'ils pratiquent ou pas l'ATF. La singularité de la pratique de la mycologie dans les hôpitaux généraux tient au fait que les laboratoires y assurant le diagnostic et le suivi des infections fongiques sont des laboratoires de microbiologie polyvalente, devant disposer de méthodes robustes, fiables, peu onéreuses, ne nécessitant pas de compétences pointues dans le domaine, ainsi que de recommandations de bon usage quant à leurs indications et leurs pertinences cliniques. La généralisation de pratiques standardisées pour l'identification fongique comme pour l'ATF permettrait sans doute d'améliorer le service rendu au clinicien et au patient et certainement de générer des données d'ampleur nationale concernant l'épidémiologie des infections fongiques et des résistances. Des évolutions techniques et un certain nombre de recommandations françaises sont disponibles depuis la période de cette enquête ^[86,87,88], et l'intérêt pour la mycologie n'en est que plus vif au sein des hôpitaux du ColBVH. Les résultats de notre enquête nous apparaissent donc utiles à prendre en compte lors de propositions de recommandations ou pour les stratégies futures de développement et d'évaluation de techniques en mycologie.

IV.2 La caspofungine :

IV.2.1 Chimie :^[89]

- ❖ Dénomination commune : acétate de caspofungine
- ❖ Nom chimique : diacétate de 1-[(4R,5S)-5-[(2-aminoéthyl)amino]-N2-(10,12- diméthyl-1-oxotétradécyl)-4-hydroxy-L-ornithine]-5-[(3R)-3-hydroxy-L-ornithine] pneumocandine B0 (sel).
- ❖ Formule moléculaire : C₅₂H₈₈N₁₀O₁₅ 2C₂H₄O₂
- ❖ Poids moléculaire : 1 213,42
- ❖ Formule développée :

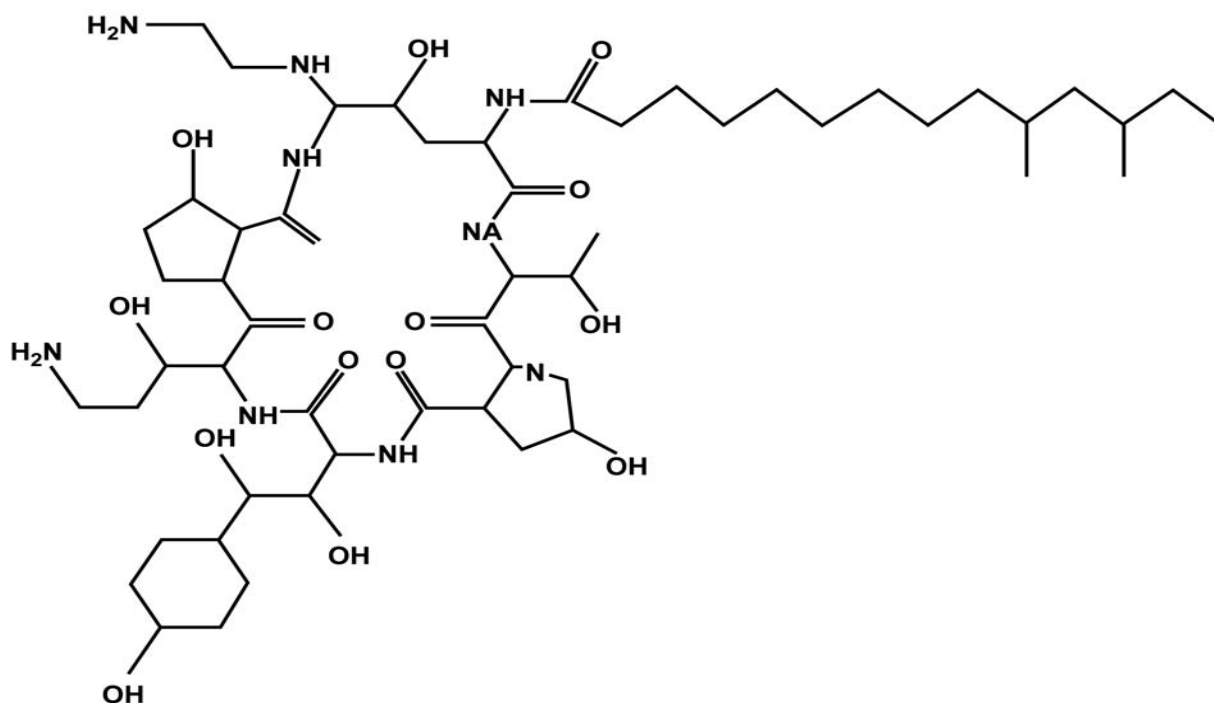


Figure 21. Structure chimique de l'acétate de caspofungine^[90]

- ❖ Propriétés physicochimiques :

Aspect physique : L'acétate de caspofungine est une poudre hygroscopique blanche ou blanc cassé. Elle est soluble dans l'eau et le méthanol, et légèrement soluble dans l'éthanol.

PH : Le PH de la solution aqueuse saturée d'acétate de caspofungine est d'environ 6,6.

IV.2.2 Activités pharmacologiques :

Mode d'action :

L'arsenal des antifongiques s'est enrichi depuis peu de molécules appartenant à de nouvelles classes chimiques comme les échinocandines ^[2,100].

La caspofungine (acétate de caspofungine) fait partie de cette classe. C'est un lipopeptide semi-synthétique hydrosoluble produit par la fermentation d'un champignon issu d'une rivière madrilène, *Glarea lozoyensis*. Il dérive de la pneumocandine B. Cet antifongique agit en bloquant la synthèse du β (1-3)-D-glucane de la paroi fongique par inhibition non compétitive de l'enzyme β (1-3)-D-glucane synthase. Le β (1-3)-D-glucane pariétal est un composant essentiel dont les chaînes, formant un réseau tridimensionnel particulièrement solide, sont responsables de la forme et de la résistance mécanique de cette paroi. 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.

L'inhibition de la synthèse du β (1-3)-D-glucane se traduit par un double effet, un effet fongistatique et un effet fongicide. L'effet fongistatique résulte du blocage de la synthèse de la paroi qui réduit la croissance fongique. L'effet fongicide résulte de l'altération de l'intégrité de la paroi qui perd ses propriétés mécaniques de résistance. Elle devient alors plus perméable, incapable de résister à la pression osmotique intracellulaire. Cet ensemble d'action conduit alors à la mort de la cellule fongique. Ce mécanisme d'action diffère de celui des autres classes d'antifongiques systémiques qui comme l'amphotéricine B (AMB) et les azolés agissent au niveau de la membrane plasmique, ou encore comme la 5-fluorocytosine (5-FC) qui inhibe la synthèse de l'ADN et des protéines. L'activité antifongique de la caspofungine *in vitro* et en clinique humaine a été pleinement démontrée sur les infections à *Candida* et à *Aspergillus*. Aussi nous avons essayé de passer en revue les études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ainsi que les quelques essais cliniques relatifs à son efficacité dans les mycoses à champignons dits rares.

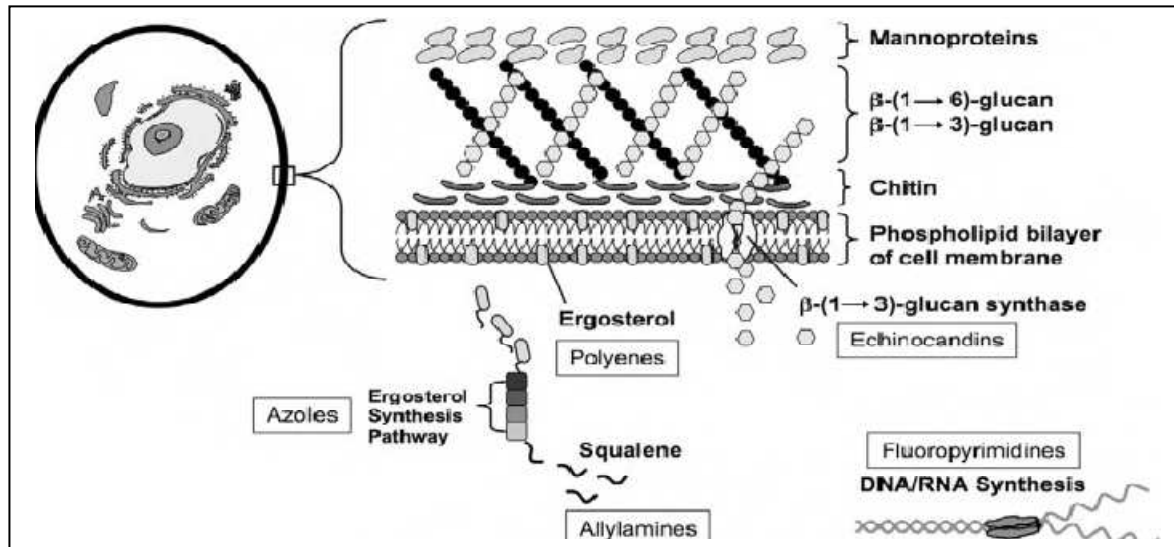


Figure 22 : Mode d'action des antifongiques.

Spectre d'action : La caspofungine(CAS) a un spectre d'activité théorique large qui s'étend à tous les champignons possédant du b (1-3)-D glucane .L'activité *in vitro* de cet antifongique a le plus souvent été étudiée par les méthodes préconisées par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ex National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ^[101,102,103,104] bien que ces méthodes ne soient pas encore standardisées pour les échinocandines. Cependant, certains auteurs ^[105] conseillent de mesurer l'inhibition de la b (1-3)-D-glucane synthase et la réduction du taux de b (1-3)-D-glucane pour évaluer l'activité de la caspofungine sur les champignons rares (*Alternaria*, *Curvalaria*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Bipolaris*. .).

L'activité antifongique de la caspofungine sur les *Candida* est maintenant bien connue, il faut cependant signaler son effet fongicide sur ces levures ^[106,107] et son efficacité sur les espèces résistantes (*C. krusei*) ou moins sensibles (*C.dubliniensis*, *C.glabrata*) aux azolés ou résistants à l'amphotéricine B(AMB) ^[108,109]. Cet antifongique, comme les autres échinocandines, n'est pas actif sur *Cryptococcus neoformans* ^[101].

Par ailleurs, la caspofungine est active *in vitro* sur les champignons filamenteux pathogènes et en particulier sur ceux responsables d'infections profondes tels que les *Aspergillus*, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) inférieures ou égales à 0,5 mg/ml sur des souches résistantes à l'amphotéricine B ^[110]. L'association *in vitro* de ces deux antifongiques

montre un effet additif ou synergique sur les *Aspergillus* et en aucun cas antagoniste ^[111]. D'autres études in vitro ont visualisé cette activité sur les *Aspergillus* par un effet sélectif sur les extrémités des filaments mycéliens, sites d'activité de la croissance apicale du champignon ^[110, 111]. La détermination de la concentration minimale effective [Minimum Effective Concentration (MEC)] sur des souches d'*Aspergillus* et de *Fusarium* comme étant la plus faible concentration d'antifongique responsable de la formation d'extrémités anormales d'hyphes. Ces valeurs sont basses (0,125-0,5 mg/ml) pour les *Aspergillus* et supérieures à 16 mg/ml pour les *Fusarium*. Des antifongiques tels que l'itraconazole (ITZ), le voriconazole, le posaconazole (POS) ^[112] ou encore une autre échinocandine (LY303366) n'apparaissent pas actifs sur *Fusarium sp.* ^[104]. Dans une récente étude, ^[113] un effet synergique a été mis en évidence sur 80 et 48% des souches de *Scopulariopsis brevicaulis* testées respectivement avec les associations CAS + AMB et CAS + POS. Pour les champignons filamenteux plus rares, la caspofungine possède une activité qui peut varier selon les espèces. Elle est active par exemple sur *Paecilomyces variotii* (CMI ≤ 0,5 µg/ml) mais pas sur *P. lilacinus* (CMI = 3-100 µg/ml) ou encore sur *S. apiospermum* (anamorphe de *Pseudallescheria boydii*) mais pas sur *S. prolificans* ^[104]. Elle apparaît légèrement plus active in vitro que l'ITZ sur *P. boydii* ^[104] avec respectivement des CMI₅₀ égales à 0,5 et 1 µg/ml et huit fois plus active que l'AMB (CMI₅₀ = 4 µg/ml). Cet antifongique n'est actif in vitro ni sur les *Fusarium* tels que *F. solani* et *F. oxysporum* (CMI > 50 µg/ml) ni sur les mucorales du genre *Rhizopus* (CMI > 100 µg/ml) ^[114,101,104]. La réponse des *Fusarium* à la caspofungine serait médiée par une iso forme particulière d'une sous-unité de la glucane synthase (FsFKS1) spécifique de *F. solani* f.sp. *pisi* ^[115]. Une action synergique ou additive de l'association CAS + AMB a par contre été observée sur *Fusarium* ^[116]. Les zygomycètes (*Mucor circinelloides*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor pusillus*, *Cunninghamella bertholletiae*, *Syncephalastrum racemosum*) ne sont pas sensibles à cette molécule in vitro avec des moyennes géométriques de CMI (G-CMI) supérieures à 16 µg/ml. Les champignons dimorphiques tels que *Blastomyces dermatitidis* ou *Histoplasma capsulatum* sont sensibles in vitro à cet antifongique mais de façon plus inconstante pour *Histoplasma*. *Sporothrix schenckii* apparaît moins sensible avec une CMI moyenne de l'ordre de 5,4 µg/ml.

Dans une étude comparative avec l'AMB sur *Coccidioides posadasii*, champignon dimorphiques responsable d'une maladie endémique dans la zone semi-aride du Nord-Est du Brésil, des CMI comprises entre 6 et 32 µg/ml ($6 < \text{CMI} < 32 \text{ µg/ml}$) pour la caspofungine et entre 0,0625 et 0,125 µg/ml ($0,0625 < \text{CMI} < 0,125 \text{ µg/ml}$) pour l'AMB ont été mis en évidence.

Bien qu'intéressante, la pertinence clinique de ces données in vitro n'a pas été clairement établie. De même, les concentrations critiques pour la caspofungine ne sont pas encore connues.^[117]

Tableau 20 : spectre d'action de la caspofungine. (Établie par Mr le Dr B.Coupré Laboratoire de parasitologie CHU de Bordeaux)

<i>Candida</i> spp	<i>C.albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C.parapsilosis</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C.lusitaniae</i>
Caspofungine	S	S	S ?	S	S	S

<i>Aspergillus</i> spp	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. terreus</i>
Caspofungine	S	S	S

Divers	<i>Cryptococcus</i> spp	<i>Trichosporon</i> spp	<i>Pneumocystis jiroveci</i>	<i>Scedosporium</i> spp	<i>Fusarium</i> spp	<i>Zygomycètes (Mucorales)</i>
Caspofungine	R	R	S (kystes)	R	R	R

S : sensible - R : résistant

IV.2.3 Posologies et administration :

1) Molécules et spécialités :^[118]

CANCIDAS® 50 mg perfusion IV => CIP 564 338.1

CANCIDAS® 70 mg perfusion IV => CIP 564 340.6



2) Composition qualitative et quantitative :

Chaque flacon contient 50/70 mg de Caspofungine équivalent à 55,5/77,7 mg d'acétate de caspofungine.

3) Liste des excipients :

- Saccharose
- Mannitol
- Acide acétique glacial
- Hydroxyde de sodium (pour ajustement du pH)

4) Incompatibilités :

Ne pas mélanger avec des solutions contenant du glucose, car Caspofungine MSD n'est pas stable dans ces solutions. Ne pas mélanger ou perfuser Caspofungine MSD avec d'autres médicaments, car il n'y a pas de données disponibles sur la compatibilité de Caspofungine MSD avec d'autres substances intraveineuses, additifs ou médicaments.

5) Durée de conservation :

2 ans.

La solution concentrée reconstituée: doit être utilisée immédiatement. Les données de stabilité ont montré que la solution diluée pour perfusion peut être conservée jusqu'à 24 heures lorsque le flacon est conservé à une température ne dépassant pas 25°C et que la solution a été reconstituée avec de l'eau pour préparations injectables.

Solution diluée pour perfusion: doit être utilisée immédiatement. Les données de stabilité ont montré que le produit peut être utilisé dans les 24 heures lorsqu'il est conservé à une température ne dépassant pas 25°C ou dans les 48 heures lorsque la poche (le flacon) de perfusion intraveineuse est conservée au réfrigérateur (entre 2 et 8°C) et diluée au moyen d'une solution de chlorure de sodium à 9 mg/ml(0,9 %), 4,5 mg/ml (0,45 %) ou 2,25 mg/ml (0,225 %) pour perfusion, ou d'une solution de Ringer lactate.

D'un point de vue de sécurité microbiologique, le produit doit être utilisé immédiatement. S'il ne l'est pas, les durées et les conditions de conservation avant utilisation sont de la responsabilité de l'utilisateur et ne devront normalement pas dépasser 24 heures à une température de 2 à 8°C, à moins que la reconstitution et la dilution n'aient eu lieu dans des conditions aseptiques contrôlées et validées.^[89]

6) Précautions particulières de conservation :

Flacons non ouverts: à conserver entre 2°C et 8°C (au réfrigérateur).

La solution concentrée reconstituée: doit être utilisée immédiatement. La stabilité chimique et physique lors de l'utilisation pendant 24 heures à 25°C a été démontrée.

Solution diluée pour perfusion: doit être utilisée immédiatement. La stabilité chimique et physique lors de l'utilisation pendant 24 heures à 25°C, et pendant 48 heures au réfrigérateur (entre 2 et 8°C) a été démontrée.

7) Posologie ^[118] :

Dose de charge unique : 70 mg administrée le premier jour de traitement

Dose de 50 mg à partir du deuxième jour

- Pour les patients de plus de 80 kg, après la dose de charge initiale, administrer une dose de 70 mg par jour (doses supérieures à 70 mg par jour non étudiées)
- Le traitement sera poursuivi jusqu'à 72 heures après la résolution de la neutropénie (nombre de polynucléaires neutrophiles $\geq 500/\text{mm}^3$).
- Durée du traitement : En cas d'infection fongique, les patients doivent être traités pendant au moins 14 jours et le traitement poursuivi pendant au moins 7 jours après la résolution à la fois de la neutropénie et des symptômes cliniques.
- ❖ candidose invasive fonction de la réponse clinique et microbiologique du patient=> passage à un traitement antifongique oral peut être envisagée.
- ❖ l'aspergillose invasive déterminée pour chaque cas en fonction de la gravité de la pathologie sous-jacente du patient, de l'état de récupération de la dépression immunitaire et de la réponse clinique => au moins 7 jours après la résolution des symptômes.
- Patients âgés (65 ans ou plus) : Aucun ajustement posologique systématique n'est nécessaire.
- Aucun ajustement posologique : en fonction du sexe, de la race, ou en cas d'insuffisance rénale, d'insuffisance hépatique légère .
- Pour les patients ayant une insuffisance hépatique modérée dose de 35 mg par jour (dose de charge de 70 mg le premier jour).

Posologie chez les enfants âgés de 12 mois à 17 ans

Chez les enfants âgés de 12 mois à 17 ans, la posologie doit être établie en fonction de la surface corporelle du patient . Dans toutes les indications, une dose de charge unique de 70 mg/m² (sans dépasser 70 mg par jour) devra être administrée le premier jour, suivie d'une dose quotidienne de 50 mg/m² (sans dépasser 70 mg par jour). Si la dose quotidienne de 50 mg/m² est bien tolérée mais n'apporte pas de réponse clinique suffisante, la dose quotidienne pourra être augmentée à 70 mg/m² (sans dépasser 70 mg par jour). L'efficacité et la sécurité d'emploi de CANCIDAS[®] n'ont pas été suffisamment étudiées dans les essais cliniques réalisés chez les nouveau-nés et les nourrissons de moins de 12 mois. La prudence est requise lors du traitement des patients de cette tranche d'âge. Des données limitées suggèrent que l'on peut envisager chez le nouveau-né et le nourrisson (de moins de 3 mois) des doses de CANCIDAS[®] de 25 mg/m² par jour et chez le nourrisson (de 3 à 11 mois) des doses de 50 mg/m² par jour.

L'acétate de caspofungine n'a pas été étudié chez l'enfant. Son utilisation chez les patients de moins de 18 ans n'est pas recommandée.

Des données limitées suggèrent qu'une augmentation de la dose quotidienne de Caspofungine à 70 mg après la dose de charge habituelle de 70 mg doit être envisagée lorsque Caspofungine est Co-administré avec certains inducteurs d'enzymes métaboliques.^[118]

IV.2.4 Pharmacodynamie :

Classe pharmaco-thérapeutique: antimycosiques pour usage systémique Code ATC: J 02 AX04.^[119]

L'acétate de caspofungine est un lipopeptide semi-synthétique (échinocandine) synthétisé à partir d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*. L'acétate de caspofungine inhibe la synthèse du bêta (1,3)-D-glucane, un constituant essentiel de la paroi cellulaire de nombreux champignons filamenteux et levures. Le bêta (1,3)-D-glucane n'est pas présent dans les cellules de mammifères.

L'activité fongicide de la caspofungine a été démontrée sur *Candida*. Des études in vitro et in vivo démontrent que l'exposition d'*Aspergillus* à la caspofungine entraîne une lyse et la mort

des extrémités des filaments mycéliens et des sites où se produisent la croissance et la division des cellules.

La caspofungine a une activité *in vitro* sur les espèces d'*Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nidulans*, et *Aspergillus terreus*), et les espèces de *Candida* (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitanae*, et *Candida parapsilosis*), y compris sur les isolats ayant acquis des mutations de transport de résistance multiple et ceux ayant une résistance acquise ou intrinsèque au fluconazole, à l'amphotéricine B et au 5-flucytosine. Un test de sensibilité a été réalisé selon une modification de la méthode M38-P (pour *Aspergillus spp*) et de la méthode M27-A (pour *Candida spp*) mise au point par le « National Committee for Clinical Laboratory Standards » (NCCLS). Cependant, les techniques standardisées pour le test de sensibilité vis-à-vis des agents antifongiques, y compris les inhibiteurs de la synthèse du bêta (1,3)-D-glucane, n'ont pas été réalisées, et les résultats des études de sensibilité ne sont donc pas nécessairement corrélés aux résultats cliniques. Le développement *in vitro* de la Résistance à la caspofungine par les espèces d'*Aspergillus* n'a pas été étudiée. Au cours de l'expérience clinique limitée, une résistance à la caspofungine chez des patients avec une aspergillose invasive n'a pas été observée. L'incidence de la résistance à la caspofungine par divers isolats cliniques d'*Aspergillus* est inconnue.

Soixante-neuf patients adultes (âgés de 18 à 80 ans) ayant une aspergillose invasive ont été inclus dans une étude ouverte, non comparative, afin d'évaluer la sécurité d'emploi, la tolérance et l'efficacité de la caspofungine. Les patients inclus devaient être soit réfractaires (progression de la maladie ou absence d'amélioration avec d'autres traitements antifongiques administrés pendant au moins 7 jours) (84 % des patients inclus) ou intolérants (16 % des patients inclus) à d'autres traitements antifongiques standards. La plupart des patients avait une maladie sous-jacente (hémopathie maligne, allogreffe de moelle osseuse ou greffe de cellules souches, transplantation d'organe, tumeur solide, ou autres conditions cliniques). Des définitions rigoureuses, élaborées d'après le « Mycoses Study Group Criteria » ont été utilisées pour le diagnostic d'aspergillose invasive et pour la réponse au traitement (une

réponse favorable nécessitait une amélioration cliniquement significative des radiographies, ainsi que des signes et des symptômes). La durée moyenne de traitement était de 33,7 jours, avec une fourchette de 1 à 162 jours. Un comité d'experts indépendant a déterminé que 41 % des patients ayant reçu au moins une dose de caspofungine ont eu une réponse favorable. Parmi les patients traités plus de 7 jours par la caspofungine, 50 % ont eu une réponse favorable. Les taux de réponse favorable pour les patients qui étaient soit réfractaires soit intolérants à des traitements antérieurs ont été de 36 % et 70 %, respectivement. Bien que les doses de traitements antifongiques antérieurs de 5 patients inclus comme étant réfractaires, furent plus basses que celles qui sont généralement administrées pour le traitement de l'aspergillose invasive, les taux de réponse favorable pour ces patients durant le traitement avec caspofungine furent similaires à ceux observés chez les patients qui sont restés réfractaires. Les taux de réponse parmi les patients ayant une maladie pulmonaire et extra pulmonaire ont été de 47 % et 28 %, respectivement. Parmi les patients ayant une atteinte extra pulmonaire, 2 des 8 patients qui avaient également une affection certaine, probable ou possible du SNC ont présenté une réponse favorable.

IV.2.5 Pharmacologie de la caspofungine :

1. Pharmacocinétique :

Distribution : La caspofungine est fortement liée à l'albumine (environ 97 %). La distribution dans l'organisme joue un rôle prédominant dans la pharmacocinétique plasmatique de la caspofungine et est l'étape contrôlant à la fois les phases alpha- et bêta de distribution. La distribution dans les tissus a atteint un pic à 1,5-2 jours après l'administration lorsque 92 % de la dose a été distribuée dans les tissus. Il est probable qu'une petite fraction de la caspofungine fixée dans les tissus retourne ultérieurement dans le plasma sous forme de composant apparenté. Par conséquent, l'élimination se produit en l'absence d'équilibre de distribution, et une estimation correcte du volume de distribution de la caspofungine est impossible à obtenir.^[119]

Métabolisme : La caspofungine subit une dégradation spontanée en un composé cyclique ouvert. Elle est métabolisée ensuite par hydrolyse peptidique et N-acétylation. Deux composés intermédiaires, formés pendant la dégradation de la caspofungine en ce composé

cyclique ouvert, forment des liaisons covalentes qui se fixent faiblement de façon irréversible aux protéines plasmatiques.

Les études in vitro montrent que la caspofungine n'est pas un inhibiteur des enzymes 1A2, 2A6, 2C9, 2C19, 2D6 ou 3A4 du cytochrome P 450. Dans les études cliniques, la caspofungine n'a pas induit ou inhibé le métabolisme du CYP3A4 vis-à-vis d'autres médicaments. La caspofungine n'est pas un substrat pour la P-glycoprotéine et ne représente qu'un substrat médiocre pour les enzymes du cytochrome P450.^[119]

Élimination et excrétion : L'élimination de la caspofungine du plasma est lente, la clairance oscillant de 10-12 ml/min.

Après perfusion intraveineuse unique d'une durée d'une heure la concentration plasmatique de caspofungine diminue en plusieurs phases. Une brève phase alpha intervient immédiatement après la perfusion, suivie par une phase bêta dont la demi-vie varie de 9 à 11 heures. Une phase gamma supplémentaire survient également et sa demi-vie est de 45 heures. C'est le phénomène de distribution, plus que le phénomène d'excrétion ou de biotransformation, qui est le mécanisme essentiel influençant la clairance plasmatique.

Approximativement de 75 % d'une dose marquée par un isotope radioactif était retrouvée 27 jours après son administration: 41 % dans les urines et 34 % dans les fèces. L'excrétion et la biotransformation de la caspofungine sont faibles durant les 30 premières heures qui suivent l'administration. L'excrétion est lente et la demi-vie terminale de la radioactivité a été de 12 à 15 jours. Une faible quantité de caspofungine est excrétée sous forme inchangée dans les urines (environ 1,4 % de la dose).^[119]

Tableau 21: Caractéristiques pharmacocinétiques de la caspofungine chez l'homme : ^[120].

	Dose (mg/j)	C _{max} (µg/ml)	ASC0–24h (mg × h/l)	Demi-vie (h)	Clairance	Volume de distribution
Caspofungine	50(70 en dose de charge)	9,9	57,8 (50 mg)	9–11	12 ml/min	Indéterminé

C_{max} : concentration plasmatique maximale ; ASC : aire sous la courbe.

2. Critères de la pharmacocinétique :

La caspofungine présente une pharmacocinétique modérément non-linéaire mais une accumulation accrue lorsque la dose croît, et une dose-dépendance temporelle pour atteindre un état d'équilibre lors de l'administration de doses multiples.

2-1 Variabilité individuelle :

Selon le type de patients : ^[118]

⇒ Sexe :

Les concentrations plasmatiques de caspofungine à la suite de l'administration d'une dose unique de 70 mg ont été comparables chez des hommes et des femmes adultes en bonne santé. Après l'administration d'une dose quotidienne de 50 mg pendant 13 jours, les concentrations plasmatiques de caspofungine chez les femmes ont été légèrement plus élevées (environ 20 %) que chez les hommes. Aucun réglage de la posologie n'est nécessaire en fonction du sexe.

⇒ poids :

Chez les sujets pesant un poids important, un ajustement de la posologie peut être nécessaire. Chez des patients atteints de candidose, on a observé que le poids a une influence sur les données pharmacocinétiques de la caspofungine. Les concentrations plasmatiques diminuent lorsque le poids augmente. Il est prévisible que l'exposition moyenne chez un patient pesant 80 kg soit environ 23 % inférieure à celle d'un patient pesant 60 kg.

⇒ Race :

On n'a observé aucune différence significative sur le plan clinique quant à la pharmacocinétique entre les sujets de races blanche, noire et hispanique. Aucun réglage de la posologie n'est nécessaire en fonction de la race.

⇒ Age :

- Enfants (≤ 17 ans) : ^[89]

La tolérance et l'efficacité de la Caspofungine n'ont pas été établies chez l'enfant et son utilisation chez les patients de moins de 18 ans n'est pas recommandée mais, des études sont en cours.

L'innocuité et l'efficacité de la caspofungine n'ont pas fait l'objet d'études appropriées chez les nouveau-nés, les nourrissons de moins de 3 mois et les enfants âgés de 3 à 11 mois.

Des cas de réaction défavorable hépatobiliaire ont été rapportés après la commercialisation de La caspofungine chez des enfants présentant un état médical sous-jacent grave.

- Personnes âgées (≥ 65 ans) :

Dans les études cliniques avec la caspofungine, le nombre de patients âgés de 65 ans et plus n'était pas suffisamment élevé pour établir si la réponse au traitement diffère de celle observée chez les sujets plus jeunes. Chez un nombre limité de patients âgés (≥ 65 ans), on n'a pas observé de différence globale quant à l'innocuité et à l'efficacité de la caspofungine entre les patients âgés et les sujets plus jeunes. Les concentrations plasmatiques de caspofungine chez des hommes et des femmes âgés (≥ 65 ans) en bonne santé étaient légèrement plus élevées (augmentation d'environ 28 % de l'aire sous la courbe [ASC]) que celles obtenues chez de jeunes hommes en bonne santé. Parmi les patients qui avaient reçu un traitement empirique ou qui présentaient une candidose invasive, on a aussi observé une légère hausse de l'ASC chez les personnes âgées par rapport aux sujets plus jeunes. Aucun réglage de la posologie n'est recommandé chez les personnes âgées; cependant, on ne peut écarter la possibilité que certains patients âgés soient plus sensibles à l'action du médicament.

Selon le profil du patient :

➤ ***Insuffisance hépatique :***

On a observé une augmentation d'environ 55 % des concentrations plasmatiques de caspofungine à la suite de l'administration d'une dose unique de 70 mg chez des adultes présentant une insuffisance hépatique légère par rapport aux témoins historiques en bonne santé. Dans une étude de 14 jours portant sur l'administration de doses multiples (70 mg au jour 1 et dose quotidienne de 50 mg par la suite), on a observé une augmentation modérée (19 % à 25 %) des concentrations plasmatiques de caspofungine aux jours 7 et 14 chez les adultes présentant une insuffisance hépatique légère comparativement aux témoins en bonne santé. Aucun réglage de la posologie n'est recommandé dans les cas d'insuffisance hépatique légère. Les adultes atteints d'insuffisance hépatique modérée qui ont reçu une dose unique de 70 mg de CANCIDAS[®] ont présenté une augmentation moyenne de 76 % des concentrations

plasmatiques de caspofungine par rapport aux témoins. Il est recommandé de réduire la posologie. Chez les adultes présentant une insuffisance hépatique modérée compte tenu des données pharmacocinétiques dont nous disposons. On ne dispose pas de données cliniques concernant les adultes présentant une insuffisance hépatique grave et les enfants atteints d'insuffisance hépatique, peu importe le niveau de gravité.^[89]

➤ **Insuffisance rénale :**

Dans une étude clinique portant sur l'administration d'une dose unique de 70 mg, la pharmacocinétique de la caspofungine a été comparable chez les adultes volontaires en bonne santé présentant une insuffisance rénale légère (clairance de la créatinine [C_{cr}] de 50 à 80 ml/min) et chez les témoins. Après l'administration d'une dose unique, on a observé une augmentation de 30 % à 49 % de l'ASC des concentrations plasmatiques de caspofungine chez les patients présentant une insuffisance rénale modérée ($[C_{cr}]$ de 31 à 49 ml/min), grave (C_{cr} de 5 à 30 ml/min) ou au stade terminal ($C_{cr} < 10$ ml/min et dialyse). Cependant, chez les adultes présentant une candidose invasive ou une aspergillose invasive, qui avaient reçu des doses quotidiennes multiples de CANCIDAS® à 50 mg, on n'a observé aucun effet significatif de l'insuffisance rénale à divers degrés (allant jusqu'au stade terminal) sur les concentrations de caspofungine. Aucun réglage de la posologie n'est nécessaire dans les cas d'insuffisance rénale. Comme la caspofungine n'est pas dialysable, il n'est pas nécessaire d'administrer une dose supplémentaire après l'hémodialyse.^[89]

3. Interactions médicamenteuses :

➤ **Interactions médicament-médicament :**

Des études in vitro ont montré que l'acétate de caspofungine n'inhibe aucune enzyme du système du cytochrome P450 (CYP). Dans les études cliniques, la caspofungine n'a pas induit le métabolisme d'autres substances via le CYP3A4. La caspofungine n'est pas un substrat de la P-glycoprotéine et ne constitue qu'un substrat médiocre des enzymes du cytochrome P450. Cependant, dans les études pharmacologiques et cliniques, il a pu être démontré que la caspofungine interfère avec d'autres médicaments.

Dans deux études cliniques réalisées chez des sujets sains, la ciclosporine A (à la dose unique de 4 mg/kg ou lors de l'administration de deux doses de 3 mg/kg séparées par un intervalle de

12 heures) a entraîné une augmentation de l'ASC de la caspofungine d'environ 35 %. Ces augmentations de l'ASC sont probablement dues à une réduction de la clairance hépatique de la caspofungine. Caspofungine n'a pas augmenté les concentrations plasmatiques de ciclosporine. Des élévations transitoires des transaminases (ALAT et ASAT) restant inférieures ou égales à 3 fois la limite supérieure de la normale (LSN) ont été observées lors de l'administration concomitante de Caspofungin et de ciclosporine. Ces élévations se sont normalisées à l'arrêt des médicaments.

Par conséquent, en l'absence de données concernant la Coadministration de ciclosporine A et de caspofungine chez des patients, l'administration concomitante de caspofungine et de ciclosporine A doit être actuellement limitée. Une surveillance étroite des enzymes hépatiques doit être envisagée en cas de coadministration des deux médicaments.

Il s'avère que la Caspofungine a réduit la concentration minimale du tacrolimus de 26 %. Pour les patients recevant les deux traitements, un monitoring des concentrations sanguines du tacrolimus et de l'ajustement posologique adapté du tacrolimus sont requis.

La rifampicine a provoqué une augmentation de 60 % de l'ASC de la caspofungine ainsi qu'une augmentation de 170 % de la concentration minimale de la caspofungine lors du premier jour d'un coadministrateur simultané des deux médicaments. Les concentrations minimales de caspofungine ont diminué graduellement lors de l'administration répétée. Après deux semaines d'administration, la rifampicine a eu un effet limité sur l'ASC de la caspofungine, mais les concentrations minimales étaient de 30 % inférieures de celles des patients ayant reçu la caspofungine seule. Le mécanisme probable de l'interaction pourrait être imputé à une inhibition initiale suivie d'une induction ultérieure du transport de protéines. Il faut s'attendre à des effets similaires avec d'autres médicaments inducteurs des enzymes métaboliques. Des données limitées provenant d'études de pharmacocinétique de population indiquent que l'utilisation concomitante de la Caspofungin avec les substances inductrices tels que l'éfavirenz, névirapine, rifampicine, dexaméthasone, phénytoïne, ou carbamazépine, peut entraîner une diminution de l'ASC de la caspofungine. En cas de coadministration avec des inducteurs d'enzymes métaboliques, une augmentation de la dose quotidienne de la Caspofungin à 70 mg doit être envisagée, après la dose de charge habituelle de 70 mg.

La caspofungine n'a pas eu d'influence sur la pharmacocinétique de l'amphotéricine B, de l'itraconazole, et du mycophénolate de mofétil. Bien que les données de sécurité d'emploi soient limitées, il semble qu'aucune précaution spéciale ne soit nécessaire lorsque l'amphotéricine B, l'itraconazole, et le mycophénolate de mofétil sont Co-administrés avec la caspofungine.^[119]

Tableau 22 : Interactions médicamenteuses de la caspofungine (CI : contre-indication, ↑ : augmentation, ↓ : baisse, [c] : concentration, ASC : Aire Sous la Courbe)^[121]

Interactions propres à la caspofungine		
Association	Conséquence	Mesure
+ ciclosporine	↑ ASC caspofungine (↓ clairance hépatique)	Contrôle des transaminases
+ rifampicine	↑ transitoire transaminases Au premier jour de co-administration : ↑ ASC de caspofungine de 60 % et ↑ [c] sérique minimale de caspofungine. À l'équilibre (j15) : ↓ [c] sérique minimale de caspofungine	↑ dose de caspofungine à 70 mg/j après dose de charge de 70 mg
+ éfavirenz, nevirapine, dexaméthason, phénytoïne, carbamazépine	↓ ASC caspofungine	↑ dose de caspofungine à 70 mg/j après dose de charge de 70 mg
+ tacrolimus	↓ tacrolimus	Monitoring [tacrolimus] et ajustement posologie

➤ **Interactions médicament-aliment :**

Les interactions médicament-aliment n'ont pas été établies.

➤ **Interactions médicament-herbe médicinale :**

Les interactions médicament-herbe médicinale n'ont pas été établies.^[89]

IV.2.6 Efficacité clinique :

La caspofungine a l'AMM chez les adultes et en pédiatrie, y compris les nouveau-nés.

IV.2.6. 1.Candidoses :

❖ **Candidoses muqueuses ou œsophagiennes :**

Le cas d'un patient infecté par le VIH au stade sida a été rapporté (CD4 compris entre 9 et 3/mm³ et une charge virale entre 60 876 et 25 302 copies/ml malgré un traitement

antirétroviral). Il développe des épisodes récurrents de candidose oropharyngées à *C. albicans* (amphotéricine B et voriconazole sensibles, fluconazole et Itraconazole résistants) et à *C. glabrata* (amphotéricine B et voriconazole sensibles, fluconazole intermédiaire et Itraconazole résistant). Après intolérance au voriconazole et à l'amphotéricine B, le patient est traité par la Caspofungine aux posologies habituelles durant sept jours entraînant une guérison complète des lésions fongiques ^[122].

Une étude randomisée multicentrique en double insu de la Caspofungine et de l'amphotéricine B a été conduite chez 128 patients en Amérique centrale et du sud dans des œsophagites à *Candida* prouvées par endoscopie et examen mycologique ^[123]. Les trois bras randomisés de traitement étaient Caspofungine 50 ou 70 mg/jour et amphotéricine B 0,5mg/kg par jour pour une durée de 14 jours. Les patients résistants au fluconazole étaient exclus. L'évaluation clinique était réalisée en fin de traitement et 14 jours après la fin du traitement. Une stratification a été réalisée au début du traitement en fonction de l'intensité de l'atteinte œsophagienne à l'endoscopie. Les critères d'efficacité étaient la guérison clinique et l'amélioration ou la guérison endoscopique.

Cette évolution favorable a concerné 85, 96 et 72 % des patients en fin de traitement et 74, 89 et 63 % 14 jours plus tard pour caspofungine 50 mg, caspofungine 70 mg et amphotéricine B, respectivement.

Ainsi, il existait une tendance en faveur d'une meilleure efficacité de caspofungine 70 mg par rapport à caspofungine 50 mg et des deux bras caspofungine par rapport à l'amphotéricine B, mais sans valeur statistiquement significative. Les symptômes ont disparu chez plus de 50 % des patients en quatre jours dans chaque groupe. Les CMI de *C. albicans* étaient comprises entre 0,06 et 2 µg/ml. Les effets secondaires étaient significativement plus fréquents dans le bras amphotéricine B.

Dans une étude similaire, les patients ayant été traités antérieurement sans succès par le fluconazole répondaient moins bien au traitement (38 %) que ceux n'ayant pas eu de traitement antérieur (85 %) ^[124].

Enfin, une autre étude randomisée en double insu a comparé la caspofungine (50 mg IV) et le fluconazole (200 mg IV) dans le traitement des œsophagites à *Candida* chez 94 patients

majoritairement infectés par le VIH. Après 7 à 21 jours de traitement, le taux d'évolution favorable clinique et mycologique était le même pour la caspofungine (82 %) et pour le fluconazole (85 %). Il n'y avait pas de différence concernant les résultats endoscopiques (85 et 88 %) ou cliniques considérés isolément. Les effets secondaires étaient comparables^[125]. Ainsi, la caspofungine est aussi efficace que le fluconazole et l'amphotéricine B dans le traitement des candidoses oropharyngées et des œsophagites à *Candida spp.* Mais, la tolérance de la caspofungine est supérieure à celle de l'amphotéricine B.

❖ *Candidémies et candidoses systémiques :*

Dans un essai comparatif multicentrique en double insu de la caspofungine par rapport à l'amphotéricine B dans les candidoses invasives de l'adulte, la caspofungine IV a été prescrite à 70 mg le premier jour et 50 mg les jours suivants et l'amphotéricine B à 0,6–0,7 mg/kg par jour chez les non-neutropéniques et 0,7–1 mg/kg par jour chez les neutropéniques. Après au moins dix jours de traitement par voie IV, il était possible de passer au fluconazole per os à la posologie de 400 mg par jour dans les deux bras sauf en cas de *C. krusei* ou *C. glabrata*. La durée du traitement antifongique était de 14 jours après la dernière hémoculture positive. Le critère principal d'efficacité était l'évolution à la fin du traitement IV. Les critères secondaires d'efficacité étaient l'évolution à dix jours de traitement IV, à la fin de tout traitement et au suivi deux semaines et six à huit semaines après la fin du traitement. Deux populations prédéfinies de patients ont été considérées : en intention de traiter modifiée (ITM) qui concerne tout patient ayant une infection prouvée et ayant reçu au moins un jour de traitement et les « patients évaluable » qui ont reçu au moins cinq jours de traitement. Sur les 239 patients enrôlés, 224 ont pu être inclus dans l'analyse en ITM. Les caractéristiques de base incluant le pourcentage de patients avec neutropénie et la moyenne du score APACHE II étaient similaires dans les deux groupes de traitement. L'analyse en ITM a montré que l'efficacité de la caspofungine était similaire à celle de l'amphotéricine B, 73,4 % par rapport à 61,7 %. Toutefois, dans l'analyse des patients évaluable la caspofungine s'est révélée significativement plus efficace que l'amphotéricine B (81 et 65 % respectivement) dans le traitement des candidoses invasives et plus spécifiquement dans les candidémies. Il existait

significativement moins d'effets secondaires dans le groupe caspofungine que dans celui de l'amphotéricine B ^[126]

Ainsi, la caspofungine est significativement plus efficace et mieux tolérée que l'amphotéricine B dans le traitement des candidémies et des candidoses systémiques.

2.6.2. Aspergilloses invasives :

Une étude multicentrique, non comparative, a été réalisée dans le traitement de l'aspergillose invasive (AI) probable ou prouvée chez des patients intolérants ou réfractaires aux autres traitements antifongiques (amphotéricine B ou ses formulations lipidiques ou les triazolés). La caspofungine a été prescrit par voie intraveineuse en perfusion d'une heure à la posologie de 70 mg le premier jour et 50 mg les jours suivants. La durée médiane du traitement était de 28 jours (1–162 jours). Un relais était pris par itraconazole dans 90 % des cas. L'efficacité était évaluée à la fin du traitement par la caspofungine et quatre semaines après l'arrêt du traitement. La réponse était favorable si la réponse clinique était complète ou partielle et si la réponse microbiologique montrait une négativation des cultures ou une éradication «présumée». Quatre-vingt-dix patients ont été inclus : le sex-ratio était de 2/1 avec une majorité de caucasiens et l'âge médian était de 51 ans (15–73). Quatre-vingt-cinq patients ont été analysés en (intention de traiter modifiée) ITM et 83 ont été évaluables en analyse secondaire. La maladie sous-jacente était : hémopathie maligne (48 % des patients), transplantation allogénique de moelle osseuse et de cellules souches périphériques (25% des patients), transplantation d'organes solides (11 % des patients), cancer (3 patients). Parmi ces patients, 23% étaient neutropéniques, 64 (87 %) avaient une localisation pulmonaire et 19 une atteinte extrapulmonaire ou associée ; 71/83 (86 %) étaient réfractaires et 12 (14 %) étaient intolérants au traitement antérieur. Le taux de réponse favorable en ITM et pour ceux qui ont reçu au moins sept jours de traitement a été de 45 % (37/83), incluant 37/64 (50 %) patients avec une aspergillose invasive pulmonaire et 3/13 (23 %) patients avec une aspergillose disséminée. Il a été de 39%(28/71) chez les patients réfractaires et de 75 % (9/12°) chez les patients intolérants. Deux patients ont dû interrompre la CAS pour effets secondaires, mais en règle générale la substance a été bien tolérée et le nombre de décès a été de 40/83 patients (48,1 %) ^[127].

La CAS semble donc une bonne indication pour le traitement des aspergilloses invasives de patients réfractaires ou intolérants aux traitements classiques.

Association d'antifongiques dans le traitement de Aspergilloses invasives :[128]

❖ Échinocandines/triazolés :

La plupart des études montrent in vitro un effet indifférent ou synergique ^[129, 130,131 ,132].

In vivo, on observe dans différents modèles testant les associations caspofungine plus voriconazole, caspofungine plus posaconazole ou micafungine plus ravuconazole une réduction de la mortalité et/ou de la charge fongique des organes profonds ^[132, 133,134].

Chez l'homme, en première ligne, une étude multicentrique prospective a comparé la survie de patients transplantés d'organe traités par voriconazole plus caspofungine à celle de cas témoins traités par amphotéricine B lipidique ^[130]. Il existait un bénéfice en termes de survie pour les infections à *A. fumigatus* et les insuffisants rénaux. En seconde ligne, chez des patients d'hématologie, l'association caspofungine plus voriconazole a été comparée rétrospectivement au voriconazole seul ^[135]. La survie était significativement plus élevée dans le groupe bithérapie. En analyse multivariée, la bithérapie était associée à une diminution de mortalité.

L'association caspofungine plus itraconazole, ou voriconazole, a été évalué prospectivement chez 37 patients réfractaires (87%) ou intolérants (13 %) à un traitement par polyène, azolé ou caspofungine ^[136]. Les réponses étaient favorables dans 43%des cas, avec la caspofungine plus itraconazole, et 60% des cas avec la caspofungine plus voriconazole (73% des patients réfractaires au voriconazole ayant répondu après adjonction de caspofungine).

L'interprétation de ces différentes études doit rester prudente, en raison des faibles effectifs, des caractéristiques particulières des populations (nombreuses comorbidités) et de leur caractère le plus souvent rétrospectif et non randomisé.

❖ Échinocandines/polyènes :

In vitro, les études montrent le plus souvent une indifférence ou une synergie ^[129, 133, 137,138].

Une seule étude retrouve un antagonisme ^[131]. Chez l'animal, l'association caspofungine plus Abelcet® (amphotéricine B) n'apporte pas de bénéfice comparée à un polyène seul dans

certaines modèles ^[139,140] mais s'avère supérieure dans d'autres ^[141]. L'association micafungine plus amphotéricine B améliore quant à elle la survie ^[142].

Chez l'homme, une étude a évalué l'association caspofungine plus L'amphotéricine B en première ligne ou en traitement de sauvetage d'aspergilloses invasives ^[143]. Les réponses étaient favorables chez 42% des patients, pourcentage inférieur à celui obtenu avec le voriconazole (53 %) ^[144].

L'étude pilote Combistrat a comparé prospectivement en traitement de première ligne d'aspergilloses pulmonaires l'association caspofungine plus L'amphotéricine B à 3 mg/kg par jour à la L'amphotéricine B à 10 mg/kg par jour chez 30 patients ^[145]. Seules 13% des aspergilloses étaient prouvées. Le taux de réponses favorables était significativement plus élevé sous bithérapie, sans différence de survie. Ces résultats nécessitent d'être confirmés. L'association amphotéricine B plus caspofungine a été évaluée en traitement de sauvetage d'aspergilloses pulmonaires chez des patients réfractaires à l'amphotéricine B ^[146]. Il existait 60% de réponses favorables. Mais les durées et doses d'antifongiques reçues préalablement étaient très hétérogènes et l'aspergillose n'était prouvée que dans 20% des cas.

Dans une autre étude, 16 patients ont reçu en seconde ligne l'association caspofungine plus polyène, avec des taux de réponse très variables selon le polyène ^[136].

2.6.3. Traitement empirique antifongique chez le patient neutropénique fébrile :^[147]

L'utilisation de l'amphotéricine B dans le traitement empirique n'est pas validée par une AMM spécifique. À la suite d'une étude (1999), l'amphotéricine B a obtenu l'AMM pour le traitement empirique des infections fongiques présumées chez les patients neutropénique fébriles à la posologie de 3 mg/kg par jour. L'amphotéricine B devient donc un comparateur pour les essais de traitement antifongique empirique. Ainsi, une étude randomisée, multicentrique en double insu a évalué la caspofungine par rapport à l'amphotéricine B dans le traitement empirique antifongique des patients neutropéniques fébriles ^[148]. Il s'agissait d'un essai de non-infériorité dont l'objectif était de comparer l'efficacité et la tolérance de caspofungine par rapport à l'amphotéricine B avec deux bras : caspofungine IV 50 mg/jour (après une dose de charge de 70 mg le premier jour) et l'amphotéricine B IV (3 mg/kg/jour). Les patients étaient stratifiés à l'inclusion selon deux critères : la catégorie de risque (le risque

le plus élevé étant les allogreffes de cellules souches hématopoïétiques ou rechute de leucémie aiguë) et la prophylaxie antifongique.

Concernant l'efficacité, la caspofungine ne devait pas être inférieure à l'amphotéricine B sur le critère principal de jugement, ce dernier devant satisfaire à cinq critères (1. Succès thérapeutique, 2. Absence de survenue d'infection fongique, 3. Survie à sept jours après la fin du traitement de l'étude, 4. Absence de sortie d'étude due à une toxicité ou manque d'efficacité, 5. Disparition de la fièvre lors de la neutropénie). Concernant la tolérance, la caspofungine ne devait pas être inférieure à l'amphotéricine B sur le pourcentage de patients ayant développé en particulier une néphrotoxicité.

Le traitement devait être poursuivi pendant 72 heures après la résolution de la neutropénie. Sa durée maximale pour les patients sans infection fongique invasive (IFI) documentée était de 28 jours. Toute IFI devait être traitée pendant une durée minimale de 14 jours (durée maximale : 90 jours) et pendant au moins sept jours après la disparition des symptômes. Étaient inclus les patients âgés de 16 ans ou plus, traités par une chimiothérapie anticancéreuse ou par transplantation de cellules souches hématopoïétiques, ayant présenté une neutropénie depuis au moins quatre jours et reçu une antibiothérapie depuis au moins quatre jours avec une fièvre persistante ($T > 38^{\circ}\text{C}$).

Cet essai a concerné 116 centres investigateurs (3 centres français). La durée de l'étude a été de 32 mois (janvier 2000– août 2002). Les caractéristiques démographiques étaient équivalentes dans les deux bras. Les résultats d'efficacité analysés sur le critère principal de jugement en analyse ITM ajustée selon la stratification ont montré une réponse globale favorable comparable dans les deux bras : caspofungine 33,9 % et l'amphotéricine B 33,7%. Le taux de survie sept jours après la fin du traitement est de 92,6 % dans le bras caspofungine et de 89,2 % dans le bras l'amphotéricine B. La toxicité liée au traitement est 4,9 % dans le bras caspofungine et de 8,2 % dans le bras L'amphotéricine B.

Ainsi, la caspofungine a été aussi efficace que L'amphotéricine B dans le traitement antifongique empirique chez les patients neutropéniques fébriles avec une meilleure tolérance sur les critères étudiés.

2.6.4. Traitement prophylactique :[149]

L'efficacité de la caspofungine en traitement prophylactique des infections fongiques invasives a été étudiée dans une étude de phase II monocentrique, randomisée, ouverte chez des patients ayant un traitement d'induction de leucémie aiguë myéloïde (LAM) ou de syndrome myélodysplasique en comparaison à une prophylaxie par itraconazole 200 mg ×2/j. Le taux de succès était de 52 % dans le bras caspofungine et de 51 % dans le bras itraconazole [150]. La caspofungine n'est pas recommandée en prophylaxie primaire des infections fongiques invasives.

2.6.5. Autres indications de la caspofungine :

Zygomycètes :[149]

Les zygomycètes sont résistants à la caspofungine in vitro. En revanche, la cible de la caspofungine, la 1,3-b-glucane synthase est exprimée par *Rhizopus oryzae* et de faibles doses de caspofungine permettent de diminuer la charge fongique d'une infection chez des souris diabétiques [151]. L'association caspofungine et ABLC (complexe lipidique d'amphotéricine B) versus ABLC améliore la survie des souris diabétiques infectées [152]. Une étude rétrospective sur deux centres entre 1994 et 2006 a évalué l'efficacité des bithérapies polyènes et caspofungine versus polyènes dans le traitement des zygomycoses des sinus de l'orbite et/ou du système nerveux central. Le taux de succès était évalué par la survie hors de l'hôpital à 30 jours de la sortie de l'hôpital. Quarante et un cas de zygomycoses ont été étudiés dont 21 avec atteinte rhino-orbitaire et 20 cas d'atteinte rhino-orbitocérébrale, 83 % des patients étaient diabétiques. Quinze patients ont été traités par amphotéricine B déoxycholate, 22 par ABLC (5 mg/kg par jour) dont cinq en association avec de la caspofungine et quatre par amphotéricine B liposomale (5 mg/kg par jour) dont deux en association avec de la caspofungine. Le taux de succès était de 54 % dont 45 % en monothérapie, 100 % chez les patients traités par bithérapie avec la caspofungine [153]. L'adjonction de caspofungine à l'amphotéricine B liposomale pourrait être discutée en seconde ligne dans le traitement des zygomycoses en cas d'échec du traitement de référence.

Autres infections à champignons filamenteux La caspofungine a été utilisée avec succès en association dans des cas d'infections invasives à *Scedosporium* (Steinbach, JCM).

Pneumocystose :^[149]

Quelques observations de succès d'un traitement par caspofungine en association au triméthoprime-sulfaméthoxasone ont été rapportées chez des patients transplantés d'organe ou de moelle ^[154,155].

IV.2.7 Tolérance a la caspofungine : ^[147]

Les études randomisées ont permis d'apprécier la tolérance clinique et biologique de la caspofungine par rapport aux comparateurs l'amphotéricine B et fluconazole.

Dans l'étude ouverte du traitement des Aspergillose invasive, des effets secondaires observés chez 12,2 % des patients et les plus fréquents étaient : fièvre, nausées, vomissements, diarrhées, complications veineuses au niveau de la perfusion, éruption cutanée rare. Des anomalies biologiques étaient observées chez 12 patients (13,6 %) incluant une élévation de la protéinurie, de l'éosinophilie, des transaminases ^[136]. Aucun patient ne sont sorti de l'étude pour effet indésirable grave.

Les effets secondaires de la caspofungine et du fluconazole étaient équivalents dans le traitement des candidoses oropharyngées et œsophagiennes, mises à part des irritations veineuses au point de perfusion et des céphalées plus fréquentes dans le groupe caspofungine. De même, aucun effet secondaire grave n'a été noté dans une étude multicentrique, randomisée, en double insu comparant la caspofungine et l'amphotéricine B dans le traitement de l'œsophagite à *Candida spp.* (128 patients). Une élévation de la créatinémie est observée chez huit patients dans le groupe l'amphotéricine B contre un patient dans le groupe caspofungine ^[40]. Des réactions fébriles ont été notées chez 69%des patients sous amphotéricine B contre 21 à 26 % pour la caspofungine en fonction de la posologie (50 mg/70 mg). Toutefois, cet effet secondaire n'a pas été observé dans les autres études citées dans cet article.

Il est rapporté dans la littérature une thrombopénie sévère réversible sous caspofungine et un effet paradoxal de la CAS avec réduction de son activité sur *C. albicans* si cette dernière est utilisée à fortes concentrations ^[131].

1-Effets indésirables :

Effets indésirables rapportés dans les études cliniques (< 5 %) ^[89] :

Les effets indésirables d'importance clinique, peu importe leur lien de causalité et leur fréquence, qui sont survenus dans ces études, sont présentés ci-dessous :

-Troubles du système sanguin et lymphatique : anémie, coagulopathie, neutropénie fébrile, neutropénie, thrombopénie.

-Troubles cardiaques : arythmie, fibrillation auriculaire, bradycardie, arrêt cardiaque, infarctus du myocarde, tachycardie.

-Troubles gastro-intestinaux : distension abdominale, douleur dans le haut de l'abdomen, constipation, dyspepsie.

-Troubles généraux et réactions au site d'administration : asthénie, fatigue, douleur, prurit ou enflure au point d'injection, inflammation des muqueuses, œdème.

-Troubles hépatobiliaires : insuffisance hépatique, hépatomégalie, hépatotoxicité, hyperbilirubinémie, ictère.

-Troubles du système immunitaire : bactériémie, sepsis, infection des voies urinaires.

-Troubles du métabolisme et de la nutrition : anorexie, diminution de l'appétit, surcharge liquidienne, hypomagnésémie, hypercalcémie, hyperglycémie, hypokaliémie.

-Troubles musculosquelettiques et des tissus conjonctifs : arthralgie, douleur dorsale, douleur au niveau des extrémités.

-Troubles du système nerveux : convulsions, étourdissements, somnolence, tremblements.

-Troubles psychiatriques : anxiété, confusion, dépression, insomnie.

-Troubles rénaux et urinaires : hématurie, insuffisance rénale Troubles respiratoires, thoraciques et médiastinaux : dyspnée, épistaxis, hypoxie, tachypnée.

-Troubles de la peau et du tissu sous-cutané : érythème, pétéchies, lésion cutanée, urticaire

-Troubles vasculaires : bouffées vasomotrices, hypertension, phlébite.

Effets indésirables rapportés après la commercialisation du produit ^[89] :

En plus des effets indésirables signalés dans le cadre des études cliniques, les effets suivants ont été rapportés depuis la commercialisation de CANCIDAS®. Comme ces effets sont rapportés de manière spontanée par une population de patients de taille indéterminée, il est

impossible d'estimer leur fréquence. Les effets suivants sont présentés en raison de leur gravité, de la fréquence des rapports, du lien de causalité possible avec CANCIDAS® ou d'une association de ces facteurs.

Les effets indésirables suivants ont été rapportés depuis la commercialisation de CANCIDAS® :

-Troubles du système immunitaire et allergies : œdème angioneurotique.

-Troubles gastro-intestinaux : pancréatite.

-Troubles hépatobiliaires : nécrose hépatique, rares cas de dysfonction hépatique.

-Troubles du métabolisme et de la nutrition : hypercalcémie.

-Troubles rénaux et urinaires : dysfonction rénale d'importance clinique.

-Troubles de la peau et du tissu sous-cutané : érythème polymorphe, syndrome de Stevens-Johnson, exfoliation de la peau, épidermolyse bulleuse toxique.

-Troubles généraux et réactions au site d'administration : enflure et œdème périphérique.

Des cas de réaction défavorable hépatobiliaire ont été rapportés après la commercialisation de CANCIDAS® chez des enfants présentant un état médical sous-jacent grave.

2. Contre-indications :

Hypersensibilité à la caspofungine ou à l'un des excipients.

➤ Données disponibles dans la grossesse

-Etat des connaissances

o Il n'y a pas de donnée publiée chez des femmes enceintes exposées à la caspofungine mais aucun élément inquiétant n'a été signalé à ce jour.

o Les études de tératogenèse chez l'animal sont insuffisantes. ^[156]

-En pratique

• Traiter une femme enceinte :

o On préférera, en fonction des indications, l'amphotéricine B (Fungizone®, Ambisome®) ou l'itraconazole (Sporanox®), antifongiques systémiques injectable mieux connus chez la femme enceinte quel que soit le terme de la grossesse.

o En cas d'inefficacité ou de mauvaise tolérance des alternatives proposées, et en raison de la gravité des pathologies traitées, l'utilisation de la caspofungine pourra éventuellement être envisagée, de préférence après le 1er trimestre de grossesse.

o En cas d'exposition à la caspofungine, en particulier au 1er trimestre, envisager une surveillance échographique fœtale de bonne qualité.

- **Découverte d'une grossesse pendant le traitement :**

o Ne pas inquiéter la patiente quant au risque malformatif éventuel de la caspofungine.

o Envisager une surveillance échographique fœtale de bonne qualité, en particulier en cas d'exposition au 1er trimestre de grossesse.

o Si un antifongique systémique injectable doit être maintenu :

On préférera si possible l'amphotéricine B (Fungizone®, Ambisome®) ou l'itraconazole (Sporanox®) mieux connus quel que soit le terme de la grossesse.

En cas d'inefficacité ou de mauvaise tolérance des alternatives proposées, et en raison de la gravité des pathologies traitées, l'utilisation de la caspofungine pourra éventuellement être envisagée, de préférence après le 1er trimestre de grossesse, et moyennant une échographie fœtale de bonne qualité.

- **Données disponibles dans l'allaitement :**

Il n'y a pas de donnée publiée sur caspofungine et allaitement. Il est donc préférable d'éviter d'allaiter en cas de traitement maternel par caspofungine. ^[156]

IV.2.8 Données pharmaco-économiques :

Le coût du traitement est un élément important dans la stratégie thérapeutique. Les coûts journaliers approximatifs sont représentés dans la Figure 23.

Il ressort que l'amphotéricine B de loin reste le traitement le moins onéreux. Cela plaide en faveur de son utilisation malgré sa toxicité, dans la conférence de consensus française de 2004^[157].

Le coût du traitement par fluconazole est nettement plus élevé mais peut se justifier en vue du bénéfice attendu en termes d'innocuité.

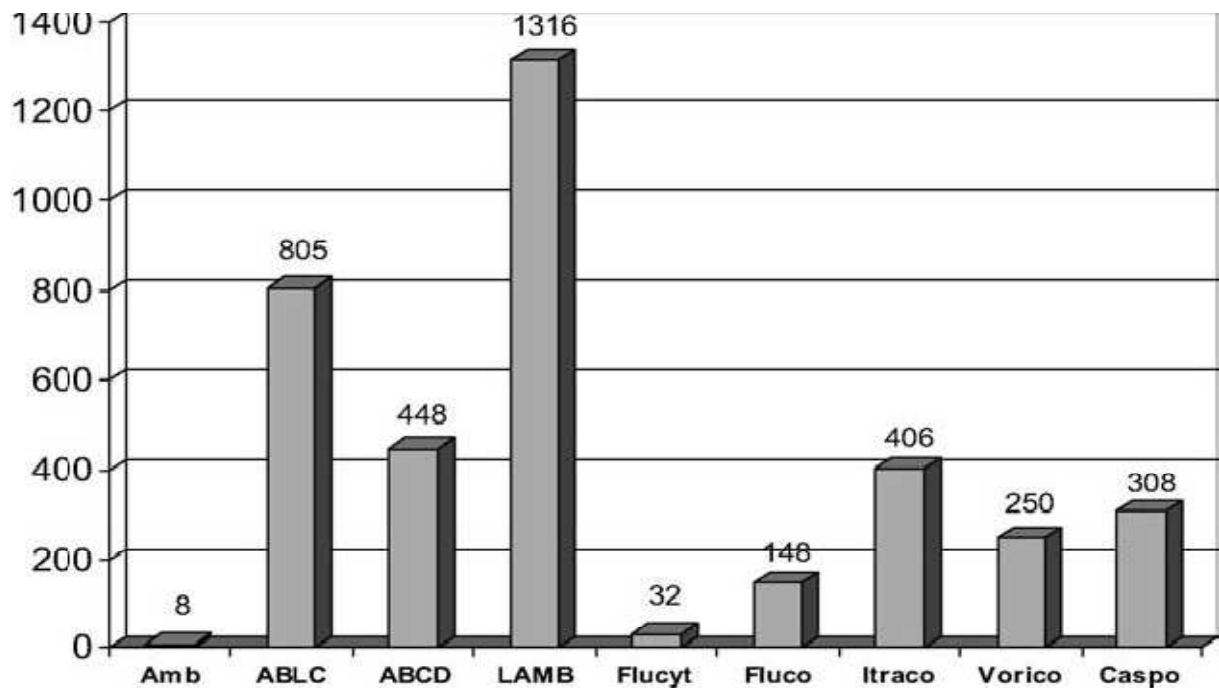


Figure 23 : Coûts journaliers comparés des traitements antifongiques (\$). [158]

Le voriconazole et la caspofungine coûtent approximativement trois fois plus cher mais la résistance au fluconazole peut justifier leur utilisation.

Enfin, le prix des formes lipidiques se place bien au-dessus (jusqu'à 90 fois plus cher que l'amphotéricine B), pour un bénéfice par rapport aux nouveaux azolés et aux échinocandines qui n'est pas évident.

IV.3 Résistances :

1. Définition :

La résistance peut être définie comme une diminution de la sensibilité à un antifongique, mesurée in vitro par une méthode standardisée.

On mesure le plus souvent la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice=la Plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum / Témoin)

2. Types de résistance :

Tout comme chez les bactéries, il existe deux types de résistances chez les levures :

- ❖ les résistances naturelles (primaires, caractère d'espèce ; par exemple, *C. krusei* et fluconazole).
- ❖ les résistances acquises (secondaires, caractère de souche, résultant de mutations et de la surexpression de certains gènes). . Ces résistances acquises surviennent rarement, mais principalement après l'exposition à un antifongique, et peuvent correspondre à un état D'adaptation transitoire ou définitif. ^[159]

La résistance naturelle caractérise toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre et peut être due à une absence de concentration de l'antifongique dans la cellule ou à une faible affinité de l'antibiotique pour sa cible.

La résistance naturelle (de faible niveau) de *Candida krusei* au fluconazole s'explique par l'existence, chez cette espèce, d'une pompe d'efflux pour laquelle le fluconazole est un bon substrat, l'efflux étant supérieur à celui observé chez *Candida albicans* ; de plus la cible de *Candida krusei* a une affinité plus faible pour le fluconazole^[160]. L'emploi de cet antifongique peut entraîner le remplacement de l'espèce endogène sensible, *Candida albicans*, par une espèce résistante du même genre. Ce phénomène est particulièrement observé chez les individus immunodéprimés.

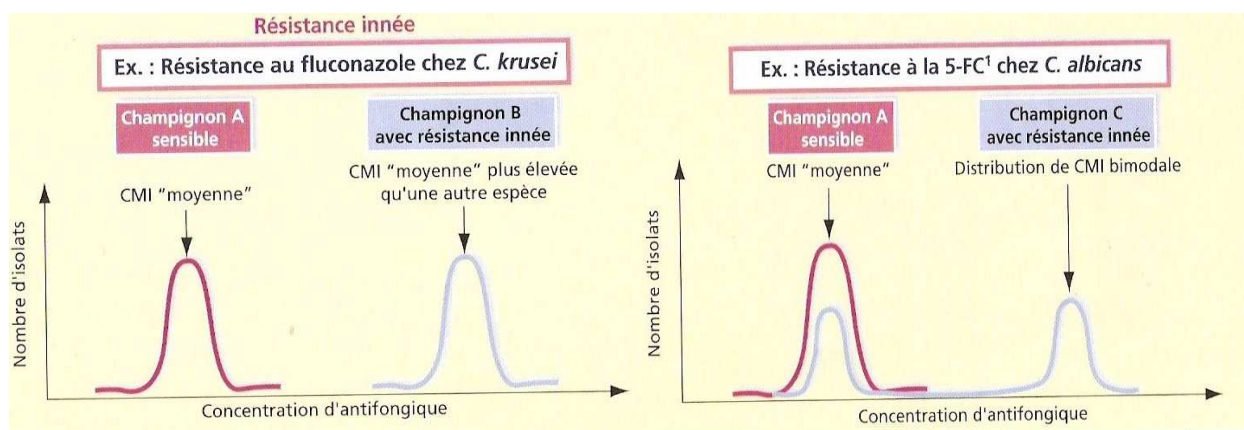


Figure 24 : Résistance innée chez *C.krusei* au fluconazole et *C.albicans* à la 5flucytosine

Chez *Cryptococcus neoformans*, une résistance hétérogène au fluconazole est décrite [161] :

- la majeure partie des cellules d'une population sont sensibles et une sous population est résistante ;
- la population résistante peut s'adapter à des concentrations fortes de fluconazole. C'est ce phénomène réversible qui se produit en présence de fluconazole, donc au cours d'un traitement.
- Les cellules sensibles ne peuvent pas être purifiées à partir de la souche hétéro résistante .Le mécanisme de cette résistance n'est pas connu.

Une résistance acquise fait suite à une modification génétique. Une souche devient résistante lorsque, appartenant à une espèce naturellement sensible à un antifongique, elle est apte à tolérer des concentrations de cet antifongique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance in vitro de la majorité des souches dites sensibles de la même espèce.

La résistance acquise, au sens microbiologique, se traduit par une augmentation des CMI. Au sens clinique, la résistance acquise se définit comme un échec thérapeutique lors d'un traitement dans les conditions usuelles (dose, fréquence, voie d'administration...). Les deux définitions ne sont pas obligatoirement superposables : une faible augmentation des CMI n'entraîne pas obligatoirement la catégorisation clinique de la souche comme résistante. Un échec thérapeutique peut avoir d'autres causes que l'acquisition d'un mécanisme de résistance par la souche responsable de la mycose : l'activité uniquement fongistatique de l'antifongique peut en être la cause mais c'est le statut immunitaire de l'hôte qui joue un rôle prépondérant dans l'évolution de la maladie sous traitement. Le site infectieux (organes «séquestrés» comme le cerveau ou l'oeil), la présence d'abcès, l'observance du traitement, souvent de longue durée, interviennent aussi.

La résistance acquise doit être distinguée de la résistance adaptative qui est liée à des modifications physiologiques transitoires. Suite à un premier contact avec l'antifongique, la CMI augmente puis elle diminue en l'absence de l'antibiotique.

L'augmentation de l'expression de la pompe d'efflux Afu MDR4 en présence de voriconazole a été démontrée [162].

Le phénomène d'Eagle ou effet paradoxal, c'est-à-dire l'aptitude de levures et de moisissures à croître en présence de concentrations d'échinocandines supérieures aux CMI, correspond à une résistance adaptative. Chez *Candida albicans*, l'expression de certains gènes est modifiée en présence de caspofungine ^[163]. Le phénomène d'Eagle se traduit chez *Candida spp.* par des modifications morphologiques, la disparition de la couche de β -1,3 glucane de la paroi et l'accumulation de chitine ^[164].

Les cellules de mycètes participant à des biofilms, des communautés de micro-organismes adhérents entre eux et à un support endogène ou exogène (prothèse, cathéter...) et produisant une matrice extracellulaire de polymères sont plus résistantes que les cellules planctoniques.

Pour différentes espèces de *Candida* et pour *Aspergillus fumigatus*, les CMI de voriconazole, d'échinocandine et d'amphotéricine B pour des cellules planctoniques sont inférieures aux CMI pour des cellules issues de biofilms ^[165].

Au cours de leur croissance, les champignons filamenteux et dimorphiques présentent des morphotypes différents, correspondant chacun à un stade de leur développement. Les conidies d'*Aspergillus fumigatus* (formes cellulaires utilisées pour évaluer l'activité in vitro d'un antifongique) sont plus sensibles au voriconazole et à la caspofungine que les structures filamenteuses multicellulaires, ce qui peut expliquer la plus ou moins grande efficacité des traitements ; l'amphotéricine B présente l'avantage de conserver son activité sur les différents morphotypes. ^[166]

❖ La multi résistance médiée par les pompes à Efflux : ^[167]

La résistance acquise par efflux transmembranaires a été découverte auparavant. Les pompes à efflux peuvent donner lieu à des phénotypes de résistance croisée aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. Le mécanisme de ce type de résistance est corrélé à la surexpression des pompes à efflux qui sont des transporteurs membranaires entraînant une excrétion de molécules toxiques. En effet, les pompes d'efflux peuvent être classées selon la source d'énergie nécessaire à leurs changements de conformation lors du transport, fournie soit par dissipation d'un gradient de protons, proton motive force (PMF) ou d'ions Na⁺, soit par hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP).

➤ Augmentation de l'activité des pompes d'efflux :

Plusieurs mécanismes essentiels peuvent expliquer l'augmentation de l'activité des pompes d'efflux. De nombreuses études ont montré que la régulation de l'activité des pompes d'efflux se fait essentiellement au niveau transcriptionnel.

Dans de nombreux cas, les gènes des pompes d'efflux sont organisés en opéron dont l'expression est contrôlée par un régulateur local. Cependant, la régulation transcriptionnelle peut aussi se faire à un niveau global, notamment par des systèmes à deux composants. Pour certaines levures pathogènes, comme *C. albicans* et *C. glabrata*, la surexpression des pompes d'efflux représente le mécanisme majeur de résistance aux antifongiques. Cette augmentation de l'activité des pompes d'efflux est la conséquence de mutations au niveau des facteurs de transcription qui contrôlent l'expression des transporteurs.

L'interaction entre la résistance aux azolés et l'efflux a été largement étudiée pour le fluconazole chez *C. albicans*.

3. Causes des résistances aux antifongiques :

La résistance peut provenir :

✓ D'un défaut de transport ou de pénétration de l'antifongique à l'intérieur de la cellule fongique. Un des mécanismes de résistance au 5flucytosine est l'inactivation de la cytosine perméase, codée par le gène *FCY2* et qui permet l'import de la flucytosine dans la cellule^[168,169].

✓ D'un défaut de transformation de l'antifongique en forme active toxique. Des mutations au niveau des gènes nécessaires au métabolisme de la 5flucytosine, comme celui de la cytosine désaminase (*FCY1*), empêchent sa transformation et confèrent à la levure une résistance totale à la 5flucytosine^[169,170].

✓ D'une surproduction de la cible cellulaire de l'antifongique. Ce type de mécanisme de résistance est fréquent : la surexpression des gènes de la thymidylate synthase ou de la C14-déméthylase (*ERG11*) aboutissent respectivement à une résistance à la 5flucytosine ou aux azolés^[171]. La surexpression du gène *ERG11* peut être la conséquence de l'action d'un facteur de transcription,^[172] ou bien d'un mécanisme d'aneuploïdie et de formation d'isochromosome chez *C. albicans*^[173].

✓ D'une modification de la cible cellulaire de l'antifongique, qui conduit à la diminution de son affinité pour l'antifongique. Certaines mutations ponctuelles du gène *ERG11* peuvent se traduire par la substitution d'acides aminés importants pour la structure tridimensionnelle de la protéine et conduire à la diminution de l'affinité de la protéine pour l'antifongique azolé^[170].

✓ D'une disparition de la cible et de son remplacement par le recrutement ou le détournement d'un autre métabolite. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la résistance à l'amphotéricine B. Dans un premier temps, la voie de biosynthèse de l'ergostérol serait bloquée afin de soustraire la cible à l'action de l'antifongique. Dans un deuxième temps, l'ergostérol serait remplacé dans les membranes par d'autres stérols viables. Cependant, une mutation du gène *ERG3* (qui code pour une "5,6 désaturase") pourrait conférer à elle seule une résistance croisée à l'amphotéricine B et aux azolés, en empêchant la formation de 14méthyl- 3,6- diol toxique et en permettant l'accumulation de 14-méthyl-fécostérol, un stérol méthylé qui pourrait suppléer l'ergostérol^[174]. Ce mécanisme a été évoqué chez *C. albicans*^[175,176]. Plus récemment, il a été montré qu'un isolat clinique de *C. albicans* possédant une mutation dans les gènes *ERG11* et *ERG5* (C22 désaturase) avait une résistance croisée au fluconazole et à l'amphotéricine B^[177].

✓ D'un efflux actif de l'antifongique. Deux principales familles de transporteurs sont impliquées dans la résistance aux azolés chez les levures. Elles se distinguent par l'énergie nécessaire à leur fonctionnement et par les différents substrats antifongiques qui peuvent les emprunter. Les transporteurs de type MF (Major Facilitator), codés par le gène *MDR1* chez *C. albicans*^[178], fonctionnent à l'aide d'un gradient électrochimique de protons. Ces pompes ont parmi les azolés un seul substrat, le fluconazole. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette), codés par les gènes *CDR1* et *CDR2* chez *C. albicans*, utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour exporter hors du cytoplasme la plupart des antifongiques azolés^[179,180]. En situation normale, les transporteurs Mdr ou Cdr sont exprimés à un niveau de base dans la cellule fongique, même quand elle n'est pas exposée à un antifongique. La résistance résulte de la surexpression des gènes et de

l'accumulation des pompes dans la membrane. Cette surexpression est sous le contrôle de facteurs de transcription, comme *TAC1*.

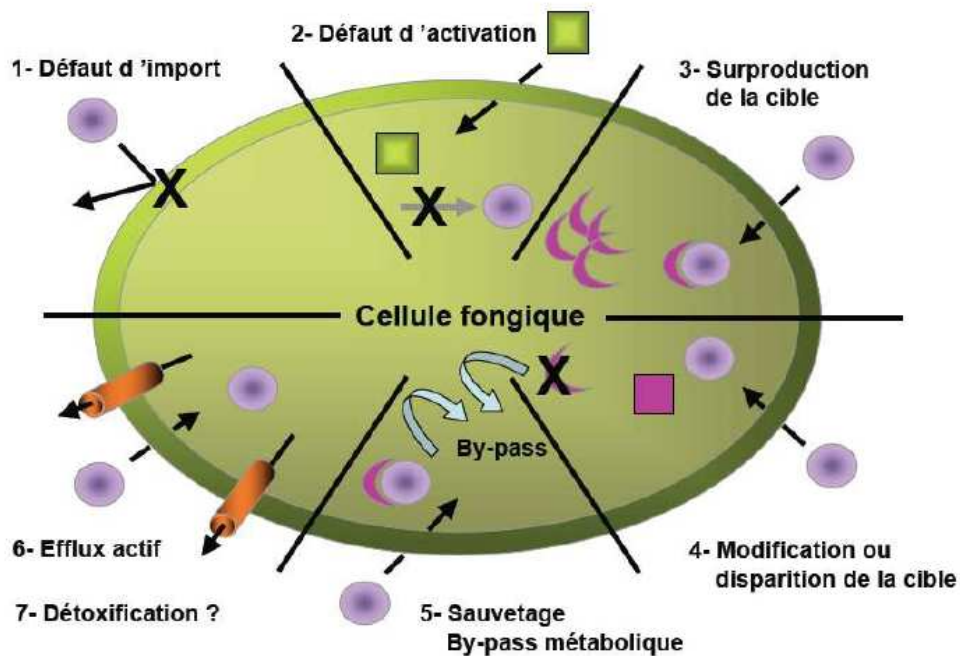


Figure 25 : Mécanismes cellulaires de résistance aux antifongiques.

IV.3.2 Mécanismes de résistance aux échinocandines :

Depuis son introduction en clinique en 2001, il n'y a pas d'émergence de résistances décrites à cette classe médicamenteuse, mais uniquement des échecs de traitement par caspofungine à partir de 2005. Les différences de sensibilité aux échinocandines et/ou les échecs thérapeutiques peuvent relever de différents phénomènes :

✓ Polymorphisme dans le gène *FKS 1* ou *FKS 2* (gènes codant pour la β (1-3) D-glucane synthase) : *C.parapsilosis* et *C.guilliermondii* possèdent des mutations ponctuelles dans *FKS1*, d'où leur sensibilité moindre. Les 3 membres du complexe *parapsilosis* possèdent eux aussi une mutation ponctuelle en position 606 dans *FKS1* entraînant le remplacement d'une proline en alanine, et *C.guilliermondii* possède quant à lui 3 mutations ponctuelles dans une région « hot-spot » de *FKS1* (région à l'intérieur d'un gène où les mutations sont fréquentes). Concernant *C.glabrata*, les CMI plus élevées aux échinocandines sont la

conséquence de mutations dans *FKS2*.^[182] Ces différentes mutations entraînent une fixation diminuée des échinocandines à leur cible cellulaire : les β (1-3) D-glucane synthase.

✓ Augmentation de la synthèse des chitines : la paroi fongique est une structure dynamique, et l'inhibition de la synthèse d'un des composants (β (1-3) D-glucane) peut entraîner l'augmentation de la synthèse d'un autre composant, en particulier celle de la chitine. Une pré exposition aux échinocandines peut induire ce phénomène de 'sauvetage'.^[183,184]

✓ Phénomène paradoxal d'Eagle : Effet observé *in vitro* dont la corrélation *in vivo* est controversée, il consiste en une absence de pousse à des concentrations faibles mais une pousse fongique à des concentrations plus élevées en échinocandines (8 à 32 mg/l). Ce phénomène observé est différent selon les espèces étudiées, et la méthode de détermination de la sensibilité aux antifongiques joue grandement dans la mise en évidence de cet effet (Méthode CLSI vs EUCAST).^[183]

Selected cases of echinocandin therapy failure.

Clinical setting	Pathogen	Echinocandin therapy & duration	CAS MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	FKS1 mutation	Reference
Oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS (2 courses)	>64	ND	Hernandez et al. (2004)
Prosthetic aortic valve endocarditis	<i>C. parapsilosis</i>	CAS + FCZ for 6 weeks	>16	ND	Moudgal et al. (2005)
Disseminated (abdominal surgery)	<i>C. krusei</i>	CAS for 15 days	2	ND	Pelletier et al. (2005)
Disseminated	<i>C. albicans</i>	CAS	4	S645F	Park et al. (2005)
Candidaemia	<i>C. krusei</i>	CAS	32	R1361G	Park et al. (2005)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS, AMB, VRC	>8	S633P	Dodgson et al. (2005)
Azole refractory oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS then VRC for total of 10 months	2	S645F, R1361H	Laverdiere et al. (2006)
Recurrent oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS, 2 courses with dose escalation	8	S645P (homo)	Miller et al. (2006)
Candidaemia (Acute Myeloid Leukaemia)	<i>C. krusei</i>	CAS for 17 days	8	F655C (Het)	Hakki et al. (2006) and Kahn et al. (2007)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS (3 courses)	>16	ND	Daneman et al. (2006)
Candidaemia	<i>C. parapsilosis</i>	CAS (+phenytoin)	0.25	ND	Cheung et al. (2006)
Not reported	<i>C. glabrata</i>	Not reported	4	F659V of Fks2	Katiyar et al. (2006)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	VRC, CAS for 136 days	>8	ND	Krogh-Madsen et al. (2006)
Oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS, 2 courses	2	F641S	Baixench et al. (2007)
Oesophagitis (AML)	<i>C. tropicalis</i>	CAS	4	ND	Pasquale et al. (2008)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS	>4	D632E	Clery et al. (2008)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS for 61 days	8	F659V of Fks2	Thompson III et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. parapsilosis</i>	CAS for 41 days	1	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. parapsilosis</i>	CAS for 50 days	1	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. guilliermondii</i>	CAS for 26 days	0.5	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (AML)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 16 days	4	S645P (Het)	Garcia-Efron et al. (2008b)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 44 days	4	S645P (Het)	Garcia-Efron et al. (2008b)
Candidaemia (cancer)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 21 days	1	F641L (homo)	Garcia-Efron et al. (2008b)
Disseminated	<i>C. albicans</i>	CAS for 34 days	1 (>32 Etest)	S645P	Arendrup et al. (2009)
Not reported	<i>C. glabrata</i> ^a	CAS therapy or prophylaxis	>2	Fks1,2 ^a	Garcia-Efron et al. (2009a)

^a Twelve different clinical isolates reported with various Fks1, Fks2 point mutations.

Figure 26 : Cas décrits d'échecs de traitement par échinocandines
(Source: Walker, fungal genet biol, 2010)

IV.4 Données épidémiologiques : ^[185]

Les candidoses invasives représentent un problème de plus en plus fréquent chez les patients hospitalisés, *Candida sp.* Etant le quatrième pathogène isolé, aux États-Unis, dans les hémocultures réalisées dans un contexte d'infection nosocomiale.

Il s'est progressivement produit une modification de la répartition des différentes espèces de *Candida*, avec l'émergence d'espèces non-albicans, notamment *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*. Certaines de ces espèces peuvent être résistantes ou de sensibilité diminuée aux différentes classes d'antifongiques, et donc être responsables d'un retard à l'administration d'un traitement adapté.

Au cours des dernières années, de nouveaux antifongiques sont apparus, et des recommandations sur la prise en charge des candidoses invasives ont été édictées. Malgré cela, les candidémies ont toujours un impact majeur sur la mortalité et la morbidité, ainsi que sur la durée et le coût de l'hospitalisation. Il est donc primordial de surveiller prospectivement l'épidémiologie des candidémies, à la fois aux échelons national et international, mais aussi sur un plan local, des différences importantes pouvant exister entre différentes régions. Ces études de surveillance permettent de connaître précisément la répartition des espèces fongiques impliquées et leur sensibilité aux différents antifongiques, dans le but d'adapter au mieux la prise en charge initiale de ces infections au pronostic sombre.

Une étude prospective observationnelle dans l'Ouest de la France, a été conduite de janvier à décembre 2004 pour afin d'évaluer l'épidémiologie des candidémies dans sept centres hospitaliers universitaires et dix centres hospitaliers non universitaires, membres du Groupe d'épidémiologie et de recherche en infectiologie clinique du centre-ouest (GERICCO). Tous les patients présentant une candidémie ont été inclus, une épisode de candidémie étant défini par l'isolement d'une levure du genre *Candida* à partir d'au moins une hémoculture. Les patients atteints de candidose invasive sans fongémie associée ont été exclus de l'étude. Dans chaque centre hospitalier, un biologiste référent (mycologue ou bactériologiste) recensait les candidémies et les signalait à un clinicien référent, chargé du recueil des données.

Le laboratoire de parasitologie-mycologie (ou le laboratoire de bactériologie le cas échéant) de chaque centre hospitalier réalisait l'identification de la souche responsable de l'épisode de candidémie.

La répartition des différentes espèces isolées est détaillée dans la Figure 27. *C.albicans* était isolé dans 54,9% des cas, *C.glabrata* dans 18,7% des cas, *C.parapsilosis* dans 12,9% des cas, *C.tropicalis* dans 4,7% des cas, *C.krusei* dans 4,1% des cas, *C.lusitaniae* dans 1,6% des cas, *C.kefyr* dans 1% des cas, et *C.guilliermondii* dans 0,5% des cas. Une autre espèce de *Candida* était identifiée dans 1,6% des cas. Chez sept malades, plusieurs espèces étaient isolées : *C.albicans* et *C.glabrata* ($n = 3$), *C.albicans* et *C.tropicalis* ($n = 2$), *C.albicans* et *C.parapsilosis* ($n = 1$), *C.glabrata* et *C.krusei* ($n = 1$). Aucun patient n'a présenté plusieurs épisodes distincts de candidémies durant la période d'étude. Vingt et un patients, correspondant à 22 espèces fongiques, recevaient une prophylaxie antifongique au moment de la candidémie.

Chez ces patients, les espèces non albicans étaient prédominantes (59% des souches), sans que l'on ne constate de franche émergence d'espèces réputées moins sensibles aux antifongiques (*C.glabrata* et *C.krusei* représentant au total 23% des espèces isolées).

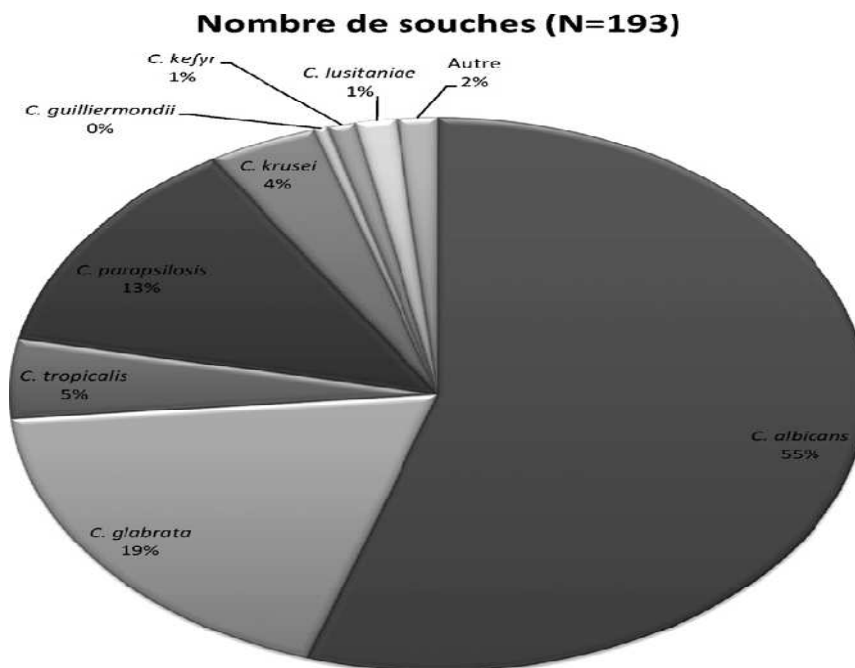


Figure 27 . Répartition des espèces de *Candida* isolées chez les 186 patients.

L'émergence de *Candida* sp. Comme agent responsable d'infections invasives est un phénomène relativement récent, apparu dans les années 1950. Actuellement, *Candida* sp. représente selon les auteurs le quatrième ou cinquième agent retrouvé dans les septicémies nosocomiales.

Cette étude est la première à s'intéresser spécifiquement à l'épidémiologie des candidémies dans l'Ouest de la France. Durant la période de surveillance, 193 souches de *Candida* sp ont été isolées chez 186 patients. *C. albicans* était l'espèce la plus fréquemment responsable de fongémie (55 %), mais 45% des cas étaient représentés par des espèces non albicans. De nombreuses études rapportent des données comparables, les auteurs notant la part de plus en plus importante des candidoses invasives liées aux espèces non albicans. *C. glabrata* et *C. parapsilosis* venaient respectivement en deuxième et troisième positions. Ces résultats sont un peu différents de ce qui était retrouvé dans une étude française publiée en 2002, où *C. parapsilosis* venait en deuxième position, et *C. glabrata* en troisième ; de même, plusieurs études européennes sur l'épidémiologie des candidémies constataient une prépondérance de *C. parapsilosis* parmi les espèces non albicans. En Amérique latine, *C. parapsilosis* est également prédominant, au même titre que *C. tropicalis*, qui dans notre étude ne représentait que 4,7% des épisodes de candidémies, alors que *C. glabrata* est peu représenté, sans que ces différences d'épidémiologie ne soient très bien comprises. Néanmoins, de vastes programmes internationaux de surveillance des candidoses invasives ainsi que d'autres études européennes retrouvent *C. glabrata* en deuxième position, derrière *C. albicans*. Aux États-Unis, *C. glabrata* est la seule espèce de *Candida* dont l'incidence en tant qu'agent pathogène isolé d'hémocultures augmente régulièrement, représentant actuellement 20 à 24% des candidémies. Dans notre série, *C. krusei* représentait 4,1% des souches isolées ; cette valeur est similaire à ce qui est décrit dans la littérature, cette espèce fongique étant responsable d'une faible proportion des candidoses invasives.

De nombreux facteurs de risque de candidoses invasives ont été identifiés, notamment l'exposition à des antibiotiques à large spectre, les chimiothérapies, les cathéters centraux, la colonisation à *Candida* spp. La nutrition parentérale, la chirurgie récente (notamment gastro-intestinale), la neutropénie, l'insuffisance rénale, l'hémodialyse. Une des raisons à évoquer est

probablement l'utilisation large des prophylaxies antifongiques chez les patients d'hématologie, notamment pour les inductions de leucémie aiguë et les greffes de moelle osseuse, qui a permis de diminuer drastiquement l'incidence des candidoses invasives. Toutefois, la prophylaxie antifongique peut également être responsable d'un sous diagnostic des candidoses invasives, puisqu'il a été montré dans une série autopsique qu'elle diminuait la sensibilité des hémocultures, qui sont souvent le seul moyen de faire le diagnostic de ces pathologies. Par ailleurs, près de la moitié des patients (43 %) étaient hospitalisés dans des services de médecine ou de chirurgie, confirmant le changement d'épidémiologie des candidémies.

De manière surprenante, aucun de nos patients n'était séropositif pour le VIH. En effet, si les infections invasives à *Candida sp.* ne font pas partie des principales infections opportunistes chez ces patients, certaines études retrouvent une prévalence de patients séropositifs pour le VIH pouvant aller jusqu'à 8% au cours des candidémies, la plupart d'entre eux étant au stade SIDA.

La présence d'un cathéter veineux central est un facteur de risque bien identifié de candidémie. Dans notre série, les trois-quarts des patients étaient porteurs de voies veineuses centrales, qui étaient fréquemment infectées, puisque 58% des 77 cathéters ôtés et mis en culture étaient positifs à la même espèce de *Candida* que les hémocultures. En analyse univariée et en analyse multivariée, l'ablation du cathéter diminuait significativement le risque de mortalité. Cette amélioration du pronostic des candidémies en cas d'ablation de la voie centrale a été rapportée dans d'autres études, et les recommandations américaines comme les recommandations françaises incitent fortement au retrait du cathéter en cas de candidémie. Toutefois, les raisons du maintien ou de l'ablation du cathéter ne faisaient pas partie des données recueillies dans notre étude ; on ne peut donc exclure l'existence de biais, et il est possible que les patients chez qui la voie veineuse a été laissée en place présentaient d'autres critères de mauvais pronostic non relevés dans cette étude.

La mortalité globale à j30 chez nos patients était de presque 49 %, ce qui est proche des valeurs habituellement rapportées dans la littérature, qui vont de 46 à 75%. La mortalité attribuable n'était pas quantifiable, en l'absence d'appariement de nos patients avec des sujets

contrôles ; cependant, la mortalité attribuable des candidoses invasives rapportée dans des cohortes rétrospectives va de 10 à 49%. Hormis l'ablation du cathéter central, les paramètres statistiquement associés à une surmortalité dans notre série en analyse univariée étaient l'âge, l'existence d'un choc septique et l'hémodialyse ; en analyse multivariée, seuls l'âge et le choc septique ressortaient. D'autres études ont pu corrélérer la mortalité à des scores de gravité, notamment au score APACHE II, mais ces données n'étaient pas recueillies dans notre étude, qui n'était pas limitée aux services de réanimation. Par ailleurs, la mortalité de nos patients n'était pas significativement influencée par l'espèce fongique, probablement en raison d'effectifs trop petits ; en effet, des études ont suggéré que certaines espèces, notamment *C.parapsilosis*, étaient responsables d'une moindre mortalité.^[185]

Cette étude témoigne de la fréquence des septicémies à *C.andida sp.* dans les hôpitaux de l'Ouest de la France. Si *C.albicans*, qui demeure largement sensible aux antifongiques, est prédominant, l'émergence de *C.glabrata* doit inciter à la prudence dans le choix du traitement initial, en raison de sa résistance potentielle à la famille des azolés. Il semble indispensable de poursuivre la surveillance épidémiologique des infections invasives à *Candida sp.* afin de détecter rapidement toute modification de l'épidémiologie et de la sensibilité aux antifongiques de ces pathogènes responsables d'une lourde morbidité

IV.4.1 Epidémiologie des résistances aux antifongiques de *Candida* :

1. Résistances aux échinocandines :

Les échinocandines (micafungine, anidulafungine et caspofungine) occupent une place croissante dans le traitement de première ligne des candidoses disséminées. *Candida glabrata* est la deuxième espèce la plus fréquente dans les infections humaines et souvent résistante aux triazolés. Les propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques des échinocandines ont été étudiées dans un modèle de candidose disséminée péritonéale à *C. glabrata* chez des souris neutropéniques^[186]. Les CMI de la micafungine, de l'anidulafungine et de la caspofungine étaient respectivement de 0,06, 0,03 et 0,5 mg/l.

Les données pharmacocinétiques sont linéaires pour les trois molécules. La vitesse de fongicidie est relativement lente et augmente avec la dose. Les posologies nécessaires pour obtenir un effet antifongique maximal étaient de l'ordre de 5 mg/kg pour la micafungine et la

Caspofungine, plus élevées pour l'anidulafungine pour obtenir le même effet. Les données suggèrent que le traitement des candidoses invasives à *C. glabrata* chez le sujet neutropénique requiert des posologies d'échinocandines plus élevées qu'il n'est habituellement préconisé.

Les paramètres pharmacocinétiques associés au succès du traitement des candidoses invasives par l'anidulafungine sont, à l'état d'équilibre, une aire sous la courbe (ASC)/CMI d'au moins 35 mg/l/h, une concentration plasmatique d'au moins 1 mg/l et un rapport ASC/CMI d'au moins 250 ^[187].

Ces paramètres ont été calculés dans une cohorte de 8 patients en état clinique critique ^[188]. Les résultats montrent que l'ASC était supérieure à la valeur cible dans tous les cas. Un seul patient avait une concentration résiduelle < 1 mg/l. En revanche, le rapport ASC/CMI n'était > 250 chez aucun patient si la CMI était ≥ 1 mg/l, chez 1 sur 8 seulement pour une CMI de 0,5 mg/l et 6 sur 8 pour une CMI de 0,25 mg/l. Les mêmes auteurs ont analysé les paramètres pharmacocinétiques obtenus avec la caspofungine dans une cohorte de 17 patients ^[189]. Ils montrent que le rapport $C_{\max}$ /CMI est supérieur à la cible recommandée de 4 dans tous les cas où la CMI est ≤ 1 mg/l. En revanche, si la CMI est de 2 mg/l, ce résultat n'est obtenu que pour moins de 1 patient sur 5. Le rapport ASC/CMI est > 250 chez 71 % et 12 % des patients, respectivement pour des CMI de 0,25 et 0,5 mg/l. La caspofungine fait partie des recommandations de traitement de première ligne des infections candidémiques chez le sujet neutropénique, tout particulièrement en cas d'exposition antérieure au fluconazole en prophylaxie. Des cas d'infections à souches de *Candida* résistantes à la caspofungine ont été décrits. Dans le cadre d'un programme de surveillance des infections fongiques regroupant un ensemble d'hôpitaux parisiens, une étude cas-témoin été entreprise pour déterminer les facteurs de risque d'infection à *Candida spp.* de sensibilité réduite à la caspofungine (CSRC). L'étude porte sur 51 cas avec CSRC et 102 témoins appariés pour l'établissement d'origine et l'année d'isolement de la souche, entre octobre 2002 et février 2010 ^[190].

L'analyse uni factorielle fait ressortir comme facteurs de risque de CSRC l'exposition à la caspofungine dans les 30 jours précédents et l'âge supérieur à 65 ans. L'analyse multifactorielle confirme ce résultat, avec un OR de 5,25 pour la caspofungine et de 3,27 pour l'âge. Les études cliniques ont montré que la prophylaxie des infections invasives à

Aspergillus fumigatus (AF) par le posaconazole est très efficace, malgré des concentrations sériques faibles. Cette discordance pourrait être due à des concentrations intracellulaires élevées, notamment dans les cellules épithéliales pulmonaires. Des cellules épithéliales pulmonaires A549 ont été exposées à différentes concentrations de posaconazole avant d'être infectées par AF soit immédiatement, soit de 6 à 48 heures après l'élimination du médicament [191].

Une étude ouverte non comparative de phase IV a évalué l'efficacité et la tolérance d'un schéma thérapeutique baptisé « Switch précoce » pour le traitement de candidémies et de candidoses invasives [192]. Chez les patients répondeurs à un traitement d'attaque d'au moins 5 jours par l'anidulafungine— dose de charge de 200 mg puis 100 mg par jour – un relais était pris par un triazolés per os (fluconazole ou voriconazole). Dix seulement des 294 patients inclus étaient neutropéniques en début de traitement. *C. albicans* était en cause dans 42 % des cas. La durée moyenne de traitement par l'anidulafungine a été de 8,6 jours. Le relais précoce a été effectivement pris chez 56 % des patients, pour une durée moyenne de 9,3 jours avec le fluconazole et 11 jours avec le voriconazole. Le taux global de réponse en fin de traitement (population dite en intention de traiter modifiée, MITT) était de 84 %. La stratégie proposée pourrait permettre d'alléger le traitement des candidémies et des candidoses invasives en diminuant significativement la durée du traitement par voie parentérale.

➤ Émergence de *Candida* résistants aux échinocandines :

En France, jusqu'à maintenant, l'apparition de *Candida* résistants aux échinocandines a été très anecdotique. Pourtant en 2011, nous avons observé sur le seul site hospitalier Pitié-Salpêtrière, l'apparition chez 5 patients de 7 isolats présentant des résistances acquises ayant conduits à des échecs thérapeutiques. Le séquençage du gène *fks* codant pour la production de la beta-glucan synthase a montré l'existence de mutations en lien avec la résistance aux échinocandines.

Alors que le nombre de *Candida* résistants aux azolés a atteint des niveaux limitant l'utilisation de ces molécules dans les candidoses profondes dues à certaines espèces (notamment *Candida glabrata*), l'apparition de souches résistant aux échinocandines doit inciter à une plus grande surveillance épidémiologique de ces résistances ainsi qu'à une

utilisation stricte et rationnelle de cette classe thérapeutique au risque de se trouver dans quelques années face à l'émergence de souches multi-résistantes difficiles à éradiquer.^[193]

2. Résistance de *Candida albicans* à la caspofungine :

A propos d'un cas au CHU de Nantes :

Les auteurs rapportent le cas d'une patiente de 52 ans hospitalisée en février 2011 pour la prise en charge d'une LAM1 non hyperleucocytaire de mauvais pronostic (multiples anomalies du caryotype).

Parmi ses antécédents on retrouvait un diabète de type 2, une obésité et une tuberculose pulmonaire. Dans les suites du traitement d'induction puis de consolidation, cette patiente qui présente par ailleurs une mycose périnéale extensive bénéficiera de trois cures de caspofungine (mars, juin et août) en raison d'épisodes fébriles non expliqués. La prise en charge sera marquée par la découverte au mois d'août d'une fistule recto-vaginale et conduira à une aggravation sur le plan septique et hémorragique. Une biopsie de colon et une biopsie cervicale retrouveront des foyers fongiques profonds. La patiente, en échappement thérapeutique, décèdera quelques jours plus tard, début octobre.

Au cours de ces huit mois, dix isolats de *C. albicans* seront identifiés dans divers prélèvements (selles, LBA et biopsie colique). L'étude, rétrospective, par méthode Etest1, du profil de sensibilité in vitro de ces souches aux antifongiques, mettra clairement en évidence l'émergence rapide d'une résistance à la caspofungine. Ainsi, alors que la première souche de *C. albicans* isolée le lendemain de l'introduction du traitement antifongique était sensible à la caspofungine (CMI = 0,19 mg/mL), une souche résistante sera mise en évidence dès le 15ème jour de traitement (CMI = 3 mg/mL). Une nouvelle augmentation de la CMI sera constatée au cours de la troisième cure de caspofungine (CMI > 32 mg/mL). Les profils de sensibilité seront confirmés par méthode EUCAST (CNRMA). Le séquençage de la région HS1 du gène FKS1, permettra de corrélérer l'augmentation progressive des CMIs à l'apparition, d'abord à l'état hétérozygote puis homozygote, de la substitution S645P, mutation impliquée dans la résistance aux échinocandines. L'étude des concentrations sériques de caspofungine, ne montrera pas de sous dosage durant les trois séquences thérapeutiques. L'acquisition de la résistance aux échinocandines chez les levures du genre *Candida* est une problématique

d'actualité. Celle-ci peut survenir rapidement et nécessite une surveillance régulière des CMIs chez les patients à risque d'infection invasive. ^[194]

IV.4.2 Facteurs de risques d'émergence des résistances aux antifongiques:

Les infections fongiques sont une cause importante de mortalité chez les patients immunodéprimés, les patients sous chimiothérapie ou après transplantation de moelle osseuse. L'immunodépression a été définie par la présence de l'un ou l'autre des critères suivants :

- la corticothérapie (au moins 0,5 mg/kg par jour de prednisolone depuis plus d'un mois).
- l'infection par le VIH.
- la chimiothérapie anticancéreuse au cours des trois derniers mois.
- la transplantation d'organe avec traitement immunosuppresseur en cours.
- l'utilisation d'anti-TNF.

Les candidoses orales et œsophagiennes par exemple sont fréquentes chez les patients atteints du sida. Lorsque *Candida* s'infiltre dans le flux sanguin, l'infection devient systémique et on parle alors de candidémie. Les candidémies sont caractérisées par une mortalité de l'ordre de 40 %. *Candida albicans* peut donner également une multitude d'autres infections car il s'agit d'un pathogène opportuniste très polyvalent.

L'utilisation des antifongiques dans le traitement de ces infections s'est accompagnée d'un phénomène de résistance à de multiples drogues (MDR) qui n'a cessé d'augmenter.

L'apparition de souches résistantes aux antifongiques est très spectaculaire spécialement chez les patients immunodéprimés où le nombre croissant est particulièrement à l'origine de l'augmentation des infections fongiques systémiques. Un large emploi des antifongiques, contribue à exercer une pression de sélection sur les micro-organismes qui développe des résistances. Ces micro-organismes tiennent une préoccupation particulière dont peu de moyens de lutte sont disponibles.

La connaissance des facteurs de risque des résistances est importante pour la conception et la mise en œuvre de mesures de prévention efficaces. Parmi les stratégies utilisées pour faire face à cette issue, la recherche des inhibiteurs de cette résistance semble être attrayante.

Le traitement optimal de première ligne des candidoses sévères est un sujet controversé. Si l'amphotéricine B a été la molécule de référence pendant de nombreuses années, le fluconazole est devenu une option. Cependant, un certain nombre de candida non-albicans sont peu sensibles au fluconazole. La caspofungine par son activité anticandidosique et par son profil de tolérance reconnu est alternative intéressante pour le traitement des candidoses invasives.

IV.4.3 Evolution de l'épidémiologie des résistances :

1. Intérêt de la surveillance :

Depuis ces dernières années, on note une évolution de l'épidémiologie des résistances aux différents antifongiques, spécialement aux azolés. La surveillance de la résistance aux antifongiques s'est aujourd'hui généralisée ^[195,196]. Plusieurs études sont réalisées continuellement dans le but d'évaluer la sensibilité des agents fongiques aux antifongiques, qu'ils soient anciennement mis sur le marché ou en vue de commercialisation. Dans le premier cas, l'étude fournit des données sur l'apparition et le profil de résistance des espèces. Alors que dans le deuxième, elle évalue l'activité du nouvel antifongique par rapport aux autres molécules disponibles sur le marché.

L'amélioration de la prise en charge des patients nécessite de connaître l'évolution épidémiologique des agents pathogènes et de leur résistance aux différents antifongiques. Chose qui souligne l'importance de cette surveillance et l'intérêt majeur de la réaliser d'une manière constante. Dans cette partie on va détailler et rapporter les résultats des plus importants systèmes de surveillance en vue d'étaler l'épidémiologie des résistances aux antifongiques.

2 .Evolution de l'épidémiologie de la résistance aux antifongiques :

Les fongémies à *Candida spp.* sont fréquentes et sévères. Elles représentent aux USA 30 cas pour 100 000 admissions hospitalières et sont responsables en Europe d'environ 15 % des sepsis sévères et chocs septiques en réanimation. Elles sont associées à une surmortalité de 14,5 %, une augmentation importante de la durée de séjour et du coût de l'hospitalisation. L'analyse des données européennes sur les fongémies à *Candida spp.* faite dans le cadre de l'European Confederation of Medical Mycology (2 089 épisodes à

travers 7 pays dont la France), a démontré que la proportion des fongémies à *Candida* causées par des souches de sensibilité diminuée aux antifongiques était faible. Néanmoins, un suivi de cette résistance est important pour évaluer ses évolutions et l'impact de l'introduction sur le marché des nouveaux agents antifongiques. La France est le seul pays à faire une surveillance de ce type.^[197,198]

Une étude mise en place en octobre 2002 visant la Surveillance de fongémies à levures en Ile-de-France / et autres infections invasives .les lieu de l'isolement sont les Laboratoires des hôpitaux d'aigus de l'AP-HP, de Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) et des Centres hospitaliers généraux (CHG)

Cette étude a permis de déterminer les Caractéristiques de la résistance de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* aux antifongiques.^[199]

Indicateur principal							
Anti-infectieux	Fluconazole Voriconazole Caspofungine						
Type d'indicateur	% de souches de résistantes à fluconazole (CMI $\geq$ 8 mg/l) % de souches de résistantes au voriconazole (CMI $\geq$ 0.25mg/l) % de souches avec CMI hautes de la caspofungine (CMI $\geq$ 0,5 mg/l) interprétation selon les bornes définies par la technique EUCAST (ESCMID) ou par les études du CNRMA * Il importe cependant de noter que l'on ne dispose pas de valeur critique pour fluconazole, voriconazole et <i>C. glabrata</i> et pour voriconazole et <i>C. krusei</i> .						
Type de données	Surveillance nationale						
Période 2005-2010		2005	2006	2007	2008	2009	2010
	<i>Candida albicans</i>						
	N souches testées	244	227	265	237	270	263
	Fluconazole	4	1	2	0	1	0
	Voriconazole	0	1	0	1	3	3
	Caspofungine		1	1	1	1	0
	<i>Candida glabrata</i>						
	N souches testées	98	85	113	98	91	112
	Fluconazole *	57	64	64	54	49	73
	Voriconazole *	55	46	22	20	32	43
	Caspofungine		1	4	8	3	3
	<i>Candida parapsilosis</i>						
	N souches testées	53	62	68	53	47	56
	Fluconazole	0	0	7	6	4	2
	Voriconazole	0	0	3	2	0	2
	Caspofungine		15	21	25	17	32
	<i>Candida tropicalis</i>						
	N souches testées	39	41	47	49	49	48
	Fluconazole	3	12	2	11	0	17
	Voriconazole	13	15	9	20	10	29
	Caspofungine		0	0	0	0	2
	<i>Candida krusei</i>						
	N souches testées	8	18	20	17	16	21
	Fluconazole	100	100	95	94	100	95
	Voriconazole *	50	56	50	53	25	52
	Caspofungine		6	0	0	0	5
Source des données	CNR Mycoses Invasives et Antifongiques						
Période de surveillance	2005-2010						

Commentaires :

L'analyse de 6 années de surveillance de la sensibilité aux antifongiques (technique EUCAST) des principales espèces de *Candida* responsables d'infections invasives en France ne met pas en évidence pas d'évènements inhabituels chez *Candida albicans* avec une prévalence très faible de résistance aux antifongiques azolés prescrits en thérapeutique (fluconazole et voriconazole). Il en est de même pour la caspofungine (et donc pour les autres échinocandines micafungine et anidulafungine comme démontré par un travail récent mené au CNRMA). Ceci permet, d'un point de vue microbiologique, d'utiliser le fluconazole dès que l'état du malade l'autorise. [200, 201, 202, 203,204]

Concernant *Candida glabrata*, on note également une prévalence stable de la résistance au fluconazole, qui ne doit d'ailleurs pas être utilisé en première intention dans une infection invasive liée à cette levure. Cette résistance se situe entre 54 et 65% selon les années avec plus de 35% des isolats résistants également au voriconazole en 2009-2010. En revanche, on note désormais plusieurs isolats de *C. glabrata* chaque année présentant une résistance acquise à la caspofungine avec une fréquence annuelle de 2,7% à 8,2%. Ceci est en accord avec d'autres données obtenues au CNRMA et avec des données récentes nord-américaines. Dans l'expérience française ou nord-américaine, ces isolats sont avant tout décrits en cas d'exposition récente ou en cours à l'une des échinocandines. Ceci renforce l'intérêt d'une politique de bon usage des antifongiques, ce d'autant que les mutations dans le gène cible sont associées à un échec thérapeutique.

Alors que nous n'observions pas d'isolat de *Candida parapsilosis* résistant au fluconazole/voriconazole en 2005 et 2006, ces résistances concernent désormais près de 10% des isolats étudiés ces dernières années. Il importe donc de particulièrement surveiller cette tendance lors des prochaines années car le fluconazole représente actuellement la proposition thérapeutique de première ligne sur le plan international. On rappelle que le complexe *parapsilosis* est intrinsèquement de moindre sensibilité ou résistant aux échinocandines. De même pour *Candida tropicalis*, on note une prévalence notable de résistance aux deux azolés testés contrastant avec la rareté des isolats résistants à la caspofungine. Enfin, pour *Candida krusei* intrinsèquement résistant au fluconazole, la résistance au voriconazole est stable et celle à la caspofungine anecdotique.

Conclusion

CONCLUSION

Ces deux dernières décennies ont vu une augmentation croissante des mycoses profondes chez les patients immunodéprimés. Parmi ces infections, les candidoses invasives constituent une menace majeure surtout en réanimation. Leur mortalité oscille entre 60 et 90%, ce taux important est principalement dû à la difficulté d'établissement d'un diagnostic rapide ce qui engendre un retard thérapeutique. De plus, les moyens thérapeutiques eux même présentent des limites qui s'illustrent en :

- ✓ Une famille d'antifongiques cantonnée en quatre classes ;
- ✓ Un spectre antifongique étroit ;
- ✓ Une toxicité élevée ;
- ✓ Une absence de forme orale.

Faire face à cette menace nécessite l'utilisation plus large des antifongiques existants et incite l'industrie pharmaceutique à rechercher de nouvelles molécules afin de mettre à disposition des professionnels de santé l'antifongique idéal. Celui-ci devrait avoir un spectre d'activité large et être plus au moins fongicide, ne pas présenter d'interférences négatives et être doué de propriétés pharmacocinétiques favorables et d'une faible toxicité. Il devrait, en outre, être disponible tant par voie orale que par voie intraveineuse. Enfin, il devrait avoir démontré son efficacité dans des essais randomisés portant sur des populations à risque. La caspofungine est un produit récemment introduit sur le marché. Depuis sa commercialisation en 2002, ce médicament constitue une avancée dans le traitement de première intention des infections fongiques invasives.

La résistance confirmée de certaines souches aux antifongiques entraîne la mise en œuvre beaucoup plus systématique des tests de sensibilité mais l'absence actuelle de méthodes standardisées et fiables ainsi que le manque de corrélation *in vitro* / *in vivo* limitent leur généralisation. Ces tests n'apportent cependant pas une réponse infaillible à toutes les questions qui se posent dans le traitement des infections fongiques mais ils restent indispensables. Dans l'état actuel de la question, l'antifongigramme ne doit pas être banalisé : ses indications doivent être sélectionnées. Cette investigation est à réserver aux mycoses profondes et aux colonisations survenant chez des patients agressés ou immunodéprimés.

Du fait qu'il existe plusieurs méthodes, commercialisées ou non, permettant de réaliser un antifongigramme, le choix d'une méthode de routine fiable de la part des biologistes s'est compliqué. Par conséquent, une incompétence vis-à-vis de sa pratique est ressentie de leur part, ce qui limite sans doute son utilisation dans les hôpitaux. De plus, une connaissance insuffisante des méthodes disponibles et de leur validité est mise en évidence. La diffusion de recommandations simples, plébiscitée par les biologistes serait sans doute le moyen à travers lequel ils pourront choisir la technique appropriée pour l'évaluation *in vitro* de la sensibilité aux antifongiques. Des évolutions techniques et un certain nombre de recommandations sont disponibles depuis la période de cette enquête, mais l'antifongigramme est un sujet qui retient toujours autant l'intérêt des biologistes et des cliniciens.

Les modifications dans la fréquence des infections fongiques, la répartition des espèces impliquées et l'évolution des résistances aux antifongiques sont des données qui permettent de cerner géographiquement les tendances épidémiologiques et de sélectionner un grand nombre de traitements empiriques. Dans ce contexte, il est de grande utilité de déterminer le profil de sensibilité d'isolats cliniques locaux aux nouveaux antifongiques.

Notre étude de sensibilité à la caspofungine des souches de *Candida* isolées dans l'HMIMV, nous a permis de générer des informations sur le profil de résistance à la caspofungine de *Candida* au sein des différents services de réanimation. Nos résultats prouvent encore une fois que la caspofungine constitue l'un des rares médicaments antifongiques promoteurs dans le traitement des infections fongiques invasives. Ces constatations pourraient constituer des lignes directrices locales pour le traitement des candidémies, notamment pour le choix de l'antifongique idéal.

L'amélioration de la prise en charge des patients nécessite de connaître l'évolution épidémiologique des agents pathogènes et de leur résistance aux différents antifongiques. Chose qui souligne l'importance de la surveillance et l'intérêt majeur de la réaliser d'une manière constante. De la sorte, notre étude devrait refléter la volonté de notre établissement de s'inscrire dans une démarche d'amélioration de la connaissance de l'épidémiologie des résistances aux antifongiques. Les résultats de notre étude devront être confirmés par d'autres

études complémentaires et comparatives, surtout qu'il s'agit d'une première de son genre à l'HMIMV (Maroc).

Résumés

RESUME

Titre de la thèse : Sensibilité in vitro à la caspofungine de 58 souches de *Candida* isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V

Auteur de la thèse: Meriama Houfar

Directeur de thèse : Pr B.E. LMIMOUNI

Mots clés : Genre *Candida* – Antifongogramme – caspofungine – Sensibilité in vitro

Introduction : Les infections invasives à *Candida* constituent une menace majeure en termes de morbidité et de mortalité surtout en réanimation. Les données sur le phénomène de résistance de *Candida* aux antifongiques ne sont pas disponibles au Maroc.

Objectifs : Etablir le profil de sensibilité phénotypique des souches de *Candida* à la caspofungine dans les services des réanimations de l'HMIMV.

Matériels et méthodes : Notre étude prospective a inclus 58 souches de *Candida* issues de prélèvements de divers sites périphériques provenant de patients hospitalisés dans les différents centres de Réanimation. La culture et l'identification des souches de *Candida* étaient faites sur milieu d'isolement Muller-Hinton et la sensibilité in vitro à la caspofungine était réalisée par diffusion en milieu gélosé des bandelettes.

Résultats : l'ensemble des prélèvements proviennent des sites périphériques. *Candida non albicans* représentait 62% alors que *C.albicans* ne représentait que 37,93%. La répartition des espèces non *albicans* était : *C.glabrata* (37,65%), *C.tropicalis* (10,34%) et *C.krusei* (37,93%). La caspofungine avait une bonne activité sur toutes les espèces de *Candida* : plus de 77% étaient sensibles et 12,06% résistantes. Il était plus actif sur *C.albicans* avec une sensibilité de 81,82% et *C.krusei* 85,71% *C.tropicalis*. Une sensibilité diminuée était observée pour *Candida glabrata* avec 73,92% et *C.tropicalis* avec 66,67%.

Discussion : Contrairement à la littérature, la distribution des espèces dans notre étude montre une prédominance de *Candida non albicans* sur *C.albicans*. *C.glabrata* est l'espèce la plus isolée après *C.albicans*. Elle est isolée des sites périphériques, ce qui diffère des données des Etats-Unis où elle représente la deuxième cause de candidémie. La caspofungine est actif sur toutes les espèces de *Candida*. Néanmoins, ce médicament représente une meilleure alternative on cas de résistances au fluconazole en traitement de première intention des candidémies.

Conclusion : Nécessité d'une surveillance épidémiologique continue des candidoses pour suivre les tendances de leurs profils de sensibilité aux antifongiques. Parallèlement, une maîtrise des techniques d'antifongogramme s'impose. Le point reste à poser sur les candidémies à *C.glabrata* pour qui une prudence s'impose, lorsqu'on envisage de traiter par la caspofungine dans une situation susceptible de générer une résistance.

SUMMARY

Title: sensitivity in vitro to caspofungine of 58 strains of *Candida* isolated at the Mohammed V's Military Instruction Hospital

Author: Meriama Houfar

Supervisor: Prof. B.E. LMIMONI

Keywords: *Candida* - epidemiology - caspofungine - resistance - antifungal susceptibility testing .

Introduction: *Candida* invasive fungal infections are a major threat in the hopper of morbidity and mortality particularly in intensive care. Data on these infections in Africa and specifically in Morocco are not available, particularly on the more informed phenomenon of resistance of *Candida* to antifungal agents.

Objectives: The aims of our study were to establish the phenotypic susceptibility profile of isolated strains of *Candida* to caspofungine with an evaluation of resistance rates.

Materials and methods: Our prospective study included 58 *Candida*'s strains from various peripheral sites isolated from hospitalized in the intensive care units. Identification of *Candida*'s strains was done on the medium Muller-Hinton and *in vitro* susceptibility to caspofungin was performed by agar diffusion of calibrated plastic strip impregnated with a continuous concentration gradient of the antimicrobial agent.

Results: All samples were isolate from peripheral sites. *Candida non-albicans* accounted for 62% while *C. albicans* was only 37.93%. The distribution of non-albicans species was: *C.glabrata* (37.65%), *C.tropicalis* (10.34%) and *krusei* (37.93%). Caspofungin had good activity on all *Candida* species: more than 77,59 % sensitive and 12.06% were resistant. He was more active with a sensitivity of *C. albicans* and with, *C.krusei*. Decreased sensitivity was observed with *Candida glabrata* with 73,92%. Resistance rates were 13,04% for *C.glabrata*, 33,33% for *C.tropicalis* and 4,54% for *C. albicans*.

Discussion: The species distribution, as shown in the literature, shows a predominance of *Candida non albicans* on *C.albicans*. *C.glabrata* is the species the most isolated after *C.albicans*. It is isolated from peripheral sites on the first line, which differs from U.S.A data that it represents the second cause of candidemia. Caspofungin is active on all species of *Candida* except *C.glabrata*, whose activity is mostly random in candidemia. However, this drug is a better alternative than fluconazole in first-line treatment of candidemia.

Conclusion: The need for continuous epidemiological surveillance of candidiasis to monitor the trends of their antifungal susceptibility for the establishment of guidelines for treatment. Meanwhile, a mastery of antifungal susceptibility testing's techniques is needed. The point is to put on candidemia with *C.glabrata* for who a caution is imposed when we consider Caspofungine therapy in a situation susceptible to generate resistance.

ملخص:

العنوان : دراسة حساسية 58 سلالة مبيضية (*Candida*) معزولة بالمستشفى العسكري محمد الخامس بالرباط للكاسبفونجين (caspofungine).

الطالبة : مريمة هوفر

المؤطر : البروفيسور بدر الدين لميموني.

الكلمات الأساسية : الحساسية، دراسة الحساسية لمضادات الفطريات، المبيضات، الكاسبفونجين (caspofungine).

الأهداف : تتجلى أهداف دراستنا في تقييم مؤهلات الحساسية لسلالة المبيضات للكاسبفونجين مع تحديد معدلات المقاومة و وصف وبائياتها في وحدات العناية المركزة بالمستشفى العسكري محمد الخامس بالرباط.

المواد و الأساليب : دراستنا الاستطلاعية التي استمرت شملت 58 سلالة مبيضية (*Candida*) استخرجت من مختلف عينات المواقع الهامشية. المرضى الذين تم دمجهم في الدراسة هم المرضى المعالجين في مختلف مصالح الإنعاش. تم تحديد سلالات المبيضات عن طريق وضعها في وسط عزل (Muller-Hinton) و تمت دراسة الحساسية في المختبر للكاسبفونجين (caspofungin) بواسطة شرائط مشربة به.

النتائج العينات المأخوذة، كانت عينات من مواقع هامشية. شكلت *Candida non albicans* أكثر نسبة 62%، في حين شكلت *C.albicans* سوى 37,93%. لقد تم تحديد 4 أنواع مختلفة من المبيضات، كانت *C.glabrata* الأكثر انتشارا ب 39,65% متبوعة ب *C.albicans* 37,93% ثم *C.krusei* ب 12,06% ثم *C.tropicalis* ب 10,34%. أبرزت نتائج الحساسية للكاسبفونجين (caspofungine) (عن نشاط جيد لهذا الدواء على كافة أنواع المبيضات (*Candida*) 77,59% من الأنواع كانت حساسة و 10,34% متوسطة و 12,06% مقاومة. كان الكاسبفونجين (caspofungine) أكثر نشاطا على *C.albicans* و *C.krusei* حيث بلغت نسبة الحساسية على التوالي 81,82% و 85,71% بالنسبة ل *C.tropicalis* بلغت نسبة الحساسية 66,67%. تراوحت نسبة المقاومة بين 13,04% ل *Candida glabrata* و 33,33% ل *Candida tropicalis* و 4,54% ل *Candida albicans*.

المناقشة : إن توزيع الأنواع، كما تدل باقي الدراسات، تبين غلبة *Candida non albicans* على *Candida albicans*. من كل عينات المواقع الهامشية، *Candida glabrata* هي النوع الأكثر عزلة من بين كل المبيضات بعد *Candida albicans*. في حين تم عزلها عند أغلبية المرضى من المواقع الهامشية حيث أنها شكلت الرتبة الأولى، مما يختلف عن البيانات الأمريكية حيث تمثل *C.glabrata* السبب الثاني في تعفن الدم. أظهر الكاسبفونجين (caspofungine) نشاطا مهما على كافة أنواع المبيضات *Candida* المعزولة، إلا أنه أظهر نشاطا عشوائيا ضد *Candida glabrata* مع ذلك يبقى هذا الدواء بديل أفضل من الفلوكونازول (Fluconazole) في حالة مقاومة ضد العلاج ب الفلوكونازول (Fluconazole) في علاج التعففات المبيضية.

استنتاج : الحاجة للترصد الوبائي المستمر للمبيضات لرصد مؤهلات حساسيتها لمضادات الفطريات و ذلك لوضع مبادئ توجيهية للعلاج. في الوقت نفسه يجب التمكن من تقنيات دراسة الحساسية في المختبر لمضادات الفطريات. بالنسبة لتعفن الدم ب *C.glabrata* يجب توخي الحذر في العلاج خاصة عند استخدام الكاسبفونجين (caspofungine) في حالة، من المرجح، أن تولد مقاومة ضد مضادات الفطريات.

Références bibliographiques:

- [1].Garnica.M , Nucci.M. Infections fongiques émergentes. Annles Nestlé [Fr] 2009;67:135–142.
- [2].Lacroix.C, Dubach.M, Feuilhade.M.les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiques. Médecine et maladies infectieuses 33 (2003) 183–191.Chabasse D,
- [3].Guiguen C, Contet-Audonneau N. Mycologie médicale. Masson 1999 : 122-125
- [4].Blanc.V, Eloy.O, Sanchez.R, Mallié.M. Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) .pratique de l'antifongigramme dans 62 hôpitaux français. Journal de Mycologie Médicale 15 (2005) 197–210.
- [5].Grillot R, Lebeau B, Alderbert D, Faure O, Bille J, Woff M. Corrélation *in vitro/in vivo*. Détermination de la sensibilité aux antifongiques au laboratoire. In: Infections fongiques: résistances et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : Optimed Ed 2003 : 47-71.
- [6].Alcamo E. I. Fundamentals of Microbiology. London: Addison-Wesley publishing company; 1984: 310-341; 617-699.
- [7].kpemissi amana.E. Les anacardiace du TOGO : études botaniques, écologiques et propriétés antifongiques. Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE UFR PHARMACIE. Page 74.
- [8]. Ariane G. Comparaison de méthode de deux antifongigramme : ATB FUNGUS3® et carte Vitek AST-YS01®. ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion. Travail de diplôme; 2008-2009.
- [9]. Marchand.S, Galerie ATB FUNGUS2®, bioMérieux SA (2004-2005).
- [10]. EUCAST. EUCAST Definitive Document E Def 7.1: Method for the determination of broth dilution MIC's of antifungal agents for fermentative yeasts. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 398-405.
- [11].National Commitee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Wayne, PA: NCCLS, 1997.

- [12].**National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Approved standard M38-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **1998**, Wayne, PA.
- [13].**Rodriguez-Tudela JL, Barchiesi F, Bille J et al**. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1–8.
- [14].**National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 2nd edn. Approved standard M27-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- [15].**National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- [16].**Rodriguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M**. Interlaboratory evaluation of hematocytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5236–5237.
- [17].**Lass-Flörl C, Perkhofer S and Mayr A**. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycose: diagnosis, therapy and prophylaxis of fungal diseases*.
- [18]. **Lass-Flörl C et al**. In vitro susceptibility testing in fungi: A global perspective on a variety of methods. *Mycoses* **2010**; 53:1-11.
- [19].**Cuenca-Estrella M et al**. Frequency of voriconazole resistance *in vitro* among Spanish clinical isolates of *Candida* spp. according to breakpoints established by the antifungal subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010**; 8:267-276.
- [20].**Johnson EM** *Antimicrob Chemother.* **2008**; 61: 113-118.

- [21].Yang HC, Mikami Y, Yazawa K, Taguchi IL, Nishimura K, Miyaji M, et al. Colorimetric MTT assessment of antifungal activity of D0870 against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Mycoses* **1998**;41(11-12):477-480.
- [22].Espinel-Ingroff.A, PhD. Antifungal Susceptibility Methods and Their Potential Clinical Relevance. *Laboratorymedicine*- august 2002- number 8- volume 33.
- [23].TREK Diagnostic Systems. Notice du Sensititre Yeast One.
- [24].Linass MD, Cassaing S. Méthodes d'évaluation *in vitro* des antifongiques: étude comparative des différents tests. *Revue française des laboratoires* **2001**. N°332.
- [25].Sanofi Pasteur. Protocole de la galerie Fungitest.
- [26].Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, and Warnock DW. Comparative evaluation of Fungitest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* **1998**, vol. 36 N°4: 926-930.
- [27].Broadsky T. F., Lewis C., Eble T. E. Bioautographic thin layer chromatographic analysis of antibiotics and their metabolites in the whole animal. I Clindamycin in the rat. *J. Chromatogr.*, 1976; 123: 33-44.
- [28].Cantón E., Espinel-Ingroff.A A., Pemán J.: Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2009, 7, 107-119.
- [29].Pfaller M.A.: New developments in the antifungal susceptibility testing of *Candida*. *Curr. Fungal Infect. Rep.*, 2008, 2, 125-133.
- [30]. <http://www.clsi.org/source/orders/free/m44-a2.pdf> (state of 05.23.2011).
- [31].Arendrup M.C., Park S., Brown S., et al.: Evaluation of caspofungin and micafungin CLSI M44-A2 disk diffusion and associated breakpoints testing using a well characterized panel of wild type and fks hot spot mutant *Candida* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, 55, 1891-1895.
- [32].Pfaller M.A., Andes D., Diekema D.J., et al., the CLSI Subcommittee for Antifungal Susceptibility Testing: Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and

species-specific clinical breakpoints for fluconazole and Candida: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resist. Updat.* 2010, 13, 180-195.

[33]. <http://www.clsi.org/source/orders/free/m51-a.pdf> (state of 05.23.2011).

[34].Brown S, Traczewski M. Quality control limits for posaconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J Clin Microbiol* 2007; 45(1):222-223.

[35].Sims CR, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L. Correlation between microdilution, E-test and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* 2006; 44(6):2105-2108.

[36].Lozano-Chio M, Nelson PW, Paetznick VL, Rex JH. Disk diffusion method for determining susceptibilities of *Candida* spp. to MK-099 I. *J Clin Microbiol* 1999; 37(5):1625-1627.

[37].Arikan S, Paetznick V, Rex JH. Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Anti Microb Agents Chemother* 2002; 46(9):3084-3087.

[38].Arikan S, Yurdakul P, Hascelik G. Comparison of two methods and three end points in determination of *in vitro* activity of micafungin against *Aspergillus* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(8):2640-2643.

[39].Messer SA, Diekema DJ, Hollis RI, Boyken LB, Tendolkar S, Kroeger J, et al. Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 2007;45(4): 1322-1324.

[40].Lopez-Oviedo E, Aller AI, Martin C, Castro C, Ramircz M, Peman JN, et al. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(3):1108-1111.

[41].Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S, et al. Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of

filamentous fungi against voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B. and caspofungin. *J Clin Microbiol* **2007**; 45(6):1811-1820.

[42].Fernandez-Torres B, Carrillo-Munoz A, inca I, Guarro J. Effect of culture medium on the disk diffusion method for determining antifungal susceptibilities of dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**;50(6):2222-2224.

[43].Venugopal PM, Venugopal TV. Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines. *Int J Dermatol* **1994**; 33(10):730-732.

[44].Colosi.I, Faure.O, Lebeau.B, Colosi.H, Junie.M, Pelloux.H, . Comparison of two methods, E-test® and Neo-Sensitabs® tablet diffusion assay, for testing susceptibility of 93 *Candida* strains to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and *caspofungine*. *Sc. Parasit.*, 2009, 1-2, 112-122.

[45].Bourounda N. Place de l'antifongigramme dans la prise en charge des infections fongiques. **Thèse de Doctorat de Pharmacie. 2010.**

[46].Rosco Diagnostica A/S. NEO-SENSITABS Antifungal Agents: Product list 2009.

[47].NCCLS. Reference Methods for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, 2nd ed.M27-A2, 2002.

[48].PFaller M.Aet al: correlation of MIC with outcome for candida spp.tested against caspofungine, Amidulafungin and micafungine: analysis and proposal for interpretative MIC breakpoints. 46,2629,20 08.

[49].Cuenca-Estrella M et al. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida spp.* of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques.

[50].Espinell-Ingroff A et al. International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida spp.* to fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **2005**;43,3884-9.

[51].Pfaller MA, Messer SA, Bolmstrom A. Evaluation of Etest for determining in vitro Susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32: 223-7.

- [52].**AB bioMérieux.** E test: Antimicrobial susceptibility testing for *in vitro* diagnostic use. Copyright AB bioMérieux 2009.
- [53].**Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH.** Comparison of E test and national committee for clinical laboratory standards north macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemoter* 1995; 39: 2520-2.
- [54].**Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstrom A.** improved detection of amphotericin B resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 339-42.
- [55].**Szekely A, Johnson EM, Warnock DW.** Comparison of Etest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J Clin Microbiol* 1999; 37:1480-3.
- [56].**Desnos-Ollivier M, Dromer F, Dannaoui E.** Detection of caspofungin resistance in *Candida spp.* by Etest. *J Clin Microbiol* 2008;46:2389–92.
- [57].**Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Alexander BD, Andes D, et al.** Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2008;46:2620–9.
- [58].**Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, et al.** Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009;48:503–35.
- [59].**Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ellis D, Tullio V, et al.** Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 2010;48:1366–77.
- [60].**Espinel-Ingroff. A A, Canton E, Peman J, Martin-Mazuelo E.** Comparison of anidulafungin MICs determined by the clinical and laboratory standards institute broth microdilution method (M27-A3 document) and Etest for *Candida* species isolates. *Antimicrob Agents Chemoter* 2010;54:1347–50.

- [61].Arendrup MC, Garcia-Effron G, Lass-Flörl C, Lopez AG, Rodriguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M, et al. Echinocandin susceptibility testing of *Candida* species: comparison of EUCAST EDef 7.1, CLSI M27-A3, Etest, disk diffusion, and agar dilution methods with RPMI and isosensitest media. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:426–39.
- [62].Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS. Correlating échinocandine MIC and kinetic inhibition of *fks1* mutant glucan synthases for *Candida albicans*: implications for interpretive breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:112–22.
- [63].Barbara D, Alexanderand Michael A, Pfaller. Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:S15-27.
- [64].Zambardi G, Parreno D, Monnin V, Fothergill A, Hurt L, Bassel A, McCarthy D, Canard I, Slaughter J, ICAAC. Poster M-1619, December 2005.
- [65].Lee S-C, Ring C-P, Lee N, See L-C, Huang J-S, Tsai C-1, et al. Fluconazole disk diffusion test with methylene blue- and glucose enriched Mueller Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1615-1617
- [66].Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 235-47.
- [67].Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS., EspinelIngroff A., Ghannoum MA., et al. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infection. *Clin Infect Dis* 1997; 24:235-47.
- [68].Dromer.F, mprovisi.L.I , dupont.B.les tests de sensibilité des levures aux antifongiques . *Option/Bio* 1988 ;199 (suppl) : 45-46.
- [69].Warnock.DW , Johnson.EM. Antifungal drug susceptibility testing. *Curr Option infect dis* 1997; 10:444-448.

- [70].CLSI (2008a) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- [71].CLSI (2008b) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- [72].CLSI (2009) Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of filamentous fungi; proposed guideline. CLSI document M51-P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
- [73].NCCLS (2004) Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. NCCLS document M44-A . National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne.
- [74].Dannaoui.E ,Lortholary.O et Dromer.F.Techniques d'étude des associations d'antifongiques in vitro et in vivo chez l'animal Mycol Med.2003 ;13 :73-85.
- [75].Kontoyiannis.DP ,Lewis.RE , 2004. Toward more effective antifungal therapy: the prospects of combination therapy, British Journal of Haematology, 126 : 165-175.
- [76].Polak.A , 1999. The past, present and future of antimycotic combination therapy, Mycoses, 42 : 355-370.
- [77].Cuenca-Estrella.M , 2004. Combinations of antifungal agents in therapy – what value are they ?, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 54 : 854-869.
- [78].Zhai.B , Zhou.H , Yang.L , Zhang.J , Giam.CZ , Xiang.X , Lin.X , 2010. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65 : 931-938.
- [79].Kontoyiannis.DP, Lewis.RE, 2002. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi, Lancet, 359: 1 135-1 144.
- [80].Johnson.MD ,Perfect.JR , 2007. Combination antifungal therapy: what can and should we expect ?, Bone Marrow Transplantation, 40 : 297-306.
- [81].Rex .JH, Pfaller .MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? Clin Infect Dis 2002; 35:982–9.

- [82].**Bille.J** . Structures, modes d'actions et mécanismes de résistance des antifongiques systémiques. In: Conférence de consensus commune SFAR, SPILF. Paris: SRLF, Elsevier Ed; 2004. p. 32–8.
- [83].**Espinel-Ingroff.A**. Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion Etest® procedure for testing susceptibilities of *Aspergillus sp.* to caspofungin (MK-0991). J Clin Microbiol 2003;41:403–9.
- [84].**Jacobs.MR**. How can we predict bacterial eradication? Int J Infect Dis 2003;7 (suppl.1):S13–20.
- [85].**Rex .JH, Pfaller.MA, Walsh.T , Chaturvedi.V , Espinel- Ingroff.A , et al**. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001;14:643–8.
- [86].**Bretagne.S** . Diagnostic au laboratoire des candidoses et aspergilloses invasives. In: Conférence de consensus commune SFAR, SPILF. Paris: SRLF, Elsevier Ed; 2004. p. 14–22.
- [87].**Conférence de consensus commune SFAR. SPILF, SRLF**. Prise en charge des aspergilloses et candidoses invasives de l'adulte. Texte long. In: Conférence de consensus commune SFAR, SPILF. Paris: SRLF, Elsevier Ed; 2004. p. 5–13.
- [88].**Dannaoui .E**. Intérêt des tests de sensibilité in vitro dans la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives. In: conférence de consensus commune SFAR, SPILF. Paris: SRLF, Elsevier Ed; 2004. p. 52–9.
- [89].**Merck Canada Inc**. Monographie de produit – CANCIDAS..Numéro de la demande : 142210 ,11,01-a_142210. Date de révision : le 12 janvier 2011.
- [90].**Caspofungin**. L743, 872, MK-0991, MK-991. Drugs R D 1999;1: 165–7(No author list).
- [100].**Mallié.M. , Bastide.JM**. Les nouveaux antifongiques. Rev Fr Lab 2001;332:63-70.
- [101].**Espinel-Ingroff.A**. Comparaison of in vitro activities of the new triazoles SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY300066 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. J Clin Microbiol 1998; 36:2950-6.
- [102].**National Committee for Clinical Laboratory Standards** :(nouvellement CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi; Approved standards M38-A, NCCLS, 2002, Waine, Pa.

- [103].**National Committee for Clinical Laboratory Standards** (nouvellement CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standards — 2nd edition M27-A, NCCLS, 2002, Wayne, Pa.
- [104].**Pfaller.MA, Marco.F, Messer.SA, Jones RN.** In vitro activity of two echinocandins derivatives, LY303366 and MK-0991 (L-743,792), against clinical isolates of *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus* and other filamentous fungi. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 30:251-5.
- [105].**Kahn.JN , Hsu.MJ , Racine.F , Giacobbe.R ,Motyl.M .** Caspofungine susceptibility in *Aspergillus* and non-*Aspergillus* molds: inhibition of glucan synthase and reduction of b-D-1,3 glucan levels in culture. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 2214-6.
- [106].**Bertout.S , Jouvert.S ,Reynes.J , Bastide.JM , Mallié.M.** Fungicidal activity of caspofungin on *C. albicans*: electron microscopy findings and growth evidence. 44th ICAAC, 2004, Washington, USA, Abstract M-1976.
- [107].**Ernst.EJ, Klepser.ME , Ernst.ME , Messer.SA, Pfaller.MA .** In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by timekill methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:75-80.
- [108].**Nelson.PW , Lozano-Chiu.M , Rex.JH .** In vitro growth-inhibitory activity of pneumocandins L-733.560 and L-743.872 against putatively amphotericin B- and fluconazole-resistant *Candida* isolates: influence of assay conditions. *J Med Vet Mycol* 1997;35:285-7.
- [109].**Vasquez.JA ,Lynch.M , Boikov.D , Sobel.JD .** In vitro activity of a new pneumocandin antifungal, L-743.872, against azole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrob Agents,Chemother* 1997;41:1612-4.
- [110].**Arikan.S ,Lozano-Chiu.M , Paetznick.V ,Rex.JH .** In vitro susceptibility testing methods for caspofungin against *Aspergillus* and *fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 327-30.
- [111].**Arikan.S ,Paetznick.V ,Rex.JH .** Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3084-7.

- [112].Diekema.DJ ,Messer .L, Boyken.L ,Tendolkar.S , Hollis.R , Pfaller .MA. Activity of new and investigational antifungal agents against recent clinical isolates of filamentous fungi. 45th ICAAC, 2005, Washington, USA, Abstract M-1630.
- [113].Cuenca-Estrella.M , Gomez-Lopez.A , Garcia-Lopez.A , Mellado.E , Rodriguez-Tudela.JL . Combined activity in vitro of antifungal agents against the multi-resistant pathogen. 45th ICAAC, 2005, Washington, USA, Abstract M-2151.
- [114].Arikan.S ,Lozano-Chiu.M , Paetznick.V , Rex.JR . In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium spp.* Antimicrob Agents Chemother 2002;46:245-7.
- [115].Ha.Y ,Covert.SF ,Monamy.M . FfFKS1, the 1,3- β -glucan synthase from caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. Eukaryotic Cell 2006;1036-42.
- [116].Graybill JR , Najvar LK , Montalbo EM , Barchiesi FJ , Luther FM ,Rinaldi MG . Treatment of histoplasmosis with MK-991 (L- 743,872). Antimicrob Agents Chemother 1998;42:151-3.
- [117].Mallié M, Bertout S. Caspofungine et mycoses a champignons rares : Activité in vitro et in vivo chez l'animal et chez l'homme. Journal de Mycologie Médicale (2007) 17, 25-32.
- [118].Pilly.E 2006. CAPSOFUNGINE Mai 06. , 20ème édition Vidal 2005.
- [119]. Merck Sharp & Dohme Ltd. Annexe i. Résumé des caractéristiques du produit. Caspofungine MSD.
- [120].Kim R, Khachikian D, Reboli AC. A comparative evaluation of properties and clinical efficacy of the echinocandins. Expert Opin Pharmacother 2007; 8:1479–92.
- [121].Delaunay P, Fissore C. Interactions médicamenteuses des antifongiques Systémiques. Journal de Mycologie Médicale 16 (2006) 152–158.
- [122].Garbino J . Caspofungin- a new therapeutic option for oropharyngeal candidiasis. Clin Microbiol Infect 2004; 10:187–9.
- [123].Villanueva A , Arathoon EG ,Gotuzzo-Noriega LM ,Kartsonis KA , Lupinacci R , et al. A randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericinB for the treatment of esophageal candidiasis. Clin Infect Dis 2001; 33:1529–35.

- [124].Arathoon EG, Gotuzzo E, Noriega LM, Berman RS, DiNubile MJ, Sable CA, et al. Randomized, double blind, multicenter study of Caspofungin versus amphotericin B for treatment of oropharyngeal and esophageal candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46: 451-7.
- [125].Villanueva A, Gotuzzo E, Arathoon EG, Noriega LM, Kartsonis KA, Lupinacci R, et al. A randomized double-blind study of Caspofungin versus fluconazole for the treatment of esophageal candidiasis. *Am J Med* 2002; 113:294-9.
- [126].Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Lopes Colombo A, Thompson- Moya L, Smietana J, et al. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2002;347:2020-9.
- [127].Maertens J, Raad I, Petrikos G, Boogaerts M, Selleslag D, Petersen FB, et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis for patients refractory or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:1563-71.
- [128].Gellen-Dautremer.J, Lanternier .F, Dannaoui.E, Lortholary.O. Associations antifongiques dans les infections fongiques invasives. *La Revue de médecine interne* 31 (2010) 72-81.
- [129].Dannaoui E, Lortholary O, Dromer F. In vitro evaluation of double and triple combinations of antifungal drugs against *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:970-8.
- [130].Singh N, Limaye AP, Forrest G, Safdar N, Munoz P, Pursell K, et al. Combination of voriconazole and caspofungin as primary therapy for invasive aspergillosis in solid organ transplant recipients: a prospective, multicenter, observational study. *Transplantation* 2006;81:320-6.
- [131].Philip A, Odabasi Z, Rodriguez J, Paetznick VL, Chen E, Rex JH, et al. In vitro synergy testing of anidulafungin with itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against *Aspergillus spp.* and *Fusarium spp.* *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3572-4.
- [132].Cacciapuoti A, Halpern J, Mendrick C, Norris C, Patel R, Loebenberg D. Interaction between posaconazole and caspofungin in concomitant treatment of mice with systemic *Aspergillus* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2587-90.

- [133]. **Lortholary O.** Associations d'antifongiques. Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF. Ann Fr Anesth Reanim 2004;60–70, numéro spécial.
- [134]. **MacCallum DM, Whyte JA, Odds FC.** Efficacy of caspofungin and voriconazole combinations in experimental aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:3697-701.
- [135]. **Marr KA, Boeckh M, Carter RA, Kim HW, Corey L.** Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 2004;39:797–802.
- [136]. **Maertens J, Glasmacher A, Herbrecht R, Thiebaut A, Cordonnier C, Segal BH, et al.** Multicenter, noncomparative study of caspofungin in combination with other antifungals as salvage therapy in adults with invasive aspergillosis. Cancer 2006;107:2888–97.
- [137]. **Johnson MD, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH.** Combination antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:693–715.
- [138]. **Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH.** In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium spp.* Antimicrob Agents Chemother 2002;46:245–7.
- [139]. **Clemons KV, Espiritu M, Parmar R, Stevens DA.** Comparative efficacies of conventional amphotericin b, liposomal amphotericin B (AmBisome), caspofungin, micafungin, and voriconazole alone and in combination against experimental murine central nervous system aspergillosis. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4867–75.
- [140]. **Imai J, Singh G, Fernandez B, Clemons KV, Stevens DA.** Efficacy of Abelcet and caspofungin, alone or in combination, against CNS aspergillosis in a murine model. J Antimicrob Chemother 2005;56:166–71.
- [141]. **Sionov E, Mendlovic S, Segal E.** Efficacy of amphotericin B or amphotericin B-intralipid in combination with caspofungin against experimental aspergillosis. J Infect 2006;53:131–9.
- [142]. **Dennis CG, Greco WR, Brun Y, Youn R, Slocum HK, Bernacki RJ, et al.** Effect of amphotericin B and micafungin combination on survival, histopathology, and fungal burden in experimental aspergillosis in the p47phox-/-mouse model of chronic granulomatous disease. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:422–7.

- [143].**Kontoyiannis DP, Hachem R, Lewis RE, Rivero GA, Torres HA, Thornby J, et al.** Efficacy and toxicity of caspofungin in combination with liposomal amphotericin B as primary or salvage treatment of invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies. *Cancer* 2003;98:292–9.
- [144].**Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al.** Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347:408–15.
- [145].**Caillot D, Thiebaut A, Herbrecht R, de Botton S, Pigneux A, Bernard F, et al.** Liposomal amphotericin B in combination with caspofungin for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancies: a randomized pilot study (Combistrat trial). *Cancer* 2007;110:2740–6.
- [146].**Aliff TB, Maslak PG, Jurcic JG, Heaney ML, Cathcart KN, Sepkowitz KA, et al.** Refractory Aspergillus pneumonia in patients with acute leukemia: successful therapy with combination caspofungin and liposomal amphotericin. *Cancer* 2003;97:1025–32.
- [147].**Datry.A , Bart-Delabesse.B,** La caspofungine : du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. *La revue de médecine interne* 27 (2006) 32–39.
- [148].**Walsh TJ, Teppler H, Donowitz GR, Johan MD, Maertens MD, Baden LR, et al.** Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med* 2004; 351:1391–402.
- [149].**Lanternier.F , Lortholary.O.** Caspofungine. *Journal de Mycologie Médicale* (2010) 20, 190-193.
- [150].**Mattiuzzi GN, Alvarado G, Giles FJ, et al.** Open-label, randomized comparison of itraconazole versus caspofungin for prophylaxis in patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:143.
- [151].**Ibrahim AS, Bowman JC, Avanesian V, et al.** Caspofungin inhibits *Rhizopus oryzae* 1,3-beta-D-glucan synthase, lowers burden in brain measured by quantitative PCR, and improves survival at a low but not a high dose during murine disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:721.

- [152].**Spellberg B, Fu Y, Edwards Jr JE, Ibrahim AS.** Combination therapy with amphotericin B lipid complex and caspofungin acetate of disseminated zygomycosis in diabetic ketoacidotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:830.
- [153].**Reed C, Bryant R, Ibrahim AS, et al.** Combination polyenecaspofungin treatment of rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Clin Infect Dis* 2008;47:364.
- [154].**Utili R, Durante-Mangoni E, Basilico C, Mattei A, Ragone E, Grossi P.** Efficacy of caspofungin addition to trimethoprim-sulfamethoxazole treatment for severe pneumocystis pneumonia in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2007; 84:685.
- [155].**Annaloro C, Della Volpe A, Usardi P, Lambertenghi Deliliers G.** Caspofungin treatment of pneumocystis pneumonia during conditioning for bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:52.
- [156].**Pilly.E 2010 20ème édition . Vidal 2011.** Antibio-garde Edition 2011. CAPSOFUNGINE Mai 2011.
- [157].**Conférence de consensus commune organisée conjointement par la SFAR, la SPILF et la SRLF.** Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte. *J Mycol Med* 2004;14: 142–6.
- [158].**Kettani .A, Belkhadir Z.H, Mosadik .A, Faroudy.M, Ababou.A,Lazreq.C, Sbihi.A.** Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale* 16 (2006) 16–25.
- [159].**Sanglard D, et al.** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 73-85.
- [160].**Yang YL, Lo HJ, 2001.** Mechanisms of antifungal agent resistance, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 34 : 79-86.
- [161].**Sionov E, Chang YC, Garraffo HM, Kwon-Chung KJ, 2009.** Heteroresistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* is intrinsic and associated with virulence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 : 2 804-2 815.
- [162].**Rajendran R, Mowat E, McCulloch E, Lappin DF, Jones B, Lang S, Majithiya JB, Warn P, Williams C, Ramage G, 2011.** Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilm is

partly associated with efflux pump activity, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 : 2 092-2 097.

[163].Espinel-Ingroff A, 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi, *Revista Iberoamericana de Micología*, 25 : 101-106.

[164].Bizerra FC, Melo ASA, Katchburian E, Freymüller E, Straus AH, Takahashi HK, Colombo AL, 2011. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 : 302-310.

[165].Fiori B, Posteraro B, Torelli R, Tumbarello M, Perlin DS, Fadda G, Sanguinetti M, 2011. In vitro activities of anidulafungine and other antifungal agents against biofilms formed by clinical isolates of different *Candida* and *Aspergillus* species, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55 : 3 031-3 035.

[166].Mowat E, Williams C, McCulloch E, Jones B, Ramage G, 2008. Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62 : 1 281-1 284.

[167].Kouidhi .B, Ben Gaied. M, Mhadhebi. L, Bakhrouf .A, Bouraoui .A. Les pompes à efflux en mycologie médicale : mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques. *Journal de Mycologie Médicale* (2010) 20, 304—314.

[168].Chapeland-Leclerc F., Bouchoux J., Goumar A., Chastin C., Villard J., et al. (2005). "Inactivation of the FCY2 gene encoding purine-cytosine permease promotes crossresistance to flucytosine and fluconazole in *Candida lusitanae*." *Antimicrob Agents Chemother* 49(8): 3101-8.

[169].Papon N., Noel T., Florent M., Gibot-Leclerc S., Jean D., et al. (2007). "Molecular mechanism of flucytosine resistance in *Candida lusitanae*: contribution of the FCY2, FCY1, and FUR1 genes to 5-fluorouracil and fluconazole cross-resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 51(1): 369-71.

[170].Sanglard D. (2002). "Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts." *Enferm Infecc Microbiol Clin* 20(9): 462-9; quiz 470, 479.

[171]. Song J. L., Harry J. B., Eastman R. T., Oliver B. G. and White T. C. (2004). "The

Candida albicans lanosterol 14-alpha-demethylase (ERG11) gene promoter is maximally induced after prolonged growth with antifungal drugs." *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1136-44.

[172].Znaidi S., Weber S., Al-Abdin O. Z., Bomme P., Saidane S., et al. (2008). "Genomewide location analysis of *Candida albicans* Upc2p, a regulator of sterol metabolism and azole drug resistance." *Eukaryot Cell* 7(5): 836-47.

[173].Selmecki A., Forche A. and Berman J. (2006). "Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*." *Science* 313(5785): 367-70.

[174].Zhang Y. Q., Gamarra S., Garcia-Effron G., Park S., Perlin D. S., et al. (2010). "Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs." *PLoS Pathog* 6(6): e1000939.

[175]. Kelly S. L., Lamb D. C., Kelly D. E., Loeffler J. and Einsele H. (1996). "Resistance to fluconazole and amphotericine in *Candida albicans* from AIDS patients." *Lancet* 348(9040): 1523-4.

[176].Nolte F. S., Parkinson T., Falconer D. J., Dix S., Williams J., et al. (1997). "Isolation and characterization of fluconazole- and amphotericin B-resistant *Candida albicans* from blood of two patients with leukemia." *Antimicrob Agents Chemother* 41(1): 196-9.

[177].Martel C. M., Parker J. E., Bader O., Weig M., Gross U., et al. "A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14alpha-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B." *Antimicrob Agents Chemother* 54(9): 3578-83.

[178].Sanglard D., Kuchler K., Ischer F., Pagani J. L., Monod M., et al. (1995). "Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters." *Antimicrob Agents Chemother* 39(11): 2378- 86.

[179].Sanglard D., Ischer F., Monod M. and Bille J. (1997). "Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene." *Microbiology* 143 (Pt 2): 405-16.

- [180].Schuetzer-Muehlbauer M., Willinger B., Krapf G., Enzinger S., Presterl E., et al. (2003). "The *Candida albicans* Cdr2p ATP-binding cassette (ABC) transporter confers resistance to caspofungin." *Mol Microbiol* 48(1): 225-35.
- [181].Coste A. T., Crittin J., Bauser C., Rohde B. and Sanglard D. (2009). "Functional analysis of cis- and trans-acting elements of the *Candida albicans* CDR2 promoter with a novel promoter reporter system." *Eukaryot Cell* 8(8): 1250-67.
- [182].Zimbeck AJ, Iqbal N, Ahlquist AM et al. FKS mutations and elevated échinocandine MIC values among *Candida glabrata* isolates from U.S. population-based surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 5042-7.
- [183].Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal échinocandine resistance. *Fungal Genet Biol* 2010; 47: 117-26.
- [184].Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 73-85.
- [185].Talarmin J.-P, Bouteille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P . Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. *Médecine et maladies infectieuses* 39 (2009) 877–885.
- [186].Howard SJ, Slater J, Sharp A, Goodwin J, Gregson L, Alastruey-Izquierdo A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of micafungin, anidulafungine and caspofungin for disseminated candidiasis due to *Candida glabrata*. Congrès ECCMID-ICC, Milan, 2011 [O485].
- [187].Andes D, Diekema DJ, Pfaller MA, Bohrmuller J, Marchillo K, Lepak A. In vivo comparison of the pharmacodynamic targets for echinocandin drugs against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:2497-506.
- [188].Baietto L, De Rosa FG, Baietto L, D'Avolio A, Pasero D, Raviolo S, et al. Caspofungin: is standard dosing optimal or inadequate? Pharmacokinetic description in a cohort of patients. Congrès ECCMID-ICC, Milan, 2011 [P802].
- [189].Baietto L, De Rosa FG, Baietto L, D'Avolio A, Pasero D, Raviolo S, et al. Anidulafungin pharmacokinetic evaluation in a cohort of critically ill patients. Congrès ECCMID-ICC, Milan, 2011 [P803].

- [190] Kurz SG, Bethel CR, Tremblay LW, Blanchard JS, Caselli E, Prati F, et al. Inhibiting the hyphen; lactamase of Mycobacterium tuberculosis (Mtb) with novel Boronate-Transitional-State-Analogs (BATSA). Congrès ECCMID-ICC, Milan, 2011 [O386].
- [191].Campoli P, Robitaille R, Laverdiere M, Sheppard D. In vitro posaconazole pharmacokinetics. Congrès ECCMID-ICC, Milan, 2011 [O484].
- [192].Vazquez J, Reboli A, Pappas P, Patterson TF, Reinhardt J, Chin-Hong P, et al. A phase IV, open-label study evaluating efficacy and safety of intravenous anidulafungin followed by oral azole for the treatment of candidaemiasol ; invasive candidiasis in US/Korean patients. Congrès ECCMID-ICC, Milan, 2011 [O153].
- [193].Fekkar. A, Meyer .I, Dannaoui .E, Uzunov .M, Eppelboin .L, et al Émergence de Candida résistants aux échinocandines. Journal de Mycologie Médicale (2012);276.
- [194].Fournier .B, F. Morio.F, Leterrier.M , Villers.D. Résistance de Candida albicans à la caspofungine : à propos d'un cas au CHU de Nantes. Journal de Mycologie Médicale (2012);287.
- [195].Redding SW, Pfaller MA, Messer SA, et al. Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *C.albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering from one or more episodes of infection. *J Clin Microbiol* **1997**; 35:17615.
- [196].Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andreumont A, French Candidemia Study Group. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8:405-12.
- [197].Tortorano.AM et al. Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance International Journal of Antimicrobial Agents 27 (2006) 359-366.
- [198].Centre national de référence, rapport d'activité : <http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2005/Mymol.html>
- [199].Sanglard.D and odds.FC. Resistance of Candida species to antifugal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002 Feb;2(2):73-85.

- [200].Desnos-Ollivier M, Bretagne S, Raoux D, Hoinard D, Dromer F, and Dannaoui E. 2008. Mutations in the *fkp1* gene in *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* correlate with elevated caspofungin MICs uncovered in AM3 medium using the method of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3092-8.
- [201].Dannaoui E, Lortholary O, Raoux D, Bougnoux ME, Galeazzi G, et al . 2008. Comparative in vitro activities of caspofungin and micafungin, determined using the method of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, against yeast isolates obtained in France in 2005-2006. *Antimicrob Agents Chemother* 52:778-81
- [202].Lortholary O, Dannaoui E, Raoux D, Hoinard D, Datry A, et al . 2007. In vitro susceptibility to posaconazole of 1,903 yeast isolates recovered in France from 2003 to 2006 and tested by the method of the European committee on antimicrobial susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3378-80.
- [203].Pfeiffer CD, Garcia-Effron G, Zaas AK, Perfect JR, Perlin DS, Alexander BD. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. *J Clin Microbiol* 2010; 48(7): 2373-80.
- [204].Lortholary O, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Fontanet A, Bretagne S, Dromer F. Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(2): 532-8.



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

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله العظم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاو 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 والترف.
- أن لا أفشي الأسرار التي قد تعهد إلى أو التي قد أطلع عليها أثناء القيام بمهامي، وأن لا أوافق على استعمال معلوماتي لإفساد الأخلاق أو تشجيع الأعمال الإجرامية.
- لأحصى بتقدير الناس إن أنا تقيدت بعهودي، أو أحتقر من طرف زملائي إن أنا لم أف بالتزاماتي.

"والله على ما أقول شهيد"



دراسة حساسية 58 سلالة مبيضية للكاسبفونجين معزولة
بالمستشفى العسكري محمد الخامس بالرباط.

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم.....

من طرف

الآنسة : مريمة هوفر

المزودة : في 3 يناير 1988 بالقنيطرة

لنيل شهادة الدكتوراة في الصيدلة

الكلمات الأساسية : الحساسية, دراسة الحساسية لمضادات الفطريات, المبيضات, الكاسبفونجين, (caspofungine) ..

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد : ادريس لحلو امين

أستاذ في علم الجراثيم

السيد : بدر الدين الميموني

أستاذ في علم الطفيليات

السيدة : نزهة المسعودي

أستاذة مبرزة في علم الدم البيولوجي

السيد : جمال المساوري

أستاذ مبرز في الكيمياء العلاجية

السيد : عبد الله دامي

أستاذ مبرز في الكيمياء الإحيائية والكيميائية