

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

ANNEE: 2012

THESE N°: 67

SENSIBILITÉ *IN VITRO* AU KÉTOCONAZOLE DE 85
SOUCHES DE *CANDIDA* ISOLÉES À L'HÔPITAL MILITAIRE
D'INSTRUCTION MOHAMMED V

THESE

Présentée et soutenue publiquement le :

PAR

Mlle. ILHAM MAATOUK
Né le 09 Août 1986 à Casablanca

Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES :

JURY

Mme. W. EL MELLOUKI

Professeur de Parasitologie-Mycologie

Mr. B. E. LMIMOUNI

Professeur de Parasitologie-Mycologie

Mr. I. LAHLOU AMINE

Professeur de Microbiologie

Mr. J. LAMSAOURI

Professeur agrégé de Chimie-Thérapeutique

Mr. M. ER-RAMI

Professeur agrégé de Parasitologie-Mycologie

PRESIDENT

RAPPORTEUR

JUGES

Membre associé



UNIVERSITE MOHAMMED V- SOUISSI

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE - RABAT

DOYENS HONORAIRES :

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

ADMINISTRATION :

- Doyen : Professeur Najia HAJJAJ
Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et 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
Conservateur : Ahmed ZAHIDI

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

Oto-Rhino-Laryngologie
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
Pathologie 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 Houria ép.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*
43. Pr. YAHYAOUI Mohamed

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

Décembre 1988

44. Pr. BENHAMAMOUCHE Mohamed Najib
 45. Pr. DAFIRI Rachida
 46. Pr. FAIK Mohamed
 47. Pr. HERMAS Mohamed
 48. Pr. TOLOUNE Farida*

Chirurgie Pédiatrique
 Radiologie
 Urologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

49. Pr. ADNAOUI Mohamed
 50. Pr. AOUNI Mohamed
 51. Pr. BENAMEUR Mohamed*
 52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali
 53. Pr. CHAD Bouziane
 54. Pr. CHKOFF Rachid
 55. Pr. KHARBACH Aïcha
 56. Pr. MANSOURI Fatima
 57. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda
 58. Pr. SEDRATI Omar*
 59. Pr. TAZI Saoud Anas

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

Février Avril Juillet et Décembre 1991

60. Pr. AL HAMANY Zaïtounia
 61. Pr. ATMANI Mohamed*
 62. Pr. AZZOUZI Abderrahim
 63. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM
 64. Pr. BELKOUCHI Abdelkader
 65. Pr. BENABDELLAH Chahrazad
 66. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif
 67. Pr. BENSOUDA Yahia
 68. Pr. BERRAHO Amina
 69. Pr. BEZZAD Rachid
 70. Pr. CHABRAOUI Layachi
 71. Pr. CHANA El Houssaine*
 72. Pr. CHERRAH Yahia
 73. Pr. CHOKAIRI Omar
 74. Pr. FAJRI Ahmed*
 75. Pr. JANATI Idrissi Mohamed*
 76. Pr. KHATTAB Mohamed
 77. Pr. NEJMI Maati
 78. Pr. OUAALINE Mohammed*
 79. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH

Anatomie-Pathologique
 Anesthésie Réanimation
 Anesthésie Réanimation
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Hématologie
 Chirurgie Générale
 Pharmacie galénique
 Ophtalmologie
 Gynécologie Obstétrique
 Biochimie et Chimie
 Ophtalmologie
 Pharmacologie
 Histologie Embryologie
 Psychiatrie
 Chirurgie Générale
 Pédiatrie
 Anesthésie-Réanimation
 Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
 Pharmacologie

80. Pr. TAOUFIK Jamal

Chimie thérapeutique

Décembre 1992

81. Pr. AHALLAT Mohamed
82. Pr. BENOUDA Amina
83. Pr. BENSOUA Adil
84. Pr. BOUJIDA Mohamed Najib
85. Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza
86. Pr. CHRAIBI Chafiq
87. Pr. DAOUDI Rajae
88. Pr. DEHAYNI Mohamed*
89. Pr. EL HADDOURY Mohamed
90. Pr. EL OUAHABI Abdessamad
91. Pr. FELLAT Rokaya
92. Pr. GHAFIR Driss*
93. Pr. JIDDANE Mohamed
94. Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine
95. Pr. TAGHY Ahmed
96. Pr. ZOUHDI Mimoun

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

Mars 1994

97. Pr. AGNAOU Lahcen
98. Pr. AL BAROUDI Saad
99. Pr. BENCHERIFA Fatima
100. Pr. BENJAAFAR Nouredine
101. Pr. BENJELLOUN Samir
102. Pr. BEN RAIS Nozha
103. Pr. CAOUI Malika
104. Pr. CHRAIBI Abdelmjid
105. Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT
106. Pr. EL AOUAD Rajae
107. Pr. EL BARDOUNI Ahmed
108. Pr. EL HASSANI My Rachid
109. Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur
110. Pr. EL KIRAT Abdelmajid*
111. Pr. ERROUGANI Abdelkader
112. Pr. ESSAKALI Malika
113. Pr. ETTAYEBI Fouad
114. Pr. HADRI Larbi*
115. Pr. HASSAM Badredine
116. Pr. IFRINE Lahssan
117. Pr. JELTHI Ahmed
118. Pr. MAHFOUD Mustapha
119. Pr. MOUDENE Ahmed*

Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Ophtalmologie
Radiothérapie
Chirurgie Générale
Biophysique
Biophysique
Endocrinologie et Maladies Métaboliques
Gynécologie Obstétrique
Immunologie
Traumato-Orthopédie
Radiologie
Médecine Interne
Chirurgie Cardio- Vasculaire
Chirurgie Générale
Immunologie
Chirurgie Pédiatrique
Médecine Interne
Dermatologie
Chirurgie Générale
Anatomie Pathologique
Traumatologie – Orthopédie
Traumatologie- Orthopédie

120. Pr. OULBACHA Said
 121. Pr. RHRAB Brahim
 122. Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR
 123. Pr. SLAOUI Anas

Chirurgie Générale
 Gynécologie – Obstétrique
 Dermatologie
 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 Lalla Ouafae
 133. Pr. EL ABBADI Najia
 134. Pr. HANINE Ahmed*
 135. Pr. JALIL Abdelouahed
 136. Pr. LAKHDAR Amina
 137. Pr. MOUANE Nezha

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

Mars 1995

138. Pr. ABOUQUAL Redouane
 139. Pr. AMRAOUI Mohamed
 140. Pr. BAIDADA Abdelaziz
 141. Pr. BARGACH Samir
 142. Pr. BEDDOUCHE Amograne*
 143. Pr. BENZAOUZ Mustapha
 144. Pr. CHAARI Jilali*
 145. Pr. DIMOU M'barek*
 146. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*
 147. Pr. EL MESNAOUI Abbes
 148. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila
 149. Pr. FERHATI Driss
 150. Pr. HASSOUNI Fadil
 151. Pr. HDA Abdelhamid*
 152. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed
 153. Pr. IBRAHIMY Wafaa
 154. Pr. MANSOURI Aziz

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

155. Pr. OUAZZANI CHAHDI Bahia
 156. Pr. RZIN Abdelkader*
 157. Pr. SEFIANI Abdelaziz

Ophtalmologie
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale
 Génétique

158. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali

Réanimation Médicale

Décembre 1996

159. Pr. AMIL Touriya*
160. Pr. BELKACEM Rachid
161. Pr. BELMAHI Amin
162. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim
163. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan
164. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*
165. Pr. GAOUZI Ahmed
166. Pr. MAHFOUDI M'barek*
167. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
168. Pr. MOHAMMADI Mohamed
169. Pr. MOULINE Soumaya
170. Pr. OUADGHIRI Mohamed
171. Pr. OUZEDDOUN Naima
172. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Radiologie
Chirurgie Pédiatrie
Chirurgie réparatrice et plastique
Ophtalmologie
Chirurgie Générale
Parasitologie
Pédiatrie
Radiologie
Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-ptisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

Novembre 1997

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

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

Novembre 1998

193. Pr. AFIFI RAJAA
194. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali*

Gastro-Entérologie
Pneumo-ptisiologie

195. Pr. ALOUANE Mohammed*
 196. Pr. BENOMAR ALI
 197. Pr. BOUGTAB Abdesslam
 198. Pr. ER RIHANI Hassan
 199. Pr. EZZAITOUNI Fatima
 200. Pr. KABBAJ Najat
 201. Pr. LAZRAK Khalid (M)

Oto-Rhino-Laryngologie
 Neurologie
 Chirurgie Générale
 Oncologie Médicale
 Néphrologie
 Radiologie
 Traumatologie Orthopédie

Novembre 1998

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

Hématologie
 Cardiologie
 Anatomie Pathologique

Janvier 2000

205. Pr. ABID Ahmed*
 206. Pr. AIT OUMAR Hassan
 207. Pr. BENCHERIF My Zahid
 208. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd
 209. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine
 210. Pr. CHAOUI Zineb
 211. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer
 212. Pr. ECHARRAB El Mahjoub
 213. Pr. EL FTOUH Mustapha
 214. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*
 215. Pr. EL OTMANY Azzedine
 216. Pr. GHANNAM Rachid
 217. Pr. HAMMANI Lahcen
 218. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim
 219. Pr. ISMAILI Hassane*
 220. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss
 221. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*
 222. Pr. TACHINANTE Rajae
 223. 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

224. Pr. AIDI Saadia
 225. Pr. AIT OURHROUI Mohamed
 226. Pr. AJANA Fatima Zohra
 227. Pr. BENAMR Said
 228. Pr. BENCHEKROUN Nabiha
 229. Pr. CHERTI Mohammed
 230. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma

Neurologie
 Dermatologie
 Gastro-Entérologie
 Chirurgie Générale
 Ophtalmologie
 Cardiologie
 Anesthésie-Réanimation

231. Pr. EL HASSANI Amine
232. Pr. EL IDGHIRI Hassan
233. Pr. EL KHADER Khalid
234. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*
235. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan
236. Pr. HSSAIDA Rachid*
237. Pr. LACHKAR Azzouz
238. Pr. LAHLOU Abdou
239. Pr. MAFTAH Mohamed*
240. Pr. MAHASSINI Najat
241. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae
242. Pr. NASSIH Mohamed*
243. Pr. ROUIMI Abdelhadi

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

Décembre 2001

244. Pr. ABABOU Adil
245. Pr. AOUAD Aicha
246. Pr. BALKHI Hicham*
247. Pr. BELMEKKI Mohammed
248. Pr. BENABDELJLIL Maria
249. Pr. BENAMAR Loubna
250. Pr. BENAMOR Jouda
251. Pr. BENELBARHDADI Imane
252. Pr. BENNANI Rajae
253. Pr. BENOUACHANE Thami
254. Pr. BENYOUSSEF Khalil
255. Pr. BERRADA Rachid
256. Pr. BEZZA Ahmed*
257. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi
258. Pr. BOUHOUCHE Rachida
259. Pr. BOUMDIN El Hassane*
260. Pr. CHAT Latifa
261. Pr. CHELLAOUI Mounia
262. Pr. DAALI Mustapha*
263. Pr. DRISSI Sidi Mourad*
264. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira
265. Pr. EL HIJRI Ahmed
266. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid
267. Pr. EL MADHI Tarik
268. Pr. EL MOUSSAIF Hamid
269. Pr. EL OUNANI Mohamed
270. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil
271. Pr. ETTAIR Said
272. Pr. GAZZAZ Miloudi*

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

273. Pr. GOURINDA Hassan
 274. Pr. HRORA Abdelmalek
 275. Pr. KABBAJ Saad
 276. Pr. KABIRI EL Hassane*
 277. Pr. LAMRANI Moulay Omar
 278. Pr. LEKEHAL Brahim
 279. Pr. MAHASSIN Fattouma*
 280. Pr. MEDARHRI Jalil
 281. Pr. MIKDAME Mohammed*
 282. Pr. MOHSINE Raouf
 283. Pr. NABIL Samira
 284. Pr. NOUINI Yassine
 285. Pr. OUALIM Zouhir*
 286. Pr. SABBAAH Farid
 287. Pr. SEFIANI Yasser
 288. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia
 289. Pr. TAZI MOUKHA Karim

Chirurgie-Pédiatrique
 Chirurgie Générale
 Anesthésie-Réanimation
 Chirurgie Thoracique
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Médecine Interne
 Chirurgie Générale
 Hématologie Clinique
 Chirurgie Générale
 Gynécologie Obstétrique
 Urologie
 Néphrologie
 Chirurgie Générale
 Chirurgie Vasculaire Périphérique
 Pédiatrie
 Urologie

Décembre 2002

290. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane*
 291. Pr. AMEUR Ahmed *
 292. Pr. AMRI Rachida
 293. Pr. AOURARH Aziz*
 294. Pr. BAMOU Youssef *
 295. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene*
 296. Pr. BENBOUAZZA Karima
 297. Pr. BENZEKRI Laila
 298. Pr. BENZZOUBEIR Nadia*
 299. Pr. BERNOUSSI Zakiya
 300. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya
 301. Pr. CHOHO Abdelkrim *
 302. Pr. CHKIRATE Bouchra
 303. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair
 304. Pr. EL ALJ Haj Ahmed
 305. Pr. EL BARNOUSSI Leila
 306. Pr. EL HAOURI Mohamed *
 307. Pr. EL MANSARI Omar*
 308. Pr. ES-SADEL Abdelhamid
 309. Pr. FILALI ADIB Abdelhai
 310. Pr. HADDOUR Leila
 311. Pr. HAJJI Zakia
 312. Pr. IKEN Ali
 313. Pr. ISMAEL Farid
 314. Pr. JAAFAR Abdeloihab*
 315. Pr. KRIOULE Yamina

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

316. Pr. LAGHMARI Mina
 317. Pr. MABROUK Hfid*
 318. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss*
 319. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid*
 320. Pr. MOUSTAINE My Rachid
 321. Pr. NAITLHO Abdelhamid*
 322. Pr. OUJILAL Abdelilah
 323. Pr. RACHID Khalid *
 324. Pr. RAISS Mohamed
 325. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha*
 326. Pr. RHOU Hakima
 327. Pr. SIAH Samir *
 328. Pr. THIMOU Amal
 329. Pr. ZENTAR Aziz*
 330. Pr. ZRARA Ibtisam*

Ophtalmologie
 Traumatologie Orthopédie
 Gynécologie Obstétrique
 Cardiologie
 Traumatologie Orthopédie
 Médecine Interne
 Oto-Rhino-Laryngologie
 Traumatologie Orthopédie
 Chirurgie Générale
 Pneumophtisiologie
 Néphrologie
 Anesthésie Réanimation
 Pédiatrie
 Chirurgie Générale
 Anatomie Pathologique

PROFESSEURS AGREGES:

Janvier 2004

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

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

357. Pr. ZARZUR Jamila

Cardiologie

Janvier 2005

358. Pr. ABBASSI Abdellah
359. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
360. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
361. Pr. ALLALI Fadoua
362. Pr. AMAR Yamama
363. Pr. AMAZOUZI Abdellah
364. Pr. AZIZ Nouredine*
365. Pr. BAHIRI Rachid
366. Pr. BARKAT Amina
367. Pr. BENHALIMA Hanane
368. Pr. BENHARBIT Mohamed
369. Pr. BENYASS Aatif
370. Pr. BERNOUSSI Abdelghani
371. Pr. BOUKLATA Salwa
372. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed
373. Pr. DOUDOUH Abderrahim*
374. Pr. EL HAMZAOUI Sakina
375. Pr. HAJJI Leila
376. Pr. HESSISSEN Leila
377. Pr. JIDAL Mohamed*
378. Pr. KARIM Abdelouahed
379. Pr. KENDOUCI Mohamed*
380. Pr. LAAROUSSI Mohamed
381. Pr. LYAGOUBI Mohammed
382. Pr. NIAMANE Radouane*
383. Pr. RAGALA Abdelhak
384. Pr. SBIHI Souad
385. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam
386. Pr. ZERAIDI Najia

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

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*
424. Pr. AFIFI Yasser
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

Rhumatologie
Dermatologie
Radiologie
Dermatologie
Hématologie
O.R.L
Biophysique
Chirurgie - Pédiatrique
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Chirurgie Cardio – Vasculaire
Gynécologie Obstétrique

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
 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

Cardiologie
 Gastro-entérologie
 Cardiologie
 Anesthésie Réanimation
 Urologie
 Médecine Interne
 Anesthésie Réanimation
 Microbiologie
 Radiologie
 Urologie
 Pédiatrie
 Psychiatrie
 Chirurgie – Pédiatrique
 Médecine Interne
 Pharmacie Galénique
 Parasitologie
 Radiothérapie
 O.R.L
 Psychiatrie
 Endocrinologie
 Psychiatrie
 Anatomie Pathologique
 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 Ez zohra *
 465. Pr. BALOUCH Lhousaine *
 466. Pr. SELKANE Chakir *
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef *
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *
 469. Pr. EL ABSI Mohamed
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad *
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq*
 473. Pr. GHARIB Nouredine
 474. Pr. TABERKANET Mustafa *
 475. Pr. ISMAILI Nadia

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 générale
 Chirurgie plastique
 Chirurgie vasculaire périphérique
 Dermatologie

476. Pr. MASRAR Azlarab	Hématologie biologique
477. Pr. RABHI Monsef *	Médecine interne
478. Pr. MRABET Mustapha *	Médecine préventive santé publique et hygiène
479. Pr. SEKHSOKH Yessine *	Microbiologie
480. Pr. SEFFAR Myriame	Microbiologie
481. Pr. LOUZI Lhoussain *	Microbiologie
482. Pr. MRANI Saad *	Virologie
483. Pr. GANA Rachid	Neuro chirurgie
484. Pr. ICHOU Mohamed *	Oncologie médicale
485. Pr. TACHFOUTI Samira	Ophtalmologie
486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine	Ophtalmologie
487. Pr. MELLAL Zakaria	Ophtalmologie
488. Pr. AMMAR Haddou *	ORL
489. Pr. AOUI Sarra	Parasitologie
490. Pr. TLIGUI Houssain	Parasitologie
491. Pr. MOUTAJ Redouane *	Parasitologie
492. Pr. ACHACHI Leila	Pneumo phtisiologie
493. Pr. MARC Karima	Pneumo phtisiologie
494. Pr. BENZIANE Hamid *	Pharmacie clinique
495. Pr. CHERKAOUI Naoual *	Pharmacie galénique
496. Pr. EL OMARI Fatima	Psychiatrie
497. Pr. MAHI Mohamed *	Radiologie
498. Pr. RADOUANE Bouchaib*	Radiologie
499. Pr. KEBDANI Tayeb	Radiothérapie
500. Pr. SIFAT Hassan *	Radiothérapie
501. Pr. HADADI Khalid *	Radiothérapie
502. Pr. ABIDI Khalid	Réanimation médicale
503. Pr. MADANI Naoufel	Réanimation médicale
504. Pr. TANANE Mansour *	Traumatologie orthopédie
505. Pr. AMHAJJI Larbi *	Traumatologie orthopédie

Mars 2009

Pr. BJIJOU Younes	Anatomie
Pr. AZENDOUR Hicham *	Anesthésie Réanimation
Pr. BELYAMANI Lahcen*	Anesthésie Réanimation
Pr. BOUHSAIN Sanae *	Biochimie
Pr. OUKERRAJ Latifa	Cardiologie
Pr. LAMSAOURI Jamal *	Chimie Thérapeutique
Pr. MARMADE Lahcen	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AMAHZOUNE Brahim*	Chirurgie Cardio-vasculaire
Pr. AIT ALI Abdelmounaim *	Chirurgie Générale
Pr. BOUNAIM Ahmed *	Chirurgie Générale
Pr. EL MALKI Hadj Omar	Chirurgie Générale
Pr. MSSROURI Rahal	Chirurgie Générale
Pr. CHTATA Hassan Toufik *	Chirurgie Vasculaire Périphérique

Pr. BOUI Mohammed *
 Pr. KABBAJ Nawal
 Pr. FATHI Khalid
 Pr. MESSAOUDI Nezha *
 Pr. CHAKOUR Mohammed *
 Pr. DOGHMI Kamal *
 Pr. ABOUZAHIR Ali*
 Pr. ENNIBI Khalid *
 Pr. EL OUENNASS Mostapha
 Pr. ZOUHAIR Said*
 Pr. L'kassimi Hachemi*
 Pr. AKHADDAR Ali *
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia
 Pr. AGADR Aomar *
 Pr. KARBOUBI Lamya
 Pr. MESKINI Toufik
 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 *

Dermatologie
 Gastro-entérologie
 Gynécologie obstétrique
 Hématologie biologique
 Hématologie biologique
 Hématologie clinique
 Médecine interne
 Médecine interne
 Microbiologie
 Microbiologie
 Microbiologie
 Neuro-chirurgie
 Neurologie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pédiatrie
 Pneumo-phtisiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Radiologie
 Rhumatologie
 Rhumatologie
 Traumatologie orthopédique
 Traumatologie orthopédique

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

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

Pr. NAZIH Mouna*
Pr. LAMALMI Najat
Pr. ZOUAIDIA Fouad
Pr. BELAGUID Abdelaziz
Pr. DAMI Abdellah*
Pr. CHADLI Mariama*

Hématologie
Anatomie pathologique
Anatomie pathologique
Physiologie
Biochimie chimie
Microbiologie

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES
PROFESSEURS

1. Pr. ABOUDRAR Saadia
2. Pr. ALAMI OUHABI Naïma
3. Pr. ALAOUI KATIM
4. Pr. ALAOUI SLIMANI Lalla Naïma
5. Pr. ANSAR M'hammed
6. Pr. BOUKLOUZE Abdelaziz
7. Pr. BOUHOUCHE Ahmed
8. Pr. BOURJOUANE Mohamed
9. Pr. CHAHED OUZZANI Lalla Chadia
10. Pr. DAKKA Taoufiq
11. Pr. DRAOUI Mustapha
12. Pr. EL GUESSABI Lahcen
13. Pr. ETTAIB Abdelkader
14. Pr. FAOUZI Moulay El Abbas
15. Pr. HMAMOUCHE Mohamed
16. Pr. IBRAHIMI Azeddine
17. Pr. KABBAJ Ouafae
18. Pr. KHANFRI Jamal Eddine
19. Pr. REDHA Ahlam
20. Pr. OULAD BOUYAHYA IDRISSE Med
21. Pr. TOUATI Driss
22. Pr. ZAHIDI Ahmed
23. Pr. ZELLOU Amina

Physiologie
Biochimie
Pharmacologie
Histologie-Embryologie
Chimie Organique et Pharmacie Chimique
Applications Pharmaceutiques
Génétique Humaine
Microbiologie
Biochimie
Physiologie
Chimie Analytique
Pharmacognosie
Zootechnie
Pharmacologie
Chimie Organique
Biotechnologie
Biochimie
Biologie
Biochimie
Chimie Organique
Pharmacognosie
Pharmacologie
Chimie Organique

* *Enseignants Militaires*

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots...
Tous les mots ne sauraient formuler les phrases...

*Pour exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la
reconnaissance...*

Aussi, c'est tout simplement que...



Je dédie cette Thèse... ✍

A mon très cher père

МААТОВУК Ahmed

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour que j'éprouve pour toi. Quoique je dise quoique je fasse, je ne saurai te traduire les vagues de sentiments qui déferlent en moi. Tu représenteras toujours pour moi l'exemple vivant de persévérance, d'indulgence, de sagesse, d'honnêteté, et de fermeté. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté.

En écrivant ces quelques mots, j'ai les larmes aux yeux. Tu m'as tant donné. Tes conseils et tes morales ont guidé mes pas vers la réussite. Tu as su m'apporter la force qui m'a poussé à faire ce qu'il y a de mieux en moi. Tu as su m'inculquer le sens de responsabilité, d'optimisme et de confiance face aux difficultés et défaites de la vie.

Aujourd'hui, je te réalise l'un de tes rêves, je t'offre ce travail en espérant que tu sauras en trouver, cher père, le témoignage de mon grand amour et mes sincères remerciements.

Puisse DIEU, le tout puissant, t'accorder santé, quiétude de l'esprit et te préserver afin que je puisse te combler à mon tour. Inchallah.

Je t'aime

A ma très chère mère

RAMMAL Malika

Fondatrice de mes jours, je ne saurai t'exprimer mon amour. Je te dois la vie, je te dois ce que je suis. A travers ces lignes je voudrai te rendre hommage. Toutes les phrases aussi éloquentes soit-elles ne sauraient t'exprimer mes témoignages. Tu représenteras toujours pour moi un chef d'œuvre de tendresse et de délicatesse.

Bébé, tu as veillé à mon bien être avec sensibilité ; Enfant, tu m'as appris mes premiers mots, tu as soutenu mes premiers pas, tu m'as hissé dans mes chutes ; Adolescente, tu m'as inspiré la sagesse ; Etudiante, tu as veillé à mon succès avec dévouement, tu m'as submergé avec ton affection tout au long de mon parcours.

Sur les ailes de ton affection, je me suis envolée. Aujourd'hui au bout du chemin tant attendu, je me réjouis de t'offrir le fruit de tes sacrifices. En ce jour mémorable, reçoit, chère mère, ce travail en signe de mon profond amour et ma vive reconnaissance.

Puisse DIEU le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour. Inchallah.

Je t'aime

*À mes très chères sœurs Lamia, Hanane, et mon très cher
frère Anasse*

*Votre Sympathie et vos encouragements ont constitué pour moi une aide
morale inestimable.*

*Sachez que l'amour et le respect que je porte pour vous sont uniques. Vous
êtes et vous resterez mes frères et sœurs dont je suis fière*

*Pour toute l'ambiance dont vous m'avez entouré, pour votre spontanéité et
vos élans chaleureux, en souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les
meilleurs et les plus agréables moments. Recevez ce travail que je vous dédie
en témoignage de mon affection et mon attachement.*

*Puisse DIEU, le tout puissant, exhausser vos vœux et vous accorder une
longue et heureuse vie.*

Je vous aime

A mes grands-parents paternels

Mohammed et Fatima

A mon grand-père maternel

Bouchaib

Que j'ai la chance d'avoir dans ma vie, vous êtes toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite.

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières.

Que DIEU tout puissant vous réserve santé et longue vie

A la mémoire de ma grand-mère maternel

Zahra

Le destin a fait que tu partes trop tôt, avant même de te connaître, jouir de ce bonheur et cueillir tes bénédictions interminables. Je regrette de ne t'avoir jamais connu. Je te dédie ce travail en priant DIEU d'accueillir ton âme dans sainte miséricorde et son éternel paradis.

A ma grande famille МААТОВУК

Dont je suis fière de porter le nom.

A mes oncles, mes tantes ainsi que mes cousins et cousines.

Puisse ce travail témoigner de mon profond attachement.

A la famille РАММАЛ

A mes oncles, mes tantes ainsi que mes cousins et cousines.

Je cite particulièrement ma chère tante Fatima

Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour toi. Quelque part, tu as participé à mon épanouissement, tu m'as encouragé et soutenu. Tu m'étais toujours proche. A tout stade de ma vie, tu étais là.

Puisse ce travail témoigner de ma profonde affection et de mon sincère estime.

*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

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

A.B. Kaoutar, T. Fadwa, S. Zohra, K. Hajar, A. Hadda

*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 le personnel du Service de Parasitologie et
Mycologie médicales de L'H.M.I.M.V RABAT*

J'ai été énormément touchée par votre gentillesse, disponibilité et vos qualités humaines. Votre aide et vos conseils m'étaient très précieux. Je n'oublierai pas vos encouragements qui m'ont permis d'avoir confiance en moi et de mener à bien mon travail. L'ambiance que vous créez au sein du laboratoire rend le travail au laboratoire un vrai plaisir.

*A tous les Internes et Résidents et les étudiants en
Master Biologie*

Qui ont participé à la réalisation et au bon déroulement de ce travail.

Je cite en particulier,

EL IDRISSI OBAIDA Fatima Zahra

Tu t'es grandement impliquée dans l'élaboration de ce travail. Ton aide m'était très utile dans chaque étape.

Ton savoir faire m'a été un fort appui. J'ai admiré en toi tes qualités humaines et professionnelles ainsi que ta compétence et ta disponibilité chaque fois que tu étais sollicité.

Je tiens à t'exprimer ma gratitude pour ta contribution et ton implication.

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 leurs 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 Maître et Président de Thèse,
Madame Le Pharmacien Colonel
WAFÀ EL MELLOUKI
Professeur de Parasitologie - Mycologie
Chef de pôle des laboratoires de l'HMIMV*



*Nous sommes très sensibles à l'hommage que vous nous faites en acceptant la
présidence de notre jury de thèse.*

*C'est un grand honneur pour nous que notre travail soit jugé par le grand
Maître de Parasitologie-Mycologie que vous êtes.*

*Vos qualités humaines et professionnelles jointes à votre compétence seront
pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre profession.*

*Nous tenons à vous remercier pour le meilleur accueil que vous nous avez
réservé au laboratoire ainsi que pour la qualité des cours que vous nous avez
disposés toujours aussi clairs.*

*Veillez croire à l'expression de notre grande admiration et notre profond
respect.*

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



Votre cordialité, votre gentillesse, et votre compréhension nous ont profondément marquées, mais l'une des choses que nous retiendrons de vous est votre écoute. Vous étiez toujours là attentionné et attentif à nos soucis.

Vos directives nous ont permis d'aller de l'avant dans la réalisation de ce travail, vous vous y êtes impliqués par vos instructions, vos remarques, mais aussi par vos encouragements dans les moments clés de son élaboration.

Nous tenons à vous remercier aussi pour cette liberté que vous nous avez permise, votre manière de penser et de procéder, votre manière d'être, bref toute votre personnalité.

Vous êtes un grand, plus qu'un professeur à mes yeux, je vous respecte énormément...

*A notre Maître et Juge de Thèse,
Monsieur Le Pharmacien Lieutenant Colonel
IDRISS LAHLOU AMINE
Professeur de Microbiologie*



Nous vous sommes très reconnaissants de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail. Vous avez l'amabilité de discuter avec nous certains points clés de notre analyse, vos remarques pertinentes contribueront sans doute au perfectionnement du présent travail.

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

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 Pharmacien Commandant
MOHAMMED ER-RAMI
Professeur agrégé de Parasitologie-Mycologie*



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

Vos remarques pertinentes contribueront sans doute au perfectionnement du présent travail.

Votre compétence, votre dynamique, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en nous une grande admiration et un profond respect.

Veillez accepter, Monsieur, l'assurance de notre estime et profond respect.

*A notre Maître et Juge de Thèse,
Monsieur Le Pharmacien Commandant
JAMAL LAMSAOUIRI
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.*

SOMMAIRE

I.	Introduction	1
II.	Matériels et méthodes	5
	II.1 Lieu et période de l'étude	6
	II.2 Critères d'inclusion	6
	II.3 Méthodologie	6
III.	Résultats	17
	III.1 Répartition des espèces isolées	19
	III.2 Répartition des espèces selon le type de prélèvement	20
	III.3 Sensibilité in vitro au kétoconazole des espèces isolées.....	22
	III.4 Sensibilité selon le type de prélèvement	24
	III.5 Sensibilité selon les espèces.....	29
IV.	Discussion	33
	IV.1 Etude de la sensibilité in vitro aux antifongiques	33
	IV.1.1 Indications et objectifs	33
	IV.1.2 Moyens d'étude de la sensibilité in vitro	35
	1. Méthodes par dilution	35
	1.1 En milieu solide	36
	1.2 En milieu semi solide	36
	1.3 En milieu liquide	39
	2. Méthodes par diffusion.....	49
	3. Méthode par dilution affusion : E-Test	54
	4. La technologie Vitek	58
	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	65
	3. Facteurs compliquant la corrélation in vitro/in vivo	66
	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'antifongogramme	73
IV.2	Kétoconazole	77
IV.2.1	Chimie	77
IV.2.2	Activités pharmacologiques	78
IV.2.3	Pharmacologie.....	82
1.	Posologie et administration.....	82
2.	Taux sériques	83
3.	Taux sériques chez les immunodéprimés	84
4.	Pharmacocinétique	85
5.	Interactions médicamenteuses	88
6.	Indications thérapeutiques	94
IV.2.6	Efficacité clinique	109
IV.2.7	Tolérance du Kétoconazole.....	110
1.	Effets secondaires hépatiques et endocriniens	110
2.	Prophylaxie antifongique chez les neutropéniques	111
3.	Synergie avec les cellules de défenses de l'organisme	112
4.	Résistance	112
5.	Effets indésirables	112
IV.3	Résistances	113
IV.3.1	Résistances aux antifongiques.....	113
1.	Définition	114
2.	Types de résistances.....	114
3.	Causes des résistances aux antifongiques	116
IV.3.2	Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés	116
1.	Diminution de l'affinité pour la cible	116
2.	Multiplication des copies de 14 α déméthylase	117
3.	Blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol	117
4.	Surexpression des pompes à efflux	117
IV.4	Données épidémiologiques.....	119

1. Epidémiologie des résistances aux antifongiques de <i>Candida</i>	119
2. Résistances aux azolés chez les patients VIH ⁺	119
3. Facteurs de risque d'émergence des résistances aux antifongiques.	121
4. Intérêt de la surveillance	122
V. Conclusion	123
Résumés	126
Références bibliographiques	129



Introduction

I. Introduction :

Au cours de ces vingt dernières années, il a été observé une augmentation constante des infections fongiques invasives nosocomiales devenant ainsi un problème de santé publique. Cela est principalement dû à l'intensification des protocoles d'immunosuppression en oncologie, mais également des procédures invasives en réanimation et transplantation d'organes. Elles sont également communautaires, notamment au cours de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et à la faveur des voyages pour les mycoses tropicales ^[1].

Les agents fongiques responsables des mycoses invasives sont les champignons filamenteux tels que l'*Aspergillus*, et les levures surtout celles appartenant au genre *Candida* puisqu'on trouve 10 000 cas d'aspergillose invasive qui surviennent chaque année aux États-Unis et, selon les continents, les candidémies occupent entre la quatrième et la septième position parmi les septicémies. De plus, même si *Candida albicans* reste l'agent le plus fréquemment impliqué au cours des infections fongiques systémiques, des espèces fongiques ont émergé surtout chez les patients aux défenses immunitaires amoindries (les patients greffés, sidéens, héroïnomanes, traités par corticoïdes à long terme, présentant une pathologie hématologique, diabétiques...), comme *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, ou récemment décrites comme *C. dubliniensis*. Ces dernières souches naturellement sensibles ont acquis des résistances, ce qui dans certains cas a pu être corrélé avec l'évolution clinique ^[2].

Une étude récente montre que les infections fongiques et en particulier les candidémies, ont une incidence de 0,20 à 0,38 pour 1000 admissions. *Candida albicans* est identifié dans 56 % des cas et la mortalité afférente à 30 jours est de 37,9 %. Face à l'importance et à la gravité de cette pathologie, le biologiste doit pouvoir communiquer le plus rapidement possible au clinicien l'identité de la souche isolée pour recommander un traitement de première intention ^[3].

La thérapeutique antifongique est longtemps restée cantonnée à un petit nombre de médicaments, en particulier dans les mycoses systémiques. L'amphotéricine B (AmB) par voie intraveineuse, chef de file chronologique des antifongiques systémiques, reste la

première en efficacité, notamment chez les sujets immunodéprimés. L'arrivée de la flucytosine ^[1], des dérivés azolés comme le kétoconazole, premier dérivé azolé systémique disponible par voie orale, présente un grand intérêt dans la thérapeutique des mycoses grâce à un spectre très large, une diffusion rapide dans les tissus, à l'administration orale facile et à une bonne tolérance ^[4]. Puis le fluconazole et l'itraconazole, et après le voriconazole, le posaconazole et le ravuconazole représentant les trois derniers-nés de cette famille des azolés. Ces trois dérivés ont en commun un spectre élargi à toutes les espèces de *Candida* et à de nombreux champignons filamenteux dont les *Aspergillus*, couvrant ainsi la grande majorité des espèces pathogènes. Plus récemment, des formes lipidiques d'Amphotéricine B ont représenté des étapes importantes dans l'amélioration de l'efficacité, mais également de la tolérance des antifongiques systémiques. Enfin, de nouvelles molécules, appartenant ou non aux classes thérapeutiques déjà disponibles, sont en cours de développement in vitro, en expérimentation animale, et pour certaines d'entre elles, dans de larges protocoles thérapeutiques multicentriques internationaux ^[1].

Cette ascension croissante de l'utilisation des antifongiques a pour conséquences :

- d'une part, l'apparition ou la sélection d'espèces de champignons présentant des résistances primaires ou ayant acquis une résistance secondaire en raison du traitement antifongique de longue durée à titre curatif ou prophylactique, telle que la résistance primaire de *Candida krusei* et la résistance secondaire possible de *Candida glabrata* au fluconazole (FCZ) par mécanisme d'efflux ; ainsi l'identification rapide de ces deux espèces est importante pour pouvoir donner un conseil thérapeutique,
- d'autre part, l'émergence de nouvelles espèces de champignons (levures ou champignons filamenteux) nécessitant une utilisation plus large d'antifongiques existants, ainsi que la recherche de nouvelles molécules. Ceci a donc entraîné une mise en œuvre beaucoup plus systématique de tests de sensibilité in vitro par des méthodes variées ; aussi une évaluation de la sensibilité in vitro aux antifongiques est fort utile pour le clinicien en cas de suspicion d'infection profonde à levures. Devant la diversité des méthodes d'identification et de mesure de la sensibilité des souches aux antifongiques in vitro, il nous a paru nécessaire d'étudier

l'intérêt porté à ces techniques et d'évaluer les résultats obtenus pour une molécule qui est le kétoconazole ^[5].

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 thérapeutiques 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 ^[2].

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



*Matériels et
méthodes*

II. Matériels et méthodes :

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 médicale de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V (HMIMV) sur une durée de 9 mois (Septembre 2011- Mai 2012).

II.2 Critères d'inclusion :

Toutes les souches de *Candida* isolées dans les services de réanimation du CHU de Rabat (réanimation médicale et chirurgicale de l'HMIMV et de l'hôpital universitaire Avicenne), en plus du service d'hématologie clinique de l'HMIMV à partir d'une hémoculture ou d'un site corporel périphérique, sont incluses.

II.3 Méthodologie :

1. Prélèvements :

Dans cette étude deux types de prélèvements sont inclus: des prélèvements sanguins pour la réalisation des hémocultures, et des écouvillonnages de différents sites corporels périphériques (buccal, nasal, anal, auriculaire et rectal) en plus des urines.

✚ **L'hémoculture :** nécessite 3 prélèvements sanguins successifsensemencés directement dans le milieu de culture Mycosis-IC/F fournit dans des flacons (figure1), qui servent pour la culture aérobie du sang, les flacons ainsiensemencés sont transportés rapidement au laboratoire pour l'incubation dans le Bactec® 9050 (figure 2), appareil de la série à fluorescence conçu pour la culture et la mise en évidence sélective des levures dans le sang. Le délai d'incubation est de 10 jours, si aucune positivité n'apparaît, le flacon est considéré négatif, par contre une hémoculture positive se traduit par un signal sonore accompagné de l'emplacement du flacon positif. Ce dernier est repiqué dans l'objectif de déterminer la cause de la positivité du flacon, pour ce faire une culture sur milieu Sabouraud chloramphénicol avec et sans Actidione ainsi que sur milieu chromogène est réalisée.

✚ **Sites périphériques :** sont utilisés pour la réalisation de l'index de colonisation qui traduit le degré d'envahissement du corps, pour ce faire, des prélèvements sont pratiqués sous

forme d'écouvillonnage buccal, nasal, auriculaire, anal et trachéal en plus du prélèvement de l'urine.

2. culture et identification :

La culture des différents prélèvements s'effectue sur milieu Sabouraud chloramphénicol avec et sans Actidione® et sur milieu chromogène.

L'ensemencement se fait par striation auprès du bec benzène pour éviter toute contamination. Selon l'origine du prélèvement, la gélose est placée dans une étuve à 30°C ou à 37 °C. Les levures ayant un temps de génération d'environ 2 heures, les colonies se développent rapidement en 24 à 48 heures. Après leur croissance, les levures apparaissent sous forme de colonies blanchâtres et crémeuses spécifiques de *Candida* sur milieu Sabouraud ou sous forme de colonies de couleurs différentes en fonction de l'espèce sur milieu chromogène (figure 3).



3. Lecture des résultats :

Figure 1: Flacon d'hémoculture

Figure 2: Photo du Bactec 9050

Figure 3 : Aspect des colonies de *Candida*

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

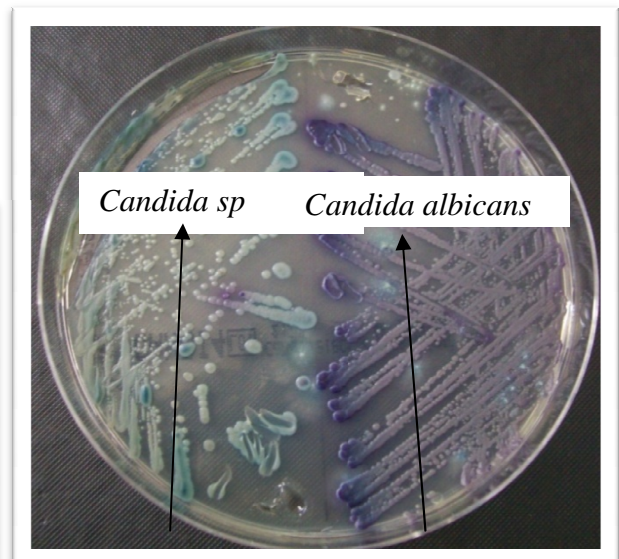
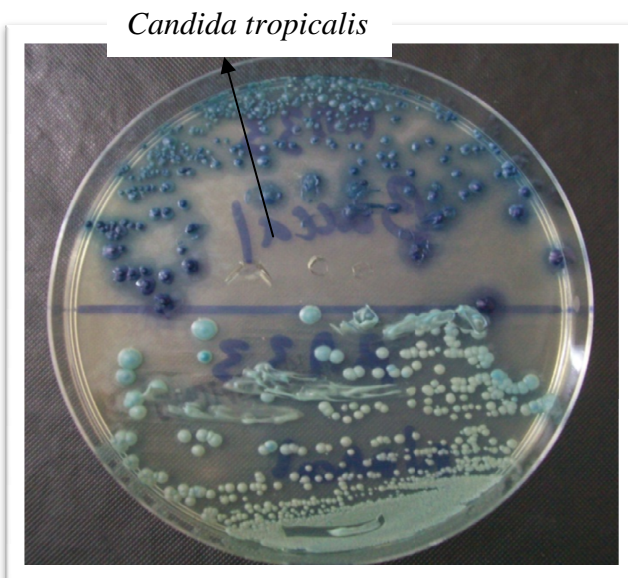
Colonies de couleur rose à violette → *C. albicans*

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 blanchâtres → autres espèces de levures → galerie biochimique d'identification API.



Candida glabrata

Figure 4 : Identification des espèces de *Candida* sur le milieu chromogénique. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

4. Antifongogramme : profil de résistance phénotypique

Le but de l'antifongogramme est de déterminer la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques pour détecter une éventuelle résistance. 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.

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

Intérêt clinique : Les disques d'antifongogramme 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 du kétoconazole. Les autres antifongiques font l'objet également d'autres travaux.

Principe : Des disques de papiers imprégnés avec une concentration déterminée d'antifongique sont déposés à la surface du milieu MHGBM (Muller Hinton additionnée de 2% de glucose et 0,5µg/ml de bleu de méthylène) préalablementensemencé avec un inoculum calibré, préparé à partir d'une culture pure et jeune de la levure à tester. Un gradient de concentration d'antifongique s'établit autour des disques dans la gélose. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition est lu autour des disques afin de déduire les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de l'antifongique testé ; ceci va nous permettre de conclure la catégorisation clinique de la souche testée : résistante (R), sensible dose dépendante (SDD) et sensible (S).

Présentation : Les disques sont fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure, ils ont un diamètre de 6,5mm, imprégnés d'antifongiques à des concentrations précises. Ces disques sont clairement identifiés par un symbole comportant 3 lettres suivi de la charge exprimée en μg imprimés sur les deux côtés du disque.

N.B : Les disques Bio-Rad sont présentés en cartouche de 50 disques conditionnés en containers étanches contenant un déshydratant.

Tableau 1 : Caractéristiques du disque du kétoconazole

	Charge du disque	Symbole	Conditionnement
Kétoconazole	50 μg	KET 50	1 x 50 disques

Mode opératoire : le référentiel du CLSI/ NCCLS recommande l'utilisation du milieu MHGBM pour la réalisation de l'antifongigramme : Muller Hinton avec 2% de glucose et 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bleu méthylène. Après avoir préparé ce milieu de culture, nous versons 25ml dans une boîte de pétri ronde de diamètre de 90mm. Après solidification, nous laissons sécher 15 minutes à 37°C avant utilisation.

L'inoculum standardisé à 0,5 McFarland est préparé à partir d'une culture pure de 24 heures de levures de genre *Candida*, obtenue sur un milieu d'isolement (Sabouraud Chloramphénicol). Pour ce fait, l'équivalent de 5 colonies bien isolées de 1 mm de diamètre est mis en suspension dans du sérum physiologique stérile. Après homogénéisation au vortex de la suspension ainsi préparée, l'opacité est ajustée à 0,5 McFarland, soit par addition de sérum physiologique soit par ajout de colonies supplémentaires afin de généraliser une concentration unique pour les différentes suspensions.

Dans le cas de l'antifongigramme l'ensemencement se fait par écouvillonnage : dans les 15 minutes suivant l'ajustement de l'inoculum, on plonge l'écouvillon de coton dans la suspension ainsi préparée en tournant plusieurs fois. L'excès du liquide est éliminé en pressant l'écouvillon fortement contre la paroi du tube au-dessus du niveau du liquide. Après séchage du milieu 15 minutes à 37°C, la totalité de la boîte estensemencée à l'aide de

l'écouvillon selon la méthode standard. On répète l'écouvillonnage plusieurs fois en tournant la boîte de 60° de manière à s'assurer de l'homogénéité de la répartition de l'inoculum sur toute la surface de la boîte y compris les bords.

La boîte ainsiensemencée est laissée ouverte pendant 3 à 5 minutes (sans dépasser 15 minutes) afin de laisser absorber l'excès d'humidité avant de déposer les disques d'antifongiques à l'aide d'une pince stérile. Après application de ces disques, les boîtes sont incubées à 35+/-2°C pendant 24 heures.

Lecture et interprétation : Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après 24h d'incubation. Pour cela, les boîtes sont placées sur un fond noir non réfléchissant et on effectue la lecture sous une lampe. Si la culture est insuffisante la boîte est ré-incubée pendant 24heures supplémentaires avant d'effectuer la lecture à 48 heures. La mesure est faite jusqu'aux colonies de taille normale, puisqu'il est possible d'observer des colonies de petite taille qui ne doivent pas être prises en compte pour la lecture en question. Les diamètres des zones d'inhibition sont exprimés en millimètre, la correspondance diamètre, concentration minimum inhibitrice (CMI) et catégorisation clinique est résumée dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Interprétation des résultats de l'antifongigramme

Antifongique	Charge	Symbole	Diamètre de la zone d'inhibition en mm			Concentration minimum inhibitrice CMI en µg/ml		
			R	SDD	S	R	SDD	S
Kétoconazole	50µg	KET 50	≤ 10	10-20	≥ 20	≥ 6,4	1,56-6,4	≤1,56

Contrôle qualité du test : le tableau suivant rassemble les limites acceptables des diamètres d'inhibition obtenus par diffusion en milieu gélosé pour les souches de référence ci-après :

Tableau 3 : Souche de contrôle qualité de l'antifongigramme

Disque	Charge du disque	Limites acceptables des diamètres d'inhibition (nm)	
		<i>Candida albicans</i> DP 3153A	<i>Candida albicans</i> DP 41R5FC
Kétoconazole	50 µg	25 – 36	29- 39

Figure 4 : préparation de l'inoculum à 0.5 McFarland, et ensemencement de la souche par écouvillonnage [photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat

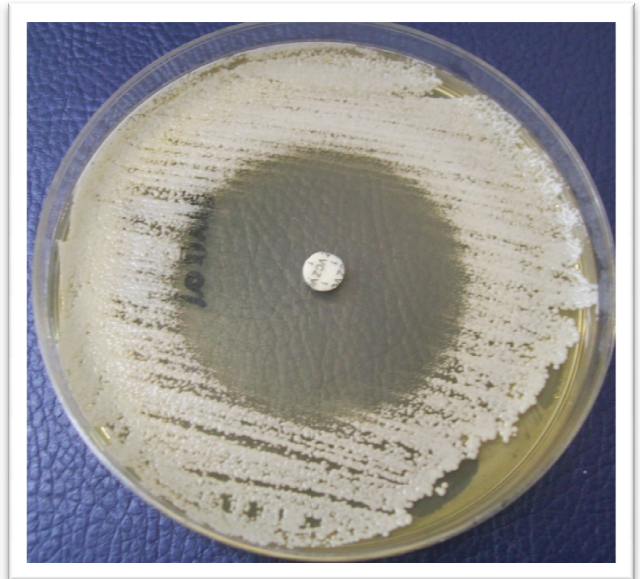
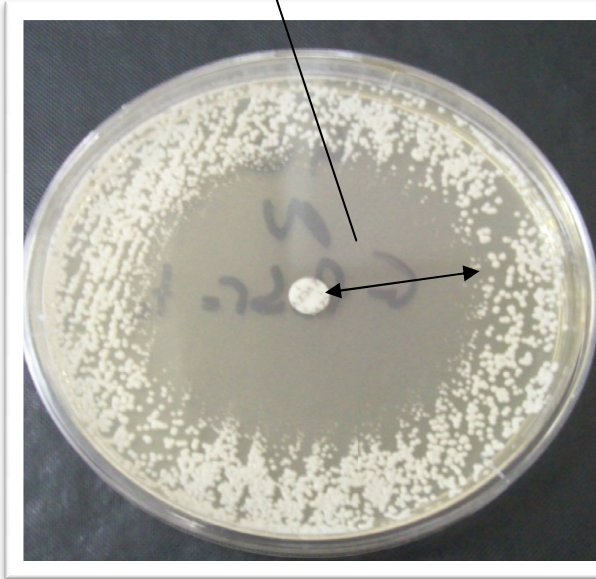


Figure 5 : Préparation de l'inoculum à 0,5 McFarland.[Photos du laboratoire de parasitologie l'HMIMV Rabat]

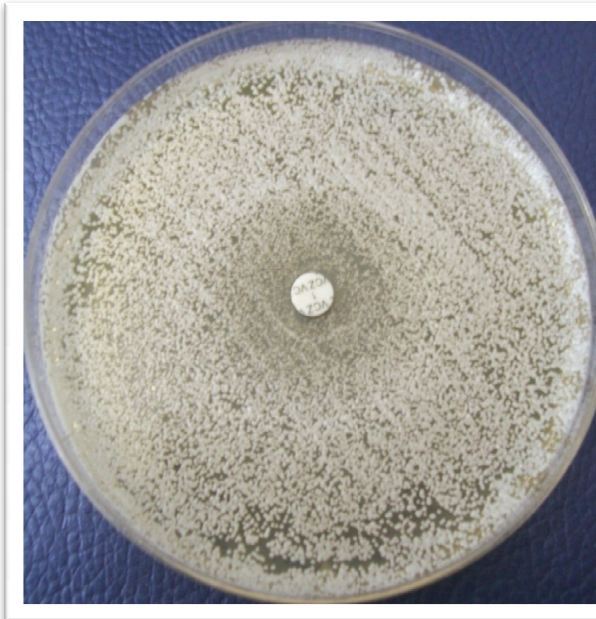


Figure 6: Ensemencement de la souche et dépôt du disque de l'antifongique. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

Diamètre de la zone
d'inhibition



Souches sensibles



Souches résistantes

Figure 7 : Lecture des résultats de l'antifongigramme. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]



Résultats

III. Résultats :

Durant la période de l'étude, 85 souches de *Candida* sp. sont incluses, dont 25 souches sont isolées à partir des hémocultures, alors que 60 souches proviennent des autres sites périphériques (buccal, nasal, vaginal, rectal.....).

Tableau 4 : Types des prélèvements effectués et leurs pourcentages.

Type de prélèvement	Nombre	Pourcentage (%)
Hémocultures	25	29,41
Sites périphériques	60	70,59
Total	85	100

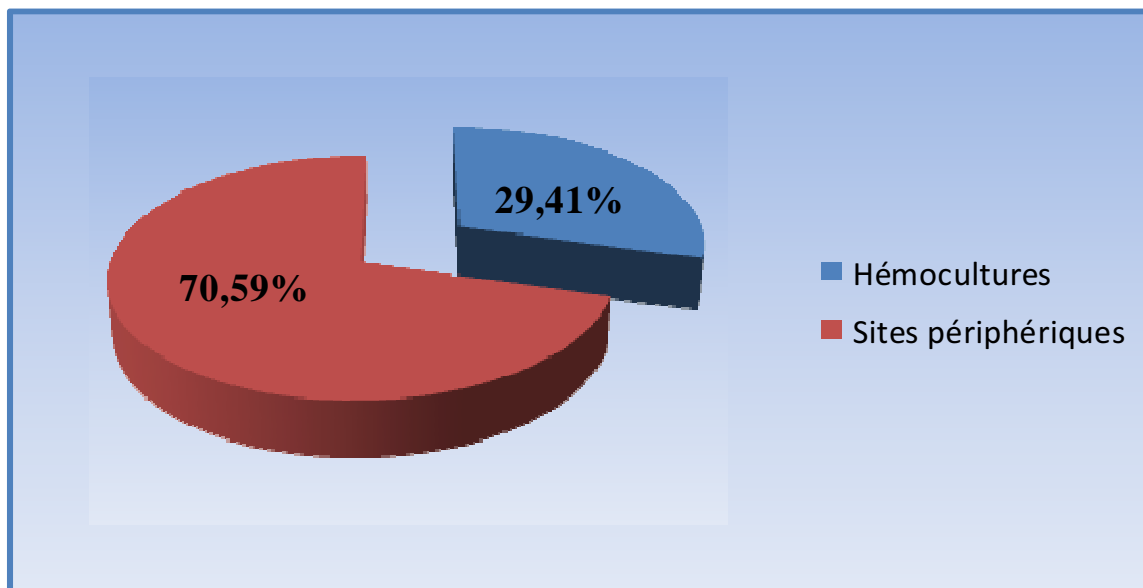


Figure 8 : Types des prélèvements effectués et leurs pourcentages.

III.1 Répartition globale des espèces isolées :

La répartition des souches isolées montre une prédominance de *Candida non albicans* (58 souches) par rapport à *Candida albicans* (27 souches).

Tableau 5: Proportion des espèces *albicans* et non *albicans* dans les prélèvements effectués

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>C. albicans</i>	27	31,76
<i>C. non albicans</i>	58	68,24
Total	85	100

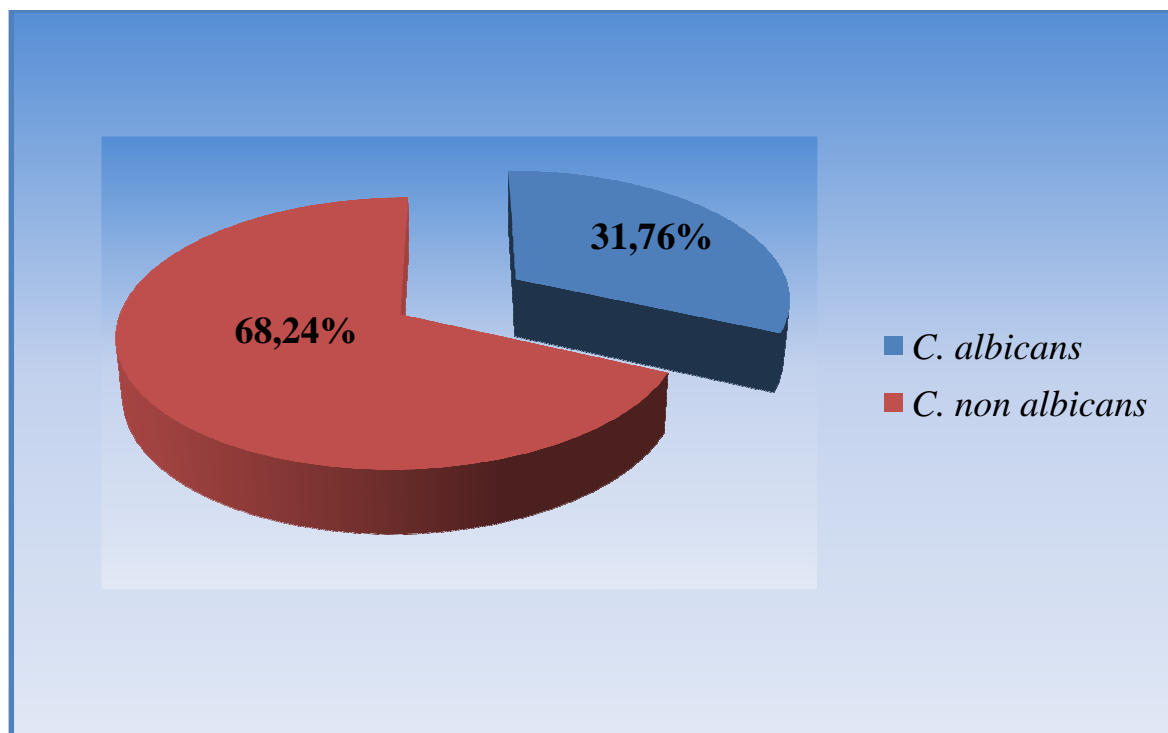


Figure 9 : proportions de *Candida albicans* et non *albicans*

Notre collection de souche nous a permis d'isoler 5 espèces différentes de *Candida*, dont la prédominance revient à *Candida glabrata* avec 33 souches, suivie de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, puis *Candida krusei* et finalement *Candida dubliniensis*. La répartition des souches isolées est illustrée dans le tableau 6 :

Tableau 6: Proportion des différentes espèces de *Candida* isolées

Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<i>C.glabrata</i>	33	38,82
<i>C.albicans</i>	27	31,76
<i>C.tropicalis</i>	13	15,3
<i>C.krusei</i>	11	12,94
<i>C.dublinsiensis</i>	1	1,18
Total	85	100

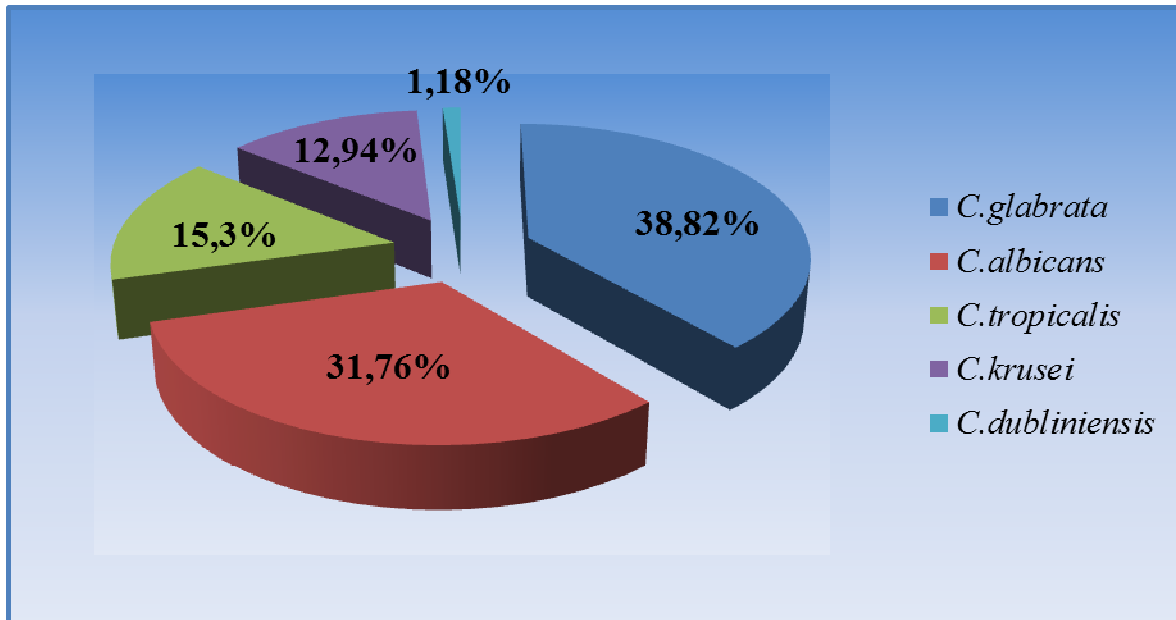


Figure 10 : distribution des différentes espèces de *Candida*

III.2 Répartition des espèces selon le type de prélèvement :

✿ Hémoculture :

L'hémoculture a servi pour l'isolement de 5 espèces différentes de *Candida* avec une prédominance de *Candida glabrata* avec 11 souches sur 25 prélèvements, suivie de *Candida albicans*, puis les autres espèces du genre *Candida* bien évidemment.

Tableau 7: Proportion des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des hémocultures

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

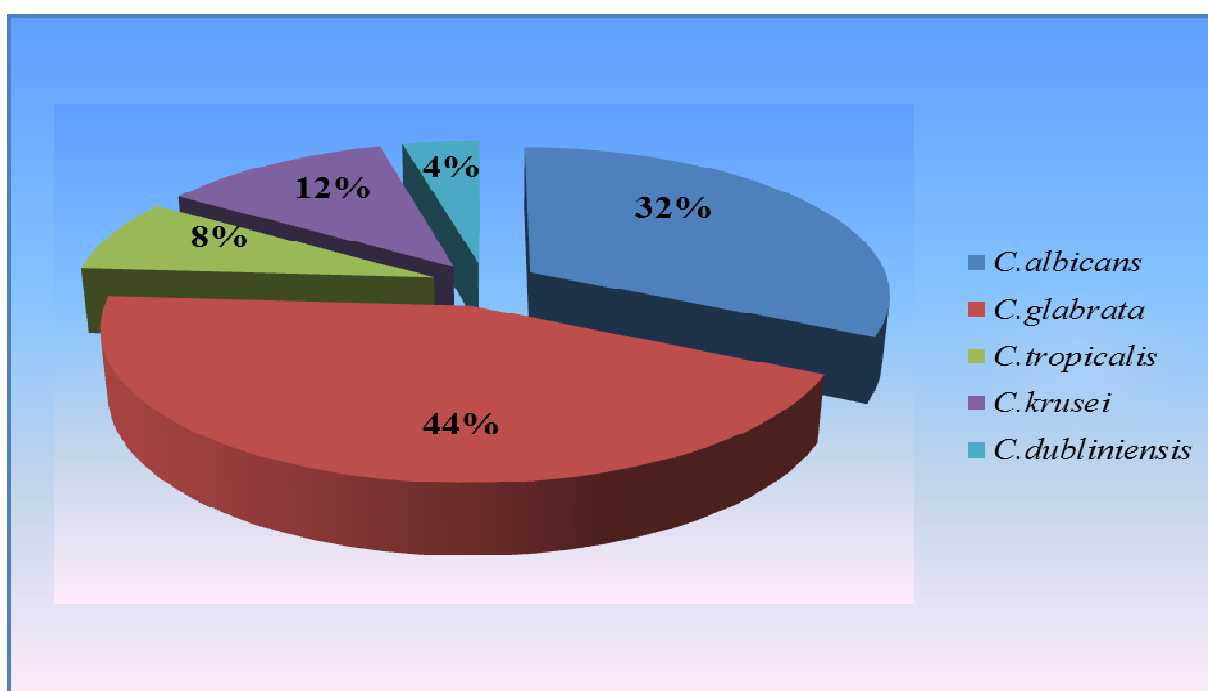


Figure 11 : distribution des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des hémocultures

✿ **Sites périphériques**

A partir des sites corporels périphériques, 4 espèces différentes ont été isolées dont l'espèce la plus représentée est toujours *Candida glabrata* avec 36,67%, suivie de *Candida albicans*, la troisième place est occupée par *Candida tropicalis* et dernièrement *Candida krusei* (tableau 8).

Tableau 8 : Proportion des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des sites périphériques

Espèces	Nombre	Pourcentage (%)
<i>C.glabrata</i>	22	36,67
<i>C.albicans</i>	19	31,67
<i>C.tropicalis</i>	11	18,33
<i>C.krusei</i>	8	13,33
Total	60	100

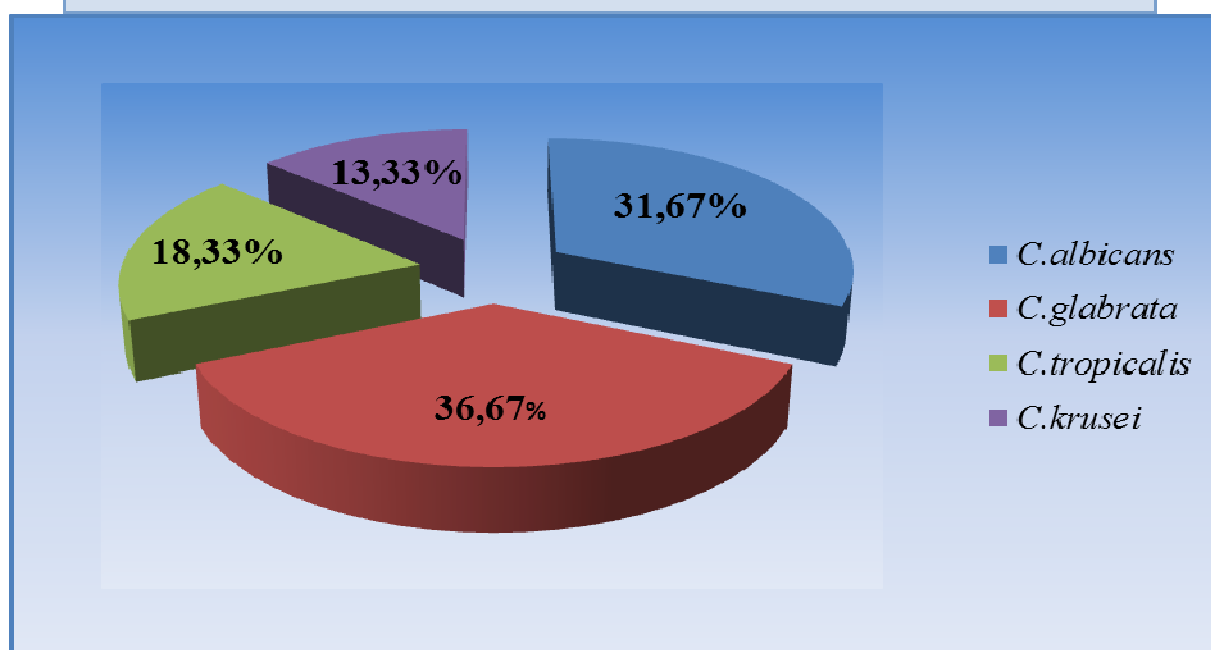


Figure 12 : distribution des différentes espèces de *Candida* isolées à partir des sites périphériques

III.3 Sensibilité in vitro au kétoconazole des espèces isolées :

La figure 13 décrit l'activité du kétoconazole vis-à-vis de l'ensemble des espèces isolées. L'antifongique est significativement actif sur *Candida* puisque l'étude faite montre un taux faible de résistance de l'ordre de 20%, alors que 54,12% des souches isolées sont sensibles à cet agent antifongique, sans oublier que les souches dose dépendantes (SDD) occupent un

taux de 25,88%. La figure 14, quant à elle, indique la distribution des diamètres des zones d'inhibition.

Tableau 9 : sensibilité des souches de *Candida* isolées vis à vis du kétoconazole

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	46	54,12
SDD	22	25,88
Résistante	17	20
Total	85	100

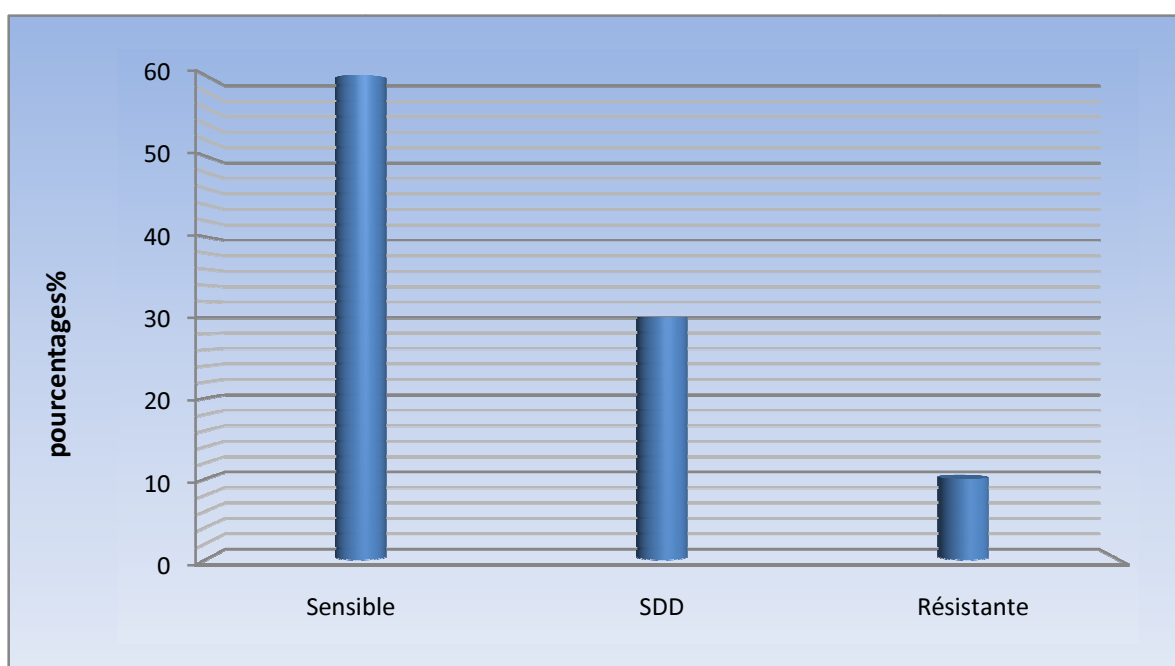


Figure 13: proportions des souches résistantes, sensibles et sensibles selon la dose vis-à-vis du kétoconazole

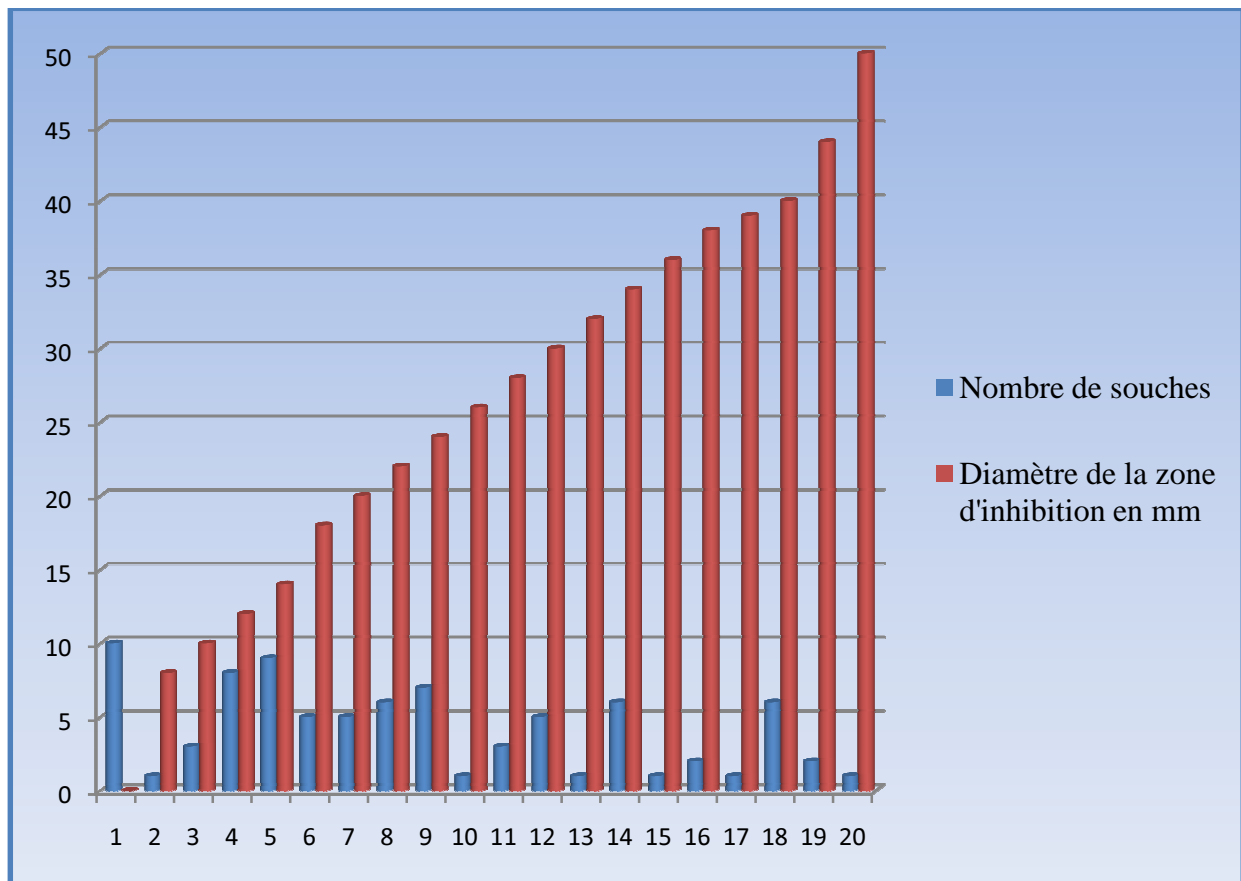


Figure 14 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en mm

N.B. Catégorisation respective de sensibilité :

- Les souches dont le diamètre de la zone d'inhibition est ≤ 10 mm sont résistantes.
- Les souches dont le diamètre de la zone d'inhibition est entre 10 et 20 mm sont intermédiaires ou sensibles dose-dépendantes.
- Les souches dont le diamètre de la zone d'inhibition est ≥ 20 mm sont sensibles.

III.4 Sensibilité selon le type de prélèvement :

✿ **Hémocultures :**

Les isolats provenant des hémocultures sont plus sensibles au kétoconazole par rapport aux isolats prélevés à partir des sites périphériques avec une forte sensibilité dépassant les 90% puisque le pourcentage trouvé de souches sensibles est de 92% et celui de souches résistantes est nul.

Tableau 10 : Pourcentage des souches dans chaque catégorie (Sensible, Sensible Dose Dépendante, Résistante) pour les souches provenant des hémocultures

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	23	92
SDD	2	8
Résistante	0	0
Total	25	100

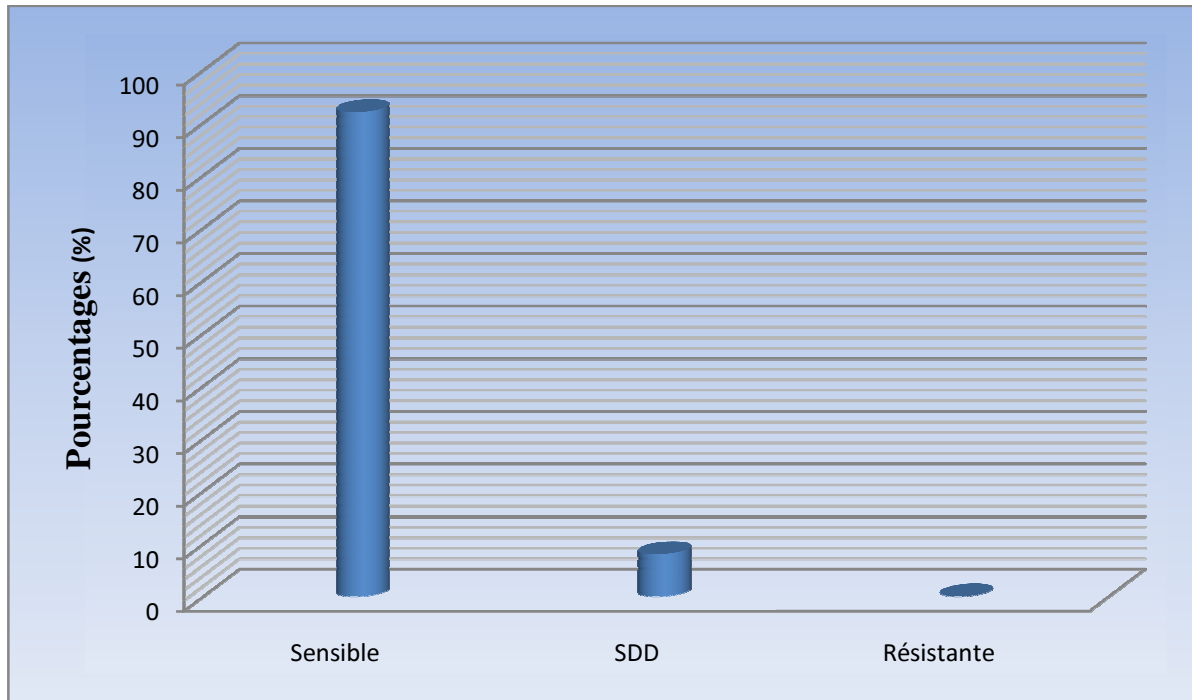


Figure 15 : Sensibilité des souches de *Candida* isolées des hémocultures

✿ **Sites périphériques :**

Contrairement aux hémocultures, les souches provenant des différents sites périphériques prélevés sont moins sensibles au kétoconazole avec une sensibilité ne dépassant pas les 40%. Les pourcentages des souches dans chaque catégorie (S, SDD, R) sont respectivement de 38,33%, 33,33%, et de 28,33%.

Tableau 11: Pourcentage des souches dans chaque catégorie (Sensible, Sensible Dose Dépendante, Résistante) pour les souches provenant des sites périphériques

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	23	38,33
SDD	20	33,33
Résistante	17	28,33
Total	60	100

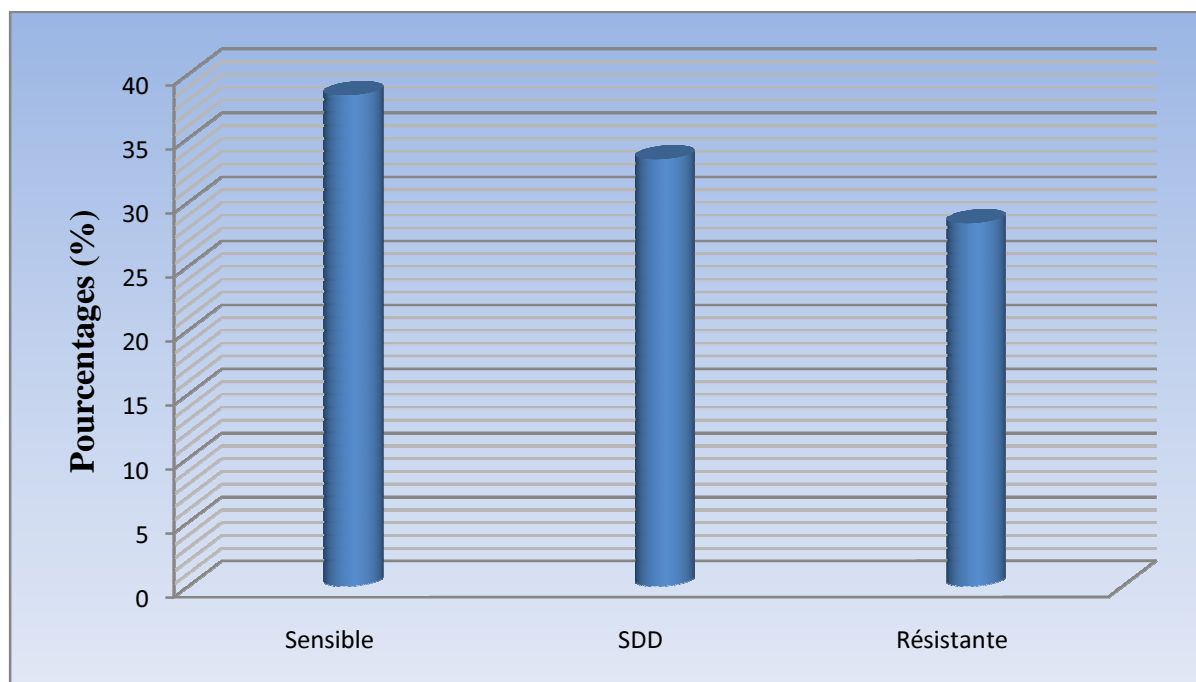


Figure 16 : Sensibilité des souches de *Candida* isolées des sites périphériques

➤ **Site buccal :**

Des 34 souches isolées du site buccal, 12 sont sensibles au kétoconazole, 13 sont sensibles dose-dépendantes et 9 sont résistantes.

Tableau 12: Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site buccal

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	12	35,3
SDD	13	38,23
Résistante	9	26,47
Total	34	100

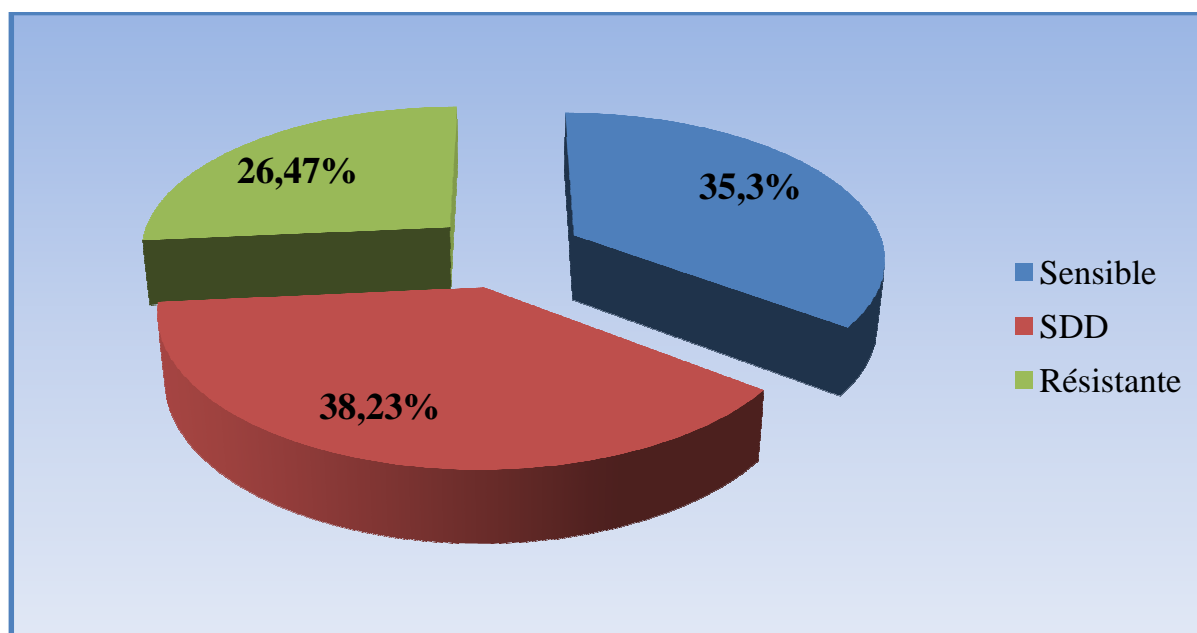


Figure 17 : Sensibilité des souches de *Candida* isolées du site buccal

➤ **Site anal :**

Des 10 souches isolées du site anal, 6 souches sont sensibles, alors que seulement une souche est résistante.

Tableau 13 : Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site anal

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	6	60
SDD	3	30
Résistante	1	10
Total	10	100

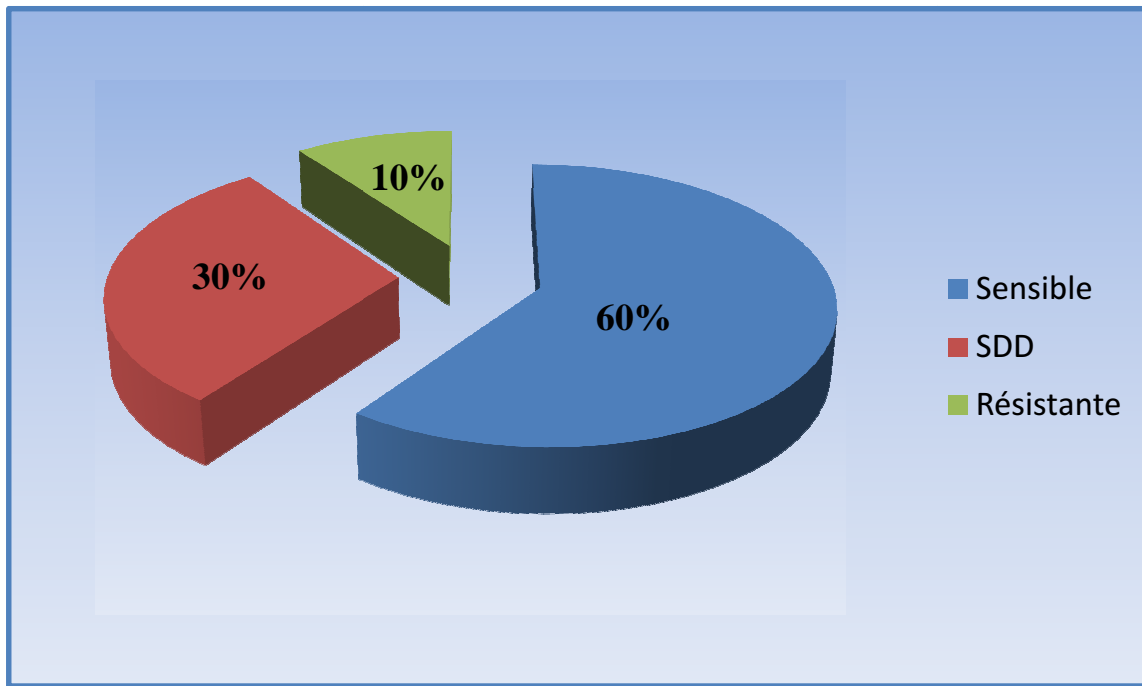


Figure 18 : Sensibilité des souches de *Candida* isolées du site anal

Pour le reste des sites prélevés (nasal, urinaire, auriculaire, vaginal), le nombre des souches sensibles, sensibles dose dépendantes et résistantes est représenté dans la figure 19. A partir du site auriculaire et du site vaginal, la seule souche isolée est résistante tandis que la moitié des souches du site nasal est sensible et l'autre moitié est résistante, et enfin pour le site urinaire une souche est sensible, une autre est résistante et 4 souches sont sensibles dose dépendantes.

➤ **Site nasal :**

Tableau 14 : Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site nasal

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	4	50
SDD	0	0
Résistante	4	50
Total	8	100

➤ **Site urinaire :**

Tableau 15 : Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site urinaire

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	1	16,66
SDD	4	66,66
Résistante	1	16,66
Total	6	100

➤ **Site auriculaire :**

Tableau 16 : Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site auriculaire

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	0	0
SDD	0	0
Résistante	1	100
Total	1	100

➤ **Site vaginal :**

Tableau 17 : Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site vaginal

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage (%)
Sensible	0	0
SDD	0	0
Résistante	1	100
Total	1	100

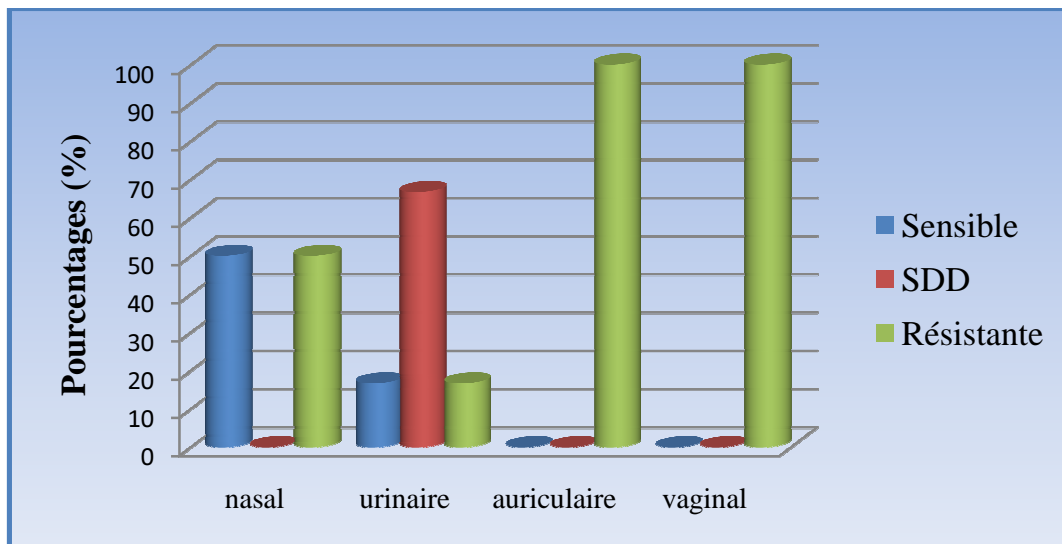


Figure 19 : Sensibilité des souches de *Candida* isolées des sites : nasal, urinaire, auriculaire et vaginal.

III.5 Sensibilité selon les espèces :

✿ Pour la totalité des souches :

Le kétoconazole est significativement actif contre toutes les espèces de *Candida*. Le kétoconazole est actif sur *Candida albicans* (taux de sensibilité = 55,55%), *Candida krusei* (taux de sensibilité = 63,63%) et sur *Candida glabrata* (taux de sensibilité = 51,51%). Pour *Candida dubliniensis*, une seule souche est isolée et elle est sensible. Une sensibilité diminuée à cet antifongique est observée pour *Candida tropicalis* (Taux de sensibilité = 46,15%). On voit que *Candida tropicalis* est la moins sensible au kétoconazole avec un taux de résistance aux alentours de 31%. Ce taux est de 22,22% pour *Candida albicans*, et de 18,18% pour *Candida glabrata*, alors qu'il est uniquement de 9% pour *Candida krusei*.

Tableau 18 : Taux de sensibilité au kétoconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques et des hémocultures.

Espèces	Nombre	Sensibilité					
		Sensibles		SDD		Résistantes	
		N	%	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	27	15	55,55	6	22,22	6	22,22
<i>C. glabrata</i>	33	17	51,51	10	30,3	6	18,18
<i>C.tropicalis</i>	13	6	46,15	3	23,07	4	30,77
<i>C. krusei</i>	11	7	63,63	3	27,27	1	9,09
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	100	0	0	0	0

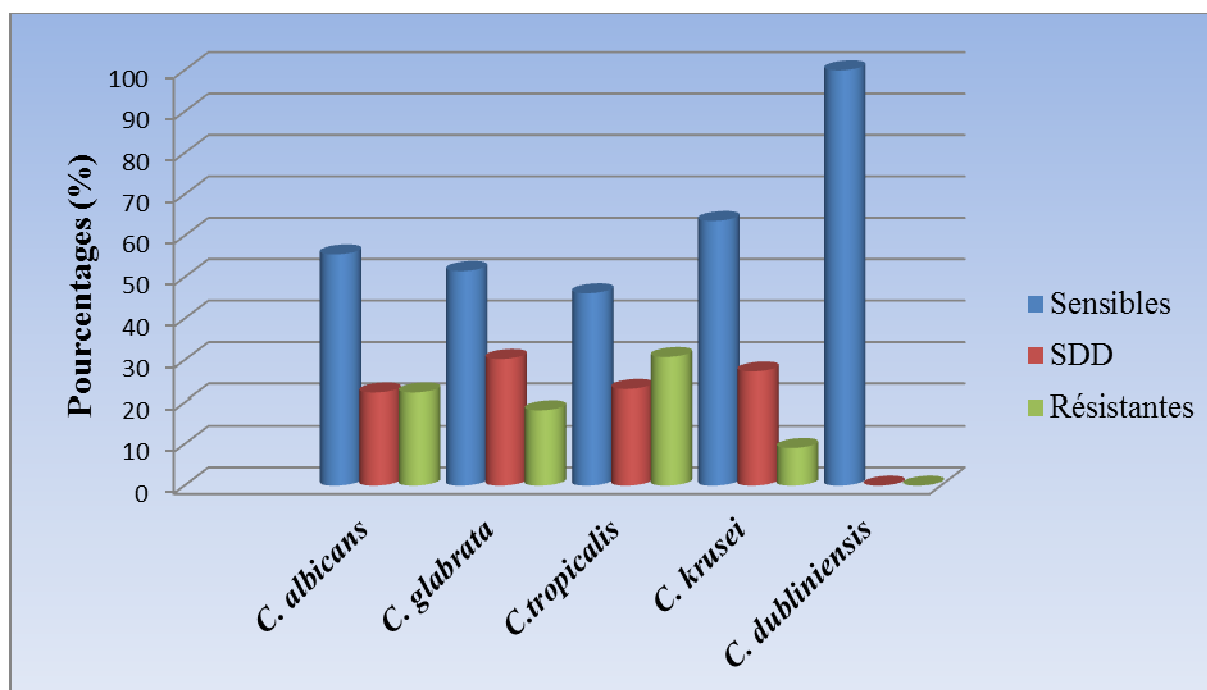


Figure 20 : Sensibilité au kétoconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques et des hémocultures.

✱ **Pour les souches provenant des hémocultures :**

Le kétoconazole est nettement actif sur les souches de *Candida* isolées à partir des hémocultures, et cela est observé pour *Candida albicans* (taux de sensibilité = 100%), et

Candida glabrata (taux de sensibilité = 90,9%). Pour *Candida krusei* les trois souches isolées sont sensibles, et dernièrement pour *Candida dubliniensis*, la seule souche isolée est sensible.

Concernant les souches résistantes, aucune souche isolée à partir des hémocultures n'est résistante.

Tableau 19 : Taux de sensibilité au kétoconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des hémocultures.

Espèces	Nombre	Sensibilité					
		Sensibles		SDD		Résistantes	
		N	%	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	8	8	100	0	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	11	10	90,9	1	9,09	0	0
<i>C.tropicalis</i>	2	1	50	1	50	0	0
<i>C. krusei</i>	3	3	100	0	0	0	0
<i>C. dubliniensis</i>	1	1	100	0	0	0	0

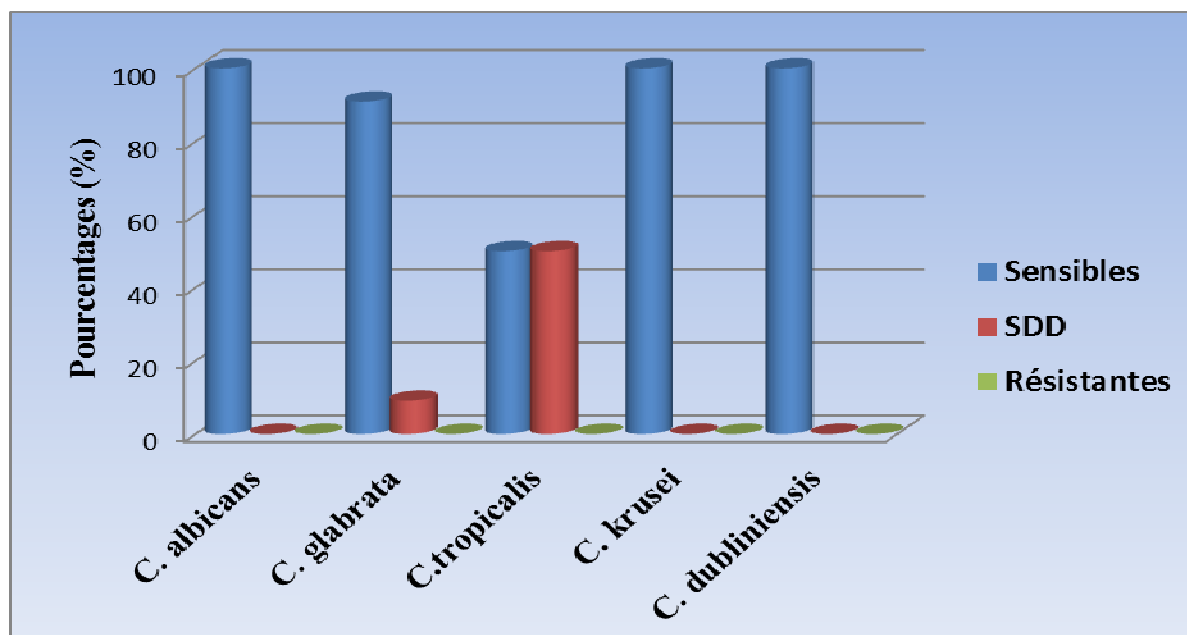


Figure 21 : Sensibilité au kétoconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des hémocultures.

✳ **Pour les souches provenant des sites périphériques :**

Le kétoconazole a été relativement actif sur *Candida krusei* (taux de sensibilité = 50%), *Candida tropicalis* (taux de sensibilité = 45,45%), *Candida albicans* (taux de sensibilité = 36,84%) et *Candida glabrata* (taux de sensibilité = 31,82%), néanmoins toutes les espèces de *Candida* isolées ont présenté des souches résistantes.

Tableau 20 : Taux de sensibilité au kétoconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques.

Espèces	Nombre	Sensibilité					
		Sensibles		SDD		Résistantes	
		N	%	N	%	N	%
<i>C. albicans</i>	19	7	36,84	6	31,58	6	31,58
<i>C. glabrata</i>	22	7	31,82	9	40,91	6	27,27
<i>C.tropicalis</i>	11	5	45,45	2	18,18	4	36,36
<i>C. krusei</i>	8	4	50	3	37,5	1	12,5

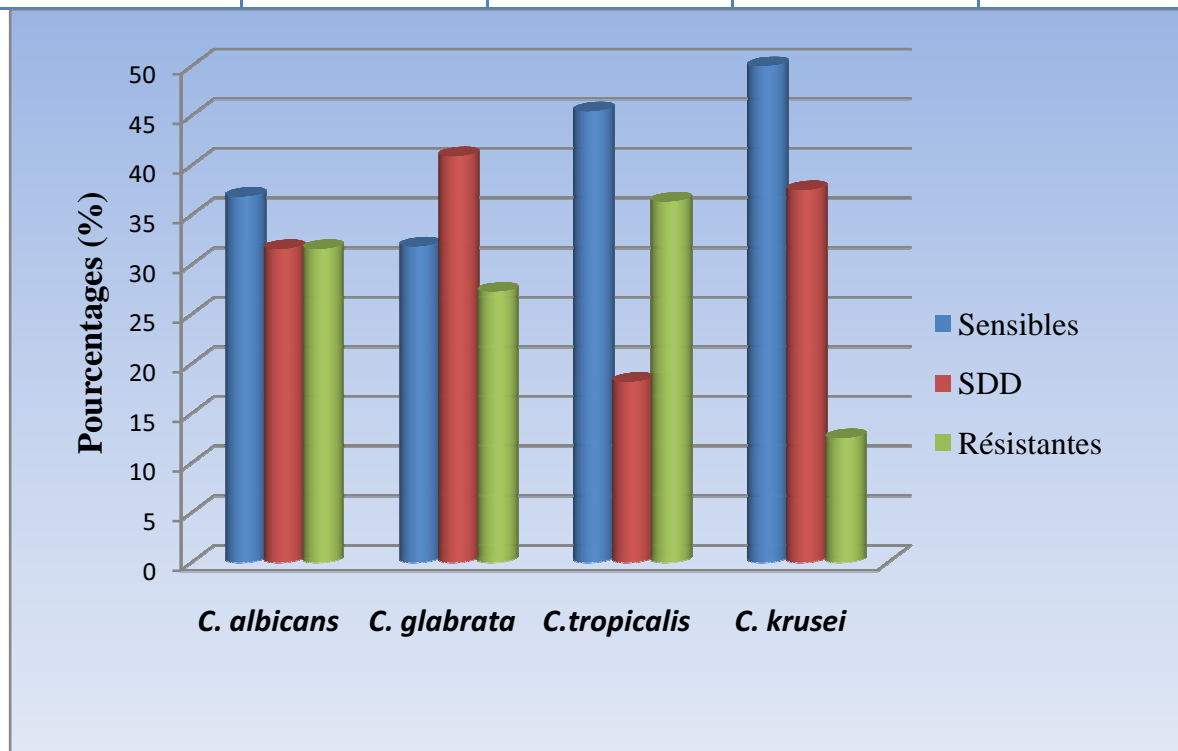


Figure 22 : Sensibilité au kétoconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques.

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 une 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 le choix de 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 : réanimation médicale, chirurgicale, services d'oncohématologie, 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 ^[6].

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 et 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 entretenues 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.

Activité de surveillance épidémiologique : 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.

En ce qui concerne les antifongiques déjà utilisés depuis un certain nombre d'années, la surveillance de l'évolution de 5/10 ans de la sensibilité des isolats cliniques locaux permet d'anticiper sur des modifications subtiles, difficiles à mettre en évidence en dehors d'une surveillance longitudinale, locale, régionale ou nationale ^[7].

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 association. 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. Egalement, 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 ^[7].

IV.1.2 Moyens d'étude de la 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 ^[6].

1. Méthodes par dilution :

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

1.1 En milieu solide :

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

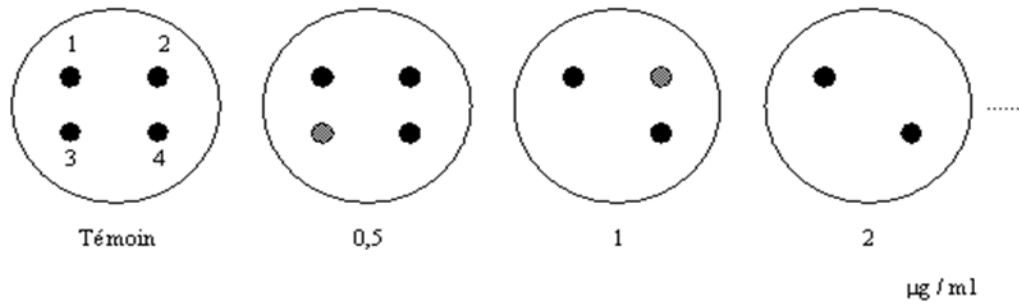


Figure 23 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

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

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

Le milieu casitone a permis d'améliorer la lecture pour les azolés. Il existe une bonne corrélation avec les microméthodes en milieu liquide ^[6].

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® : (Bio-Mérieux) C'est un test commercialisé qui permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et de *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques dans des conditions très proches de la technique de référence de microdilution ^[8].

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

Il existe la galerie ATB-Fungus3® et le modèle précédent ATB-Fungus2®. La différence entre les deux réside en la présence d'un cinquième agent antifongique dans la galerie ATB-Fungus3® qui est le voriconazole [8,9].



Figure 24 : Galerie ATB Fungus2®, bioMérieux SA Marchand S., (2004-2005)

Antifongiques : Les antifongiques utilisés dans ce test sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 21 : Antifongiques des deux modèles de la galerie ATB-Fungus [8, 9, 10,11].

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

Mode opératoire : A partir d'une culture fraîche de levures, on prépare une suspension de 2 McFarland. 20µl de cette suspension est ensuite transféré dans un milieu de croissance spécifique (ATB-Fungus medium). Après homogénéisation, chaque puit de la galerie est inoculé avec 135 µl de l'inoculum homogénéisé (4×10^3 levures/cupule). Après 24h

d'incubation à $36 \pm 1^\circ\text{C}$, la croissance dans les puits est lue visuellement par deux techniciens indépendants ^[8,9].

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

Absence de réduction de croissance → score = 4

Légère réduction de croissance → score = 3

Réduction marquée de croissance → score = 2

Très faible croissance → score = 1

Absence de croissance → score = 0

Pour ce qui est de l'amphotéricine B, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 0, donc une inhibition complète. Pour le fluconazole, le flucytosine, l'itraconazole et le voriconazole, du fait du phénomène de croissance résiduelle, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 2,1 ou 0 ^[8, 11].

Avantages : La méthode est rapide, reproductible et automatisable. Les CMI sont précises (plusieurs concentrations) ^[6,8].

Inconvénients : Pour cette méthode, la lecture de la quantification de la croissance est relativement difficile au début et peut varier selon les personnes, donc le résultat dépend de notre jugement. Ce résultat est parfois peu clair du fait d'une mauvaise préparation ou d'une incubation inadéquate. Le temps d'incubation est de 24 heures pour toutes les espèces, sauf pour *C.glabrata* (48 heures). Après 48 heures, les cupules de la galerie sont parfois sèches et ininterprétables ^[8].

1.3 En milieu liquide :

En milieu liquide, l'inoculum est distribué dans une série de tubes (méthode de macrodilution) ou de cupules (méthodes 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 µg/ml (premier tube dans lequel aucune croissance n'est visible à l'œil nu).

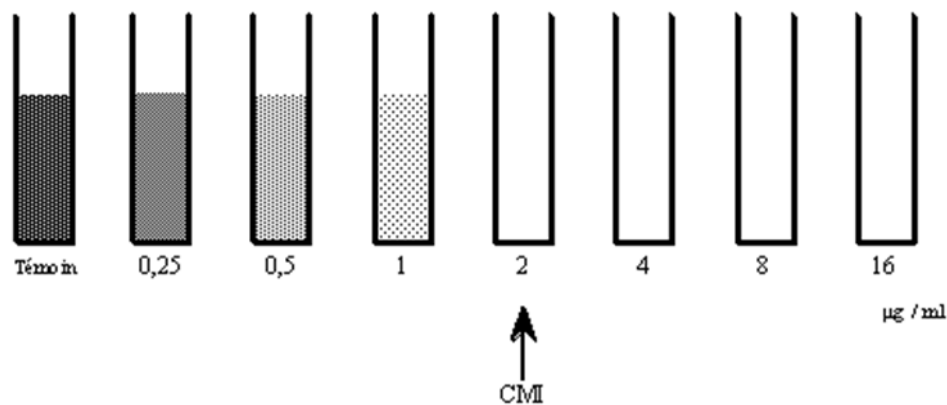


Figure 25 : Détermination de la CMI par dilution en milieu liquide

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

-**Méthodes de référence** : deux techniques de références sont disponibles. Le standard américain et le standard français.

1-Standard américain : Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) : l'absence de reproductibilité des concentrations minimales inhibitrices entre les laboratoires a imposé la nécessité d'obtenir des méthodes standardisées et reproductibles. Beaucoup d'efforts ont été entrepris par le NCCLS ou le National Committee for Clinical Laboratory Standards depuis 1985 afin d'obtenir des méthodes rapides, fiables et de routine au sein des laboratoires. Les

buts princeps étaient d'obtenir des résultats reproductibles et définir des souches contrôle, de constituer une référence pour l'évaluation des autres méthodes, d'évoluer vers des méthodes de pratique courante et construire pour le mycologue une trousse de routine.

Ainsi, en 1982, une première section chargée de la standardisation des tests de sensibilité des levures aux antifongiques a été créé aux Etats-Unis au sein du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Suite aux études initiées, depuis 1982, par le Subcommittee on Antifungal Susceptibility Tests (sous-comité sur les essais de sensibilité aux antifongiques), le NCCLS a publié en 1997 une méthode de référence officielle de microdilution en bouillon (Approved Standard M27-A) et ses variantes de microdilution pour tester in vitro les activités des composés antifongiques contre *Candida sp.* et *Cryptococcus neoformans* ^[12]. La méthode M27-A est une macrométhode longue et laborieuse réalisée en tube avec une détermination visuelle des CMI. Pour pallier à la lourdeur de la mise en œuvre de cette technique, le NCCLS a proposé une microméthode adaptée pour une utilisation en microplaques avec lecture spectrophotométrique des CMI. Elle est bien corrélée avec la macrométhode mais elle reste une technique lourde non utilisée en routine. Ainsi, la publication de la méthode M27-A a été suivie en 1998 du Proposed Standard M38-A, qui décrit des méthodes de microdilution et de microdilution en bouillon pour des essais de sensibilité des champignons filamenteux (*Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus oryzae*.....) ^[13].

Tableau 22: Paramètres de mise en œuvre des méthodes M27 et M38 de microdilution du CLSI

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

- CMI (mg/L) = Concentration minimale inhibitrice : plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum / témoin.
- CMI- 0 : inhibition complète de la croissance.
- CMI- 2 : inhibition de 50% / témoin.
- CME (mg/L) = Concentration Minimale Efficace : Plus petite concentration d'antifongique pour laquelle on observe des hyphes courtes, trapues et compactes / témoin.

2- Standard européen : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

(EUCAST) : Un test de dilution en bouillon pour tester des levures normalisé par le Comité Européen sur les essais de sensibilité aux antifongiques (EUCAST), et le Sous- Comité sur les essais de sensibilité aux antifongiques (AFST), est également disponible et initialement documenté en 1999 ^[14]. Le test est similaire à la méthode de dilution en bouillon du CLSI, sauf que le milieu RPMI 1640 est supplémenté de 2% de glucose, la densité d'inoculum est de $1-5 \times 10^5$ cellule/ml, et les résultats sont lus à 24h au lieu de 48h pour le CLSI. Une évaluation multicentrique de la méthode de l'EUCAST a montré qu'elle donne des résultats reproductibles ^[15] et des études comparatives suggèrent une bonne corrélation (taux d'accord 92%) entre la méthode de CLSI et celle de l'EUCAST ^[16].

Des paramètres optimaux pour les tests de sensibilité d'*Aspergillus sp.* aux antifongiques ont également été proposés par EUCAST-AFST. Il s'agit notamment de l'utilisation de RPMI 1640 supplémenté à 2% de glucose comme le milieu d'essai, d'un inoculum d'une densité de $1-2,5 \times 10^5$ conidies/ml, d'une température d'incubation de 35°C pendant 48h, et une lecture visuelle des CMI à CMI-0 ^[17]. Un taux d'accord global de 92,5% a été atteint entre la méthode d'EUCAST et la méthode du CLSI lors d'un essai qui a englobé le posaconazole et le voriconazole contre *Aspergillus* ^[18].

Expression des résultats : les résultats des deux 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 un taux $\geq 99,9\%$ de l'inoculum ou qui diminue de 3 log au moins la densité de l'inoculum /témoin ^[19].

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

a) pour *Candida sp.* ^[20] :

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

Tableau 23 : 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	$\leq 0,125$	-	$> 0,125$	< 1	2	≥ 4
Kétoconazole	NE	NE	NE	$\leq 0,001$	0,002- 0,004	$\geq 0,008$
Caspofungine	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE	NE
Micafungine	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE	NE
Anidulafungine	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE	NE

*les isolats de *Candida* testés qui ont des CMI $> 2\text{mg/L}$ 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 24 : 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'amphotéricineB :

Il n'existe pas de valeurs seuil d'interprétation approuvées par le CLSI ou l'EUCAST concernant l'amphotéricineB ^[21,22].

Candida. sp : CMI > 1mg/L → Résistant

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

-Méthodes colorimétriques (dérivées de la méthode du NCCLS) : Nous avons vu précédemment que la détermination des CMI pour la méthode 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 de résultats, des indicateurs colorimétriques ou des colorants fluorescents peuvent être utilisés.

Plusieurs méthodes colorimétriques sont utilisées tel que le Sensitre YeastOne. Des méthodes non commercialisées sont également utilisées (celles qui utilisent les sels de tétrazolium) ^[23,24]. Alamar bleu ou d'autres indicateurs peuvent être ajoutés au RPMI. En utilisant Alamar bleu, le bleu indique l'absence de croissance, le violet indique une inhibition partielle de la croissance, et le rouge indique la présence d'une croissance. Ces résultats peuvent être également évalués par spectrophotométrie.

Dans l'autre cas, où c'est les sels de tétrazolium qui sont utilisés, le changement de couleur reflète l'activité métabolique et peut être évalué par spectrophotométrie en mesurant la densité optique. Le sel de tétrazolium jaune vire au violet quand il est réduit en formazan ^[25].

Parmi ces méthodes colorimétriques commercialisées on citera :

a) Sensititre Yeast One® : (Trek Diagnostic Systems) ^[26]:

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

Principe : Le test de sensibilité des levures Sensititre est un test de microdilution colorimétrique en milieu liquide. Il fournit des résultats qualitatifs et quantitatifs de CMI sous forme de plaque sèche. Chaque plaque est dosée avec des antifongiques à des dilutions appropriées, et un indicateur colorimétrique (Alamar Blue). Les résultats sont lus visuellement par l'observation de la concentration d'antifongique la plus basse indiquant l'inhibition de la croissance mise en évidence par l'absence de changement de couleur.

Antifongiques : Les antifongiques disponibles pour ce test sont représentés dans le tableau suivant avec la fourchette de dilutions de chaqu'un d'entre eux.

Tableau 25 : 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. 20mL de la suspension est transféré dans 11mL de milieu liquide d'inoculum Yeast One pour obtenir un inoculum d'une densité de $0.6 \text{ à } 5 \times 10^6$ cellules souches/ml.

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

- ↳ **Auto-inoculateur 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'auto-inoculateur.
- ↳ **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 72h.

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

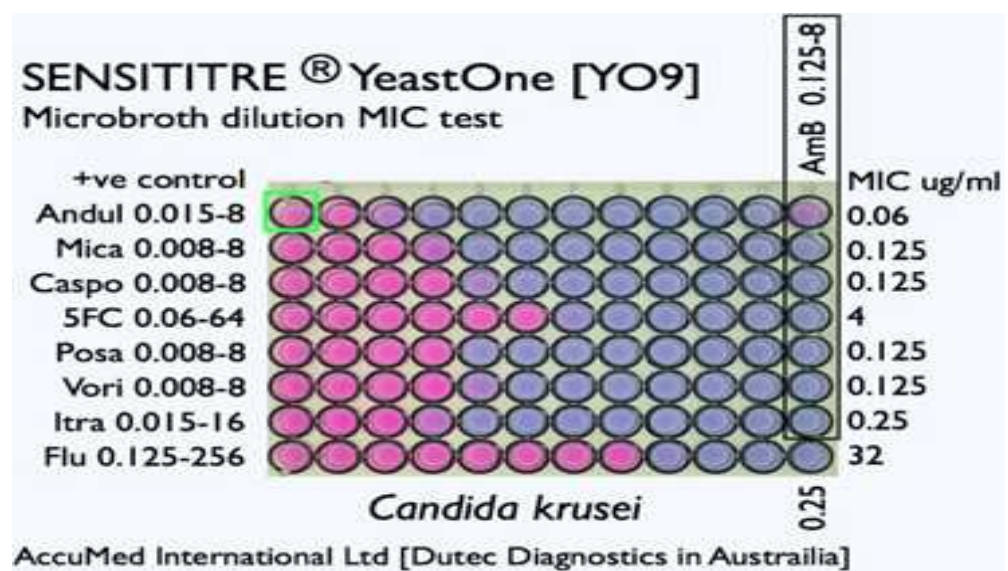


Figure 26: lecture des résultats du sensititreYeast One® (virage de la couleur de l'indicateur)

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

Tableau 26 : 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.

Avantages : Selon les évaluations publiées, ce test présente une concordance de plus de 85% avec les résultats obtenus avec la méthode M27-A. la présence d'un indicateur d'oxydoréduction rend la lecture des CMI beaucoup plus aisée [27].

Inconvénients : le système Sensititre Yeast One Colorimétric antifungal panel (procédé Blue Alamar®) 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*) [7].

b) Fungitest® :

Principe : Cette technique permet d'étudier la croissance des levures in vitro en milieu liquide en présence de six antifongiques testés à deux concentrations différentes. Elle dérive

de la dernière recommandation du NCCLS. Le milieu de culture utilisé est RPMI glucosé à 2% et tamponné. Il est additionné d'un indicateur d'oxydoréduction qui traduit la croissance des levures par virage de sa couleur du bleu au rose [28, 29].

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 [30].

Antifongiques [30] : 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 :

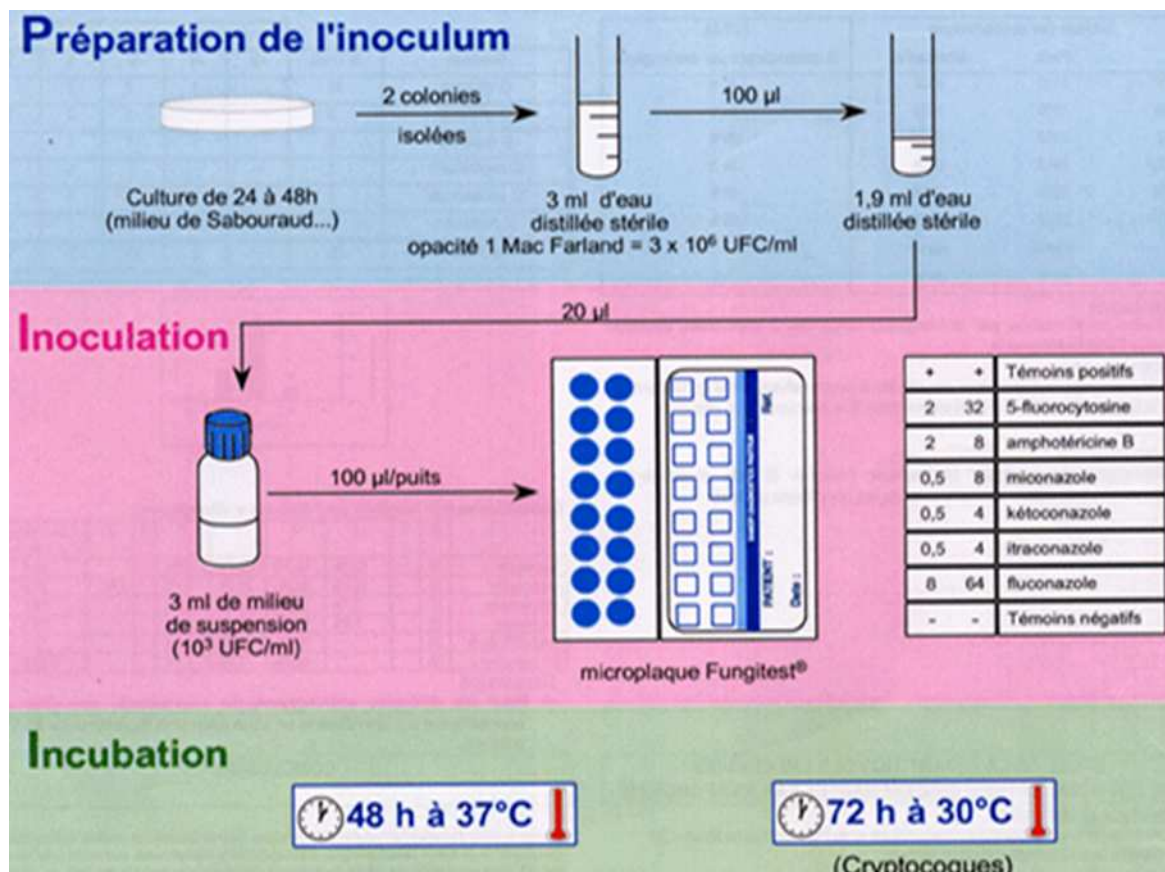


Figure 27 : Mode opératoire du Fungitest

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 [29].

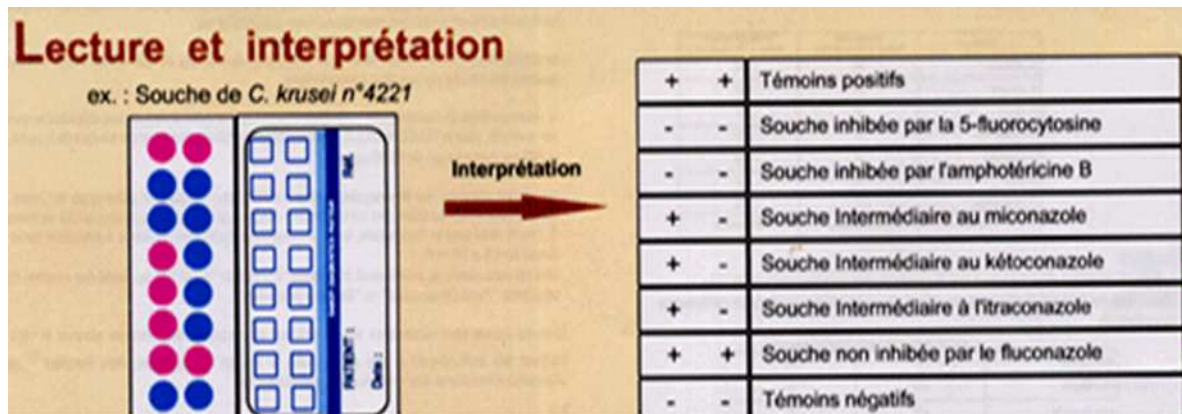


Figure 28 : Lecture et interprétation des résultats du Fungitest

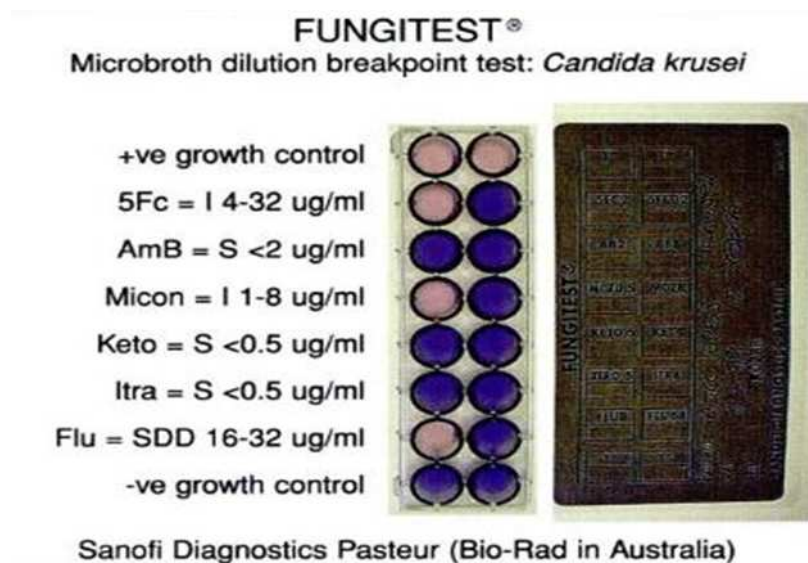


Figure 29 : Lecture de résultats du fungitest® en fonction de la couleur des cupules

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 ^[28].

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 ^[28].

2. Méthode par diffusion :

-Méthode de diffusion des disques du CLSI : Après le succès du développement de méthodes standardisées de dilution en bouillon pour tester la sensibilité aux antifongiques des champignons, l'étape suivante pour le CLSI était de simplifier cette approche et la rendre plus attrayante pour les essais de petits volumes. La diffusion en disque est depuis longtemps une technique populaire et simple pour tester la sensibilité, et cette méthodologie a été adaptée par le CLSI aux antifongiques. Ainsi, sur la base d'études du fluconazole et du voriconazole contre *C.albicans* ^[31,32], une méthode normalisée de la susceptibilité des levures, particulièrement *Candida*, aux antifongiques (fluconazole et voriconazole) par la diffusion des disques (M44-A) est disponible ^[33]. Elle est utilisée pour les études de surveillance antifongique ^[34].

Cette méthode utilise les règles de base, à savoir, un milieu agar de Mueller-Hinton complété par du glucose à 2% et 0,5µg/ml de bleu de méthylène (pH 7,2-7,4 à température ambiante après gélification). Bien que l'ajout du glucose fournisse une croissance favorable, l'addition du bleu de méthylène améliore la définition des contours des zones d'inhibition ^[35]. La densité de l'inoculum doit être ajustée par une solution saline à 0.5McFarland visuellement ou par spectrophotométrie à 530 nm, pour avoir une concentration finale de $1-5 \times 10^6$ cellules/ml. Les résultats se lisent à 80% de la croissance après incubation des plaques pendant 24h à 35°C. La période d'incubation peut être prolongée à 48h pour les isolats qui ne se développent

pas suffisamment à 24h [25]. Pour l'interprétation des résultats, elle se fait en fonction des diamètres d'inhibition.

Tableau 27: Critères d'interprétation de la méthode de diffusion pour le Fluconazole et le Voriconazole contre *Candida*.

Disque	Diamètre de la zone d'inhibition en mm		
	R	SDD	S
Voriconazole	≤13	14 – 16	≥17
Fluconazole	≤14	15 – 18	≥19
Kétoconazole	≤10	10 – 20	≥20

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

- ↳ **Une souche sensible** est une souche pour laquelle la probabilité de succès thérapeutique est forte.
 - ↳ **Une souche de sensibilité dose dépendante** 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 sensibilité dose dépendante 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* [36, 37] ; Caspofungine vs *Candida* [38] ; l'amphotéricine B, la Flucytosine, et azolés [39] ; Caspofungine et micafungine vs *Aspergillus* et *Fusarium* [40,41] , Posaconazole vs *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium* et *Fusarium* [42, 43] ; Posaconazole, Voriconazole, L'Itraconazole, L'AmphotéricineB, et la caspofungine vs *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, et *Scedosporium* [44] ; Itraconazole, Terbinafine, Voriconazole, et Ravuconazole vs *Microsporum* et *trichophyton* [45] , et Terbinafine et Naftifine vs *Microsporum*, *Epidermophyton*, et *Trichophyton* [46]. Les résultats de ces études en général suggèrent un degré acceptable de corrélation entre la diffusion des disques et les dosages de la méthode de dilution de référence du CLSI.

Cependant, la méthode de référence de diffusion des disques peut parfois donner des résultats qui diffèrent de ceux obtenus par la méthode de dilution en bouillon [31, 35, 47], certains isolats qui sont sensibles au Fluconazole peuvent être classés comme résistants par le Test de diffusion des disques. De plus, ce test peut ne pas différencier les isolats résistants au Fluconazole de ceux sensibles dose dépendants. Plus important encore, certains isolats résistants au Fluconazole peuvent être classés comme sensibles par un test de diffusion des disques. La méthode de référence de dilution en bouillon reste le gold standard pour la catégorisation correcte de la sensibilité, en particulier lorsque l'étude de résistance aux antifongiques est effectuée à des fins de routine et pour guider le traitement antifongique [25].

-Méthode de diffusion des comprimés Néo-sensitabs™ : Il s'agit d'un test de diffusion qui utilise des comprimés d'antifongiques commercialisés au lieu des disques. Cette méthode a été étudiée en comparaison avec le test de référence de diffusion du CLSI. Jusqu'ici, elle a

donné des taux acceptables d'accord avec la méthode de diffusion des disques de référence et les méthodes de dilution en bouillon, dans des essais sur le fluconazole, le voriconazole, et la caspofungine contre *Candida* ou *C.neoformans* [48, 49]. Cette technique est utilisée aussi pour tester certains imidazolés dont le kétoconazole. 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 [50].

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 [51].

Tableau 28 : Antifongiques à tester par le Néo-Sensitabs

Ref N°	Produit	Code	Puissance (µg)
81012N	Amphotericin B	AMPHO	10
82412N	Caspofungin <i>For research use only</i>	CASP5	5
81112N	Ciclopiroxolamine	CICLO	50
81212N	Clotrimazole	CTRIM	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 ^[51] : A partir d'une culture fraîche de 24h, quelques colonies sont prélevées pour préparer une suspension de levures. La densité de l'inoculum préparé doit être de 0.5 McFarland. Avec un écouvillon stérile, la boîte contenant le milieu agar de Mueller- Hinton complété par du glucose à 2% et 0.5µg/ml de bleu de méthylène doit êtreensemencée sur toute la surface. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures pour *Candida*. Pour *Cryptococcus*, l'incubation se fait à 30°C pendant 42 à 48 heures. Une durée d'incubation plus longue peut entraîner une fausse résistance contre les imidazolés notamment le kétoconazole. 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 ^[51] : 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, ces colonies ne doivent pas être considérées comme des mutants résistants.

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

Interprétation des résultats :

***Selon les valeurs seuils du CLSI** : Lors de l'utilisation de la procédure recommandée par le CLSI pour le test de diffusion (gélose MH + 2% de glucose + 0.5 µg/ml de bleu de méthylène et inoculum de 0.5 McF) ^[31, 33, 35, 52, 53]. L'interprétation sera comme suit :

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

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

***Selon les valeurs seuils de l'EUCAST** : EUCAST travaille sur l'harmonisation des valeurs seuils, cependant, il n'existe aucun accord avec les valeurs seuils du CLSI. Dans les études comparant les méthodes, les erreurs d'interprétations des catégories peuvent être dues aux différences dans les valeurs seuils des CMI [54, 55].

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

All MIC breakpoints from EUCAST are tentative

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

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 [50].

Inconvénients : Il existe une mauvaise corrélation entre le diamètre de la zone d'inhibition et la CMI, il faut signaler 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 ^[50].

3. Méthode par dilution-affusion :

Il s'agit de la méthode du **E-Test®**.

Principe : L'E-Test est une technique quantitative pour la détermination sur milieu gélosé de la concentration minimale inhibitrice des agents antifongiques vis-à-vis des champignons, et pour la détection des mécanismes de résistance. Elle est basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antifongique à étudier sur une face, et une échelle de lecture sur l'une autre face. Lorsqu'une bandelette E-Test est appliquée sur la surface d'une gélose ensemencée, le gradient exponentiel préformé de l'agent antifongique est immédiatement transféré dans la matrice de l'agar. Le gradient de concentration, continue et prédéfini, établi le long de la bandelette reste stable pendant une longue période de temps. Après une incubation d'une nuit ou plus, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette est formée ^[56].

Antifongiques : le gradient d'antifongique couvre des valeurs très étendues de 0,016 à 256µg/ml pour le fluconazole et de 0.002 à 32 µg/ml pour le 5-FC, le kétoconazole, l'amphotéricine B et l'itraconazole ^[6]. Par ailleurs, la gamme d'antifongiques disponibles est en cours d'élargissement pour les médicaments ayant récemment bénéficiés d'une AMM (Voriconazole, Caspofungine, Anidulafungine).

Mode opératoire : La préparation de l'inoculum (densité de 0,5McFarland) 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 24h. 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 par position sur le couvercle dans les conditions appropriées pour chaque microorganisme étudié [56].



Figure 30: Différentes étapes du mode opératoire du E-Test

Lecture des CMI et interprétation des résultats : La lecture de la CMI d'une souche donnée est déterminée par le point d'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette

imprégnée d'antifongique sur laquelle est portée une échelle de lecture exprimée en µg/ml permettant une interprétation immédiate.

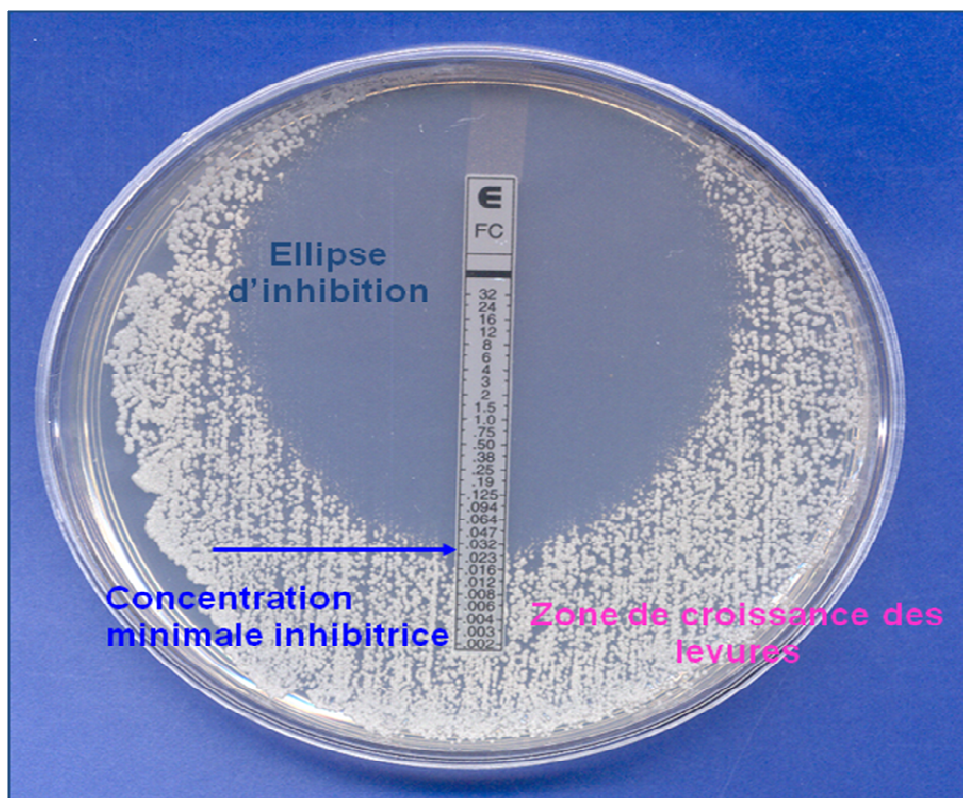


Figure 31 : Lecture des résultats de l'E-test

L'interprétation se fait selon les guidelines du document du NCCLS M27-A.

Tableau 29 : Détermination de la sensibilité par la méthode E- test selon ^[27]

Antifongique	Susceptible	SDD	Intermédiaire	Résistant
Fluconazole	≤8	16 – 32	-	≥64
Itraconazole	≤0,125	0,25 - 0,5	-	≥1
Flucytosine	≤4	-	8 – 16	≥32
Amphotéricine B	≤0,5			≥2

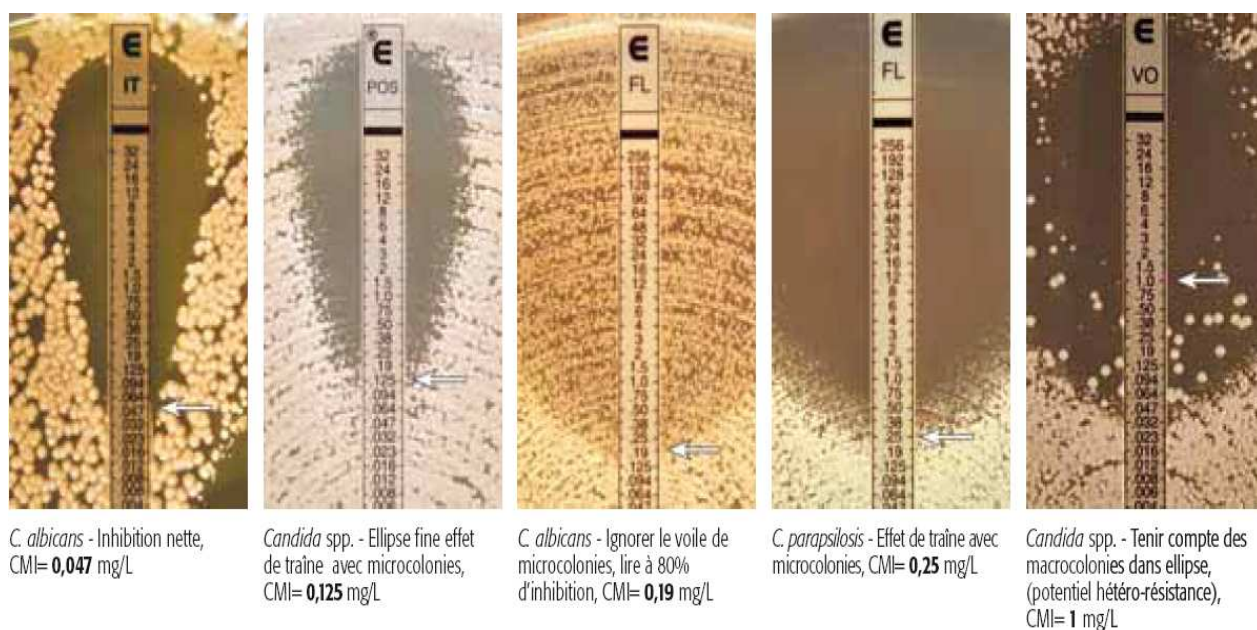


Figure 32 : Fiche de lecture des résultats de l'E- test pour les azolés. BioMérieux

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.* [57] et pour les filamenteux [58]. L'avantage particulier de l'E-Test est sa capacité de détecter les isolats résistants à l'amphotéricine B rencontrés notamment chez *C. lusitaniae* [59] et chez des espèces d'*Aspergillus non fumigatus* [60].

Inconvénients : Le principal inconvénient repose sur certaines difficultés de lecture, surtout pour les azolés dont le kétoconazole bien évidemment, 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 [7].

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 [61]. Grâce à la technologie Vitek 2, l'antifongigramme est automatisé, standardisé et rapide. Avec la technologie Vitek 2, les résultats sont disponibles en 13 heures seulement [62].



Figure 33 : Système automatisé Vitek 2, bioMérieux [8]

Principe [8] : Cette technique permet de déterminer la sensibilité de *Candida* et de *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques en milieu semi-liquide.

La carte Vitek comprend 64 cupules réactionnelles comprenant quatre antifongiques 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 antifongique, 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. 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 antifongique. Pour finir, les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités.

Matériel : Le Vitek 2® 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. 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, et 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 dernière sert également au support des cartes. Le Vitek 2® se charge automatiquement de la dilution à effectuer.

- **La carte Vitek AST-YS01® :**

La carte Vitek AST-YS01® comprend 64 cupules réactionnelles comprenant quatre antifongiques dont le fluconazole, le voriconazole, la flucytosine et l'amphotéricine B à quatre concentrations différentes. Les cartes sont inoculées avec les diverses suspensions avec un module de remplissage qui utilise une chambre à vide et une pompe. Cette carte miniature prête à l'emploi permet d'améliorer la productivité du laboratoire par un haut niveau d'automatisme assuré par le concept original de la carte, aucun réactif ajouté, une carte scellée pour une sécurité maximale et un code-barre pré-imprimé pour une plus grande traçabilité.

Elle permet aussi de réduire le temps/délai de résultat par une lecture cinétique toutes les 15 minutes et un délai moyen de résultat en 6 à 8 heures ^[8].

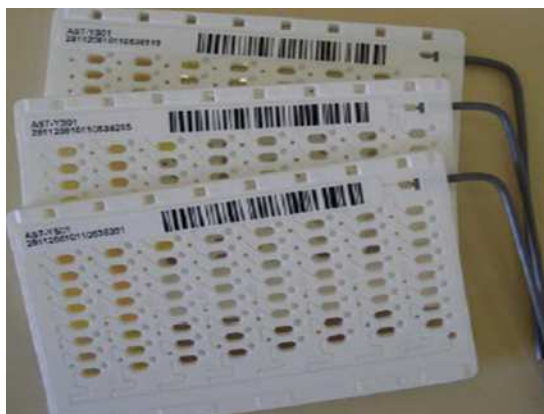


Figure 34 : Carte Vitek AST-YS01 [bioMérieux]

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, une suspension d'opacité de 2 McFarland est préparée en prélevant et dissolvant quelques colonies à l'aide d'un écouvillon stérile dans environ 3 ml de NaCl 0.45%. Ensuite, le tube contenant la suspension est alors placé sur le portoir sur la station satellite. 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 NaCl 0.45%. Il homogénéise la suspension par aspiration et refoulement, puis il inocule les cartes. Pour finir, les cartes sont isolées de l'extérieur et l'analyse commence. Il n'y a ainsi pas de risque de contamination pour le personnel. BioMérieux® assure des résultats dans les 13 heures pour les *Candida* et 20 heures pour les *Cryptococcus neoformans* ^[8].

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'identifiant :					
Germe sélectionné		Candida albicans		Par : Système	
Commentaire sur l'ident :		Entré le : 5 août 2008 14:23 CEST			
Résultats Antibiogramme					
Carte : AST 1061		N° de lot : 281103230		Péremption : 11 oct. 2009 13:00 CEST	
Terminée le : 6 août 2008 03:19 CEST		Etat : 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 35 : rapport de laboratoire et résultat de l'automate Vitek2 [ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion]

Avantages : l'antifongigramme automatisé présente plusieurs avantages : sa préparation est simple et rapide. Le code barre individuel permet une reconnaissance du type de carte, une traçabilité, et un rejet d'une carte périmée par le système automatiquement. Les temps d'incubation prescrits sont plus ou moins corrects pour toutes les espèces de *Candida* ainsi que pour le *Cryptococcus neoformans*. Le contenu du kit est de 20 cartes et la date de péremption est de 14 mois, ce qui rend la méthode adaptée à la consommation en routine.

De plus, grâce à l'automatisation, les résultats d'identification s'obtiennent dans la journée et contribuent ainsi à une meilleure prise en charge des patients, puisque les résultats sont rapidement disponibles. C'est une méthode standardisée et automatisée qui présente une reproductibilité excellente [8].

Inconvénients : l'inconvénient majeur de l'antifongigramme automatisé reste le prix élevé. On remarque aussi le manque d'itraconazole par rapport aux galeries disponibles [8].

IV. 1.3 Interprétation des résultats de l'antifongigramme :

Malheureusement, de nombreuses difficultés, en particulier le manque de standardisation des techniques, rendent difficile l'interprétation des résultats. Des différences peuvent être considérables d'un laboratoire à l'autre. L'interprétation des résultats doit donc être effectuée avec prudence. De plus concernant les CMI, il n'existe pas de valeurs seuils qui définissent les souches comme sensibles, sensibles dose dépendantes ou résistantes. Leur interprétation dépend de la composition des milieux utilisés, du pH, de la taille de l'inoculum, de la durée et de la température de l'incubation.

1. Facteurs influençant l'interprétation de la CMI :

1.1 Le milieu :

Le milieu utilisé dans les tests de détermination de CMI ne doit pas contenir de substances qui interfèrent avec les antifongiques. Par exemple, l'action de la 5-flucytosine peut être inhibée par les purines ou les pyrimidines contenues dans certains tampons (MOPS-tris : acide morpholine propane sulfonique), les stérols interfèrent avec les polyènes. La composition de l'agar varie en fonction des différents fabricants. Le RPMI 1640 tamponnée à pH 7,0 est le milieu de référence utilisé par le NCCLS. Le milieu synthétique HR et le milieu casitone sont des bonnes alternatives pour évaluer la CMI du fluconazole pour les levures [6].

1.2 Le pH :

Le pH du milieu peut influencer la croissance des levures ou modifier l'activité de l'antifongique. A pH acide, les valeurs de CMI sont augmentées pour l'amphotéricine B et les azolés, mais diminuées pour la 5-FC. Les variations de pH sont neutralisées par l'adjonction de tampon [6].

1.3 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 ^[6].

1.4 L'incubation (durée et température) :

La durée d'incubation est fonction de la vitesse de croissance de la souche testée. 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*. L'AB Biodisk recommande la détermination des CMI à 24 heures par la méthode E-test. La température d'incubation idéale est de 35°C ^[6].

1.5 Les concentrations critiques : Les concentrations critiques n'ont été établies que pour le fluconazole et l'itraconazole vis-à-vis de *Candida sp.* à l'exclusion de *C. krusei*, essentiellement sur la base de candidoses oropharyngées chez les patients positifs au VIH avant l'avènement des trithérapies et à partir d'une centaine de cas des candidoses disséminées ^[7]. Ainsi des points finaux, classant les CMI du fluconazole et de l'itraconazole en sensible (S), sensible dose-dépendante (S-DD) et résistante (R) ont été établis. En effet, les valeurs seuils de résistance pour la CMI du fluconazole et de l'itraconazole ont été établies respectivement à 64µg/ml et à 1µg/ml. La sensibilité à ces antifongiques est indiquée par des valeurs de CMI maximales de 8µg/ml pour le fluconazole et de 0,125µg/ml pour l'itraconazole. Entre ces deux valeurs seuils (résistance et sensibilité) les valeurs de CMI indiquent que les souches sont sensibles dose dépendantes ^[63].

Tableau 29 : guide d'interprétation des CMI pour les tests de sensibilité in vitro sur *Candida* pour le fluconazole et l'itraconazole

Agent antifongique	CMI en µg/ml		
	S	S-DD	R
Fluconazole	<8	16 – 32	≥64
Itraconazole	≤0,125	0,25 – 0,5	≥1

S : sensible ; **S-DD :** sensible dose dépendante ; **R :** résistante.

D'autre part, concernant la 5 fluocytosine, des points finaux ont été fixés arbitrairement ($S < 4\text{mg/l}$, $I = 8-16\text{mg/l}$, $R > 32\text{mg/l}$) [64]. Ainsi, les CMI prédictives de succès ou d'échec thérapeutique vis-à-vis de *Candida sp* sont $\leq 4\text{mg/L}$ pour les souches sensibles, entre 8 et 16 mg/L pour les souches dites sensibles dose dépendantes et 32mg/L pour les souches résistantes [65]. Cependant Grillot et Coll. proposent des concentrations critiques pour l'amphotéricine B ($S \leq 0,5\mu\text{g/ml}$, $I = 0,5 - 0,8\mu\text{g/ml}$, $R \geq 0,8\mu\text{g/ml}$), et pour le kétoconazole ($S \leq 1 \mu\text{g/ml}$, $I = 2-4\mu\text{g/ml}$, $R \geq 8\mu\text{g/ml}$).

La détermination du point final reste donc la source majeure de variation inter-laboratoires pour les azolés et la 5-FC. La détermination de la valeur de la CMI à 80% d'inhibition de croissance pour la microméthode en milieu liquide donne la détermination la plus reproductible et la plus concordante avec les modèles *in vivo* [6].

1.6 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. Le NCCLS suggère que l'amphotéricine B et le kétoconazole soient dissous dans le diméthyl sulfoxyde. Plus encore, l'amphotéricine B et les azolés ont tendance à se détériorer quand ils sont stockés sous forme diluée ou sèche dans les disques. La toxicité, la voie d'administration, les propriétés pharmacocinétiques, les interactions médicamenteuses et enfin la capacité à parvenir sur le site de l'infection sont autant de paramètres qui compliquent toute corrélation *in vitro/ in vivo* dans l'analyse des propriétés d'un antifongique [6].

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

- ① Une CMI n'est pas une mesure chimique ou physique ;
- ① Les facteurs inhérents à l'hôte supplantent les résultats des tests de sensibilité pour juger de l'évolution clinique ;
- ① 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:

Une analyse critique de la littérature, montre qu'en dehors de la situation très particulière de la candidose oropharyngée du sidéen, les données in vitro n'ont aucune valeur prédictive de l'évolution thérapeutique in vivo [63,7]. En effet, la sensibilité in vitro n'est pas prédictive de succès thérapeutique, de même la résistance in vitro n'est pas prédictive d'un échec thérapeutique.

Il existe une excellente corrélation in vitro/in vivo pour le fluconazole et l'itraconazole chez les patients infectés par le VIH et présentant une candidose oropharyngée. Des relations ont pu être établies, surtout pour les dérivés azolés, entre les CMI et le devenir des patients atteints. Les CMI prédictives de succès ou d'échec thérapeutique vis-à-vis de *Candida sp.* sont établies [63]. Il faut signaler, pour l'itraconazole, qu'il est également important de prendre en compte les dosages sériques chez les patients à risque : on observe en effet des variations intra- individuelles et inter-individuelles importantes des concentrations sériques du produit chez les immunodéprimés [65].

L'étude de Walmsley, est une des contributions mettant en évidence une corrélation entre tests de sensibilité in vitro et évolution clinique. Chez ces patients positifs au VIH ayant une candidose oropharyngée, le taux d'échec clinique est associé à 61% de souches de *Candida* résistantes ou sensibles dose dépendantes, alors que lorsque les souches causant l'infection sont sensibles ou sensible dose dépendantes, le taux de succès atteint 86% [66].

Tableau 30 : fluconazole dans le traitement de la candidose oropharyngée chez des patients VIH⁺ : Corrélations in vitro et in vivo

<i>Candida albicans</i>	Echec clinique n = 23	Succès thérapeutique n = 49
R/S-DD	61%	
S/S-DD		86%

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

Il existe d'importants problèmes d'interprétation des CMI, voire une mauvaise corrélation in vitro/in vivo dans les autres infections fongiques pour le fluconazole et l'itraconazole. Citons à titre d'exemple que les résistances à l'amphotéricine B sont difficilement évaluables (CMI > 1mg/ml). La M27 ne permet pas de les identifier et *C. lusitaniae* montre souvent une résistance primaire. Les résultats suggérant une corrélation sont essentiellement historiques et basés sur des constructions pharmacocinétiques. Enfin aucune donnée clinique n'est disponible pour l'amphotéricine B ni pour les candidines ^[64].

L'étude de JH Rex et al. Parue en 1995 comparant fluconazole et amphotéricine B dans le traitement des candidémies chez les patients non neutropéniques illustre bien l'absence de corrélation clinique et in vitro ^[67]. La sensibilité in vitro a été testée par la méthode NCCLS M27 sur 232 souches de *Candida sp.* isolées à partir d'hémoculture de patients traités soit par fluconazole (400mg/j) soit par amphotéricine B (0.5 mg/kg/j). Les CMI pour l'amphotéricine B sont très serrées (0.125 à 1µg/ml) et il n'est pas trouvé d'isolat résistant in vitro, ni de corrélation entre l'augmentation des CMI et l'échec du traitement. Pour le fluconazole, les CMI vont de 0.125 à plus de 64 µg/ml. Il n'a pas été trouvé là non plus de corrélation entre l'augmentation des CMI et l'échec du traitement.

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.

3.1 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. Quelle que 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 [7]. 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.

3.2 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'échec thérapeutique. Malheureusement, ils sont suffisamment 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'antifongogramme employé : posologie inadaptée, pénétration insuffisante au site de l'infection, interaction médicamenteuse, mauvaise observance....
- A l'agent pathogène lui-même : échappement, libération de facteurs de virulence ou toxines....

Par conséquent, face à une situation d'échec thérapeutique, en particulier dans les traitements impliquant le fluconazole, une analyse précise des facteurs à prendre en compte pour documenter une éventuelle résistance doit être effectuée. Cette approche constitue le seul moyen d'établir une corrélation in vitro/ in vivo et de progresser dans la définition des concentrations critiques [7].

3.3 Les modèles animaux :

Pour pallier au problème des interférences liées au patient et lorsqu'on veut corréler les résultats in vitro à l'évolution in vivo, la réalisation de modèles expérimentaux constituent 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 pouvant rendre difficile l'adaptation des doses. Malgré cela, cette approche peut donner des données initiales très utiles ^[7]. 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 ^[63].

3.4 L'antifongique :

Pour les antibiotiques, les relations entre données pharmacocinétiques et effets obtenues 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.

Par exemple, dans le cas du fluconazole et *Candida*, il apparaît que le rapport ASC/ CMI constitue le meilleur facteur prédictif d'efficacité thérapeutique ^[7].

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

La difficulté d'interprétation des CMI obtenues par l'antifongigramme n'est pas le seul problème qui se heurte à son utilisation et sa pratique. L'antifongigramme est aussi difficile à standardiser. En effet, l'absence de reproductibilité des CMI entre les laboratoires (variation jusqu'à 50 000 fois) a imposé la nécessité d'obtenir des méthodes standardisées et reproductibles ^[64]. L'étape de standardisation de l'antifongigramme a constitué un préliminaire pour le NCCLS, dont le but initial a été d'obtenir, pour des souches de levures

données, des CMI reproductibles non seulement au sein d'un même laboratoire mais aussi d'un laboratoire à l'autre.

En dépit des critiques évoquées, les efforts développés par le NCCLS depuis 1985 restent considérables pour réduire la complexité de cette standardisation. Ces travaux ont consisté à examiner le rôle de l'ensemble des variables susceptibles d'intervenir dans la reproductibilité des résultats, notamment pour les antifongiques azolés qui sont particulièrement influencés par les conditions environnementales : densité de l'inoculum, temps et température d'incubation, composition du milieu, « endpoints ». Cette stratégie a abouti à la publication de documents définissant les conditions opératoires pour les levures (M27-A juin 1997) et qui servent aujourd'hui de référence ^[7]. Cette méthode standard est toutefois lourde, et de nouvelles approches ont été proposées :

- ⇒ Utilisation de nouveaux milieux : RPMI et glucose, casitone[®] ;
- ⇒ Méthode de microdilution ;
- ⇒ E-Test (bonne alternative) ;
- ⇒ Milieu antibiotiques 3 pour révéler les résistances à l'amphotéricine B.

Effectivement, comme la méthode M27-A ne fait pas clairement la différence entre les levures qui sont sensibles et celles qui sont potentiellement résistantes à l'amphotéricine B, le remplacement du bouillon RPMI-1640 standard par le milieu antibiotique 3 a été suggéré pour la détermination de la CMI de l'amphotéricine B ^[68].

Pour le NCCLS l'objectif n'était pas de proposer une méthode destinée à être utilisée en pratique courante au laboratoire, mais le but princeps était, outre l'obtention de résultats reproductibles et la définition de souches contrôles, de constituer une référence pour l'évaluation des autres méthodes existantes. La macrométhode initiale devait ensuite évoluer vers une trousse de routine avec un format en microdilution plus pratique ^[7]. Par ailleurs divers problèmes ont surgi tels que les phénomènes de traîne. Ces problèmes devraient être corrigés et faire l'objet de nouvelles recommandations du NCCLS.

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

La méthode la plus simple d'évaluation in vitro de ces associations d'antifongiques est la méthode de l'échiquier qui permet de déterminer l'index FIC (Fractional Inhibitory Concentration). Différentes techniques sont décrites dans la littérature, de la diffusion en milieu solide à la méthode de dilution en milieu liquide avec définition du FIC index. Cet index représente la valeur la plus utilisée pour définir ou décrire les interactions entre médicaments, néanmoins il n'est pas toujours optimal pour les antifongiques en raison des difficultés à définir les CMI. Le FIC index exprime le niveau d'interaction d'un antifongique A avec un antifongique B. Il est calculé par la formule suivante où CMI associée et CMI seule correspondent respectivement aux CMI des antifongiques A et B en association et lorsqu'ils sont testés seuls.

$$\text{FIC index} = \frac{\text{CMI A associée}}{\text{CMI A seule}} + \frac{\text{CMI B associée}}{\text{CMI B seule}}$$

En théorie, un index FIC < 1 indique une synergie d'action, un index FIC = 1 une additivité d'action, un index FIC > 1 un antagonisme d'action.

Selon les recommandations de la société américaine de microbiologie, en pratique, avec une variabilité de ± 1 log de dilution, un index FIC ≤ 0.5 correspond à une synergie, un FIC > 0.5 et ≤ 4 à une additivité ou indifférence et un index FIC > 4 à un antagonisme ^[69].

Les figures ci-après sont un exemple d'étude de l'association antifongique amphotéricine B + 5 flucytosine par la méthode de l'E-Test

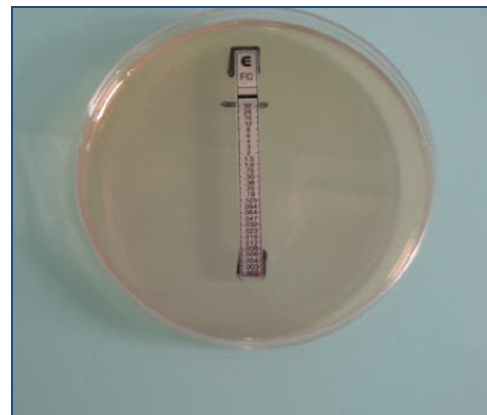
Association

Dépôt de la bandelette du premier antifongique:



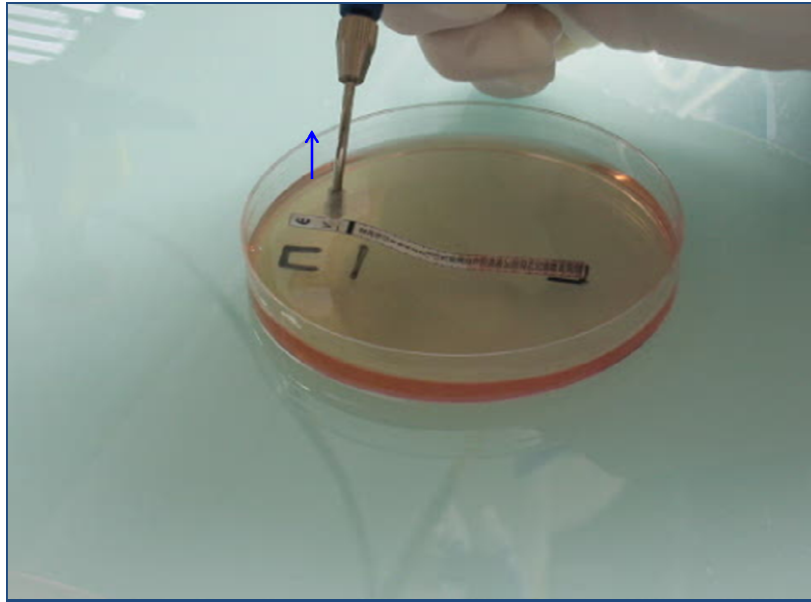
**Appliquer la technique classique du Etest®
Transfert du gradient d'antifongique dans la gélose (60 min.,
température ambiante)**

Préparation et repérage:

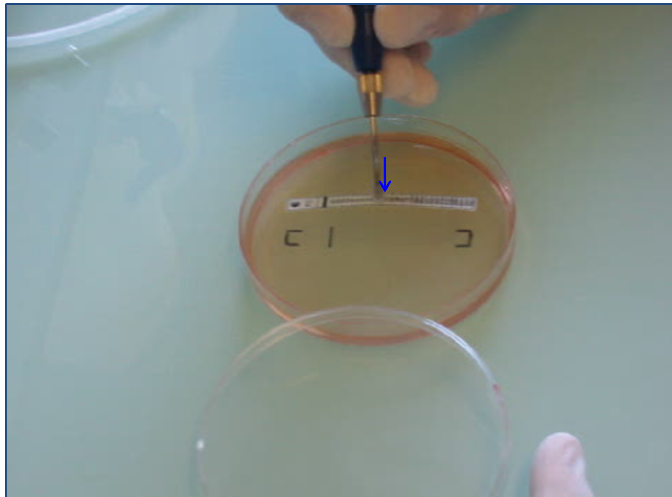


**Repérer PRÉCISÉMENT sur l'envers de la boîte la position de la
première bandelette**

Retirer la première bandelette :



Dépôt de la bandelette du deuxième antifongique



Déposer la deuxième bandelette en superposant les gradients maximum

ATTENTION : La gamme de concentration des bandelettes peut être différente suivant l'antifongique

Incuber 24-48h à 35°C

Lecture des CMI



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

Le développement de nouveaux antifongiques élargissant les possibilités thérapeutiques et l'émergence de résistances aux antifongiques ont créé une demande accrue des tests de sensibilité de la part des cliniciens. Cela a remis à l'ordre du jour, les questions de fiabilité, de pertinence et de modalités de réalisation de l'antifongigramme. De plus, du fait de l'existence de plusieurs méthodes, commercialisées ou non, permettant de réaliser un antifongigramme, le choix d'une méthode de routine et fiable de la part des biologistes s'est compliqué.

Ainsi les microbiologistes du Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) ont souhaité engager une réflexion sur ce thème et réaliser une évaluation de la pratique de l'antifongigramme au sein du groupe ^[70]. Plusieurs études ont été menées par ce centre visant à faciliter le choix d'une méthode de routine fiable d'antifongigramme, face à une demande de plus en plus fréquente des cliniciens (notamment les réanimateurs) en ce qui concerne l'identification rapide de la souche isolée et de sa sensibilité vis-à-vis des principaux antifongiques utilisés.

Le ColBVH est un réseau de 213 biologistes, répartis dans 193 hôpitaux non universitaires couvrant géographiquement l'ensemble du territoire français. Une enquête rétrospective au moyen d'un questionnaire, portant sur l'année 2002, a été proposée aux membres du réseau afin d'évaluer l'activité de mycologie au sein de la microbiologie, la quantité d'antifongogrammes réalisés, leurs indications, les méthodes utilisées, les molécules testées, l'interprétation des résultats, les difficultés et les attentes des microbiologistes concernant cette partie de leur activité.

Parmi les hôpitaux du ColBVH, 32% ont répondu à l'enquête, ce qui représente environ un nombre de 40 000 lits. L'activité mycologique est variable d'un centre à l'autre. En moyenne, les isollements fongiques représentent 10,8% des isollements microbiens, et les antifongogrammes représentent 2% des études de sensibilité, l'antifongogramme est pratiqué dans 11,3 % des cas, contre 68,4 % des cas pour l'antibiogramme, soit en moyenne 82 antifongogramme par hôpital en 2002. 38% des répondants ne réalisent pas d'antifongogramme dans leur laboratoire: 26 % les transmettent à un laboratoire spécialisé, 12 % n'en pratiquent jamais. Les principales raisons évoquées pour la non pratique de l'antifongogramme sont :

- ↳ Un manque de recrutement en mycologie (56%) ;
- ↳ La notion d'absence de technique validée en routine (52%) ;
- ↳ L'absence d'indications cliniques (53%) ;
- ↳ Le sentiment d'incompétence pour le choix de la méthode à utiliser et des antifongiques à tester (17% et 9% respectivement) ;
- ↳ Les indications et l'interprétation de l'antifongogramme (13% et 4% respectivement) ;
- ↳ Le coût en matériel ou en personnel (9%).

Parmi les 88 % de répondants qui pratiquent ou transmettent au moins un antifongogramme par an, les espèces testées appartiennent essentiellement au genre *Candida*.

L'antifongigramme est effectué en fonction de divers critères biologiques ou cliniques variés, souvent à la demande du clinicien.

Concernant les indications de l'antifongigramme, hormis les sept laboratoires qui, quelle que soit l'indication potentielle, ne font pas et ne transmettent aucun antifongigramme au moment de l'enquête, la décision de réaliser l'antifongigramme 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'antifongigramme.

L'espèce *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.dublinsiensis* (7%), *C.lusitaniae* (7%) et *C.parapsilosis* (7%) sont citées.

La nature du prélèvement intervient dans le choix de réalisation de l'antifongigramme. 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.

Les méthodes les plus utilisées sont Fungus® bioMérieux (56%) et le E-test® AB Biodisk (41%), ou une combinaison de deux ou plusieurs méthodes (38%), conditionnant le choix des antifongiques testés en première intention : amphotéricine B dans 93% des cas, fluconazole dans 49% des cas. Les résultats sont interprétés en sensible, intermédiaire, résistant dans 98% des cas. Un contrôle de qualité est utilisé, à intervalles réguliers, par 3% des laboratoires. Seules les souches issues d'hémocultures sont conservées par la majorité des centres.

Le choix méthodologique de la technique d'antifongigramme à utiliser découle de :

- ↳ Un choix fréquemment inapproprié des antifongiques testés, puisque la plupart des systèmes commercialisés ne permettent pas de tester l'ensemble des antifongiques d'action systémique.
- ↳ La nécessité fréquente d'associer au moins deux techniques afin de pallier l'absence de certaines molécules dans les galeries commercialisées.
- ↳ Une catégorisation clinique de type sensible, intermédiaire, résistant, quasi-systématique, fondée sur les recommandations du fournisseur, et ce même en l'absence de seuils de sensibilité définis et validés pour un certain nombre de couples champignon/antifongique et de situations cliniques ^[13, 12, 71].

Concernant les attitudes des cliniciens face à l'antifongigramme, 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'antifongigramme, le choix des antifongiques à tester, la réalisation technique, la lecture, ou l'interprétation de l'antifongigramme. Enfin, 95% des répondants sont fortement demandeurs de recommandations consensuelles concernant les indications, la réalisation et l'interprétation de l'antifongigramme.

De cette enquête, on sent clairement une incompétence vis-à-vis de la pratique de l'antifongigramme, 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, plébiscitées 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 l'intérêt des biologistes et des cliniciens.

Dans une autre étude épidémiologique multicentrique française conduite par le même collègue (colBVH), en octobre 2004, le but était de faciliter le choix pour les biologistes d'une méthode de routine d'antifongigramme pour les *Candida sp.* ^[72]. La susceptibilité in vitro à l'amphotéricine B, à la 5-fluocytosine, au fluconazole, à l'itraconazole, au voriconazole et à la caspofungine a été déterminée sur 46 isolats de *Candida sp.* Les souches isolées

comportaient 23 *C.albicans*, 12 *C.glabrata*, 5 *C.tropicalis*, 3 *C.parapsilosis*, un *C.krusei*, un *C.kefyr* et un *C.guillermundii*. Les CMI ont été mesurées par la méthode M27, EUCAST, et deux méthodes commerciales : le Etest et ATB fungus 2.

Pour savoir si les quatre méthodes ont donné une distribution de CM semblable, le test de Friedman et le test des signes ont été employés. Les résultats de l'étude montrent qu'ils peuvent être considérés comme équivalents pour tester la sensibilité de *C.glabrata* vis-à-vis de l'amphotéricine B, de *C.albicans* vis-à-vis du fluconazole, de *C.parapsilosis* ou *C.tropicalis* vis-à-vis du voriconazole ou le fluconazole. Dans d'autres cas complexes, seulement trois méthodes ont donné une distribution équivalente des CMI. Elles concernent *C.albicans* et l'amphotéricine B (CLSI/EUCAST/ATB FUNGUS2), *C.parapsilosis* et amphotéricine B (CLSI EUCAST/E TEST), *C.albicans* et 5-flucytosine (CLSI/ E-TEST/ ATB FUNGUS2).

On en conclut que la distribution des intervalles de CMI obtenues par certaines techniques diffère de celle obtenue par les autres techniques. Il pourrait ne pas être recommandé d'utiliser ces techniques dans les cas suivants : le E test pour *C.albicans* et amphotéricine B ou voriconazole, EUCAST pour *C.albicans* et 5 flucytosine, CLSI pour *C.tropicalis* et amphotéricine B, et ATB FUNGUS 2 pour *C.parapsilosis* et amphotéricine B. La distribution des CMI obtenues diffère sensiblement entre les quatre méthodes pour *C.glabrata* et 5 flucytosine.

Dans une autre étude menée par le ColBVH dans 95 hôpitaux en 2005 ^[73], le but était de savoir quelles étaient les techniques utilisées par les laboratoires de biologie hospitalière et quelles étaient les conclusions émanant de l'évaluation des résultats obtenus.

Concernant la pratique de l'antifongigramme par les laboratoires participant à l'étude, 29% des laboratoires n'ont pas réalisé d'antifongigramme, 71% ont testé au moins une molécule, 17% ont testé seulement quatre molécules : amphotéricine B, 5 fluorocytosine, fluconazole et itraconazole.

Quant aux méthodes utilisées par les laboratoires pour l'étude de la sensibilité aux antifongiques, 46% des laboratoires ont utilisé l'ATB FUNGUS bioMérieux®, 25% le

✿ **Relation structure-activité :**

Son appartenance aux azolés lui confère un spectre antifongique large qui s'étend aux bactéries Gram⁺. Il est indiqué dans les mycoses superficielles et profondes.

Il est utilisé sous forme de base ou de sel nitrate.

L'existence du noyau imidazolé le rend fortement métabolisé, c'est pourquoi il a été remplacé plus récemment par le cycle triazolé afin d'améliorer l'activité donnant naissance aux antifongiques triazolés de première génération d'une part (Fluconazole et Itraconazole) et de deuxième génération d'autre part (Voriconazole et Posaconazole).

Le substituant N-3 du cycle imidazolé lui confère une interaction avec l'atome de fer du cytochrome P-450, d'où découle son mécanisme d'action qui s'étend à d'autres stéroïdes en particulier aux hormones, ce qui explique les effets indésirables, les interactions médicamenteuses et l'hépatotoxicité, ce qui engendre Malheureusement une limitation importante du traitement avec ce produit.

La présence d'un noyau aromatique sur le substituant N-1 le rend un puissant inhibiteur de la 17 α hydroxylase et la 17,20-lyase des testicules et des surrénales, et inhibe aussi les activités de l'aromatase du placenta et de l'ovaire et autres enzymes, pouvant avoir ainsi un rôle potentiel dans le traitement de l'ostéoporose, et être utilement exploités dans les essais cliniques dont les situations nécessitant l'inhibition de la production d'androgènes comme dans le cancer de prostate et l'HBP [l'hyperplasie bénigne de la prostate], la puberté précoce et l'hirsutisme ; ou l'inhibition de la biosynthèse des œstrogènes comme dans le cancer du sein [75].

IV.2.2 Activités pharmacologiques :

✿ **Mode d'action :**

Le mécanisme d'action du kétoconazole, miconazole, et clotrimazole a fait l'objet de nombreux travaux. Les données morphologiques en microscopie électronique suggèrent que le site primaire d'action de ces imidazolés est la membrane plasmique avec atteinte

simultanée du système vacuolaire central, et finalement une désorganisation interne des organelles conduisant à la mort des cellules fongiques. Les modifications au niveau du métabolisme oxydatif et peroxydatif amènent une accumulation du peroxyde d'hydrogène qui asphyxie la cellule fongique. Mais à la lumière des derniers travaux c'est l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol constituant majeur nécessaire à la formation de la membrane de la cellule cytoplasmique fongique. Cette inhibition de synthèse est obtenue par inhibition de la 14 alpha-déméthylase ou CYP51, enzyme du cytochrome P450 nécessaire à la conversion du lanostérol en ergostérol, ceci engendre une importante accumulation de C-14 méthylstérols qui altère la perméabilité cellulaire, tandis que le cholestérol des cellules de l'organisme hôte n'est pas modifié. Des travaux japonais récents montrent que l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol peut être une conséquence de l'atteinte fonctionnelle respiratoire des mitochondries altérées par le kétoconazole (Kcz) qui bloque le transport des électrons de la chaîne respiratoire de *C. albicans* dans des conditions d'aérobiose sur divers substrats comme le NADH ou le succinate ; une interaction entre le Kcz et le cytochrome C oxydase a été observée. Le Kcz, le plus puissant des dérivés imidazolés, interfère à de très faibles concentrations (10^{-11} M) avec le cytochrome P450 des microsomes dont dépend le système lanostérol 14 α -déméthylase aboutissant à l'accumulation des 14 méthylstérols. Pour ce même mécanisme, à de fortes doses le Kcz bloque la synthèse des stéroïdes des surrénales et du testostérone chez les malades ou chez le rat in vitro, d'où les répercussions développées comme effets secondaires ou comme possibilités thérapeutiques en cancérologie et endocrinologie ^[4].



Figure 37 : Cibles des antifongiques au niveau de la biosynthèse de l'ergostérol [79].

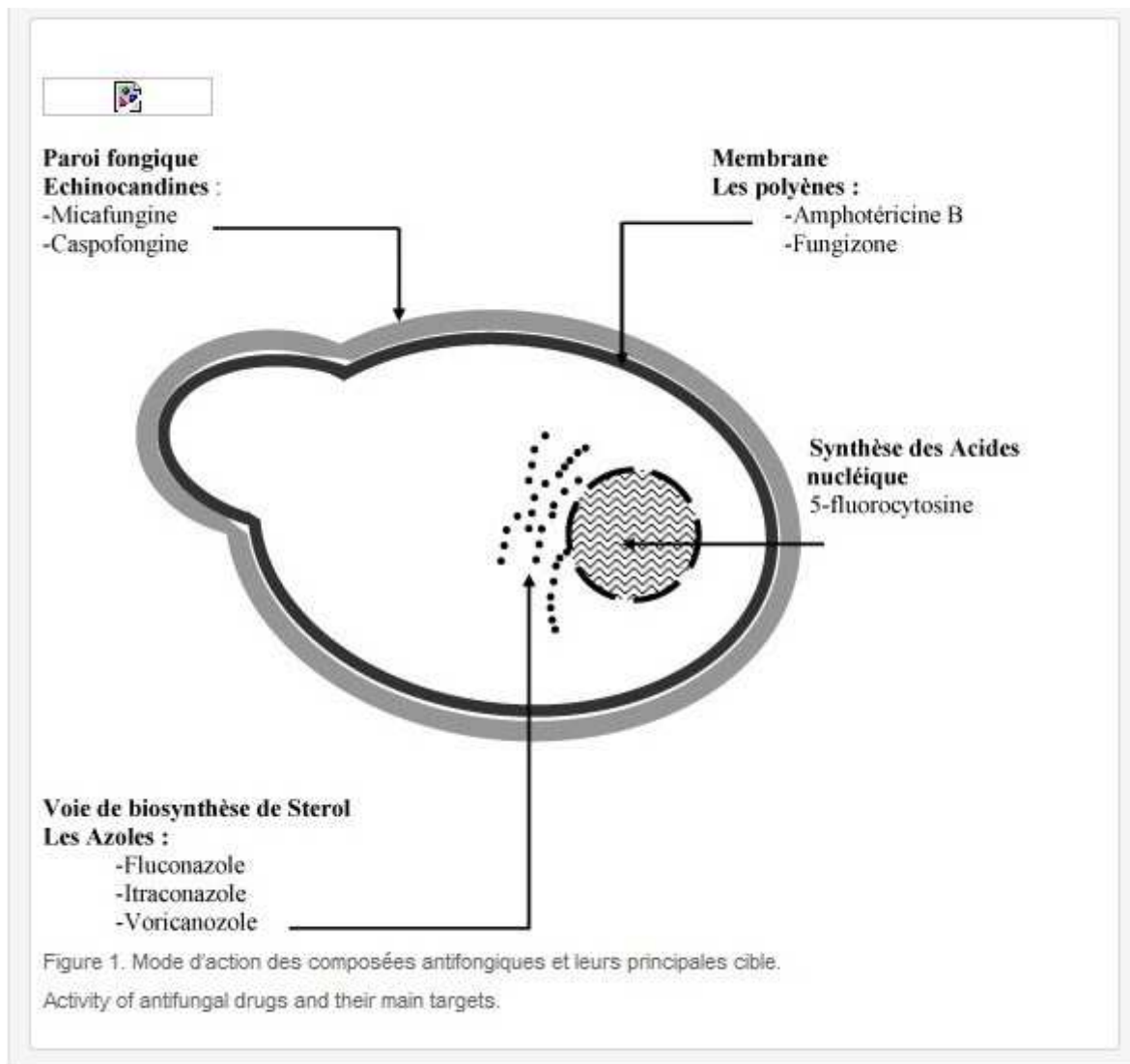


Figure 38 : Mode d'action des composés antifongiques et leurs principales cibles ^[79].

✿ **Spectre antifongique :**

Ainsi que les autres dérivés imidazolés, le Kétoconazole est caractérisé par un large spectre antifongique avec une phase de latence de quelques heures avant l'effet fongistatique, dont la concentration minimale inhibitrice (CMI) sur le milieu complexe casitone à pH 6,6 ou 7 est beaucoup plus basse pour la majorité des champignons étudiés que celle obtenue sur les milieux conventionnels comme les milieux synthétiques contenant l'isopentényl diphosphate (IPP) , le bouillon d'extrait de levure et mannitol (YMB) ou solidifié avec 15g/l d'agar

(YMA) + glucose + asparagine (Difco) ou le milieu gélosé glucosé de Sabouraud ; milieux qui sont tous à des pH acides (5-5, 6). Le rôle du pH acide masquant l'activité fongistatique des imidazolés comme l'éconazole et le miconazole est plus frappant pour le kétoconazole. Le Kcz inhibe particulièrement la forme (agressive) mycélienne de *Candida albicans* à des concentrations extrêmement basses (0,018 µg/ml) ce qui explique les résultats thérapeutiques spectaculaires dans les candidoses muco-cutanées chroniques où dans le derme *C. albicans* se présente sous forme mycélienne, ou dans les candidoses septicémiques cutanées disséminées chez des héroïnomanes dont les cheveux sont envahis par les filaments mycéliens. Dans aucun des cas de candidoses traités nous n'avons pu trouver des souches de *C. albicans* dont la CMI soit supérieure à 1,56 µg/ml sur le milieu casitone liquide ou gélosé sur l'antibiogramme en gélose, les zones d'inhibition des disques de kétoconazole (50 µg de charge) sont plus nettes que sur les autres milieux.

Ce milieu nous a servi également pour l'évaluation des taux de Kétoconazole dans le sérum et les autres liquides biologiques avec une sensibilité de dosage assez grande pour déceler des concentrations de 0,04 µg/ml. Les autres champignons levuriformes (*Torulopsis glabrata*, *Trichosporom capitatum*, *T. cutaneum*, *Cryptococcus neoformans*) sont également sensibles. Les CMI obtenues sur divers inoculum (spores, spores germées, mycélium) d'*Aspergillus fumigatus* donnent des résultats similaires d'après Viviani et Tortorano, mais ces CMI même dans les conditions les plus favorables, comme les milieux synthétiques ramenés à pH 7, et surtout le milieu casitone, sont plus élevées par rapport à celles obtenues pour *C. albicans*. De nombreuses souches d'*Aspergillus* (environ 62,5% d'après nos données) ont des CMI entre 12.5 et 25 µg ce qui explique partiellement les résultats médiocres obtenus chez les malades ayant un aspergillome pulmonaire ; mais ces souches sont également peu sensibles aux autres antifongiques systémiques (amphotéricine B, 5-FC).

Des CMI suffisamment basses pour un effet thérapeutique ont été observées avec des champignons filamenteux comme *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Scedosporium (Monosporium) apiospermum* et sa forme parfaite *Allescheria boydii*, *Phialophora parasitica* ; toutefois les effets thérapeutiques chez des malades immunodéprimés atteints par ces champignons opportunistes ont été discutables pour certains

d'entre eux. Il en fut de même pour certains agents de chromoblastomycoses ou phéohyphomycoses (*Exophiala jeansel-mei*, *Wangiella dermatitidis*) ce qui explique les difficultés d'obtention rapide et prolongée des effets thérapeutiques qui nécessitent des doses de Kétoconazole beaucoup plus élevées que celles habituelles. Des agents de mycétomes et entomophthoromycoses (*Basidiobolus haptosporus*, *Conidiobolus coronatus*) sont sensibles à des CMI inférieures à 1 µg/ml, ce qui explique les résultats thérapeutiques favorables observés.

Une souche de *Sporothrix schenckii* d'un cas de sporotrichose qui a été traité par le Kétoconazole s'est montrée relativement peu sensible (CMI 6.25µg) ce qui explique les récurrences observées dans ce cas, ainsi que dans d'autres cas observés par divers auteurs. Par contre, les autres champignons dimorphiques (*Histoplasma capsulatum*, *H. duboisii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Coccidioidomyces immitis*) sont particulièrement sensibles (CMI de 0.02 à 1,56 µg/ml). Les dermatophytes sont également sensibles comme Van Cutsem l'a montré ; sur le milieu casitone les CMI sont inférieures à 0.78 µg/ml pour *T. violaceum* et *T. schoenleini* ce qui explique les excellents résultats chez 11 enfants teigneux, un seul dont la CMI était 6.25 µg/ml ayant récidivé [4].

IV.2.3 Pharmacologie:

1. Posologie et administration:

Azols	Kétoconazole	Nizoral®	Cp 200 mg	200 à 400 mg/jour en une seule prise, au milieu d'un repas
	Fluconazole	Triflucan® + G	Gélule 50, 100 ou 200 mg Pdre pour susp. buv. 50 mg/5 mL et 200 mg/5 mL Sol. pour perf. 2 mg/mL	Adulte : 50 à 400 mg/jour en 1 prise Nourrisson et enfant : 3 à 12 mg/kg/jour
	Itraconazole	Sporanox® + G	Gélule 100 mg. Sol. buv. 10 mg/mL	100 à 400 mg/jour
		Sporanox®	Sol. à diluer/solv. pour perf. 10 mg/mL	200 mg 2 fois/jour pendant deux jours puis 200 mg une fois par jour
	Voriconazole	Vfend®	Cp pell. 50 ou 200 mg	Enfant : 200 mg 2 fois/jour
			Pdre pour susp. buv. 40 mg/mL	Adulte : 200 à 400 mg toutes les 12 h, puis 100 à 200 mg 2 fois/jour
			Pdre pour sol. pour perf. 200 mg	Enfant : 7 mg/kg deux fois/jour Adulte : 6 mg/kg toutes les 12 h, puis 4 mg/kg 2 fois/jour
	Posaconazole	Noxafil®	Susp. buv. 40 mg/mL	400 mg 2 fois/jour

Le kétoconazole (dans le traitement des mycoses systémiques) n'est disponible que sous forme de comprimés dosés à 200 mg. La posologie varie de 200 à 400 mg/j à prendre au cours des repas, en deux prises. Chez l'enfant, la posologie est de 5 à 7 mg/kg, avec une forme liquide (1mg/goutte) [1].

Au lieu de la posologie de un comprimé par jour au cours du repas, posologie utilisée par la plupart des expérimentateurs américains et recommandée par prudence par les laboratoires Janssen au début des essais cliniques, nous avons administré 2 x 200 mg chez l'adulte, un comprimé matin et soir (5-7 mg/kg/24 h chez l'enfant). En fonction des taux sériques et/ou de l'efficacité clinique, cette posologie a été augmentée à 2 comprimés le matin et le soir (8 à 10 mg/kg posologie recommandée chez l'enfant) et exceptionnellement à 3 comprimés matin et soir (10 à 15 mg/kg) ce qui nous a permis d'avoir des effets thérapeutiques plus rapides et plus efficaces dans les mycoses profondes plus particulièrement. Tous les malades traités pour une mycose systémique et une partie de ceux traités pour une mycose superficielle ont eu des dosages sériques de Kétoconazole 1,2, 4 et 6 heures après la prise matinale de 1 ou 2 comprimés. La durée du traitement a été de quelques jours à 1 an selon la chronicité de l'infection en cause ^[4].

2. Taux sériques :

La pharmacocinétique du kétoconazole est dose dépendante. Les taux plasmatiques maxima sont atteints en 1 à 2 heures, selon la dose ingérée. Les valeurs de cette concentration maximale montrent une grande variabilité intra et interindividuelle pour une même forme pharmaceutique : elles sont comprises entre 0,3 et 10 µg/ml pour la suspension et entre 0,9 et 10 µg/ml pour les comprimés après administration unique de 200 mg. La demi-vie d'élimination est de 8,1 et 9,6 heures pour des doses respectives de 200 et 400 mg. La courbe d'élimination est biphasique avec une première phase rapide ($T_{1/2\alpha}$) puis une phase plus lente ($T_{1/2\beta}$). La première phase correspond à un phénomène de saturation au premier passage hépatique. Cet effet se traduit par un accroissement de biodisponibilité en fonction de la dose, c'est à dire une progression géométrique et non arithmétique des taux plasmatiques lorsqu'on augmente la posologie. Il n'y a pas de diminution des taux au cours des traitements ultérieurs même s'ils sont prolongés durant des mois et, dans de nombreux cas, on a été obligé d'augmenter la posologie pour avoir des taux qui dépassent 1µg (ceci est une concentration qui a été arbitrairement choisie) lorsque la dose de 1µg n'est pas atteinte. Avec une posologie à la carte on a pu obtenir (Tableau I) des concentrations décelables dans des liquides où le Kétoconazole passe assez mal, comme les urines (0,03 à 0,80 µg/ml en 6 h) le liquide

articulaire (0,20 à 0,30 µg/ml), le liquide pleural, le liquide péritonéal ; avec une posologie efficace, on peut avoir du Kcz qui traverse surtout le péritoine inflammatoire et qui peut pénétrer aussi dans l'humeur vitrée (0,04 µg/ml) ou dans la chambre antérieure comme dans des cas de candidoses oculaires chez les héroïnomanes ; les concentrations dans le liquide céphalorachidien sont de l'ordre de 1 à 2% des concentrations sériques et témoignent de la faible pénétration dans ce milieu, ce qui nous amène à ne pas utiliser le Kcz dans les méningites à *C. neoformans* surtout que plusieurs échecs ayant été signalés. Les recherches effectuées avec un Kcz marqué montrent que chez l'animal la distribution du cet antifongique se fait non seulement dans les organes profonds mais aussi dans les organes superficiels comme la peau, les poils et les glandes sébacées. Chez l'homme des travaux récents de Artis et Coll. montrent que le Kcz passe dans la sueur et de la sueur il peut y avoir une absorption cutanée. La liaison aux protéines plasmatiques est de 84% du Kcz circulant (la liaison est largement préférentielle pour l'albumine à 99%); 15% est lié aux cellules sanguines et 1% est sous forme libre. Le Kcz est métabolisé par le foie. Il existe un phénomène de premier passage hépatique saturable après absorption. [4].

TABLEAU I
Taux de kétoconazole dans les liquides biologiques chez l'adulte. 45 cas : moyenne d'âge 36 ans ± 16 ans

Doses	Nombre de cas	1er JOUR					5 - 7ème JOUR					1 MOIS		2 - 5 MOIS		
		0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	0 h	2 h	0 h	2 h	
200 mg A.M.	Horaire															
200 mg P.M. par jour	Taux limite	0	1.72 (0.03 - 7.1)	1.86 (0.03 - 10)	1.22 (0.03 - 3)	0.6 (0.03 - 3)	0.49 (0.05 - 2.6)	1.27 (0.1 - 3.8)	1.14 (0.10 - 10)	1.07 (0.20 - 6)	1.19 (0.10 - 6)	0.33 (0.03 - 1.28)	1.95 (0.5 - 5)	0.60 (0.03 - 1.26)	2.3 (0.6 - 6)	
	Augmentation des doses 7 cas		2 x 200 mg A.M. 200 mg P.M.			1.84 (0.31 - 2.5)	4.0 (0.6 - 10)	7.65 (0.6 - 10)	3.78 (0.6 - 20)	3.68 (0.6 - 10)	1.8 (0.31 - 2.5)	7.7 (0.6 - 10)	1.8 (0.31 - 2.5)	7.8 (0.6 - 10)		
AUTRES LIQUIDES BIOLOGIQUES : URINES : 0 - 6 h ; 0.03 - 0.80 µg/ml 6 - 24 h ; 0.03 - 0.30 µg/ml																
LIQUIDE ARTICULAIRE : 0.20 - 0.30 µg/ml ; LCR : 0.07 µg/ml ; OS : 2.5 µg/ml																
LIQUIDE PLEURAL : 0.04 µg/ml ; CHAMBRE ANTERIEURE DE L'OEIL : 0.04 µg/ml																
LIQUIDE PERITONEAL : 0.04 µg/ml ; HUMEUR VITREE : 0.04 µg/ml																

3. Taux sériques chez les immunodéprimés :

Au cours d'une étude en collaboration avec l'équipe de E.Gluckman sur la prophylaxie des mycoses par le Kétoconazole (Kcz) chez les transplantés de moelle osseuse, on a vu dès 1981 qu'environ 30% des malades soumis à ce traitement avaient un taux nul ou inférieur à 1 µg/ml, raison pour laquelle depuis tous les malades traités ont été soumis à un contrôle sérique au cours de la transplantation. Les taux sériques ont tendance à diminuer après la transplantation

(Tableau II) sans toutefois que ces différences soient statistiquement significatives. Néanmoins la moyenne des pics reste faible mais dans les limites des effets théoriquement thérapeutiques à l'exception des greffes avec un degré important de rejet (degré III et IV). Les Tableaux II et III illustrent ces résultats. D'autres auteurs ont confirmé ces taux bas chez les immunodéprimés d'où l'intérêt de suivre les taux sériques chez ces malades à grand risque de mycoses à champignons opportunistes afin de corriger la posologie du Kcz. Les taux nuls ou faibles de l'antifongique en question chez les immunodéprimés peuvent s'expliquer en dehors de la prise de pansements gastriques antiacides, cimétidine, etc... par des troubles d'absorption digestive chez ces malades, ainsi que par les médications associées. On a souvent eu une interférence avec la rifampicine et dernièrement avec D-penicillamine interférence qui fera l'objet d'une étude détaillée [4].

TABLEAU II
Taux sériques de kétoconazole avant et après la transplantation rénale. A remarquer la dimension des pics sériques après la transplantation

Interval.	Nb. de mesures	Nb. de pics conc. 0-0,50 mg/l	Nb. de pics conc. 0,51-1,00 mg/l	Nb. de pics conc. > 1,00 mg/l	% des pics conc. > 1,00 mg/l	Moyenne du pic conc. (mg/l)
Avant transplantation	25	2	3	20	80	4.8
Jour 1 - jour 25	24	5	3	16	67	3.1
Jour 26 - jour 50	10	2	0	8	80	2.6
Jour 51 ou plus	15	3	2	10	67	2.8
Total	74	12	8	54	73	3.5

TABLEAU III
Concentration sérique de kétoconazole après transplantation
en fonction de différent degré de rejet de greffe

Degré de rejet de greffe	Nb. de malades	Nb. de pics conc. > 1.0 mg/l	% des concentrations > 1 mg/l	Pic moyen taux sérique (mg/l)
0	8	7	88%	3.0
1	13	10	77%	3.9
2	20	15	75%	3.0
3 - 4	8	2	25%	0.8
Total	49	34	69%	2.9

4. Pharmacocinétique :

➤ Absorption :

La biodisponibilité des azolés est élevée. Elle est majorée par la prise au cours des repas pour le kétoconazole en gélule, ainsi que par l'augmentation de la dose unitaire, en raison de la saturation de l'effet de premier passage hépatique.

Vu que le kétoconazole est plus soluble en milieu acide et riche en graisse, on voit son absorption réduite lors d'une achlorhydrie ou lorsque le pH gastrique est élevé ^[4], par exemple par la prise d'antiacides (réduction de 50%), d'antihistaminique H₂ tels que la cimétidine et la ranitidine, ce qui nécessite donc un écart d'au moins deux heures entre les prises, d'inhibiteurs de la pompe à protons, ou de didanosine dont la formulation est fortement tamponnée, ou par l'influence de certaines pathologies comme le sida. Le kétoconazole ne doit pas donc être utilisé en première intention chez le sidéen. Le kcZ voit son disponibilité réduite de 80 à 90% par certains inducteurs enzymatique, comme la rifampicine, la rifabutine, le phénobarbital et la phénytoïne ^[1].

La possibilité d'une mauvaise absorption est très importante parce que, souvent, il a été observé des concentrations nulles, en particulier, pour les malades immunodéprimés qui avaient des médications immunosuppressives ou des médications antiacides ; ainsi il a été constaté dans certaines unités traitant des malades soumis à des immunosuppresseurs un pourcentage de 20 à 30% de taux négatifs ce qui explique que dans certains cas, il n'y avait absolument aucun effet thérapeutique ; ceci peut expliquer également certains échecs qui ont été présentés au cours du récent Colloque de la Société Française de Mycologie Médicale.

Sans déterminer le taux sérique du Kétoconazole on ne peut pas parler d'échec clinique. Il faut aussi tenir compte que des cas exceptionnels rapportés comme des échecs au Kcz sont ou peuvent être également des échecs aux autres antifongiques systémiques (amphotéricineB, 5-FC) quand la défense immunologique est totalement compromise ^[4].

➤ **Concentrations plasmatiques :**

Le kétoconazole est une base faible, lipophile, peu soluble dans l'eau, fortement métabolisée selon un processus saturable qui lui confère une cinétique dose-dépendante et temps-dépendant. La liaison du kétoconazole aux protéines sériques est de plus de 90%, son métabolisme est saturable et responsable d'une augmentation supra-proportionnelle des concentrations plasmatiques par rapport aux doses administrées. La saturation du métabolisme entraîne une baisse de la clairance et donc un allongement de la demi-vie lorsque la dose augmente mais également à la répétition des administrations. Ces phénomènes de non linéarité rendent très difficile la prédiction des concentrations plasmatiques à l'équilibre, lorsque la dose ou l'intervalle posologique sont modifiés. La mesure des concentrations plasmatiques résiduelles est nécessaire en cas de changement de posologie ou en cas de modification importante de la fonction hépatique ou digestive ^[1].

➤ **Distribution tissulaire :**

Le kétoconazole est fortement lié aux protéines (albumine) et ceci est de l'ordre de 85%, mais son volume de distribution est faible, ce qui indique une liaison restrictive qui empêche partiellement la pénétration tissulaire, les concentrations tissulaires sont au mieux de l'ordre

de la moitié de celles observées dans le plasma, et elles sont très basses dans l'os, le LCR et l'œil ^[1].

➤ **Elimination :**

Le kétoconazole est métabolisé dans le foie par le cytochrome P₄₅₀ 3A4, et excrété sous forme inactive, essentiellement dans la bile ^[1], 13% du produit sont éliminés dans les urines, dont 2 à 4% du produit sous forme active, le reste dans les fèces. Sa demi-vie terminale est de 8 heures. Il n'est pas nécessaire d'adapter la posologie chez l'insuffisant rénal comme c'est le cas pour la 5-FC, du fait que cette élimination rénale est extrêmement faible. Il y a aussi un problème de l'administration de ce produit lorsqu'il y a dysfonctionnement hépatique, des rares cas d'hépatite ayant été observés. L'absence d'interférence avec l'insuffisance rénale est un grand avantage parce que les mycoses en particulier les candidoses, surviennent souvent chez les insuffisants rénaux. Il n'y a pas de modification des activités des enzymes des microsomes ce qui fait la différence avec le premier imidazolé que l'on a administré par voie orale, le clotrimazole. La seule interférence majeure nous paraît être celle avec la ciclosporine chez les immunodéprimés ; une néphrotoxicité importante de cet immunodépresseur qui s'accumule dans le sang a été observée chez les greffes de moelle osseuse par E. Gluckman et Coll. à l'Hôpital St Louis, observation confirmée par d'autres auteurs. Une réduction ou remplacement de la ciclosporine s'impose lorsque le kétoconazole doit être administré chez ces malades ^[4].

➤ **Facteurs de variations :**

En cas d'insuffisance rénale sévère, la demi-vie du kétoconazole ne change pas et donc aucune adaptation n'est nécessaire dans cette situation.

En cas de cirrhose hépatique grave, la demi-vie du kétoconazole est multipliée par deux, ce qui impose, ici encore, d'allonger l'intervalle posologique dans le même rapport. Cependant, la prédiction des concentrations étant très aléatoire dans cette pathologie, il est recommandé de mesurer les concentrations plasmatiques résiduelles.

Chez les patients cancéreux neutropéniques, et notamment en cas d'allogreffe de moelle, la biodisponibilité du kétoconazole est réduite, et sa demi-vie est diminuée d'un facteur 3. Ces

modifications amènent à administrer des doses deux à trois fois plus élevées pour conserver les concentrations plasmatiques usuelles, mais ici encore la mesure de ces concentrations semble indispensable pour ajuster la posologie ^[1].

5. Interactions médicamenteuses ^[76] :

Depuis l'apparition des dérivés azolés utilisés pour leurs propriétés antifongiques, de nombreux effets indésirables sont survenus lors d'associations médicamenteuses. La plupart des azolés sont de puissants inhibiteurs des cytochromes P₄₅₀ 3A4, et cette propriété est la cause majeure des interactions d'ordre pharmacocinétique rencontrées avec cette classe thérapeutique. Trois approches de ces interactions sont possibles : les études in vitro sur microsomes hépatiques humains, les études cliniques contrôlées et les cas rapportés. Nous nous limiterons aux deux dernières approches, les plus significatives à prendre en compte pour la prescription d'antifongiques de cette famille.

Les enzymes mises en jeu causant ces interactions sont les cytochromes P450 et la P-glycoprotéine (PGP) :

Les cytochromes P450 (Cyt) constituent une superfamille d'hémoprotéines catalysant les biotransformations de nombreuses substances endogènes et exogènes. Les cytochromes humains sont concentrés dans le réticulum endoplasmique lisse au niveau du foie, mais aussi à un moindre degré au niveau des poumons, des reins, de l'intestin et du cerveau. Trois familles principales sont décrites : cytochromes 1, 2 et 3. Les antifongiques azolés sont des inhibiteurs de ces cytochromes avec des potentiels différents selon les isoformes concernés.

La P-glycoprotéine (PGP) est une protéine d'efflux ATP-dépendante. Elle présente des similitudes avec le Cytochrome 3A et joue un rôle parfois majeur dans la biodisponibilité des médicaments. Elle est localisée au niveau de l'intestin (surface apicale des cellules), de la barrière hémato-méningée et dans de nombreux tissus. L'expression de cette molécule a pour conséquence une diminution de pénétration due à l'efflux généré, ce qui entraîne notamment une diminution des quantités absorbées.

De très nombreuses interactions d'ordre pharmacocinétique ont été décrites dans la littérature et certaines impliquent des précautions d'utilisation, des associations déconseillées ou des contre-indications formelles.

Effets du kétoconazole sur la cinétique de certains médicaments

Médicament	Effets de l'interaction	Recommandation
immunosuppresseurs : Tacrolimus, Sirolimus	Augmentation de la biodisponibilité orale en inhibant les mécanismes de premier passage hépatique, et prolongation de l'intervalle QT.	Utilisation concomitante contre-indiquée.
Antihistaminique H1 : Astémisole	Anomalies de la repolarisation à l'électrocardiogramme se traduisant par la survenue de torsades de pointes.	Utilisation concomitante contre-indiquée.
Autre antihistaminique H1 : Loratadine	augmentation de sa concentration et réduction de sa clairance de 75%.	Association déconseillée.
Benzodiazépines et substances apparentées : triazolam, diazépam, midazolam, alprazolam	Augmentation de façon majeure de leur demi-vie pouvant conduire à un effet amnésique augmenté.	Association déconseillée sauf contre-indication pour le triazolam .
Alcool	Effet antabuse (chaleur, rougeurs, vomissements, tachycardie).	Association déconseillée
Inhibiteurs de l'HMG CoA réductase : Atrovastatine, Simvastatine, Cérivastatine	Risque majoré de rhabdomyolyse par diminution du métabolisme de l'hypocholestérolémiant.	Contre-indication
Anti-arythmiques : Amiodarone, Quinidine, Lidocaine	Augmentation de leur concentration de 3,4 fois avec élargissement de l'espace QT.	Association déconseillée.
Antagonistes calciques : Nisoldipine (non commercialisée en France)	Augmentation de la surface sous la courbe et du Cmax pouvant donner une hypotension systolique et diastolique.	Précaution d'emploi

Antipsychotique : l'Halopéridol, Clozapine, Pimozide	Interaction faible possible avec l'Halopéridol et le Clozapine , tandis qu'avec le Pimozide , on remarque un allongement de l'espace QT pouvant générer de graves torsades de pointes.	Précaution d'emploi sauf contre-indication pour le Pimozide .
Anticancéreux (agent alkylant) : Cisapride	Risque majoré de troubles de rythme notamment une arythmie ventriculaire fatale avec torsades de pointes.	Contre-indication
Antivitamine K (AVK)	Risque de surdosage de l'AVK pouvant générer une hémorragie.	Précaution d'emploi avec surveillance de l'efficacité et de l'absence de surdosage de l'AVK .

La majorité de ces interactions pharmacocinétiques des dérivés azolés sont d'origine métabolique et résultent de l'inhibition des cytochromes P450 3A. Le kétoconazole est l'inhibiteur le plus puissant de la famille des azolés vis-à-vis des Cytochrome 3A4, suivi par l'itraconazole. Ils sont sans action sur les Cytochrome 1A2, 2D6 et 2C9. Le rôle plus récemment découvert de l'inhibition de la PGP n'est pas à négliger.

Quels que soient les mécanismes de l'interaction : inhibition des cytochromes hépatiques ou intestinaux réduisant le métabolisme, ou inhibition de la PGP facilitant ainsi l'absorption, les conséquences de l'interaction sont toujours celles d'un surdosage de la molécule cible.

Quelques interactions inverses, aboutissant à l'inefficacité des dérivés azolés, ont également été décrites ^[76]. Le tableau I résume les observations rapportées en fonction de l'attitude à adopter en termes de prescription.

Tableau I / Principales interactions pharmacocinétiques décrites et conséquences sur la prescription.

Absence d'interaction	Interactions non cliniquement significatives		Précautions d'utilisation		Associations déconseillées		Associations contre-indiquées				
	K	I	K	I	K	I	K	I			
Antipyrine	X	X	Clozapine	X	Anti-vitamines K	V	Alcool éthylique	V	Atorvastatine	V	V
Azelastine	X		Désipramine	X	Carbamazépine	V	Alfentanyl	X	Cérvastatine	V	V
Caféine	X	X	Diazépam		Ciclosporine	V	Alprazolam	X	Cisapride	V	V
Clomipramine	X	X	Fentanyl	X	Didanosine	V	Amiodarone	X	Efavirenz	V	
Clozapine		X	Imipramine	X	Digoxine	V	Buspirone		Névirapine	V	
Fluvastatine		X	Indinavir	?	Dihydropyridines	V	Chlordiazépoxyde	X	Pimozide	V	V
Levocabastine	X		Nelfinavir	?	Hydroquinidine	V	Lidocaïne	X	Simvastatine	V	
Losartan	X	X	Prednisolone	X	Isoniazide	V	Loratidine	X	Tacrolimus	V	V
Nortriptyline	X	X	Prednisone	X	Phénobarbital	V	Méthylprednisolone	X	Triazolam	V	V
Pravastatine		X	Ritonavir	?	Primidone	V	Midazolam	V			
Sulfaméthoxazole	X		Saquinavir	?	Rifampicine	V	Quinine	X			
Témazépam		X	Sulfentaniil		Sildenafil	V	Rifabutine	X			
Théophylline	X	X	Taxol	X	Topiques gastriques	V	Tacrolimus				
Zolpidem		X			Zolpidem	V	Tolbutamide	X			
							Tolterodine	V			
							Vinca-alcaloïdes	V			

K : ketoconazole, I : itraconazole, X : d'après les données de la littérature, V : d'après le dictionnaire Vidal[®] ; ? : insuffisamment documenté.

➤ Azolés en tant que cibles:

Les azolés sont évidemment eux-mêmes la cible potentielle de ces interactions. Ils sont par exemple très sensibles aux inducteurs ou inhibiteurs très puissants comme sont respectivement la rifampicine et le ritonavir, même à dose infrathérapeutique dans l'utilisation intentionnelle de ce dernier comme booster du métabolisme d'autres antiprotéases associées.

Il s'agit dans ce cas d'interactions médicamenteuses réciproques opposées entre kétoconazole et rifampicine par exemple ou entre phénytoïne et kétoconazole au niveau du CYP 3A4.

Il est également envisageable que les azolés puissent développer une inhibition croisée réciproque, devant faire s'interroger sur la pertinence du maintien de la dose de charge lors du relais entre azolés.

Le pH gastro-intestinal affecte l'absorption du kétoconazole et de l'itraconazole, sensibles aux antiacides qui diminuent leur absorption. Il est recommandé de préférer dans le cas d'une augmentation du pH gastrique la forme suspension pour itraconazole. Au contraire, voriconazole et fluconazole ne sont sensibles ni aux antiacides ni aux pansements minéraux (Mg et Al).

La situation des azolés vis-à-vis de la nourriture est dominée par la possibilité de modifier l'absorption des plus lipophiles. Quelle que soit la recommandation qui en découle (kétoconazole, itraconazole forme orale solide et posaconazole pendant le repas et/ou en augmentant le fractionnement des prises pour ce dernier ; voriconazole en-dehors), il est important de maintenir les modalités d'administrations les plus constantes possibles dans le temps. Enfin, pour mémoire, les formulations intraveineuses de voriconazole et kétoconazole peuvent faire l'objet d'incompatibilités physicochimiques et doivent être administrées séparément en perfusion lente.

Effets d'autres médicaments sur le kétoconazole		
Médicament	Effet de l'interaction	Recommandation
Antihistaminiques H2 : Cimétidine, Ranitidine	Diminution de l'absorption digestive du kétoconazole par augmentation du pH intra-gastrique par l'antisécrétoire.	Précaution d'emploi
Topiques gastro-intestinaux : sels, oxydes et hydroxydes de Mg, d'Al, de Ca	Diminution de l'absorption digestive du kétoconazole par élévation du pH gastrique.	Précaution d'emploi : prendre ces topiques à distance du kétoconazole (plus de 2 heures).
Puissants inducteurs du CYP450 : Carbamazépine, Phénobarbital, Rifampicine et phénytoïne	Accélération du catabolisme et réduction significative des concentrations plasmatiques du kétoconazole.	Précaution d'emploi.

Antirétroviraux : Névirapine , l’Efavirenz	Interactions réciproques entre le kétoconazole et ces antirétroviraux : pour le névirapine , on remarque une augmentation de la concentration de celui-ci et du kcz tandis que pour l’Efavirenz , il y’a une augmentation de ce dernier et une baisse du Kcz.	Contre-indication pour les deux antirétroviraux.
Antituberculeux et puissant inhibiteur du CYP450 : Isoniazide	Inhibition du catabolisme avec augmentation significative des concentrations plasmatiques du kétoconazole.	Précaution d’emploi

➤ **Conduite à tenir devant ces interactions :**

La stratégie de la conduite à tenir devant une interaction médicamenteuse repose sur sa classification. Le raisonnement porte sur le niveau de documentation scientifique permettant de distinguer les interactions établies donc connues et prévisibles de celles simplement suspectées par extrapolation ou reposant sur un nombre limité d’informations ; sur son mécanisme d’action pharmacodynamique mettant en jeu des cibles d’effet communes, ou pharmacocinétique médié par une variation des concentrations et donc directement accessible à une adaptation de la posologie ; et bien entendu sur le caractère de gravité et donc la pertinence clinique.

La conduite à tenir est d’exercer une action corrective, voire préventive lors de la prescription d’une interaction médicamenteuse connue de risque sévère conduisant à l’aggravation de l’état du patient : s’il s’agit d’une interaction médicamenteuse pharmacocinétique en modifiant la dose, idéalement en s’appuyant sur un suivi pharmacologique thérapeutique (STP) par mesure des concentrations circulantes des médicaments impliqués, tandis qu’en présence d’une interaction pharmacodynamique, le choix de la nature de la co-prescription ne doit être maintenu qu’après évaluation individualisée de son rapport bénéfice/risque. Dans le

cas d'interaction médicamenteuse à risque modéré ou simplement suspecté, un renforcement de la surveillance est suffisant. Cependant deux interactions médicamenteuses d'intensité modérée mais de même mécanisme peuvent résulter en un effet majeur en cas de prescription simultanée. Toute substance exerçant une modification du transit gastro-intestinal est susceptible de retentir sur l'absorption orale des autres principes actifs administrés en même temps. Enfin, la prudence doit être de règle pour la co-prescription d'un médicament nouveau, surtout s'il présente un fort métabolisme oxydatif.

L'appréciation de ces trois critères (imputabilité, mécanisme et sévérité) conduit à l'attribution de niveaux de contrainte réglementaires associés aux co-prescriptions médicamenteuses. La contre-indication et l'association déconseillée relèvent de l'interdiction prenant en compte le risque clinique et la difficulté d'adaptation, tandis que la précaution d'emploi et la mention « à prendre en compte » sont des niveaux plus permissifs d'information.

6. Indications thérapeutiques :

Les infections fongiques humaines se répartissent schématiquement en deux catégories : les mycoses viscérales profondes qui peuvent menacer le pronostic vital, et les mycoses superficielles qui sont beaucoup plus fréquentes mais en règle bénignes. Certaines mycoses viscérales ont une répartition géographique particulière telle les histoplasmoses, la blastomycose ou la coccidioïdomycose. Elles représentent un problème de santé publique dans leur zone d'endémie lorsque leur incidence est élevée. D'autres mycoses viscérales posent un problème d'importance grandissante, il s'agit des infections opportunistes en particulier à *Candida* ou à *Aspergillus*. Elles surviennent en général en milieu hospitalier, au plus fort d'une immunodépression d'origine thérapeutique. Les malades cancéreux et leucémiques paient le plus lourd tribut à ces infections souvent iatrogènes, et que l'on peut qualifier de pathologie des protocoles. Le traitement de ces mycoses doit faire appel à des antifongiques dits systémiques, c'est-à-dire des médicaments qui, administrés par voie orale ou parentérale diffusent dans l'organisme et sont capables de guérir des mycoses viscérales. Les antifongiques systémiques sont en nombre restreint. Ce groupe comprend essentiellement l'amphotéricine B administrée par voie I.V, la flucytosine administrée par voie orale ou I.V,

les imidazolés dont le kétoconazole administré par voie orale et le miconazole nous paraît d'intérêt limité par voie orale ; il existe une forme galénique utilisable par voie intraveineuse ou locale intrathécale en particulier, et plus récemment les triazolés puis les candines. Les principaux paramètres qui guident le choix entre les trois premiers antifongiques sont exposés dans le tableau I.

TABLEAU I
Principales caractéristiques des trois antifongiques systémiques

	AMPHO	5-FC	KÉTO
Fongicide in vivo	—	—	—
Bonne diffusion viscérale. .	++	+++	++
Diffusion L.C.R.	+	+++	±
Diffusion urinaire	±	+++	±
Toxicité	+++	+	+
Absence de mutants résistants	+++	—	+++
Prix faible	+++*	—	+ à ++
Disponible per os et I.V. . .	non ^{xx}	oui	non

— : non.

+ : quantifie une réponse affirmative.

* : mais hospitalisation nécessaire.

xx : forme orale inadéquate pour traiter les mycoses viscérales.

On voit que l'antifongique idéal reste à découvrir mais que chaque molécule apporte des propriétés originales. Les indications, la posologie, la durée des traitements par le kétoconazole commencent à mieux se définir, certaines indications sont encore incertaines ou discutables. Dans l'évaluation de l'effet curatif du kétoconazole, il nous paraît important de ne

retenir que les observations où le diagnostic d'infections fongiques est formel, où le kétoconazole est utilisé seul et où les taux sériques de l'antifongique ont été mesurés. En effet certains sujets ont des taux sériques nuls : cette situation et ses causes connues ont été envisagées dans une précédente communication [77].

L'expérience clinique nous conduit à estimer qu'un pic sérique d'au moins 1 mcg/ml doit être obtenu.

- Traitement des Candidoses :

Les cas rapportés de septicémies ou de localisations viscérales profondes candidosiques avec diagnostic prouvé, et traités uniquement par kétoconazole sont peu nombreux (tableau II).

TABLEAU II
Candidoses et aspergilloses viscérales ou septicémiques traitées en monothérapie par le kétoconazole

Réf.	Champignon	Localisation	Posologie mg/24 h.	Durée	Age	Terrain	Evolution
5	<i>C. albicans</i>	Sept.+ poumon	N.P.	3 mois	adulte	héroïnomane	guérison
6	<i>C. albicans</i>	Poumon	200 – 400	5 mois	10 ans	G.S.F.	échec
7	<i>Candida</i>	Vertèbre	1600	7 mois	adulte	héroïnomane	guérison
10	<i>C. albicans</i>	Hanche	200	12 mois	adulte	héroïnomane	guérison
12	<i>C. tropicalis</i>	Genou	800	28 jours	adulte	cancer	guérison
12	<i>C. albicans</i>	Genou	400	13 jours	adulte	cancer	échec
14	<i>C. albicans</i>	Péritonite	3,5	70 jours	prématuré	post. opér.	guérison
20	<i>C. albicans</i>	Disséminées	400	15 jours	adulte	alimentation parentérale	décès
11	<i>A. fumigatus</i>	Prothèses vasc.	200	4 mois	15 ans	post. opér.	guérison
15	<i>Aspergillus</i>	Cote	100	à vie	10 ans	G.S.F.	favorable
18	<i>A. fumigatus</i>	Poumon	400	5 mois	adulte	pneumopathie bactérienne*	guérison

NP : non précisé.

G.S.F. : granulomatosse septique familiale.

* : surinfection aspergillaire.

L'expérience dans ce domaine concerne les infections candidosiques de l'héroïnomane. Parmi 38 malades présentant de telles localisations viscérales métastatiques, 23 ont été traités par le kétoconazole seul pour 31 localisations dont 18 étaient cutanées, 6 oculaires et 7 ostéo-articulaires, La posologie adaptée en fonction des taux sériques et de la gravité initiale a été de 200 mg matin et soir pendant 15 à 30 jours pour les atteintes cutanées, et de 600 à 800 mg par

jour pendant 0,5 à 4 mois pour autres localisations. Les taux de guérison ont été de 15/18 pour les localisations cutanées, 6/6 pour les ophtalmies et de 4/7 pour les ostéo-arthrites (tableau III). Le kétoconazole associé à la flucytosine a été utilisé d'emblée avec succès chez 3 malades. Chez 3 ostéo-arthrites ne répondant pas au kétoconazole l'adjonction de flucytosine a apporté la guérison pour un seul d'entre-eux.

TABLEAU III
Evolution de 31 localisations candidosiques métastatiques
chez 23 héroïnomanes traités par le seul kétoconazole.

Localisations	Nombre	Résultat	
		Guérison	Insuffisant ou échec
Cutanée			
- cut. isolée.	11	9	2
- cut. + oculaire.	6	5	1
- cut. + ostéo-art.	1	1	0
Oculaire	6	6	0
Ostéo-articulaire.	7	4	3
TOTAL	31	25	6
		(80,6 %)	(19,3 %)

Ces résultats montrent que le kétoconazole voire l'association kétoconazole + flucytosine est une alternative possible à l'association classique et sans doute la meilleure : amphotéricine B + flucytosine. Toutefois, on ne peut pas extrapoler une situation de ce type dans laquelle l'infection candidosique ne menace pas le pronostic vital à court terme et où les moyens de défense sont grossièrement conservés, à la situation de l'immunodéprimé, et particulièrement de l'agranulocytaire, où les conditions sont inverses. Quand on sait que le kétoconazole ne

stérilise pas les organes dans l'infection animale expérimentale et que les polynucléaires jouent un rôle fondamental dans la défense, on peut avoir des doutes sur l'efficacité de ce médicament dans la candidose du grand immunodéprimé. Ces réserves et leurs implications sur le plan de l'éthique expliquent probablement pourquoi il y a très peu de tels malades traités par le seul kétoconazole.

Au cours de brèves levurémies telles que celles associées à un cathéter, la plupart des auteurs conseillent, après retrait du cathéter, un traitement court par l'amphotéricine B en raison du risque d'apparition secondaire d'ophtalmie ou d'ostéoarthrite candidosique. Dans cette indication le kétoconazole nous paraît une alternative intéressante à étudier.

La prophylaxie digestive des candidoses chez l'immunodéprimé est actuellement l'objet d'études. Il n'est pas certain que la diminution du parasitisme buccal ou fécal qui est souvent le paramètre considéré, soit l'élément fondamental, il doit être couplé à l'étude anatomo-pathologique des malades décédés, afin de rechercher une candidose viscérale et d'apprécier sa responsabilité dans le décès. Il est possible par exemple que la stérilisation digestive ne soit pas obtenue, mais que l'action du kétoconazole contre la filamentation, c'est-à-dire contre la forme invasive du champignon, empêche la dissémination viscérale. De telles études comparées avec des placebos et avec des polyènes et en s'assurant que le kétoconazole est bien présent dans le sérum, donc bien absorbé, sont en cours. Les résultats déjà obtenus montrent que chez l'adulte la dose de 400 mg par jour semble plus efficace que 200 mg, l'action du kétoconazole sur la flore levurique fécale est voisine ou inférieure à celle de l'amphotéricine B per os et peut privilégier la présence de *Torulopsis* dont la moindre sensibilité au kétoconazole est connue. Pour l'effet préventif sur l'infection, le kétoconazole semble supérieur aux polyènes - amphotéricine B ou nystatine - per os sauf chez le transplanté de moelle où il y a peu de différence entre ces produits. Toutefois sur ce terrain on sait que les taux sériques de kétoconazole peuvent être bas, voire nuls, à certaines périodes de l'immunodépression.

Certains mugets rencontrés chez les nouveau nés traités par des antibiotiques et qui persistent curieusement malgré l'application locale de polyènes peuvent disparaître sous kétoconazole de façon spectaculaire ; c'est donc une possibilité qu'il faut garder en réserve.

Les vaginites rebelles récidivantes sont une indication que nous pensons bonne. Certaines jeunes femmes, malgré des traitements locaux à base de polyène ou d'imidazolé et malgré la suppression des classiques facteurs favorisant cette pathologie, se plaignent de récurrence de vaginite pratiquement chaque mois ou, pire encore, de vaginite permanente. Dans ces cas le kétoconazole peut apporter une suppression spectaculaire des symptômes et espacer considérablement ou supprimer les récurrences. Il y a actuellement une étude en cours comportant 3 cures successives de 7 à 10 jours de kétoconazole espacées d'un mois avec une franche efficacité pour 14 (70 %) des 20 femmes traitées. En raison du risque tératogène tout risque de grossesse doit être exclu pendant ce traitement. On pense que l'efficacité très supérieure d'un traitement systémique par rapport aux antifongiques topiques pourrait être due à deux facteurs : la suppression de formes fongiques intra-muqueuses et l'inhibition de la filamentation, forme invasive des levures.

Le traitement des onyxis candidosiques est une indication discutable. Toutefois il est assez difficile de guérir cette affection avec les moyens classiques. Malgré la suppression des facteurs favorisants et l'application prolongée de polyènes locaux, l'onyxis peut persister, d'autant plus gênant sur le plan esthétique qu'il siège en règle aux mains, et sur le plan fonctionnel qu'il est volontiers douloureux. On pense qu'il s'agit alors d'une excellente indication du kétoconazole avec une surveillance hépatique régulière. C'est un traitement de plusieurs mois, qui malheureusement est onéreux.

Les candidoses muco-cutanées chroniques (C.M.C.C.) sont certes rares mais elles représentent un classique modèle pour tester les antifongiques systémiques, les produits topiques étant inefficaces. Autrefois seule l'amphotéricine B I.V. apportait le blanchiment des lésions et la rémission clinique. La maladie est certes rare mais c'est un des exemples les plus démonstratifs de l'efficacité du kétoconazole. Il semble que dans cette indication une posologie faible telle que 3 mg/kg en une prise quotidienne soit suffisante. Il s'agit d'un progrès considérable, un traitement oral et ambulatoire remplace une longue hospitalisation avec des perfusions d'amphotéricine B. Un des problèmes importants est celui de la durée du traitement : il apparaît logique de poursuivre jusqu'après guérison clinique totale. En raison de l'atteinte quasi constante des ongles le traitement doit être prolongé jusqu'à leur repousse

saine complète soit au minimum 4 à 6 mois. Ensuite, se pose le problème d'un traitement d'entretien. Certains donnent un traitement discontinu une à deux fois par semaine. On préfère surveiller cliniquement et mycologiquement ces patients et prescrire le kétoconazole, par cure de 15 jours à un mois en cas de muguet buccal qui constitue le premier signe de rechute et qui est facile à observer par le malade ou le médecin et est aisément confirmé par un prélèvement. Curieusement certains malades ne rechutent pas, c'est le cas pour 4 parmi les 8 malades traités avec un recul de 2 à 3 ans après arrêt du kétoconazole. L'amphotéricine B doit être gardée en deuxième choix car bien qu'également très efficace, elle est d'un maniement plus lourd et nécessite l'hospitalisation, ce qui n'est pas le cas pour le kétoconazole. Dans ces traitements au long cours et éventuellement itératifs, un risque théorique est l'apparition d'une souche résistante. Dans la littérature concernant ce problème au cours des CMCC deux souches ont été trouvées avec une C.M.I. élevée après 17 et 23 mois de traitement à l'occasion d'une rechute ne répondant pas au kétoconazole. Cependant les premiers isolements n'ayant pas été gardés, la comparaison des C.M.I est impossible, peut-être même s'agit-il d'une réinfection avec une souche peu sensible et non d'une mutation. On n'a jamais pu obtenir au laboratoire de mutants stables résistants au kétoconazole [77].

Cette forme sévère de candidose granulomateuse connue pour sa résistance aux traitements antifongiques, véritable modèle pour l'évaluation de toute nouvelle thérapeutique antifongique s'est montrée particulièrement sensible au traitement par le kétoconazole. Aux 4 premiers cas traités avec succès par l'antifongique en question au cours des années 1978-1979, sans récurrence depuis, s'est ajouté un 5ème avec syndrome de Buckley (IgE 2000 U, éosinophilie, pyodermite à *Staphylococcus aureus*) et 3 nouveaux cas évoluant depuis de nombreuses années. Le dernier, âgé de 21 ans, avait présenté dès les premiers mois de sa naissance une candidose mucocutanée chronique qui avait été traitée avec succès par l'amphotéricine B intraveineuse, mais 3 ans après il a récidivé et évolué progressivement, aboutissant à des lésions granulomateuses monstrueuses du visage, du cuir chevelu et des mains. Les troubles immunologiques (présence d'antigène circulant inhibiteur du TTL à la candidine, l'IDR à la candidine positive à 30 mn, négative à 48 h, titre élevé de précipitines, etc...) sont disparus et les tests redevenus normaux (Tableau IV), le malade n'a pas rechuté au cours de 3 ans de

surveillance. L'importance de la suppression de l'antigène candidosique par une chimiothérapie puissante est soulignée pour les 8 cas qui ont répondu favorablement avec restauration de l'immunité après guérison par le kétoconazole. Les doses orales journalières ont varié entre 100 et 400 mg/jour en 2 prises (moyenne 8 mg/kg) pendant 3 à 12 mois (moyenne 6 mois) [4].

TABLEAU IV
Reconversion de l'immunité cellulaire défectueuse envers l'antigène de *C. albicans* chez des malades atteints de CMCC après traitement par le kétoconazole

Patient	Circulant inhibiteur (mannane)		Avant Ktz IDR candidine		Après Ktz IDR candidine		Test de transformation lymphocytaire			
	avant Ktz	après Ktz	30'	48 h	30'	48 h	<i>C. albicans</i>		PHA - CON A	
							avant Ktz	après Ktz	avant Ktz	après Ktz
1 G.H.	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
2 S.G.*	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
3 A.V.	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
4 B.C.	+	-	++	-	+	+	-	+	+	+
5 G.F.	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
6 L.F.	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+

* Ce malade, un enfant de 7 ans n'a pas eu de récurrence de CMCC pendant 3 ans après l'arrêt du kétoconazole, mais il a développé une anémie hémolytique auto-immune à la suite d'une infection pulmonaire traitée par Bactrim ; sous corticothérapie il a développé une aspergillose broncho-pulmonaire et des complications bactériennes entraînant sa mort. Il est le seul à ne pas avoir restauré son immunité envers *C. albicans*.

-Traitement des mycoses profondes à champignons filamenteux :

Aspergilloses

Les infections aspergillaires représentent une des difficultés majeures de la thérapeutique antifongique. Le rôle du kétoconazole paraît modeste. Dans la prévention de l'aspergillose chez l'immunodéprimé, des études sont en cours avec parfois des résultats contradictoires, mais dans l'ensemble plutôt favorables. Ces études sont longues et sont parfois biaisées par des facteurs tels que l'installation de chambres à flux laminaires qui semblent jouer un rôle décisif dans la prévention de l'infection aspergillaire. Dans l'aspergillose invasive de l'immunodéprimé, l'intérêt du kétoconazole n'est pas démontré. De telles infections peuvent même survenir chez les sujets prenant du kétoconazole à titre prophylactique. Une exception toutefois est représentée par la granulomatose septique chronique. Dans ce déficit de la

phagocytose les infections aspergillaires sont assez fréquentes et l'effet bénéfique du kétoconazole est parfois évident bien que non constant.

De rares cas de guérison par le kétoconazole d'aspergillose invasive chez le non immunodéprimé existent, mais ils ne permettent pas de généraliser, et jusqu'à preuve du contraire, l'amphotéricine B reste la molécule de référence bien que son efficacité ne soit pas constante. Pour les aspergillomes sur cavité pré-existante, pas plus le kétoconazole que les autres antifongiques, n'a fait preuve d'efficacité indiscutable, le traitement idéal reste chirurgical^[77].

D'après cette expérience, chez des malades dont les taux sériques ont été contrôlés et lorsque les souches d'*Aspergillus* ont été isolées, les CMI du kétoconazole évaluées (CMI moyenne géométrique 5.6 µg/ml avec les extrêmes de 0,8 à 25 µg/ml), les résultats thérapeutiques ont été décevants dans les formes localisées d'aspergillome, mais relativement favorables dans les formes plus ou moins diffuses. Sur 11 malades présentant un aspergillome pulmonaire, seulement 2 ont été améliorés malgré des traitements de 2 à 7 mois à une posologie de 400 mg/jour. Une sinusite maxillaire aspergillaire n'a pas répondu à un traitement de 3 mois, mais par contre, une otomycose à *A. flavus* a été guérie. Deux malades ayant une aspergillose bronchopulmonaire allergique persistante et récidivante ont répondu favorablement avec un recul de 1 an, mais pour 2 autres malades avec le même tableau clinique, on a observé des récurrences ; chez un de ces derniers malades ayant en plus une pleurésie aspergillaire, l'association de 5-FC et d'amphotéricine B a échoué également. Par contre, un épisode d'aspergillose pulmonaire diffuse chez un adolescent de 17 ans ayant une granulomatose septique familiale a bénéficié d'une guérison clinique, mycologique et sérologique après 7 mois de kétoconazole à 400 mg/kg, après un échec de la 5-FC et de l'éconazole per os. Une aspergillose aortique à *Aspergillus niger*, après une intervention chirurgicale chez un enfant de 2 ans a bénéficié du traitement par le kétoconazole (17,5 mg/kg/jour) pendant 3 mois amenant la négativation des anticorps précipitants (3 arcs en électrosynérèse), la chute de la fièvre, de l'éosinophilie, de la sédimentation et du taux des transaminases. Dans 2 observations rapportées par Koenig et al. l'association 5-FC et kétoconazole s'avère efficace,

mais des études approfondies et plus nombreuses sont nécessaires pour une évaluation exacte de l'efficacité du kétoconazole dans les aspergilloses ^[4].

Alternarioses, phéohyphomycoses et autres hyphomycoses :

Diverses infections dues à des *Alternaria* , *Wangiella dermatitidis*, *Phialophora parasitica* chez des malades immunodéprimés dont les souches étaient relativement sensibles in vitro n'ont pas pu bénéficier du traitement malgré des taux sériques de kétoconazole dépassant la dose arbitraire de 1 µg/ml ; il est à remarquer toutefois que les CMI totales de ces souches sont situées entre 1-10 µg, le taux sérique maximal étant difficilement atteint chez ces malades soumis à des traitements associés (cimétidine, immunodépresseurs) pouvant diminuer l'absorption du kétoconazole. Par contre, une arthrite *Scedosporium* (*Monosporium*) *apiospermum* chez un garçon de 9 ans a été guérie d'une façon spectaculaire par un traitement de 5 mois et ½ à 200 mg/jour et une spondylodiscite à *Drechslera longirostrata* ; dans ce dernier cas, l'atteinte très grave aboutissant à la destruction de trois vertèbres malgré des traitements uniques successifs d'amphotéricine B I.V. et de kétoconazole, n'a pu être arrêtée que par l'association de kétoconazole et d'amphotéricine B qui a permis la guérison définitive sans rechute durant 3 ans de contrôle. Malgré l'élévation marquée des transaminases au début du traitement, l'administration de l'imidazolé en question a été continuée et progressivement avec l'évolution favorable, les transaminases sont revenues à la normale. Une libération des toxines fongiques pourrait expliquer cette élévation transitoire des transaminases observée chez un certain nombre de malades (10-15%). Un cas d'une phéohyphomycose du genou due à une dématiée et acquise par un français au cours d'un traumatisme lors d'une partie de chasse en Afrique, a été guérie après 400 mg puis 600 mg/jour pendant 3 mois avec un recul de 3 ans ^[4].

Entomophthoromycoses :

Après les 3 premiers cas signalant la réussite du traitement par le kétoconazole qu'on a rapporté, deux nouveaux cas ont été signalés et tout dernièrement un autre cas a bénéficié également du traitement par le kétoconazole, ce qui ramène à un total de 6 cas ayant bénéficié d'une façon spectaculaire de ce traitement ; il s'agit de 2 cas de phycomycose sous-cutanée à

Basidiobolus haptosporus et d'un cas de rhinoentomophthoromycose à *Conidiobolus coronatus* améliorés dès les premiers jours du traitement et guéris sans rechute avec des traitements de kcZ à des doses de 200 mg (un enfant de 6 ans), 400 et 600 mg/jour pendant 2 à 4 mois avec un recul de 3 ans pour 4 cas ^[4].

-Traitement des Cryptococcoses :

La faible diffusion du kétoconazole dans le LCR aux doses usuelles doit faire exclure ce produit du traitement des méningites à *cryptocoques* ; même l'association kétoconazole-flucytosine ne semble pas recommandable. Avec de fortes posologies, c'est-à-dire 800 à 1200 mg en prise unique, des concentrations dans le LCR de 0,2 à 1,65 mcg/ml peuvent être obtenues, on peut donc imaginer des situations exceptionnelles où l'emploi du kétoconazole à très forte dose serait la dernière chance. Dans les cryptococcoses non méningées, le kétoconazole peut être une alternative thérapeutique au traitement classique : amphotéricine B + 5FC mais n'est pas un traitement de premier choix.

Il n'a pas été insisté sur des mycoses exceptionnelles, par exemple : à *Monosporium*, à *Drechslera*, à *Trichosporom*, à *Alternaria* ou à d'autres opportunistes. En cas d'échec avec l'amphotéricine B, il faut penser qu'il existe la possibilité du kétoconazole qui a ainsi à son actif quelques succès spectaculaires. Dans les mycoses dites exotiques, les indications du kétoconazole commencent à bien se préciser ^[77].

Des essais ont été effectués dans quelques cas de cryptococcoses méningées mais le traitement a été arrêté tout de suite à cause de l'absence de passage du kétoconazole dans le LCR et l'absence d'effet thérapeutique : seulement les formes extra-méningées peuvent bénéficier d'un traitement par cet antifongique ^[4].

-Traitement d'autres infections à champignons levuriformes :

***Trichosporom* :**

Des cas sévères d'infections généralisées à *Trichosporom cutaneum* (beigelii) et *Trichosporom (Geotrichum) capitatum* ont été diagnostiqués récemment, chez des immunodéprimés, mais malgré la sensibilité des souches au kétoconazole et des taux sériques

théoriquement valables à des doses de 400-800 mg/jour, les résultats ont été décevants ; l'issue a été fatale dans 3 cas, malgré l'association de l'amphotéricine B dans un de ces cas ; dans un 4ème cas d'endocardite rapporté par Mogahed et Coll. Après les résultats favorables maintenus pendant 5 mois, l'endocardite aortique sur prothèse a évolué fatalement ^[4].

-Traitement des mycoses dues aux champignons dimorphiques systémiques :

Le kétoconazole se montre particulièrement actif sur les 2 phases parasitaires et saprophytiques des agents de mycoses profondes systémiques comme l'histoplasmosse, la paracoccidioidomycose, la blastomycose à *Blastomyces dermatitidis*, la coccidioidomycose ^[4].

Histoplasmoses :

L'expérience concerne 9 cas d'histoplasmosse importés d'Afrique ou de la Guyane Française, chez des sujets non immunodéprimés. Dans 5 cas, il s'agissait d'une histoplasmosse à *Histoplasma capsulatum* et dans 4 cas, d'*H. duboisii*. La dose de kétoconazole a été de 400 mg à 800 mg/jour pendant 1 à 5 mois. Quatre patients des 5 cas d'histoplasmosse *H. capsulatum* sont guéris sans rechute (recul de 1 1/2 - 4 ans) ; un seul cas, un noir sénégalais atteint d'histoplasmosse laryngée et hépatique, après guérison apparente, revenant d'Afrique pour contrôle après 3 mois de traitement, a présenté des opacités arrondies des sommets pulmonaires (sans preuve d'histoplasmosse) qui n'ont pas disparu sous l'amphotéricine B I.V. Trois des cas d'histoplasmosse africaine à *H. duboisii* présentant des lésions cutanées (1 cas) et pulmonaires (2 cas) ont rechuté 6, 12 et 39 mois après l'arrêt du traitement. Ces rechutes ont été guéries avec la reprise du traitement mais ces données montrent la nécessité d'un traitement prolongé d'au moins 6 mois pour l'histoplasmosse africaine à *H. duboisii*. Toledo, Basset et Jelou rapportent la guérison d'une histoplasmosse cutanéomuqueuse traitée 4 mois et demi par 400 mg/jour. Par contre, lorsque la posologie est faible les résultats peuvent paraître médiocres alors que le kétoconazole administré à une posologie adéquate a une remarquable efficacité dans l'histoplasmosse ^[4].

Blastomycose et Coccidioidomycose :

L'expérience a montré qu'un cas de blastomycose à *Blastomyces dermatitidis* a bénéficié du traitement par le kétoconazole ainsi qu'un cas de coccidioidomycose inédit, ce qui concorde avec les résultats obtenus par les auteurs américains ^[4].

Pour les infections à champignons dimorphiques 3 maladies peuvent être traitées en première intention par le kétoconazole : l'histoplasmose, la blastomycose nord-américaine et la paracoccidioidomycose. Dans l'histoplasmose, on pense qu'il faut différencier les formes dues à *H. capsulatum* qui guérissent bien avec un traitement d'au moins 3 mois avec une posologie de 400 à 600 mg/24 h., des formes dues à *H. duboisii*, car ces dernières après guérison apparente, peuvent rechuter tardivement surtout s'il s'agit de formes cavitaires pulmonaires (tableau IV). Deux rechutes : cas 5 et 8 ont été traités avec 600 à 800 mg/jour pendant un an avec guérison apparente 10 et 12 mois après l'arrêt du kétoconazole. Une durée de traitement d'environ un an à forte posologie semble nécessaire pour *H. duboisii* et représente une alternative au traitement classique par l'amphotéricine B I.V apportant une dose totale d'au moins 2 g d'antifongique.

TABLEAU IV
Traitement de 4 histoplasmoses à *Histoplasma capsulatum*
et de 4 histoplasmoses à *H. duboisii*. Rechutes de
3 histoplasmoses africaines.

Champignon Localisations	Kétoconazole		Evolution	Recul* (mois)
	posologie mg/jour durée (j)	taux sériques (pic : mcg/ml)		
Cas n° 1	400	4,4	guérison	59
<i>H. capsulatum</i>	130	3,8		
Muqueuse buccale Peau		1,25		
Cas n° 2	400	0,8	guérison	50
<i>H. capsulatum</i>	30	1,8		
Muqueuse nasale Larynx				
Cas n° 3	600	2,5	guérison	47
<i>H. capsulatum</i>	105	5		
Poumons				
Cas n° 4	400	1,8	guérison	47
<i>H. capsulatum</i>	135	2,10		
Poumons		4,2		
Cas n° 5	400	1,25	rechute	37
<i>H. duboisii</i>	160	1,25		
Poumons				
Cas n° 6	400	3,5	guérison	29
<i>H. duboisii</i>	600	10		
Côtes	96	7		
Cas n° 7	400	2	rechute	11
<i>H. duboisii</i>	60			
Lèvre (cutanée) Langue				
Cas n° 8	400	3,4	rechute	12
<i>H. duboisii</i>	135	2,5		
Poumons		3,5		
Peau		2,5		

* : date de l'évaluation ou de la rechute après arrêt du traitement.

Dans les formes cutanées de blastomycose, les résultats semblent très bons mais les cas traités sont peu nombreux. De récents travaux montrent que le kétoconazole à la posologie de 400 à 800 mg/24 h pendant 6 mois est un bon traitement des formes viscérales profondes sans atteinte méningée. Dans la paracoccidioïdomycose, le kétoconazole à la dose de 200 à 400 mg par jour pendant 6 à 12 mois semble être le traitement de choix. Les rechutes tardives après arrêt du traitement sont rares. Dans la coccidioïdomycose, les résultats obtenus avec le kétoconazole sont voisins de ceux obtenus avec l'amphorécine B, c'est-à-dire moyens.

Des essais sont en cours avec de très fortes posologies, 800 à 1200 mg en prise unique, dans le but d'être plus efficaces sur les localisations neurologiques qui représentent un grand facteur de gravité dans cette maladie. Dans la sporotrichose cutanéolymphatique, le meilleur traitement reste l'iodure de potassium. Dans les chromoblastomycoses des améliorations sont obtenues sous kétoconazole mais les rechutes apparaissent après l'arrêt. Le traitement de cette maladie reste donc à découvrir. Pour terminer avec la pathologie exotique, rappelons les résultats spectaculaires obtenus dans quelques cas d'entomophthoromycoses. Ces maladies dues à *Entomophthora coronata* ou à *Basidiobolus haptosporus* semblent rares, elles réalisent des déformations monstrueuses par atteinte du tissu sous-cutané. On a obtenu une guérison inespérée pour 4 malades. D'autres auteurs ont également rapporté des succès thérapeutiques.

-Traitement des mycoses superficielles à dermatophytes :

Il reste donc à aborder le délicat problème de la prescription du kétoconazole dans les mycoses superficielles bénignes, en cas d'échec ou d'intolérance avec les traitements classiques.

Les infections à dermatophytes : dermatoses à *T. rubrum*, teignes et onyxis quel que soit l'agent relèvent de la prescription de griséofulvine orale. En cas d'inefficacité prouvée ou d'intolérance avec éruption cutanée ou céphalées insupportables, le recours au kétoconazole peut se discuter en fonction de la gêne exprimée par le patient, mais la plus grande prudence est de mise puisque les rares cas d'hépatite semblent survenir préférentiellement chez les sujets de plus de 50 ans, de sexe féminin, atteints d'onyxis et venant de prendre depuis moins d'un mois de la griséofulvine. On peut également citer à titre d'indications discutables les

grands pityriasis versicolor profus quand les patients ne veulent plus utiliser le Selsun® et certains pityriasis seborrhéiques psoriasiformes non améliorés par les traitements locaux ^[77].

IV.2.6 Efficacité clinique :

Le kétoconazole , dernier né des dérivés d'imidazolés, présente un grand intérêt dans la thérapeutique des mycoses superficielles et profondes non seulement grâce à une activité antifongique plusieurs fois supérieure à l'activité des autres dérivés imidazolés lorsqu'elle est évaluée dans certaines conditions in vitro et in vivo sur certains modèles expérimentaux , mais surtout grâce aux propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques de sa molécule, permettant une pénétration dans les tissus profonds et superficiels de l'organisme hôte sans grande toxicité pour celle-ci et agissant aux concentrations fongistatiques sur les champignons pathogènes conjointement au système immunitaire de défense ; ceci aboutit à la disparition des antigènes fongiques qui dans de nombreuses mycoses profondes ou chroniques bloquent l'immunité cellulaire . La remarquable activité thérapeutique du Kétoconazole est due à son profil caractérisé par :

- un large spectre antifongique à activité inhibitrice pour la plupart des agents de mycoses superficielles et profondes,
- une administration facile par voie orale en 1,2 ou 3 prises quotidiennes,
- une bonne tolérance avec peu d'effets secondaires et une absence de toxicité sauf exceptionnellement sur le plan hépatique,
- une absence de résistance induite jusqu'à présent,
- une administration ambulatoire évitant parfois l'hospitalisation, élément important dans le traitement des mycoses surtout pour le traitement antifongique qui doit être prolongé pour certaines mycoses profondes ou chroniques ^[4].

IV.2.7 Tolérance du kétoconazole :

1-Effets secondaires hépatiques et endocriniens:

Pendant ces 6 dernières années depuis l'introduction du Kétoconazole 2,5 millions de malades ont été traités par voie orale. Des effets secondaires rares n'ont été observés que dernièrement lorsqu'on a traité des patients sur une plus grande échelle.

A part d'exceptionnels signes d'intolérance digestive (nausées, vomissements), cutanée (prurit, rash cutané, urticaire) ou céphalées et vertiges passagers, les effets secondaires plus importants sont d'un côté les réactions hépatiques, d'un autre côté les réactions endocriniennes; ces dernières ont abouti à des recherches particulièrement intéressantes sur le mécanisme d'action du kétoconazole sur les stéroïdes et des possibilités d'applications du Kétoconazole et prochainement de molécules analogues perfectionnées en cancérologie (adénocarcinome prostatique), endocrinologie (syndrome de Cushing) et virologie (herpes cataménial récidivant) ^[4].

Dans la catégorie des réactions hépatiques on reconnaît :

- un accroissement asymptomatique des transaminases hépatiques au début du traitement avec normalisations vers la fin du traitement au moment de la guérison ce qui laisse à penser à un éventuel effet des toxines fongiques libérées sous l'action du kétoconazole,
- un accroissement des enzymes hépatiques allant de pair avec des symptômes cliniques de nature ictérique ou non. Jusqu'à aujourd'hui 151 réactions hépatiques symptomatiques ont été rapportées sur un total approximatif de 2,5 millions de sujets traités, ce qui ramène à une incidence de 1 sur 10 000 patients ; il est à remarquer que les troubles hépatiques de 25% de ces cas n'avaient pas de rapport avec le kétoconazole. Les seules vraies hépatites jugées toxiques ont été observées chez des femmes d'environ 50 ans (ménopause ou post-ménopause) atteintes d'une onychomycose à dermatophytes traitée auparavant par la griséofulvine et ayant une allergie concomitante à d'autres médicaments.

Les réactions endocriniennes se manifestent chez des sujets traités par des doses quotidiennes fortes (800 à 2 000 mg, coccidioidomycose, histoplasmosis) et se traduisent par la diminution de la libido, oligospermie et gynécomastie, symptômes entièrement réversibles en rapport avec la diminution de la production de testostérone. En effet, De Felice et Stevens et al ont observé 4 cas de gynécomastie sans autres troubles parmi 90 hommes traités par le kétoconazole. Du fait de ces observations et des effets du kétoconazole sur la synthèse des stéroïdes aboutissant à l'inhibition de la C-14 déméthylation du lanostérol provenant la synthèse de l'ergostérol de la cellule fongique dans une très faible mesure celle du cholestérol de cellules humaines et animales. Pont et al ont étudié l'action du Kétoconazole sur les hormones stéroïdes de l'homme. Il a été démontré que cet antifongique inhibe également la synthèse du corticostérone des cellules séminales et des cellules surrénales du rat et de testostérone chez l'homme.

A la suite de ces recherches on a envisagé l'application en clinique humaine du Kcz comme inhibiteur de la stéroïdogénèse dans toute une série d'affections comme le syndrome de Cushing, l'hirsutisme, les cancers hormono-dépendants. Des travaux récents ont montré que le Kcz inhibe les enzymes mitochondriales à cytochrome P450 des surrénales. Le Kétoconazole se lie aux récepteurs glucocorticoïdes et montre une activité antagoniste glucocorticoïde avec un déplacement compétitif du (3 H) dexaméthasone dans les cultures de cellules d'hépatome. Néanmoins, on n'a jamais signalé des signes d'insuffisance surrénalienne associés à l'administration du Kcz à la posologie actuelle mais cette éventualité pourrait survenir à des doses plus élevées et plus fréquentes. Kowal a trouvé que le Kcz affecte la stéroïdogénèse des cultures de cellules tumorales de cortex surrénalien des souris ^[4].

2-Prophylaxie antifongique chez les neutropéniques (non greffés de moelle) :

Le kétoconazole prévient habituellement la survenue d'une candidose oropharyngée, mais ni le recours à l'amphotéricine B empirique, ni le risque de survenue d'une candidose systémique et la mortalité ne sont diminués. De plus, on ne note pas de supériorité nette du kétoconazole (200 ou 400 mg/j) par rapport à celle des polyènes oraux. Le kétoconazole présente par ailleurs d'autres inconvénients potentiels chez les neutropéniques : son inefficacité sur les *Aspergillus* et les mucorales, un risque de sélectionner des espèces

résistantes, une absorption réduite en cas d'achlorhydrie, et le risque de toxicité, notamment hépatique. Par contre plusieurs études multicentriques ont démontré l'efficacité du fluconazole (50 à 400 mg/j) chez l'adulte, comme prophylaxie chez ces patients ^[1].

3-Synergie avec les cellules responsables des défenses de l'organisme :

La synergie du Kétoconazole avec une culture de leucocytes et de macrophages en présence de *C. albicans* a été prouvée in vitro ; de très faibles concentrations (0,01 µg/ml) de Kétoconazole éliminent cette levure qui normalement détruit les neutrophiles et les macrophages en moins d'une heure par la formation de filaments mycéliens ^[4].

4-Résistance :

Aucune souche résistante au Kétoconazole n'a été obtenue in vitro ou chez des malades traités à l'exception de 3 souches de *C. albicans* dont 2 isolats chez des malades atteints de candidose mucocutanée chronique ; toutefois Levine infirme cette donnée, sur ces mêmes 3 souches étudiées sur le milieu casitone, on n'a observé une CMI effectivement élevée que chez une seule souche. Jusqu'à présent on ne peut pas parler d'une véritable résistance mais de variations de sensibilité en fonction surtout des conditions d'évaluation de l'action antifongique ^[4].

5-Effets indésirables :

Les effets indésirables communs aux divers antifongiques azolés sont les troubles gastro-intestinaux (nausées, douleurs abdominales, diarrhées, parfois vomissements et constipation), les réactions allergiques (prurit, rash cutané), les maux de tête et l'élévation transitoire des enzymes hépatiques.

La fréquence de ces effets indésirables dépend de la dose journalière et de la durée de traitement. Par exemple, avec le kétoconazole, les traitements d'une durée supérieure à 1 semaine génèrent l'un ou l'autre des effets indésirables chez 5 à 10% des patients aux doses usuelles, mais leur fréquence n'est que de 2% si la durée du traitement est inférieure à 5 jours. En revanche, à la dose de 1600 mg/j, plus de 50 % des patients présentent des nausées. Par

ailleurs, l'incidence des effets indésirables gastro-intestinaux du kétoconazole est moindre en cas d'absorption au cours des repas.

Les réactions d'hypersensibilité sont bénignes dans l'immense majorité des cas. Des cas d'angio-œdème ont été observés avec le kétoconazole ^[1].

L'hépatotoxicité se traduit par une élévation des enzymes hépatiques, parfois avec ictère. Elle est dose-dépendante et fonction de la durée du traitement. Une élévation modérée des transaminases survient chez 2 à 5% des patients, avec un retour spontané à la normale. Elle intervient dans un délai très variable (5 jours à 195 jours pour le kétoconazole), et elle est réversible à l'arrêt du traitement dans un délai tout aussi variable. Le traitement doit être interrompu dès que le taux de transaminases s'élève à deux ou trois fois le chiffre normal. L'incidence de l'hépatite symptomatique, pour le kétoconazole, est de l'ordre de 1/10 000, toutes indications confondues, mais elle peut varier de 1/1500 à 1/50 000 selon les indications.

Les azolés, en raison de leur mécanisme d'action, inhibent faiblement la synthèse du cortisol et de la testostérone. Cet effet est nettement plus marqué pour le kétoconazole que pour les autres azolés, mais ici encore, il dépend de la dose : l'effet est faible à 200 mg/j. Elle peut se traduire par une baisse de la libido. Une gynécomastie et une impuissance qui sont réversibles à l'arrêt du traitement.

Le kétoconazole est parfois été associé à une thrombocytopénie sévère.

Par ailleurs, le risque de toxicité pour le fœtus est considéré comme faible. Cependant, les azolés sont contre-indiqués par principe chez la femme enceinte.

Les effets secondaires des antifongiques azolés locaux sont rares, car ces formes galéniques sont très peu ou pas résorbées. On peut cependant observer des phénomènes de sensibilisation ou d'irritation dus au principe actif ou à l'excipient, en particulier au gaz propulseur des sprays ^[1].

IV.3 Résistance :

IV.3.1 Résistances aux antifongiques :

La maîtrise des mécanismes physiologiques déterminant la résistance des champignons aux antifongiques permet de mieux cerner l'épidémiologie de ces microorganismes, d'identifier des cibles pour les nouvelles molécules mais aussi d'anticiper les nouvelles résistances.

1. Définition :

La résistance antifongique peut être définie comme la diminution de la sensibilité à un antifongique, mesurée in vitro par des méthodes appropriées et standardisées. La sensibilité d'un champignon est estimée le plus souvent par la mesure de la CMI vis-à-vis d'un antifongique donné. Cette CMI correspond à une concentration d'antifongique inhibant la croissance de la grande majorité d'un groupe d'isolats de la même espèce. La CMI₅₀ et la CMI₉₀ correspondent à l'inhibition respectivement de 50% et 90% de mêmes ou différentes espèces à une concentration d'antifongique donnée. Cependant, une CMI ne peut être considérée comme une valeur absolue prédictive de succès ou d'échec thérapeutique. En effet, la mesure in vitro d'une CMI est tributaire de nombreux éléments (température, pH,). La définition des résistances par des valeurs seuils (break points) requiert un consensus et une collaboration effective pour une standardisation, ce que réalise le NCCLS ^[78].

2. Types de résistances :

-Résistance innée : La résistance à un antifongique peut être innée, c'est le cas de *C. Krusei* au fluconazole. Une résistance innée peut se manifester par une apparition des CMI bimodale. C'est le cas de la résistance à la 5fluocytosine de *C. Albicans* où sont rencontrés des isolats ayant une CMI haute et d'autres une CMI basse ^[79].

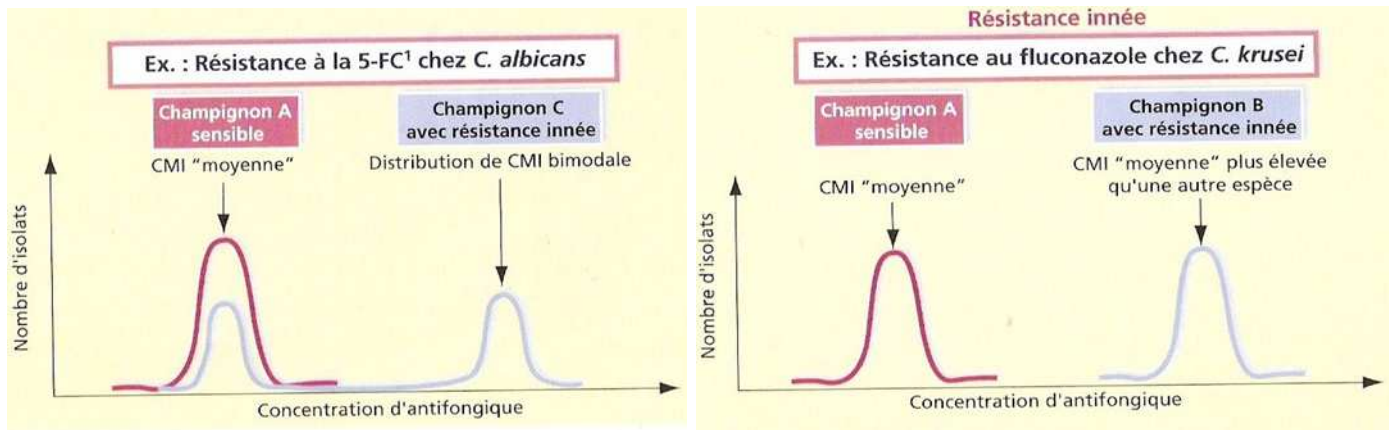


Figure 39 : résistance innée chez *C.krusei* au fluconazole et *C .albicans* à la 5 flucytosine [79].

-Résistance acquise : la résistance acquise se rencontre après exposition de certaines souches aux antifongiques. On assiste à une modification de CMI pour une même espèce ainsi qu'à une répartition des CMI dans un plus large spectre de concentration d'antifongique. C'est le cas de la résistance de *C.albicans* au fluconazole [79].

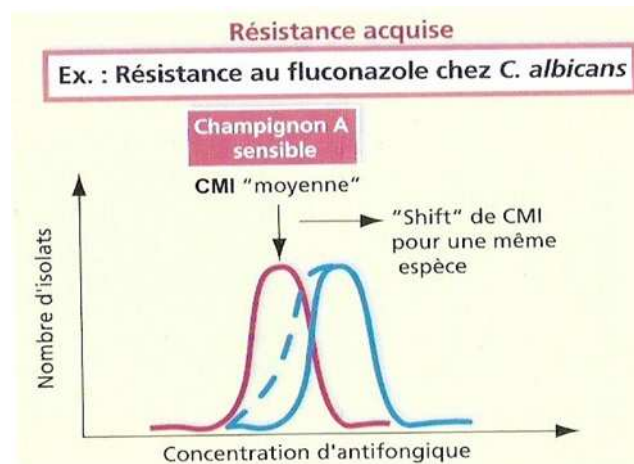


Figure 40 : résistance acquise chez *C.albicans* au fluconazole [79].

-Multirésistance médiée par les pompes à efflux : c'est une résistance acquise par efflux transmembranaires qui a été découverte auparavant [80]. 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 excréation 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 portons, proton motive force (PMF) ou d'ions Na⁺, soit par hydrolyse d'Adénosine triphosphate (ATP) ^[81].

La surexpression des protéines d'efflux est maintenant aisément caractérisée chez des isolats cliniques résistants, en particulier, aux antifongiques azolés. L'enjeu de la recherche dans ce domaine depuis le début des années 2000 permettrait de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de la dérégulation de l'expression de ces gènes.

2. Causes de résistance à l'antifongique :

Les causes d'apparition des résistances aux antifongiques sont multiples, à savoir, l'utilisation abusive des traitements antifongiques disponibles mais également l'augmentation de l'effectif des patients immunodéprimés dans différents services. Toutefois, il faut faire la distinction entre la résistance *in vitro* d'une espèce à un antifongique, et échec thérapeutique clinique d'un traitement antifongique. En effet, la résistance de l'espèce à un antifongique est un élément propre au microorganisme qui est dû aux altérations génétiques. Tandis que l'échec clinique inclut de nombreux paramètres liés :

- **Au champignon responsable** : son genre et espèce, sa virulence, son niveau de résistance intrinsèque ou acquise ;
- **A l'antifongique utilisé** : son choix, les posologies prescrites, ses propriétés pharmacocinétiques et ses interactions médicamenteuses potentielles ;
- **A l'hôte** : son statut immunitaire, le site et la sévérité de l'infection, la pathologie sous-jacente et la présence ou non d'un cathéter ^[79, 65].

IV.3.2 Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés :

Bien que depuis quelques années la fréquence de la résistance aux antifongiques azolés n'augmente plus en raison de l'amélioration des thérapies antifongiques, le début des années 1990 s'est accompagné d'une augmentation considérable du nombre d'isolats cliniques résistants. De même, si le profil des espèces rencontrées s'est modifié depuis ces vingt dernières années, c'est en partie en raison de l'utilisation croissante des antifongiques azolés et

de la sélection des espèces qui leurs sont le moins sensibles, ou ayant la plus forte propension à développer une résistance à cette classe d'antifongiques.

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux azolés ont été largement étudiés et peuvent être répartis en quatre catégories [82] :

1. Diminution de l'affinité des azolés pour la cible :

Ainsi, une mutation ponctuelle du gène ERG 11, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14 α déméthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme. De nombreuses mutations ont été identifiées, notamment chez *Cryptococcus neoformans*, *C.albicans* [83] et *C. tropicalis* [84]

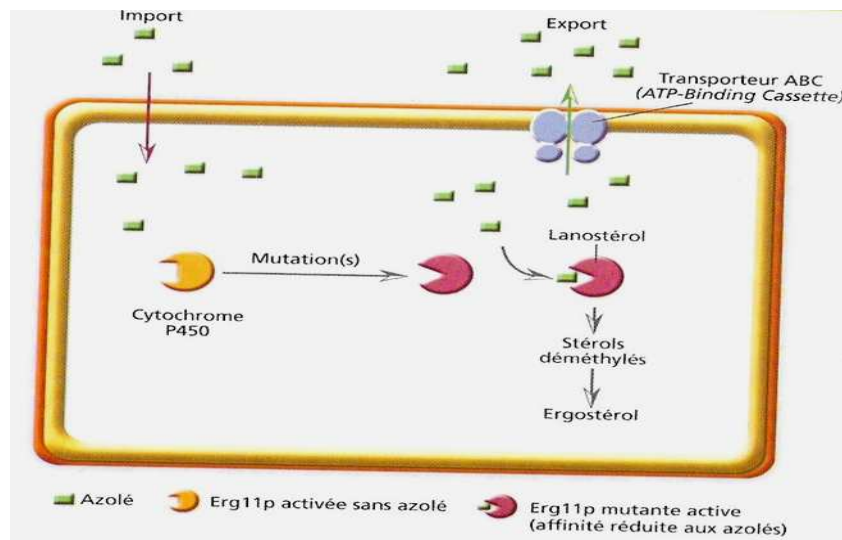


Figure 41 : Résistance aux azolés par altération de la cible [79].

2. Multiplication du nombre de copies de la 14 α déméthylase : Dans cette situation, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du Lanostérol en stérol 14 α déméthylé. Ainsi, la surexpression du gène ERG 11, par duplication chromosomique ou modification du promoteur comme l'augmentation de la demi-vie des ARN_m, peut aboutir à la résistance [85].

3. blocage de la voie de la biosynthèse de l'ergostérol : Il s'agit d'un mécanisme moins fréquemment observé chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolés. Il est

connu que l'effet fongistatique des azolés repose sur la conversion en stérols toxiques des intermédiaires 14 α méthylés synthétisés suite au blocage de la lanostérol 14 α déméthylase. Ainsi, une mutation d'un gène responsable de la synthèse de ces intermédiaires toxiques aura pour conséquence une résistance aux azolés. C'est notamment le cas pour *C.albicans*, chez qui la mutation du gène ERG 3 aboutit à une résistance aux azolés ^[86].

4. Surexpression des pompes d'efflux : La résistance aux azolés a été observée chez des souches cliniques de *C.albicans* qui est due à l'efflux du fluconazole par l'expression constitutive élevée des deux types de transporteurs d'efflux : ATP-ABC codés par les gènes *Candida* drug response (CDR) qui utilisent l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie, et les MFS à laquelle appartient multidrug résistance 1 (MDR1) qui utilise un gradient de protons à travers la membrane comme une force motrice pour le transport ^[87]. En effet, un défaut d'accumulation d'azolés à l'intérieur de la cellule fongique a été identifié comme un mécanisme d'importance des résistances aux azolés chez des patients positifs au VIH souffrant de candidoses oropharyngées. Un isolat de *Candida* peut devenir résistant aux azolés par une augmentation d'efflux liée à une surexpression de transporteurs multidrogues de deux classes : les transporteurs ATP-binding- cassette (ABC) et la famille des major facilitators (MF). La surexpression des gènes codant pour ces transporteurs est impliquée dans ce phénomène. Pour la famille MF, qui ont la capacité de transporter non seulement des azolés, c'est la protéine CaMDR1 et la surexpression du gène CaMDR1 qui confère une résistance de *Candida sp* aux azolés. Mais le rôle prédominant de la surexpression des gènes codant des transporteurs à efflux concerne les transporteurs ABC (CDR 1 et CDR 2) chez *C.albicans*. La surexpression de ces transporteurs provoque une baisse de concentration intracellulaire d'azolés, la cellule continuant de synthétiser l'ergostérol et de croître malgré une concentration élevée d'azolés ^[79].

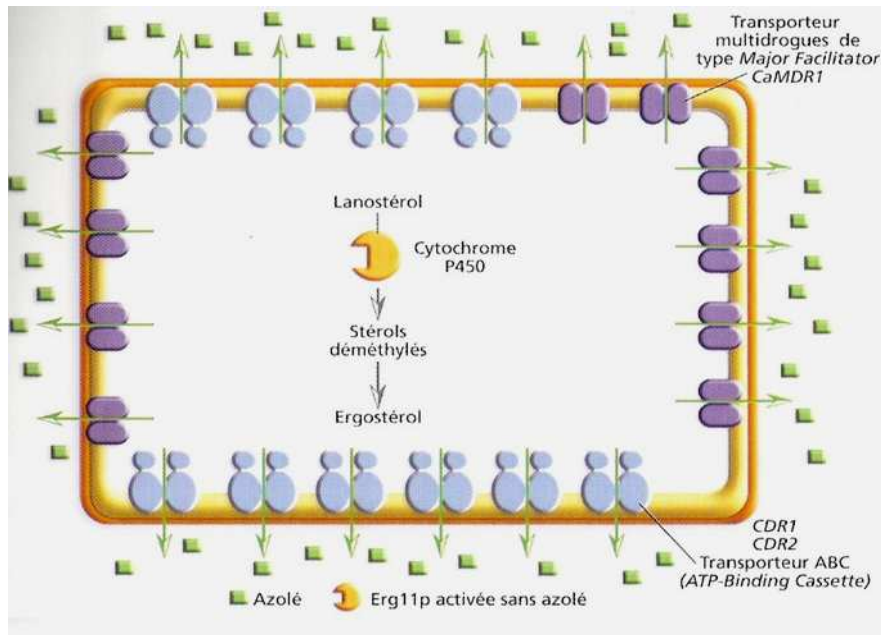


Figure 42 : Résistance aux azolés chez *C. albicans* par augmentation d'efflux [79].

IV.4 Données épidémiologiques :

1. Epidémiologie des résistances de *Candida* aux antifongiques:

L'augmentation de la fréquence des infections systémiques à *Candida sp*, la modification de la répartition des espèces sont accompagnées d'une évolution des résistances aux antifongiques. Si les levures du genre *Candida* sont quasiment uniformément sensibles à l'amphotéricine B, ce n'est pas le cas pour les dérivés azolés envers lesquels le degré de sensibilité varie d'une espèce à l'autre et parfois même entre les souches d'une même espèce. *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, et *C. lipolytica* présentent parfois une sensibilité diminuée aux azolés, *C. krusei* est généralement résistante.

Depuis quelques années, il a été rapporté que la proportion de souches de *Candida* non *albicans* intrinsèquement résistantes aux dérivés triazolés a augmenté de façon importante dans certains centres d'oncohématologie dans les services de réanimation. C'est tout particulièrement le cas pour *C. glabrata* et *C. krusei* [88].

2. Résistance aux azolés chez les patients VIH⁺ :

L'acquisition de résistance par *C.albicans* est bien décrite chez les patients victimes d'une infection à VIH, et elle survient habituellement dans des circonstances bien particulières : il s'agit des patients dont le nombre de lymphocytes CD₄ est généralement inférieur à 50 mm³ qui sont exposés à de faibles doses de fluconazole (50 à 100mg/j) pour le traitement d'une candidose oropharyngée ou œsophagienne. La résistance clinique peut parfois être vaincue par une posologie plus élevée, de 400 à 800mg /j [88]. Quoique dans 9% [89] à 13% [90] des cas, une résistance clinique apparaît.

Bien que la prophylaxie secondaire par le fluconazole a été abandonnée dans les années 90 pour éviter l'émergence d'espèces naturellement résistantes au fluconazole comme *C. glabrata* et *C.krusei* [91], ceci n'évite pas l'apparition de souches de *C.albicans* avec des CMI augmentées au fluconazole chez des sujets VIH⁺ ayant subi des traitements au coup par coup de leurs candidoses oropharyngées.

La crainte de résistances au fluconazole dues à la pression de sélection d'un traitement antérieur est cantonnée à ce type de malades, à l'exclusion des autres, notamment non neutropéniques est élevée [92]. Ces terrains présentent beaucoup de particularités favorisant l'apparition de résistance :

- L'immunodépression qui favorise l'hétérogénéité génétique des *Candida*, ce qui accélère le développement de mutants résistants ;
- L'importance de l'inoculum et la variété des espèces colonisant la bouche [89], ainsi que le traitement au long cours et à faibles doses [92, 93] augmentent le taux d'exposition des *Candida* aux antifongiques ;
- Enfin, la variété des mécanismes possibles de résistance aux azolés diminue le nombre de mutations nécessaires à l'émergence d'une résistance.

Diverses études vont dans ce sens : certains auteurs ont montré de grandes variations phénotypiques, une grande hétérogénéité génétique [94] et une activation de divers mécanismes de résistance [95,96] chez les souches isolées des malades atteints du sida, alors que ces phénomènes sont exceptionnellement retrouvés chez les *Candida* isolés de sujets sains [97].

Dans l'étude de Sobel portant sur des prélèvements oraux et vaginaux chez 1200 femmes porteuses ou à risque de sida et traitées au long cours au fluconazole ^[98], la prévalence de *C.albicans* est restée stable après deux ans, aussi bien chez les VIH⁺ (de 87 à 83%) que négatifs (82 à 87%). Cela fait douter de l'importance du rôle de l'utilisation de fluconazole dans l'émergence de *Candida* non *albicans*. Trois études prospectives de l'évolution des prélèvements vaginaux chez des femmes traitées au long cours par le fluconazole n'ont pas mis en évidence l'augmentation du taux de résistance ^[99, 65]. Enfin, aucune augmentation des CMI n'a été constatée dans une étude randomisée multicentrique comparant l'amphotéricine B au fluconazole dans les candidémies chez les malades non neutropéniques ^[100].

Sur une période s'étendant de décembre 1994 à juin 1996, l'acquisition de la résistance aux azolés de *C.albicans* au cours de candidose oropharyngée a été étudiée chez trois patients VIH⁺ au sein du centre hospitalier de Versailles ^[92]. Les objectifs étaient d'une part d'établir si lors des candidoses qui échappaient cliniquement au traitement d'abord par le fluconazole puis par l'itraconazole, les souches isolées étaient résistantes in vitro à ces azolés. Pour cela les CMI étaient mesurés par l'E-Test[®]. D'autre part de vérifier si une seule souche devenait résistante progressivement in vitro ou si la souche résistante était acquise ultérieurement. Pour cela une analyse génotypique des souches a été mise en place.

Sur les trois patients, le premier patient a présenté une vraie résistance clinique. L'échec thérapeutique ne pouvait pas être attribué à une mauvaise compliance du traitement ou à des posologies insuffisantes, comme cela a été reporté dans certains cas ^[90]. Une augmentation des CMI du fluconazole et de l'itraconazole des souches appartenant au même pulsotype est observée chez ce patient au fur et à mesure que des traitements par le fluconazole sont reçus. La même augmentation est constatée pour les souches appartenant à chacun des deux pulsotypes du deuxième patient, toxicomane, pour qui les posologies et les durées du traitement n'ont pas été toujours respectées.

A la lumière de cette étude deux importantes notions ont été dégagées, la première c'est que la présence de souches de *C.albicans* résistantes au traitement dans les candidoses oropharyngées est retrouvée chez les patients ayant subi de nombreuses cures par les azolés à petites doses, et chez lesquels le nombre de CD₄ est faible (premier patient). La seconde c'est

que les souches ayant une CMI élevée parmi la population d'origine sont celles qui développeraient une résistance aux azolés (deuxième patient) ^[101].

En conclusion, selon le modèle de la résistance bactérienne aux antibiotiques, les faibles doses d'azolés seraient responsables de l'apparition des résistances. Tandis que les fortes doses d'azolés administrées durant une période de temps suffisante pourraient éviter l'apparition des résistances. L'association de deux antifongiques ayant deux mécanismes d'action différents dans le traitement de la candidose oropharyngée chez le sujet VIH⁺ pourrait éviter l'apparition de résistances.

Dans une autre étude cas/contrôle, l'observation de patients infectés par le VIH, a permis de constater que la survenue d'une résistance au fluconazole était liée de façon significative à la durée du traitement par cet antifongique, au nombre de médicaments antirétroviraux utilisé et au statut immunitaire des patients. Globalement, la prévalence de la résistance aux azolés est de 1 à 3% chez les patients sous traitement HAART ^[102].

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

Les hypothèses évoquées pour expliquer le phénomène de résistance sont l'altération des défenses de l'hôte secondaires à l'agressivité croissante des mesures diagnostiques et thérapeutiques, et la pression de sélection exercée par l'utilisation de plus en plus large de certains antifongiques (particulièrement les azolés).

Le statut immunitaire est et le type d'immunodépression sont les deux facteurs prédominants. La persistance de neutropénie profonde ou d'une thérapie immunosuppressive joue un rôle important, l'immunodépression paraît favoriser l'hétérogénéité génétique de *Candida* qui accélère le développement de mutants résistants. La présence de matériels étrangers est un facteur aboutissant à la pérennisation de l'infection sous traitement antifongique par une mauvaise diffusion de l'antifongique, et aussi l'importance de l'inoculum fongique. Enfin, la compliance du patient vis -à- vis de son traitement reste un facteur important et difficile à contrôler ^[88].

Les progrès thérapeutiques et la mise à disposition des dérivés de l'imidazole, moins toxiques que l'amphotéricine B, ont permis le développement du concept de traitement empirique précoce ou présomptif. Les traitements empiriques, qui sont susceptibles d'améliorer le pronostic, reposent sur l'identification de l'exposition à une succession de facteurs de risque que le clinicien doit s'entraîner à reconnaître. Leur prescription incontrôlée a toutefois été incriminée dans le développement et/ou la diffusion de souches résistantes, et leur utilisation doit être restreinte à certains groupes de patients clairement identifiés ^[103].

4. 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 ^[104,92]. 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 leurs résistances aux différents antifongiques. Chose qui souligne l'importance de cette surveillance et l'intérêt majeur de la réaliser d'une manière constante.



Conclusion

V. Conclusion :

Ces deux dernières décennies ont vu une augmentation croissante des mycoses profondes chez les patients immunodéprimés, parmi ces infections, les candidoses invasives constituant 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 une 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 ou moins fongicide, ne pas présenter d'interférences négatives et être doué de propriétés pharmacocinétiques favorables et d'une faible toxicité. Ils devraient en outre être disponibles 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. Le kétoconazole est un produit ancien sur le marché qui retrouve son succès ces dernières années vue ses remarquables propriétés d'une part ; son administration orale facile, son large spectre, sa diffusion rapide dans l'organisme et sa bonne tolérance ; et d'une autre part le taux de résistance des espèces de *Candida* à son égard qui ; par comparaison avec le taux de sensibilité ; est presque nul.

La résistance confirmée de certaines souches aux antifongiques entraîne une mise en œuvre beaucoup plus méthodique 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'antifongogramme 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 ^[105].

Du fait qu'il existe plusieurs méthodes, commercialisées ou non, permettant de réaliser un antifongogramme, le choix d'une méthode de routine fiable de la part des biologistes s'est compliqué. Par conséquent, une incompetence vis-à-vis de sa pratique est ressentie, 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, plébiscitées 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'antifongogramme 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 niveaux antifongiques.

Notre étude de sensibilité au kétoconazole des souches de *Candida* isolées dans l'HMIMV, nous a permis de générer des informations sur le profil de résistance au Kétoconazole de *Candida* au sein de différents services de réanimation. Nos résultats prouvent encore une fois que le kétoconazole 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 nécessitent de connaître l'évolution épidémiologique des agents pathogènes et de la 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 de l'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)^[105].



Résumés

RESUME

Titre de la thèse : Etude de la sensibilité *in vitro* au Kétoconazole de 85 souches de levures du genre *Candida* isolées au CHU Ibn Sina de Rabat

Auteur de la thèse: Ilham MAATOUK

Directeur de thèse : Pr B.E. LMIMOUNI

Mots clés : Genre *Candida* – Epidémiologie -- Antifongogramme – Kétoconazole – Sensibilité *in vitro* -- Surveillance

Objectifs : Etablir le profil de sensibilité phénotypique des souches de *Candida* isolées au kétoconazole, avec une évaluation du taux de résistance et décrire l'épidémiologie des candidoses invasives dans les services de réanimation du CHU Ibn Sina Rabat.

Notre étude prospective de ... a inclut 85 souches de *Candida* issues de prélèvements divers (hémocultures et sites périphériques).

Résultats : Parmi les prélèvements effectués, 29,41% étaient des hémocultures et 70,59 % représentaient des sites périphériques. *Candida non albicans* représentait 68,24% alors que *C.albicans* ne représentait que 31,76%. 5 espèces différentes de *Candida* étaient identifiées. *C.glabrata* était la plus fréquente avec 38,82% suivie de *C.albicans* avec 31,76%, de *C.tropicalis* avec 15,3%, de *C.krusei* avec 12,94 % et *C.dublinsiensis* avec 1,18%. Les hémocultures à *Candida glabrata* représentaient le 1/2, alors que celles à *C.albicans* représentaient le 1/3. Le kétoconazole avait une bonne activité sur toutes les espèces de *Candida*. Plus de 50% étaient sensibles, 26% intermédiaires et 20% résistantes. Le kétoconazole était plus actif sur *C.albicans* avec une sensibilité de 55,5 % et *C.glabrata* avec 51,5%. Pour *C.krusei*, 7/10 étaient sensibles, et pour *C.dublinsiensis*, la seule souche isolée était sensible. Une sensibilité diminuée était observée pour *Candida tropicalis* avec 46%. Les taux de résistance étaient de 30% pour *C.tropicalis*, 22% pour *C.albicans* et 18% pour *C.glabrata*.

Conclusion : Nécessité d'une surveillance continue surtout des candidémies à *C.tropicalis* pour laquelle une prudence s'impose lorsqu'on envisage de traiter par le kétoconazole dans une situation susceptible de générer une résistance.

SUMMARY

Title: A prospective study of sensitivity to ketoconazole of 85 strains of *Candida* isolated at the CHU Ibn Sina Rabat over

Author: Ilham MAATOUK

Supervisor: Prof. B.E. LMIMOUNI

Keywords: *Candida* - epidemiology - ketoconazole - resistance - antifungal susceptibility testing - surveillance.

Objectives: The aims of our study were to establish the phenotypic susceptibility profile of isolated strains of *Candida* to ketoconazole with an evaluation of resistance rates and to describe the epidemiology of invasive candidiasis in CHU Ibn Sina Rabat.

Our prospective study included 85 *Candida*'s strains from various samples (blood and peripheral sites).

Results: Of the samples taken, 29,41% was represented by blood cultures and 70,59 % was represented by peripheral sites. *Candida non albicans* accounted 68,24%, while *C.albicans* accounted for only 31,76% . 5 different *Candida*'s species were identified. *C.glarata* was the most frequent with 38,82% followed by *C.albicans* with 31,76% , *C.tropicalis* with 15,3 % and *C.krusei* with 12,94% and *C.dublinsiensis* with 1,18% . Blood cultures with *C.glabrata* accounted for a half, while those with *C.albicans* accounted for only one quarter. Ketoconazole had a good activity against all species of *Candida*. Over 50% were susceptible, 26% intermediate and 20% resistant. Ketoconazole was more active on *C.albicans* with a sensitivity of 55,5% and *C.glabrata* with 51,5%. For *C.krusei*, among the ten strains isolated, seven were sensitive, and for *C.dublinsiensis*, the only strain isolated was sensitive .Decreased susceptibility was observed for *Candida tropicalis* with 46%. Resistance rates were 30% for *C.tropicalis*, 22% for *C.albicans* and 18% for *C.glabrata*..

Conclusion: The need for continuous epidemiological surveillance of candidiasis. Meanwhile, a mastery of antifungal susceptibility testing's techniques is needed. The point is to put on candidemia with *C.tropicalis* for who a caution is imposed when we consider ketoconazole therapy in a situation susceptible to generate resistance.

ملخص:

العنوان: دراسة حساسية 85 سلالة مبيضية (*Candida*) معزولة بالمراكز الإستشفائية ابن سينا بالرباط للكيتوكونازول

(Kétoconazole)

الطالبة: إلهام معتوق

المؤطر: البروفيسور بدر الدين لميموني.

الكلمات الأساسية: الحساسية, دراسة الحساسية لمضادات الفطريات, المراقبة, المبيضات, الكيتوكونازول (Kétoconazole).

الأهداف: تتجلى أهداف دراستنا في تقييم مؤهلات الحساسية لسلالة المبيضات للكيتوكونازول مع تحديد معدلات المقاومة و وصف وبائياتها في وحدات العناية المركزة بالمراكز الإستشفائية ابن سينا بالرباط. دراستنا الاستطلاعية التي استمرت لمدة ... شملت 85 سلالة مبيضية (*Candida*) استخرجت من مختلف العينات (دم و مواقع هامشية).

النتائج: من بين العينات المأخوذة, كانت 29,41% عينات دموية و 70,59% عينات من مواقع هامشية. شكلت *Candida non albicans* 68,24% في حين شكلت *C.albicans* سوى 31,76%. لقد تم تحديد 5 أنواع مختلفة من المبيضات, كانت *C.glabrata* الأكثر انتشارا ب 38,82% متبوعة ب *C.albicans* 31,76% ثم ب *C.tropicalis* 15,3% ثم ب *C.krusei* 12,94% وأخيرا *C.dubliniensis* 1,18%. في ما يخص الاستنابات الدموية, شكلت *C.glabrata* النصف بينما شكلت *C.albicans* الربع. أبرزت نتائج الحساسية للكيتوكونازول (Kétoconazole) عن نشاط جيد لهذا الدواء على كافة أنواع المبيضات (*Candida*). 50% من الأنواع كانت حساسة, 26% متوسطة و 20% مقاومة. كان الكيتوكونازول (Kétoconazole) أكثر نشاطا على *C.albicans* و *C.tropicalis* حيث بلغت نسبة الحساسية على التوالي 55,5% و 51,5%. بالنسبة ل *Candida krusei* 7/10 كانت حساسة أما *Candida dubliniensis* فتم عزل سلالة واحدة فقط و كانت حساسة. لقد لوحظ انخفاض في حساسية *Candida tropicalis* للكيتوكونازول (Kétoconazole) حيث كانت النسبة في حدود 46%. تراوحت نسبة المقاومة بين 30% ل *Candida tropicalis* و 22% ل *Candida albicans* و 18% ل *C. glabrata*

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

Références bibliographiques:

- [1]Lortholary O, Tod M. et Dupont B. Antifongiques. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses*, 8-004-M-10,1999, 21p.
- [2]Blanc V, Eloy O, Sanchez C. R, Mallié M, Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH). Pratique de l'antifongigramme dans 62 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* 2005 ; 15 : 197-210.
- [3]Eloy O, Blanc V, Mallié M, Decousser J.W, Pina P, Allouch P.Y et le collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH). Identification et sensibilité aux antifongiques de deux souches de *Candida* dans 95 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* 2005 ; 15 :117-126.
- [4]Drouhet E, Dupont B. Kétoconazole : spectre, pharmacocinétique, tolérance et activité thérapeutique dans les mycoses profondes. *Médecine et Maladies Infectieuses* 1984 ; N°11 : 518-529.
- [5]Linass Marie-Denise, Cassaing Sophie . Méthodes d'évaluation in vitro des antifongiques: étude comparative des différents tests. *Revue Française des Laboratoires* 2001 ; 2001 Issue 332 :49-56.
- [6]Chabasse D, Guigen C, Contet-Audonneau N. *Mycologie Médicale. Masson* 1999: 122-125.
- [7] 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: résistance et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF: *Optimed Ed* 2003: 47-71.
- [8] Ariane G. Comparaison de méthode de deux antifongigrammes : ATB FUNGUS3® et carte Vitek AST-YS01® .ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion. *Travail de diplôme*; 2008-2009.
- [9] Eraso E, Ruesga M, Villar- Vidal M, Javier Carrillo-Muñoz A, Espinel-Ingroff A and Quindos G. Comparative evaluation of ATB fungus 2 and Sensititre Yeast One panels for testing in vitro *Candida* antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 3-6.

- [10] Durussel C, Parreno D, Nougier L, Monnin V, Zambardi G, Bille J. Comparative study of various methods, NCCLS M27-A2, EUCAST and ATB Fungus 2 (bioMérieux) for the in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* sp. *Clin Microbiol Infect* **2004**;10 (Suppl.3):112-113.
- [11] Torres-Rodriguez JM, Alvarado-Ramirez E. In vitro susceptibilities to yeasts using the ATB Fungus 2 method, compared with Sensititre Yeast One and Standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 658-661.
- [12] National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 2nd ed. Approved standard M27-A2. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **2002**, Wayne, PA.
- [13] 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.
- [14] Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. EUCAST Discussion Document E.Dis 7.1. Munich, Germany: *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Jonec* **2002**.
- [15] Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Billet, Chryssanthou E, Denning DW et al. Multicenter evaluation of the reproductibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* **2003**; 9(6): 467-474.
- [16] Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Mendo E, Warnock DW, et al. Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**;46 (11): 3644-3647.

- [17] **Lass-Florl C, Cuenca-Estrella M, Denning DW, Rodriguez-Tudela JL.** Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus* spp. according to EUCAST methodology. *Med Mycol* **2006**; 44: S319-S325.
- [18] **Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M.** Comparaison of the EUCASTAFST broth dilution method with the CLSI reference broth dilution method (M38-A) for susceptibility testing of posaconazole and voriconazole against *Aspergillus* spp. *Clin Microbiol Infect* **2006**; 12(9): 901-904.
- [19] **Lass-Flörl C et al.** In vitro susceptibility testing in fungi: A 185 global perspective on a variety of methods. *Mycoses* **2010**; 53: 1-11.
- [20] **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.
- [21] **Johnson EM.** Méthodes d'évaluation in vitro des antifongiques *Antimicrob Chemother.* **2008**; 61: 113-118.
- [22] **Clinical Laboratory Standards Institute.** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard, M27-A2. Wayne, PA: *Clinical Laboratory Standards Institute*, **2008**.
- [23] **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.
- [24] **Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannout MA.** Comparative of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[1(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 1450-1452.
- [25] **Sevtap A, Rex J.** Fungal drug resistance essay. In Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects. Volume 2: *Clinical and epidemiological aspects*. Springer **2009**: 1171-1187.
- [26] **TREK Diagnostic Systems.** Notice du Sensititre Yeast One.

- [27] **Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, Ghannoun MA.** Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Plate with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida spp.*, and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **1999**; 37: 591-595.
- [28] **Linás MD, Cassaing S.** Méthodes d'évaluation in vitro des antifongiques: étude comparative des différents tests. *Revue Française des Laboratoires* **2001**; 2001 Issue 332 :49-56.
- [29] **Sanofi Pasteur.** Protocole de la galerie Fungitest.
- [30] **Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szeleky 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.
- [31] **Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD.** Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth micro-dilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**: 46(6): 1781-1784.
- [32] **Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D.** A global evaluation of the susceptibility of *Candida species* to fluconazole by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2000**; 36(4): 215-223.
- [33] **National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guidance M44-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **2004** Wayne, Pa.
- [34] **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, et al.** Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: An 8.5-year analysis of susceptibilities of *candida species* and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. *J Clin Microbiol* **2007**; 45: 1735-45.
- [35] **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.

- [36] **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.
- [37] **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.
- [38] **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.
- [39] **Girmenia C, Pizzarelli G, D'Antonio D, Cristini F, Martino P.** In vitro susceptibility testing: comparaisn of the E-test. Disk diffusion and Sensititre colorimetric methods in the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**: 47(12): 3985-3988.
- [40] **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.
- [41] **Arikan S, Yurdakul P, Hascelik G.** Comparaisn 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.
- [42] **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.
- [43] **Lopez-Oviedo E, Aller AI, Martin C, Castro C, Ramirez M, Peman JNI, et al.** Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparaisn with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**: 50(3): 1108-1111.
- [44] **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.

[45] **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.

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

[47] **Matar Mi, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH.** Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**;47(5):1647-1651.

[48] **Rementeria A, Sanchez-Vargas LO, Villar Nt Casals JB, CarrilloMunoz Ai, Andres CR, et al.** Comparaison of tablet and disk diffusion methods for fluconazole and voriconazole in vitro activity testing against clinical yeast isolates. *J Chemother* **2007**; 19(2):172-177.

[49] **Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A.** Correlation of Neo-sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44A results for testing susceptibilities of *Candida spp.* And *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* **2007** ;45(3):858-864.

[50] **Bourouda N.** Place de l'antifongigramme dans la prise en charge des infections fongiques. *Thèse de Doctorat de Pharmacie à la faculté de médecine et de pharmacie de Rabat* **2010**.

[51] **Rosco Diagnostica A/S.** Neo-Sensitabs Antifungal Agents: *Product List* **2009**.

[52] **Pfaller MA et al:** Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *C.glabrata* to Fluconazole and Voriconazole. *J.Clin. Microbiol* **2003**: 41, 1875-80.

[53] **Espinel-Ingroff A et al.** Correlation of Neo-sensitabs tablet diffusion assay on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44A results for testing susceptibilities of *Candida spp.* And *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole – *In Press*.

- [54] **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.
- [55] **Espinel-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.
- [56] **AB bioMérieux.** Etest: Antimicrobial susceptibility testing for in vitro diagnostic use. Copyright AB bioMérieux **2009**.
- [57] **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.
- [58] **Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A.** in vitro susceptibility testing of filamentous fungi : comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:3359-61.
- [59] **Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstrom A.** improved detection of amphotericin B resistant isolates of *Candida Lusitaniae* by Etest. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 339-42.
- [60] **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.
- [61] **Barbara D, Alexanderand Michael A, Pfaller.** Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases* **2006**; 43: S15-27.
- [62] **Zambardi G, Parreno D, Monnin V, Fothergill A, Hurt L, Bassel A, McCarthy D, Canard I, Slaughter J, ICAAC.** Poster M-1619, December **2005**.
- [63] **Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS., EspinelIngroff A., Ghannoum MA., et al.** Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the Ntionl Commiteee 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.

[64] **Darty A, Thellier M, Traoré B, Alfa Cissé O, Danis M.** Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques : antifongigramme, point sur les résistances, données pharmacologiques. *Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS* **2001** ; 20: 389-393.

[65] **Lortholary O.** Epidémiologie et émergence de souches résistantes: quel profil pour un antifongique idéal? *J Mycol Med* **2004**; 14:221-225.

[66] **Walmsley S, King S, McGeer A, Ye Y, Richardson S.** Oropharyngeal candidiasis in patients with VIH: correlation of clinical outcome with in vitro resistance, serum azolé levels, and immunosuppression. *Clin Infect Antimicrob Agents Chemother Dis* **2001**; 32: 1554-61.

[67] **Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, Nelson PW, Webb CD.** Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of non neutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 39:40-4.

[68] **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **1997**; Wayne, PA.

[69] **Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JF, Punt NC, Mouton JW.** Comparaison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of in vitro interaction of antifongiques against itraconazole-susceptible and resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 702-7.

[70] **Blanc V, Eloy O, Sanchez C. R, Mallié M, Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH).** Pratique de l'antifongigramme dans 62 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* **2005** ; 15 : 197-210.

[71] **Rex JH, Pfaller MA, Walsh T, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al.** Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14: 643-8.

[72] **Rieu P, Eloy O, Bertout S, Maillé M, Bain P, Blanc V.** Sensibilité comparée par CLSI, EUCAST, E-test et ATB® Fungus 2 des souches de *Candida sp.* isolées au cours d'une

enquête épidémiologique sur les candidémies dans des hopitaux non universitaires. *Journal de Mycologie Médicale* **2009** ; 19 :94-103.

[73] **Eloy O, Blanc V, Mallié M, Decousser J.W, Pina P, Allouch P.Y et le collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH).** Identification et sensibilité aux antifongiques de deux souches de *Candida* dans 95 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* **2005** ; 15, Issue 3 :117-126.

[74]**Fatima Zahra El Idrissi.** Profil phénotypique de résistance aux antifongiques des souches de *Candida Spp* isolées des services de réanimation des hôpitaux universitaires de Rabat. *Mémoire Master en biologie à la faculté de sciences de Rabat* **2011**.

[75]**Ayub M, Levell M.J.** Structure- Activity Relationships of the inhibition of human placental aromatase by imidazole drugs including ketoconazole. *J.Steroid Biochem* **1988**; Vol.31, N°.1, P: 65-72.

[76]**Saivin Sylvie, Houin Georges.** Kétoconazole et itraconazole: interactions pharmacocinétiques. *Revue Française des Laboratoires* **2001** ; Vol.2001, Issue 332, P : 57-62.

[77]**Dupont B, Drouhet E.** Indications thérapeutiques du Kétoconazole. *Médecine et Maladies Infectieuses* **1984** ; N°11 : 530-537.

[78] **Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R.** Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **2006** ; 27: 359-66.

[79] **Sanglard D.** Mécanismes de résistances. In : Infections fongiques : Résistances et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : *Optimed Ed* **2003** : 29-46.

[80] **Levy SB.** Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**; 36: 695-703.

[81] **Borges-Walmsley MI, Mckeegan KS, Walmsley AR.** Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* **2003**; 376: 313-38.

[82] **Sanglard D.** Clinical Relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infect Microbiol Clin* **2002**; 20: 462-9. Quiz 470,479.

- [83] Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J, Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 241-53.
- [84] Vandeputte P, Larcher G, Berges T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 4608-15.
- [85] De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, and Vanden Bossche H. Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob. Agents Chemother* **2001**; 45: 1660-1670.
- [86] Miyazaki Y, Geber A, Miyazaki H, Falconer D, Parkinson T, Hitchcock C, et al. Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **1999**; 236:43-51
- [87] Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu MJ, Register E, et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1 p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida sp* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 3264-73.
- [88]Eggimann P., Calandra T. Infections fongiques sévères en réanimation. In : Pathologie infectieuse en réanimation. *Editions scientifiques et médicales Elsevier* **2002** ; Pages : 519-556.
- [89]Plettenburg A, Stoehr A, Hoffken G, Bergs C, Tschechne B, Ruhnke M, Heise W, Dieckmann S, Meigel W. Fluconazole therapy of oral candidiasis in HIV infected patients: result of a multicentric study. *Infection* **1994**; 22: 118-23.
- [90]Johnson EM, Warnock DW. Azole drug resistance in yeasts. *J Antimicrob Chemother* **1995**; 36: 751-5.
- [91]White TC. Antifungal resistance in *Candida albicans*. *ASM News* **1997**; 63: 427-34.
- [92]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.
- [93]Gauzit R. Epidémiologie des candidoses invasives en réanimation : dernières données. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS (Réanimation)* **2008**. Hors série 4 : 1-3

- [94]Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoine MH, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. *JAMA* **1995**; 274: 639-44.
- [95]Wisplinghof H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* **2003**; 36:1103-10.
- [96]Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* **2002**; 28: 108-21.
- [97]Gauzit R. Épidémiologie et facteurs de risque des candidoses systémiques en réanimation. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Anesth Réanim* **2001** ; 20 : 394-9
- [98]Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *C.albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1998**; 31:327-32.
- [99]Malani PN, Bradley SF, Little RS, Kauffman CA. Trends in species causing fungaemia in a tertiary care medical centre over 12 years. *Mycoses* **2001**; 44:446-9.
- [100] Eloy O, Blanc V, Pina P, Gaudart A, Bressolle M-L, Plainvert C, Decousser J-W, Pangon B, Allouch P-Y, le Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (Co1BVH). Épidémiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique Co1BVH. *Pathologie Biologie* **2006**; 54 : 523-530
- [101]Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, Chaisson RE, Merz WG, Gallant JE. Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* **1996**; 173: 219-25.
- [102]Lortholary O, Dupont B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin Microbiol Rev* **1997**; 10: 477-504.
- [103]Eggimann P, Pittet D. Candidoses du sujet non neutropénique : de la colonisation à l'infection. *Ann Fr Anesth Réanim* **2001** ; 20 : 382-8

- [104] 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**;35:1761-5
- [105] Alem H. Sensibilité in-vitro au voriconazole de 72 souches de *Candida* isolées à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V. *Thèse de Doctorat de Pharmacie* **2011** ; N° : 60.