

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

ANNEE: 2013

THESE N°:53

**COMPARAISON DE DEUX TECHNIQUES D'ANTIFONGIGRAMME EN
MILIEU GELOSE SUR COMPRIME NEO-SENSITABS ET SUR DISQUE
BIO-RAD**

THESE

Présentée et soutenue publiquement le:.....

PAR

Mr. UWINGABIYE Jean

Né le 04 juillet 1986 à Gisenyi(Rwanda)

Interne du CHU Ibn Sina de Rabat

Pour l' Obtention du Doctorat en Pharmacie

MOTS CLES: Antifongigrammes- Comprimés Neo-sensitabs ®-Disques de diffusion Bio-rad®- Concordance

JURY

Mr. I.LAHLOU AMINE

Professeur de Microbiologie

PRESIDENT

Mr .BE.LMIMOUNI

Professeur de Parasitologie-Mycologie

RAPPORTEUR

Mme. N.MESSAOUDI

Professeur agrégé d'Hématologie Biologique

Mr. A. BENNANA

Professeur agrégé de Gestion pharmaceutique
et informatique

JUGES

Mme. N.BENSEFFAJ

Professeur agrégé d'Immunologie



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

DOYENS HONORAIRES :

1962 – 1969 : Professeur Abdelmalek FARAJ

1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH

1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK

1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI

1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI

1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

2003 – 2013 : Professeur Najia HAJJAJ - HASSOUNI



ADMINISTRATION :

Doyen par intérim : Professeur Ali BENOMAR

Vice Doyen chargé des Affaires Académiques et estudiantines

Professeur Mohammed JIDDANE

Vice Doyen chargé de la Recherche et de la Coopération

Professeur Ali BENOMAR

Vice Doyen chargé des Affaires Spécifiques à la Pharmacie

Professeur Yahia CHERRAH

Secrétaire Général : Mr. El Hassane AHALLAT

PROFESSEURS :

Mars, Avril et Septembre 1980

1.

Mai et Octobre 1981

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

Mai et Novembre 1982

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

Novembre 1983

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

Décembre 1984

- | | | |
|-----|----------------------------------|-------------------------|
| 10. | Pr. BOUCETTA Mohamed* | Neurochirurgie |
| 11. | Pr. EL GUEDDARI Brahim El Khalil | Radiothérapie |
| 12. | Pr. MAAOUNI Abdelaziz | Médecine Interne |
| 13. | Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajdi | Anesthésie -Réanimation |
| 14. | Pr. SETTAF Abdellatif | Chirurgie |

Novembre et Décembre 1985

- | | | |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|
| 15. | Pr. BENJELLOUN Halima | Cardiologie |
| 16. | Pr. BENS Aid Younes | Pathologie Chirurgicale |
| 17. | Pr. EL ALAOUI Faris Moulay El Mostafa | Neurologie |
| 18. | Pr. IRAQI Ghali | Pneumo-phtisiologie |
| 19. | | |

Janvier, Février et Décembre 1987

- | | | |
|-----|---------------------------------------|--------------------------|
| 20. | Pr. AJANA Ali | Radiologie |
| 21. | Pr. CHAHED OUZZANI Houria ép. TAOBANE | Gastro-Entérologie |
| 22. | Pr. EL FASSY FIHRI Mohamed Taoufiq | Pneumo-phtisiologie |
| 23. | Pr. EL HAITEM Naïma | Cardiologie |
| 24. | Pr. EL YAACOUBI Moradh | Traumatologie Orthopédie |
| 25. | Pr. ESSAID EL FEYDI Abdellah | Gastro-Entérologie |
| 26. | Pr. LACHKAR Hassan | Médecine Interne |



27. Pr. YAHYAOUI Mohamed Neurologie

Décembre 1988

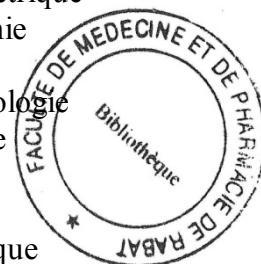
28. Pr. BENHAMAMOUCH Mohamed Najib Chirurgie Pédiatrique
29. Pr. DAFIRI Rachida Radiologie
30. Pr. HERMAS Mohamed Traumatologie Orthopédie
31. Pr. TOLOUNE Farida* Médecine Interne

Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990

32. Pr. ADNAOUI Mohamed Médecine Interne
33. Pr. AOUNI Mohamed Médecine Interne
34. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali Cardiologie
35. Pr. CHAD Bouziane Pathologie Chirurgicale
36. Pr. CHKOFF Rachid Pathologie Chirurgicale
37. Pr. HACHIM Mohammed* Médecine-Interne
38. Pr. KHARBACH Aïcha Gynécologie -Obstétrique
39. Pr. MANSOURI Fatima Anatomie-Pathologique
40. Pr. OUAZZANI Taïbi Mohamed Réda Neurologie
41. Pr. TAZI Saoud Anas Anesthésie Réanimation

Février Avril Juillet et Décembre 1991

42. Pr. AL HAMANY Zaïtounia Anatomie-Pathologique
43. Pr. AZZOUZI Abderrahim Anesthésie Réanimation
44. Pr. BAYAHIA Rabéa ép. HASSAM Néphrologie
45. Pr. BELKOUCHI Abdelkader Chirurgie Générale
46. Pr. BENABDELLAH Chahrazad Hématologie
47. Pr. BENCHEKROUN BELABBES Abdellatif Chirurgie Générale
48. Pr. BENSOUDA Yahia Pharmacie galénique
49. Pr. BERRAHO Amina Ophtalmologie
50. Pr. BEZZAD Rachid Gynécologie Obstétrique
51. Pr. CHABRAOUI Layachi Biochimie et Chimie
52. Pr. CHERRAH Yahia Pharmacologie
53. Pr. CHOKAIRI Omar Histologie Embryologie
54. Pr. JANATI Idrissi Mohamed* Chirurgie Générale
55. Pr. KHATTAB Mohamed Pédiatrie
56. Pr. SOULAYMANI Rachida ép. BENCHEIKH Pharmacologie
57. Pr. TAOUFIK Jamal Chimie thérapeutique



Décembre 1992

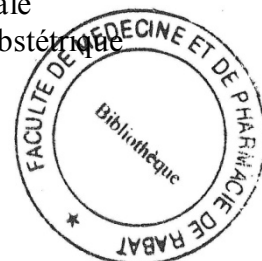
58. Pr. AHALLAT Mohamed Chirurgie Générale

59.	Pr. BENSOUDA Adil	Anesthésie Réanimation
60.	Pr. BOUJIDA Mohamed Najib	Radiologie
61.	Pr. CHAHED OUZZANI Laaziza	Gastro-Entérologie
62.	Pr. CHRAIBI Chafiq	Gynécologie Obstétrique
63.	Pr. DAOUDI Rajae	Ophtalmologie
64.	Pr. DEHAYNI Mohamed*	Gynécologie Obstétrique
65.	Pr. EL OUAHABI Abdessamad	Neurochirurgie
66.	Pr. FELLAT Rokaya	Cardiologie
67.	Pr. GHAFIR Driss*	Médecine Interne
68.	Pr. JIDDANE Mohamed	Anatomie
69.	Pr. OUZZANI TAIBI Med Charaf Eddine	Gynécologie Obstétrique
70.	Pr. TAGHY Ahmed	Chirurgie Générale
71.	Pr. ZOUHDI Mimoun	Microbiologie

Mars 1994

72.	Pr. AGNAOU Lahcen	Ophtalmologie
73.	Pr. BENCHERIFA Fatiha	Ophtalmologie
74.	Pr. BENJAAFAR Nouredine	Radiothérapie
75.	Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
76.	Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
77.	Pr. CAOUI Malika	Biophysique
78.	Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
79.	Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
80.	Pr. EL AOUDAD Rajae	Immunologie
81.	Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
82.	Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
83.	Pr. EL IDRISSI LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
84.	Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
85.	Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
86.	Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
87.	Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
88.	Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
89.	Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
90.	Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
91.	Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie – Orthopédie
92.	Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
93.	Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
94.	Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie – Obstétrique
95.	Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
96.		

Mars 1994



97. Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
98. Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie – Pédiatrique
99. Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
100. Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
101. Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
102. Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie – Obstétrique
103. Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie – Orthopédie
104. Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
105. Pr. CHERKAoui Lalla Ouafae	Ophtalmologie
106. Pr. EL ABBADI Najia	Neurochirurgie
107. Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
108. Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
109. Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
110. Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

Mars 1995

111. Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
112. Pr. AMRAoui Mohamed	Chirurgie Générale
113. Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
114. Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
115. Pr. BEDDOUCHE Amokrane*	Urologie
116. Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
117. Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
118. Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation
119. Pr. EL MESNAoui Abbes	Chirurgie Générale
120. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila	Oto-Rhino-Laryngologie
121. Pr. FERHATI Driss	Gynécologie Obstétrique
122. Pr. HASSOUNI Fadil	Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène
123. Pr. HDA Abdelhamid*	Cardiologie
124. Pr. IBEN ATTYA ANDALOUSSI Ahmed	Urologie
125. Pr. IBRAHIMY Wafaa	Ophtalmologie
126. Pr. MANSOURI Aziz	Radiothérapie
127. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia	Ophtalmologie
128. Pr. SEFIANI Abdelaziz	Génétique
129. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali	Réanimation Médicale

Décembre 1996

130. Pr. AMIL Touriya*	Radiologie
131. Pr. BELKACEM Rachid	Chirurgie Pédiatrie
132. Pr. BOULANOVAR Abdelkrim	Ophtalmologie
133. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan	Chirurgie Générale
134. Pr. GAOUZI Ahmed	Pédiatrie
135. Pr. MAHFOUDI M'barek*	Radiologie



136. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid
137. Pr. MOHAMMADI Mohamed
138. Pr. MOULINE Soumaya
139. Pr. OUADGHIRI Mohamed
140. Pr. OUZEDDOUN Naima
141. Pr. ZBIR EL Mehdi*

Novembre 1997

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

Chirurgie Générale
Médecine Interne
Pneumo-phtisiologie
Traumatologie-Orthopédie
Néphrologie
Cardiologie

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

Novembre 1998

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

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

Novembre 1998

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

Hématologie
Cardiologie
Anatomie Pathologique

Janvier 2000

171. Pr. ABID Ahmed*	Pneumophtisiologie
172. Pr. AIT OUMAR Hassan	Pédiatrie
173. Pr. BENCHERIF My Zahid	Ophtalmologie
174. Pr. BENJELLOUN DAKHAMA Badr.Sououd	Pédiatrie
175. Pr. BOURKADI Jamal-Eddine	Pneumo-phtisiologie
176. Pr. CHAOUI Zineb	Ophtalmologie
177. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Al Montacer	Chirurgie Générale
178. Pr. ECHARRAB El Mahjoub	Chirurgie Générale
179. Pr. EL FTOUH Mustapha	Pneumo-phtisiologie
180. Pr. EL MOSTARCHID Brahim*	Neurochirurgie
181. Pr. EL OTMANY Azzedine	Chirurgie Générale
182. Pr. HAMMANI Lahcen	Radiologie
183. Pr. ISMAILI Mohamed Hatim	Anesthésie-Réanimation
184. Pr. ISMAILI Hassane*	Traumatologie Orthopédie
185. Pr. KRAMI Hayat Ennoufouss	Gastro-Entérologie
186. Pr. MAHMOUDI Abdelkrim*	Anesthésie-Réanimation
187. Pr. TACHINANTE Rajae	Anesthésie-Réanimation
188. Pr. TAZI MEZALEK Zoubida	Médecine Interne



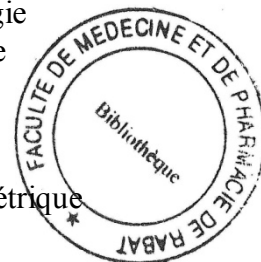
Novembre 2000

189. Pr. AIDI Saadia	Neurologie
190. Pr. AIT OURHROUI Mohamed	Dermatologie
191. Pr. AJANA Fatima Zohra	Gastro-Entérologie
192. Pr. BENAMR Said	Chirurgie Générale
193. Pr. BENCHEKROUN Nabiha	Ophtalmologie
194. Pr. CHERTI Mohammed	Cardiologie
195. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma	Anesthésie-Réanimation
196. Pr. EL HASSANI Amine	Pédiatrie
197. Pr. EL IDGHIRI Hassan	Oto-Rhino-Laryngologie
198. Pr. EL KHADER Khalid	Urologie
199. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah*	Rhumatologie
200. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
201. Pr. HSSAIDA Rachid*	Anesthésie-Réanimation
202. Pr. LAHLOU Abdou	Traumatologie Orthopédie
203. Pr. MAFTAH Mohamed*	Neurochirurgie
204. Pr. MAHASSINI Najat	Anatomie Pathologique
205. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae	Pédiatrie
206. Pr. NASSIH Mohamed*	Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale
207. Pr. ROUIMI Abdelhadi	Neurologie

Décembre 2001

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

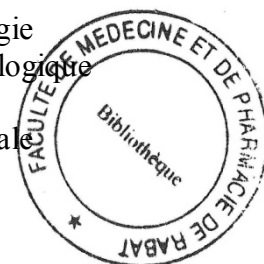
- Anesthésie-Réanimation
- Anesthésie-Réanimation
- Ophtalmologie
- Neurologie
- Néphrologie
- Pneumo-phtisiologie
- Gastro-Entérologie
- Cardiologie
- Pédiatrie
- Dermatologie
- Gynécologie Obstétrique
- Rhumatologie
- Anatomie
- Cardiologie
- Radiologie
- Radiologie
- Radiologie
- Chirurgie Générale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



249. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia Pédiatrie

Décembre 2002

- | | |
|---|---|
| 250. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane* | Anatomie Pathologique |
| 251. Pr. AMEUR Ahmed * | Urologie |
| 252. Pr. AMRI Rachida | Cardiologie |
| 253. Pr. AOURLARH Aziz* | Gastro-Entérologie |
| 254. Pr. BAMOU Youssef * | Biochimie-Chimie |
| 255. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene* | Endocrinologie et Maladies Métaboliques |
| 256. Pr. BENBOUAZZA Karima | Rhumatologie |
| 257. Pr. BENZEKRI Laila | Dermatologie |
| 258. Pr. BENZZOUBEIR Nadia* | Gastro-Entérologie |
| 259. Pr. BERNOUSSI Zakiya | Anatomie Pathologique |
| 260. Pr. BICHA Mohamed Zakariya | Psychiatrie |
| 261. Pr. CHOHO Abdelkrim * | Chirurgie Générale |
| 262. Pr. CHKIRATE Bouchra | Pédiatrie |
| 263. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair | Chirurgie Pédiatrique |
| 264. Pr. EL ALJ Haj Ahmed | Urologie |
| 265. Pr. EL BARNOUSSI Leila | Gynécologie Obstétrique |
| 266. Pr. EL HAOURI Mohamed * | Dermatologie |
| 267. Pr. EL MANSARI Omar* | Chirurgie Générale |
| 268. Pr. ES-SADEL Abdelhamid | Chirurgie Générale |
| 269. Pr. FILALI ADIB Abdelhai | Gynécologie Obstétrique |
| 270. Pr. HADDOUR Leila | Cardiologie |
| 271. Pr. HAJJI Zakia | Ophtalmologie |
| 272. Pr. IKEN Ali | Urologie |
| 273. Pr. ISMAEL Farid | Traumatologie Orthopédie |
| 274. Pr. JAAFAR Abdeloihab* | Traumatologie Orthopédie |
| 275. Pr. KRIOUILE Yamina | Pédiatrie |
| 276. Pr. LAGHMARI Mina | Ophtalmologie |
| 277. Pr. MABROUK Hfid* | Traumatologie Orthopédie |
| 278. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss* | Gynécologie Obstétrique |
| 279. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid* | Cardiologie |
| 280. Pr. MOUSTAINE My Rachid | Traumatologie Orthopédie |
| 281. Pr. NAITLHO Abdelhamid* | Médecine Interne |
| 282. Pr. OUJILAL Abdelilah | Oto-Rhino-Laryngologie |
| 283. Pr. RACHID Khalid * | Traumatologie Orthopédie |
| 284. Pr. RAISS Mohamed | Chirurgie Générale |
| 285. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha* | Pneumophtisiologie |
| 286. Pr. RHOU Hakima | Néphrologie |
| 287. Pr. SIAH Samir * | Anesthésie Réanimation |
| 288. Pr. THIMOU Amal | Pédiatrie |



289. Pr. ZENTAR Aziz*

Chirurgie Générale

PROFESSEURS AGREGES :

Janvier 2004

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

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



Janvier 2005

- 314. Pr. ABBASSI Abdellah
- 315. Pr. AL KANDRY Sif Eddine*
- 316. Pr. ALAOUI Ahmed Essaid
- 317. Pr. ALLALI Fadoua
- 318. Pr. AMAZOUZI Abdellah
- 319. Pr. AZIZ Noureddine*
- 320. Pr. BAHIRI Rachid
- 321. Pr. BARKAT Amina
- 322. Pr. BENHALIMA Hanane

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

323. Pr. BENHARBIT Mohamed	Ophtalmologie
324. Pr. BENYASS Aatif	Cardiologie
325. Pr. BERNOUSSI Abdelghani	Ophtalmologie
326. Pr. CHARIF CHEFCHAOUNI Mohamed	Ophtalmologie
327. Pr. DOUDOUH Abderrahim*	Biophysique
328. Pr. EL HAMZAoui Sakina	Microbiologie
329. Pr. HAJJI Leila	Cardiologie
330. Pr. HESSISSEN Leila	Pédiatrie
331. Pr. JIDAL Mohamed*	Radiologie
332. Pr. KARIM Abdelouahed	Ophtalmologie
333. Pr. KENDOOUSSI Mohamed*	Cardiologie
334. Pr. LAAROUSSI Mohamed	Chirurgie Cardio-vasculaire
335. Pr. LYAGOUBI Mohammed	Parasitologie
336. Pr. NIAMANE Radouane*	Rhumatologie
337. Pr. RAGALA Abdelhak	Gynécologie Obstétrique
338. Pr. SBIHI Souad	Histo-Embryologie Cytogénétique
339. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam	Ophtalmologie
340. Pr. ZERAIDI Najia	Gynécologie Obstétrique

AVRIL 2006

423. Pr. ACHEMLAL Lahsen*	Rhumatologie
425. Pr. AKJOUJ Said*	Radiologie
427. Pr. BELMEKKI Abdelkader*	Hématologie
428. Pr. BENCHEIKH Razika	O.R.L
429. Pr. BIYI Abdelhamid*	Biophysique
430. Pr. BOUHAFS Mohamed El Amine	Chirurgie - Pédiatrique
431. Pr. BOULAHYA Abdellatif*	Chirurgie Cardio – Vasculaire
432. Pr. CHEIKHAoui Younes	Chirurgie Cardio – Vasculaire
433. Pr. CHENGUETI ANSARI Anas	Gynécologie Obstétrique
434. Pr. DOGHMI Nawal	Cardiologie
435. Pr. ESSAMRI Wafaa	Gastro-entérologie
436. Pr. FELLAT Ibtiissam	Cardiologie



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

Octobre 2007

458.

459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid

Anesthésie réanimation

460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid

Anesthésier réanimation

461. Pr. LALAOUI SALIM Jaafar *

Anesthésie réanimation

462. Pr. BAITE Abdelouahed *

Anesthésie réanimation

463. Pr. TOUATI Zakia

Cardiologie

464. Pr. OUZZIF Ez zohra *

Biochimie

465. Pr. BALOUCH Lhousaine *

Biochimie

466. Pr. SELKANE Chakir *

Chirurgie cardio vasculaire

467. Pr. EL BEKKALI Youssef *

Chirurgie cardio vasculaire

468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi *

Chirurgie cardio vasculaire

469. Pr. EL ABSI Mohamed

Chirurgie générale

470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader *

Chirurgie générale

471. Pr. ACHOUR Abdessamad *

Chirurgie générale

472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq *

Chirurgie générale

473. Pr. GHARIB Nouredine

Chirurgie plastique

474. Pr. TABERKANET Mustafa *

Chirurgie vasculaire périphérique

475. Pr. ISMAILI Nadia

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. AOUIFI 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

Décembre 2008

Pr TAHIRI My El Hassan*

Chirurgie Générale

Pr ZOUBIR Mohamed*

Anesthésie Réanimation

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 *	Dermatologie
Pr. KABBAJ Nawal	Gastro-entérologie
Pr. FATHI Khalid	Gynécologie obstétrique
Pr. MESSAOUDI Nezha *	Hématologie biologique
Pr. CHAKOUR Mohammed *	Hématologie biologique
Pr. DOGHMI Kamal *	Hématologie clinique
Pr. ABOUZAHIR Ali*	Médecine interne
Pr. ENNIBI Khalid *	Médecine interne
Pr. EL OUENNASS Mostapha	Microbiologie
Pr. ZOUHAIR Said*	Microbiologie
Pr. L'KASSIMI Hachemi*	Microbiologie
Pr. AKHADDAR Ali *	Neuro-chirurgie
Pr. AIT BENHADDOU El hachmia	Neurologie
Pr. AGADR Aomar *	Pédiatrie
Pr. KARBOUBI Lamya	Pédiatrie
Pr. MESKINI Toufik	Pédiatrie
Pr. KABIRI Meryem	Pédiatrie
Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani *	Pneumo-phtisiologie
Pr. BASSOU Driss *	Radiologie
Pr. ALLALI Nazik	Radiologie
Pr. NASSAR Ittimade	Radiologie
Pr. HASSIKOU Hasna *	Rhumatologie
Pr. AMINE Bouchra	Rhumatologie

Pr. BOUSSOUGA Mostapha *

Traumatologie orthopédique

Pr. KADI Said *

Traumatologie orthopédique

Octobre 2010

Pr. AMEZIANE Taoufiq*

Médecine interne

Pr. ERRABIH Ikram

Gastro entérologie

Pr. CHERRADI Ghizlan

Cardiologie

Pr. MOSADIK Ahlam

Anesthésie Réanimation

Pr. ALILOU Mustapha

Anesthésie réanimation

Pr. EL KHARRAS Abdennasser*

Radiologie

Pr. DARBI Abdellatif*

Radiologie

Pr. EL HAFIDI Naima

Pédiatrie

Pr. MALIH Mohamed*

Pédiatrie

Pr. BOUSSIF Mohamed*

Médecine aérologique

Pr. EL MAZOUZ Samir

Chirurgie plastique et réparatrice

Pr. DENDANE Mohammed Anouar

Chirurgie pédiatrique

Pr. EL SAYEGH Hachem

Urologie

Pr. MOUJAHID Mountassir*

Chirurgie générale

Pr. RAISSOUNI Zakaria*

Traumatologie Orthopédie

Pr. BOUAITY Brahim*

ORL

Pr. LEZREK Mounir

Ophtalmologie

Pr. NAZIH Mouna*

Hématologie

Pr. LAMALMI Najat

Anatomie pathologique

Pr. ZOUAIDIA Fouad

Pr. BELAGUID Abdelaziz

Pr. DAMI Abdellah*

Pr. CHADLI Mariama*

Anatomie pathologique

Physiologie

Biochimie chimie

Microbiologie



Mai 2012

Pr. Abdelouahed AMRANI

Pr. Mounir ER-RAJI

Pr. Mouna EL ALAOUI MHAMDI

Pr. Ahmed JAHID

Pr. ABOUELALAA Khalil*

Pr. DRISSI Mohamed*

Pr. RAISSOUNI Maha*

Pr. EL KHATTABI Abdessadek*

Pr. MEHSSANI Jamal*

Pr. BELAIZI Mohamed*

Pr. EL OUAZZANI Hanane*

Pr. BENCHEBBA Drissi*

Chirurgie Pédiatrique

Chirurgie Pédiatrique

Chirurgie Générale

Anatomie Pathologique

Anesthésie Réanimation

Anesthésie Réanimation

Cardiologie

Médecine Interne

Psychiatrie

Psychiatrie

Pneumophtisiologie

Traumatologie Orthopédique

ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES

PROFESSEURS

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

** Enseignants Militaires*



Dédicaces



Je dédie ce travail :

A Dieu tout puissant,

A la mémoire de mon père MBEZEHO Laurent,

*Merci pour tout ! Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,
l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Que
Dieu repose votre âme en paix !*

A ma très chère mère NYIRAMANA Francine,

*Pour tous tes sacrifices, pour ta philosophie de vie qui m'inspire, pour
ton amour et tes prières qui m'accompagnent à tout instant ! Merci
Mama!*

A ma très chère grand-mère NYIRABITARI Saverine ,

*Je vous remercie pour tout le soutien exemplaire et l'amour exceptionnel
que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction
m'accompagnera toujours.*

A mon très cher petit frère MWISENEZA Olivier ,

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de
sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et
d'amour.*

A mes chers frères et sœurs : NYIRARUKUNDO Olive

NTACYOBAZIMAZA Narcisse, HABANJIMANA Isabelle

A tous mes frères et sœurs

A toute ma famille

*A mon très cher ami et collègue HABANABAKIZE Gilbert et sa
famille*

A mon très cher ami MUPENZI Providence, sa femme

MUKANDUTIYE Alphonsine et leurs familles

A la famille SEBUZUKIRA David

A la famille SINIBAGIWE Théophile

A la famille Dr. KAMURAGIYE Aloys

A mes chers amis : Dr.Alban Gildas ZOHOUN, Achraf ALFA-BOUKARI

Dr.NIYOMUNGERE Alexis, NDAYAMBAJE Albert, Dr.Assam EZZAKI, Dr.W.

BOUYARMANE, Dr. A.MORJAN, Dr. A FELALI, NIHORIMBERE Manasse,

Nsanzamahoro Théogène, Dr.Soufiane, Hewan Wole, Dr.Youness, Dr .Zineb L.,

Dr.Zineb M., Missbahou

A tous ceux qui ont contribué à ma formation et à mon éducation,

*Au Corps Professoral de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de
Rabat,*

A l'Agence Marocaine de Coopération Internationale(AMCI),

A REB (Rwanda Education board),

A toute la communauté Rwandaise et Burundaise au Maroc,

*A tous mes camarades de la 23ème promotion de la pharmacie à la
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,*

A tous les internes et résidants du CH IBN SINA de RABAT,

Au Rwanda; mon pays natal,

Au Royaume du Maroc ; mon pays de résidence,

*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce
travail.*

Remerciements



J'adresse mes sincères remerciements :

***A Notre Maître et Président du jury
Monsieur Idriss LAHLOU AMINE
Professeur de Microbiologie***

Grande a été notre joie et profonde notre gratitude lorsque vous avez accepté de présider le jury de notre thèse en mettant votre confiance en notre travail.

Nous sommes très sensibles au grand honneur que vous nous faites.

Nous vous présentons tout notre respect devant vos compétences professionnelles, vos qualités humaines et votre disponibilité.

Veillez agréer, cher maître, l'expression de notre vive reconnaissance, notre profond respect et notre respectueuse considération.

***A Notre Maître et Rapporteur de thèse
Monsieur Badre Eddine LMIMOUNI
Professeur de Parasitologie-Mycologie***

Je ne saurai vous remercier à la hauteur de vos actions très humaines, magnifiquement hors du commun à mon endroit. Ce fut une chance, aujourd'hui un grand honneur de vous avoir eu triplement comme Professeur, Maître de Stage dans mon cursus d'internat et Directeur de Thèse. J'apprends de vous et retiens pour toujours Votre amabilité, votre sérieux, votre compétence, votre gentillesse et votre humanisme qui couronnent en tout vos qualités professionnelles qui m'ont sans doute séduit. En voici le fruit : cette thèse qui à l'évidence me dépasse. En suivant vos directives si pédagogiques, je suis arrivé à la cerner et à la traiter. Veuillez reconnaître en ces mots l'expression de notre profonde gratitude.

***A Notre Maître et Juge de thèse
Madame Nezha MESSAOUDI
Professeur agrégé d'Hématologie Biologique***

Vous m'accordez un immense honneur en acceptant de siéger dans le Jury de ma soutenance de thèse. Je profite aussi de l'occasion pour vous remercier d'avoir grandement contribué par votre enseignement à l'amélioration de ma connaissance en hématologie au cours de mon cursus d'internat. Votre sens élevé du travail bien fait, votre disponibilité, votre pédagogie, votre gentillesse et votre compréhension nous ont beaucoup touchées et nous ne vous en remercierons jamais assez.

Veillez agréer mon plus profond respect et ma sincère reconnaissance.

***A Notre Maître et Juge de thèse
Monsieur Ahmed BENNANA
Professeur agrégé de Gestion Pharmaceutique et
Informatique***

Nous vous remercions pour l'honneur que nous faites en acceptant de siéger parmi notre Jury de thèse. Vous nous avez accueillis avec simplicité et spontanéité, nous en sommes touché et nous vous en sommes reconnaissant. C'est aussi le moment de vous remercier de votre encadrement dans mon cursus d'internat. Merci pour votre gentillesse et vos conseils à mon égard. Votre dynamisme est exemplaire.

Veillez agréer l'expression de notre considération la plus distinguée.

***A Notre Maître et Juge de thèse
Madame Nadia BENSEFFAJ
Professeur agrégé en Immunologie***

*Nous vous remercions pour la simplicité que vous avez
témoignée en acceptant de siéger parmi notre jury de thèse.*

*En acceptant de juger ce travail, vous nous accordez un très
grand honneur.*

*Veillez accepter l'expression de notre considération la plus
distinguée.*

LISTE DES ABREVIATIONS

ABREVIATION

5-FC: 5-fluorocytosine

5FU: 5-fluorouracile

A: *Aspergillus*

ABC : ATP-Binding Cassette

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFST : Antifungal susceptibility testing

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé.

ALT : Alanine aminotransférase

AmB : Amphotéricine B

AMM : Autorisation de mise sur le marché

ARN : Acide ribonucléique

AST : Aspartate aminotransférase

ASC : Aire sur la courbe

ATF : Antifongigramme

C: *Candida*

Caspo: Caspofungine

CDR: Complementarity determining regions

CME : Concentration Minimale Efficace

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

CNR : Centre national de référence

ColBVH : Collège de Bactériologie Virologie et Hygiène

CQ : Contrôle de qualité

Cr : Chrome

Conc. : Concentration

COS : géloses Columbia

DD = dose dépendant

DCI : Dénomination Commune Internationale

ECMM : La Confédération européenne de mycologie médicale

ERG: Erythroblast transformation- specific Related Gene

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Food and Drug Administration

FCZ: Fluconazole

FIC: Fractional inhibitory concentration

GB: Globule blanc

h: heure

HMIMV: Hôpital militaire d'instruction Mohammed-V

HMG CoA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A

I: Intermédiaire

IDSA: Infectious Diseases Society of America

IM : Intramusculaire

ITZ: Itraconazole

INVS : Institut de Veille Sanitaire

IV : Intraveineuse

J : jour

K:Potassium

LAMB : Liposomal amphotéricine B

LCR:Liquide cephalo-rachidien

µg: microgramme

MDR:Multidrug resistance

Mg: Magnésium

mg: milligramme

ml: millilitre

MOPS: Acide 3-(N-morpholino) propanesulfonique

N: nombre

Na: Sodium

NaCl: Chlorure de sodium

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS : Organisation mondiale de la sante

R: Résistant

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

Pb : Problème

PDH:Pyruvate Dehydrogénase

pH : Potentiel en hydrogène

PM : Poids moléculaire

PSZ : Posaconazole

Pulm. :pulmonaire

SDA : Sabauroud dextrose agar

SDD : Sensibilité Dose Dépendante

SIDA: Syndrome d'immunodéficience acquise

SCS: La Station Compacte Satellite

S: Sensible

UFC: Unités Formant Colonie

USA: United States of America

VCZ: Voriconazole

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

TABLE DES MATIERES

I.INTRODUCTION.....	1
II.MATERIELS ET METHODES	5
II.1Type, période et lieu de l'étude	6
II.2 Les souches incluses.....	6
II.3 Méthodes d'isolement et d'identification	6
II.4 Méthodes d'étude de la sensibilité in vitro aux antifongiques :.....	9
II.4.1 PRINCIPE :.....	9
II.4.2 PRESENTATION DES TECHNIQUES UTILISEES :	10
II.4.3 Technique de réalisation de l'antifongigramme par diffusion en milieu gelosé:	13
II.4.4 Les antifongiques testés : Les six antifongiques suivants seront pris en compte dans notre étude :	19
III.RESULTATS.....	20
III.1 REPARTITION GLOBALE DES ESPECES ISOLEES.....	21
III.2 ETUDE COMPRATIVE DE DEUX METHODES TESTEES	23
III.2.1 Tableau des résultats montrant les discordances et les concordances pour chaque souche isolée	23
III.2.2 Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs selon l'espèce de <i>Candida</i>	27
III.2.3 Repartition de la sensibilité des antifongiques en fonction du test utilisé.....	29
III.2.4 Pourcentage de concordance et de discordance entre les deux techniques selon l'antifongique utilisé.	37
IV.DISCUSSION	38
IV.1 Epidémiologie : Etude de la distribution des espèces de <i>Candida</i>	40
IV.2 Traitement des candidoses invasives par les antifongiques.....	43
IV.2.1 Cibles d'action des antifongiques.....	44
IV.2.2 Les classes d'antifongiques.....	46
IV.2.3 Recommandations d'association médicamenteuse pour les candidoses invasives.....	66

IV.2.4	Antécédents de prise de fluconazole.....	66
IV.3	Détermination de la sensibilité aux antifongiques	68
IV.3.1	Objectifs des tests de sensibilité des levures aux antifongiques	68
IV.3.2	Les indications de l'antifongogramme	69
IV.3.3	Qualités que doivent avoir les tests in vitro.....	69
IV.3.4	Les facteurs qui influencent les tests de sensibilités aux antifongiques	69
IV.3.5	Méthodes d'antifongogramme.....	71
IV.3.6	Utilisation en pratique médicale des tests de sensibilité in vitro	108
IV.3.7	Les recommandations	110
IV.3.8	Corrélation in vitro-in vivo.....	111
IV.4	Etude comparative des techniques testées	115
IV.4.1	Epidémiologie: comparaison avec les autres antifongiques...	115
IV.4.2	Epidémiologie: résistances croisées	117
IV.4.3	Comparaison des techniques: Praticabilité.....	120
IV.4.4	Comparaison des techniques: résultats	122
IV.4.5	Comparaison des techniques : Coût	126
IV.5	La résistance aux antifongiques chez les levures appartenant au genre <i>Candida</i>	127
IV.5.1	Définition	127
IV.5.2	Types de résistance	127
IV.5.3	Les facteurs de risques de résistance	129
IV.5.4	Mécanisme de résistance aux antifongiques.....	130
IV.6	Les limites d'études	140
IV.7	Perspectives.....	140
V.	CONCLUSION	141
	Le résumé	146
	Références bibliographiques:.....	150



INTRODUCTION



I. INTRODUCTION

L'émergence de *Candida* sp. comme agent responsable d'infections invasives est un phénomène relativement récent, apparu dans les années 1950 [1,2]. Actuellement, *Candida* sp. représente selon les auteurs le quatrième ou cinquième agent retrouvé dans les septicémies nosocomiales [1,3].

L'incidence des infections nosocomiales dues aux champignons pathogènes, notamment aux levures du genre *Candida* responsables chez l'homme de candidoses a augmenté régulièrement au cours des deux dernières décennies en raison de trois principaux facteurs :

- un accroissement du nombre de patients immunodéprimés dans la population, qui correspond à une large utilisation de traitements chimiothérapeutiques toxiques, d'immunosuppresseurs dans le cas des transplantés, d'antibiotiques à large spectre, et qui correspond également à l'augmentation de patients atteints du SIDA ;
- une prise en compte plus juste des infections fongiques profondes ou superficielles notamment grâce à l'évolution des méthodes diagnostiques ;
- une émergence de plus en plus fréquente des souches résistantes aux traitements antifongiques [4].

Candida albicans est l'espèce la plus fréquemment retrouvée, mais l'incidence des *Candida* non *albicans* comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* est croissante dans les prélèvements cliniques [5-7].

L'augmentation constante de l'incidence des infections fongiques graves, l'émergence de nouvelles espèces, le développement de nouveaux antifongiques et l'apparition de résistances requièrent ainsi l'utilisation de tests de sensibilité in vitro bien standardisés.

L'antifongigramme a pour but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques. Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation.

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

Les laboratoires doivent rendre, le plus rapidement possible, des résultats explicites et sélectifs afin que le clinicien puisse proposer des stratégies thérapeutiques adaptées, en tenant compte en particulier des indications de résistances mesurées in vitro [4].

Des efforts importants ont été déployés pour parvenir à un consensus sur des tests de sensibilité des levures aux antifongiques, et l'établissement de méthodes reproductibles et standardisées pour tester la sensibilité et leur corrélation avec les résultats cliniques [4,7-9].

Le choix d'une technique doit prendre en compte le type de souches fongiques à tester (souches d'infections ou de colonisation, levures et/ou champignons filamenteux), la nature des antifongiques à tester et la vérification du degré de corrélation avec les méthodes de référence. Dans tous les cas l'utilisation de souches, contrôles de qualité, spécifiques des antifongigrammes est indispensable pour valider les conditions techniques et standardiser la lecture lors de la mise en place de la technique.

La technique de référence CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, anciennement appelé NCCLS) pour tester la sensibilité aux antifongiques des levures (document M27-A2) a montré ses limites: la difficulté d'identifier les souches de *Candida* ayant une sensibilité réduite à l'amphotéricine B, le phénomène de la croissance résiduelle observée pour les azolés et une croissance insuffisante de certaines espèces de *Candida* [4, 10,11].

D'autres méthodes ont été développées pour tester la sensibilité aux antifongiques (méthodes de disques de diffusion, Comprimés Neo-sensitabs®, E-test®), méthodes qui ont été inspirés par la technique de référence (milieu, inoculum, des critères d'interprétation), à laquelle ils ont été comparés [12-15].

La procédure de disques de diffusion avec de nouvelles lignes directrices identifiées (méthode M44-A) a été récemment proposée par le CLSI pour évaluer la sensibilité des levures sur un milieu gélosé (milieu Mueller-Hinton

supplémenté avec du glucose et du bleu de méthylène) à l'aide des disques antifongiques^[8]. Cette méthode donne un résultat quantitatif (zone d'inhibition) et une catégorie d'interprétation qualitative ; en fonction du diamètre de la zone d'inhibition, les souches de *Candida* sont classées en tant que sensibles, sensibles dose-dépendants « SDD » ou résistants pour les antifongiques testés. Bien que cette méthode normalisée est actuellement disponible uniquement pour le fluconazole et le voriconazole, plusieurs études ont été réalisées afin de définir ou d'améliorer les normes pour d'autres agents antifongiques tels que la caspofungine, l'anidulafungine, la micafungine, l'amphotéricine B, le posaconazole et l'itraconazole^[12,13]. La technique Neo-Sensitabs® (Rosco Diagnostic, Danemark) et disque Bio-rad® sont aussi des méthodes de diffusion. La méthode Neo-sensitabs a été favorablement comparée à la méthode de référence CLSI M27-A2 ^[7] pour tester les levures ^[16-19].

Dans ce contexte, **les objectifs** de ce travail sont:

- Evaluer la performance des deux techniques d'antifongigrammes en milieu gélosé sur les disques BioRad® et sur des comprimés Neo-Sensitabs® pour tester la sensibilité des souches de *Candida* à six agents antifongiques (amphotéricine B, fluconazole, voriconazole, posaconazole, 5-Fluorocytosine et kétoconazole).
- Evaluer la sensibilité in vitro des souches de *Candida* isolées aux antifongiques usuels en utilisant les deux techniques d'antifongigramme : disque de diffusion Bio-rad® et comprimé Neo-sensitabs®.
- Définir la méthode la plus adaptée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie médicale de l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V (HMIMV)-Rabat.



MATERIELS ET METHODES



II. MATERIELS ET METHODES

II.1 Type, période et lieu de l'étude

Notre étude est une étude observationnelle prospective effectuée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie médicale de l'HMIMV durant la période s'étalant du 07 février au 07 août 2012.

II.2 Les souches incluses

Pour la réalisation de cette étude, les souches pures de *Candida sp* ont été obtenues à partir des prélèvements périphériques (buccal, rectal, urinaire, nasale, auriculaire) et les hémocultures des patients hospitalisés au service de réanimation à l'HMIM V.

II.3 Méthodes d'isolement et d'identification

La culture sur milieu Sabouraud-chloramphénicol avec et sans actidione est effectuée et milieu chromogénique Candiselect®. L'incubation de ces milieux est faite à 37°C et la lecture est pratiquée après 24 à 48 heures. L'examen macroscopique des cultures a montré des colonies blanches, humides. L'examen microscopique a mis en évidence des levures bourgeonnantes. L'identification est basée sur les méthodes phénotypiques habituelles (Test de filamentation sur sérum et galerie biochimique Auxacolor).



Figure 1 : Aspect macroscopique des colonies de *Candida* sp. sur milieu Sabouraud [Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV-Rabat]



Figure 2 : Test de filamentation positif montrant la présence de *Candida albicans*/ *Candida dubliniensis*, [Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV-Rabat]



Figure 3, 4, 5: Identification des espèces de *Candida* sur le milieu chromogénique Candiselect4® [Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV-Rabat]

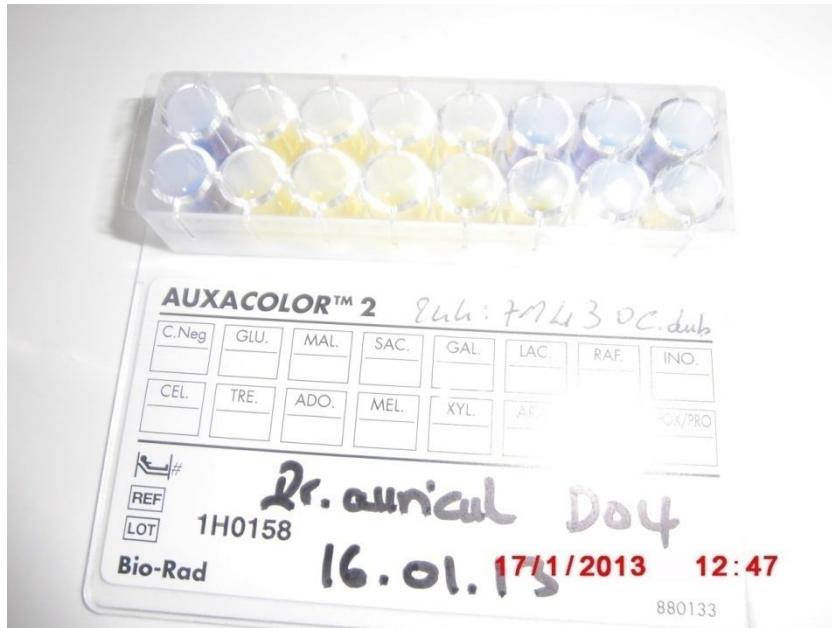


Figure 6 : Le test de l'auxacolor™2 [Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV de Rabat]

II.4 Méthodes d'étude de la sensibilité in vitro aux antifongiques :

II.4.1 PRINCIPE :

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

II.4.2 PRESENTATION DES TECHNIQUES UTILISEES :

a. Antifongigramme sur Comprimé néo-sensitabs : Le milieu de culture utilisé est la gélose Mueller-Hinton additionné de 2% de glucose et 0.5 µg/ml de bleu méthylène. L'ajout de glucose fournit une croissance convenable des levures du genre *Candida* et le colorant améliore la définition des zones d'inhibition. Le pH de la gélose Mueller-Hinton est fixé entre 7,2 à 7,4 après gélification à la température ambiante, et la surface de la gélose doit être humide. Les comprimés Neo-Sensitabs sont emballés dans des cartouches contenant 50 comprimés. Chaque coffret de vente contient 5 cartouches.

Tableau 1 : La gamme des Comprimés Neo-Sensitabs disponibles

Numéro de référence	Agents antifongiques	Code	La charge du comprimé Neo-sensitabs® en µg
81012	Amphotéricine B	AMPHO	10
81112	Ciclopirox	CICLO	50
81212	Clotrimazole	CTRM	10
82412	Caspofungine	CASP5	5
82312	Voriconazole	VOR.1	1
81312	Econazole	ECONZ	10
81512	Fluorocytosine1	FLU.1	1
81612	Fluorocytosine10	FLU10	10
81712	Griséofulvine	GRISE	25
85312	Isoconazole	ISOCN	10
81812	Itraconazole	ITRAC	8
81912	Kétoconazole	KETOC	15
82012	Miconazole	MICOZ	10
82112	Natamycine	NATAM	10
82212	Nystatine	NYSTA	50
87412	Terbinafine	TERBI	30



Figure 7: Les cartouches contenant les comprimés d'antifongigramme Neo-sensitabs® [Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV-Rabat]

b. Antifongigramme sur disque Bio-rad® :

Concernant l'antifongigramme sur disque Bio-rad®, il existe 3 milieux de culture en fonction de l'antifongique utilisé comme indiqué dans le tableau 2.

Tableau 2 : Milieux de culture utilisés avec la technique Bio-rad®

Milieu de culture	Conditionnement	Agents Antifongiques
Milieu semi-synthétique	25 tubesx15ml	5-Fluorocytosine
Milieu Casitone	25 tubesx15ml	Polyènes, Imidazolés
Milieu Mueller Hinton	6 flaconsx200ml	Triazolés

Tableau 3 : Agents antifongiques disponibles sur disques

Agents antifongiques	Charge du disque	Symbole	Conditionnement	Numéro d'ordre
ANTIMETABOLITES				
5-Fluorocytosine	1µg	5FC1	1cartouchex50 disques	62846
POLYENES				
Amphotéricine B	100µg	AB100	1cartouchex50 disques	62806
Nystatine	100 IU	NY100		62856
AZOLES				
Imidazolés :				
Clotrimazole	50µg	CTR50	1cartouche x50 disques	62816
Econazole	50µg	EC50		62826
Ketoconazole	50µg	KET50		62866
Miconazole	50µg	MCZ50		62836
Triazolés :				
Fluconazole	25µg	FCA25		62802
Voriconazole	1µg	VCZ1		62803



Figure8: Les cartouches contenant les disques d'antifongigramme Bio-rad®
[Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV-Rabat]

CONSERVATION : La date de péremption s'applique uniquement aux disques contenus dans des cartouches intactes conservées conformément aux instructions du fabricant. La date de péremption et le numéro de lot figurent sur chaque conditionnement (cartouche et container).

- Les cartouches de disques doivent être conservées dans leur container entre + 2 et + 8 °C au sec.
- Ramener les cartouches à température ambiante (18-30°C) avant de les ouvrir, remettre les cartouches inutilisées entre + 2 et + 8 °C une fois la pose des disques terminée.
- Ne pas utiliser les disques dont la date de péremption est dépassé.
- Si les cartouches sont conservées dans le distributeur après dépôt, il est nécessaire de conserver celui-ci à + 2-8°C au sec avec des dessiccants à l'intérieur.
- La stabilité des disques, de cartouches ouvertes placées dans des distributeurs a été validée en conditions de routine pendant 6 semaines.

II.4.3 Technique de réalisation de l'antifongigramme par diffusion en milieu gélosé:

Préparation de l'inoculum : Les suspensions d'inoculum fongique sont préparées dans une solution saline stérile à partir des colonies de *Candida* prélevés sur les cultures pures de 24 à 48 h à 37 °C sur le milieu Sabouraud chloramphénicol. La densité de l'inoculum est ajustée à celle de l'étalon 0,5 McFarland en y ajoutant soit le fragment de colonie, soit l'eau physiologique ; une öse calibrée, prélevée à partir d'une colonie isolée est mise en suspension dans 10 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension qui correspond à 10^6 levures/ml est bien homogénéisée. Une dilution au 1/10 de cette suspension est effectuée en introduisant 1 ml (20 gouttes de pipette Pasteur) dans 9 ml d'eau distillée stérile, afin d'obtenir une suspension finale correspondant à 10^5 levures par ml environ. L'inoculum doit aboutir à permettre la croissance de la plupart des souches des espèces de *Candida*. L'utilisation d'un inoculum standardisé est très importante.

L'inoculum trop lourd rend la lecture des zones d'inhibition pour les Imidazolés/azolés difficiles.

Ensemencement et dépôt des comprimés et des disques : L'ensemencement est fait par écouvillonnage (OMS /CLSI) : un écouvillon stérile sec est trempé dans la suspension, toute la surface de la boîte de pétri estensemencée en stries à trois reprises et enfin l'écouvillon est passé sur le bord de la gélose, l'excès de liquide de l'écouvillon est éliminé en pressant l'écouvillon ou en les faisant enrouler contre les parois du tube au dessus du niveau du liquide. Une répartition uniforme de l'inoculum est réalisée. Les boîtes sont laissées sécher pendant 15 à 30 min à température ambiante (pré-diffusion des antifongiques) avant incubation, le couvercle étant ouvert pour permettre l'absorption d'excès d'humidité de la surface de boîte, après les comprimés Neo-sensitabs et les disques Bio-rad® sont déposés à l'aide d'une paire de pinces stériles en respectant 25 à 30 mm entre les disques ou les comprimés. Il a été appuyé doucement sur chaque disque ou comprimé pour assurer un contact uniforme avec le milieu.

L'incubation : Les boîtes à incuber sont mises à l'étuve à 37°C 15 minutes après l'application des disques et des comprimés.



Figure 9: Incubation des milieux de culture dans l'étuve [Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV]

La lecture : Les diamètres de zones d'inhibitions sont mesurés à partir du moment où il y a eu une réduction importante de la croissance après 24 à 48h d'incubation. Les résultats sont interprétés en fonction des diamètres critiques figurant dans des tableaux (4,5 et 6) d'interprétation fournis par les fabricants. Le spectre de sensibilité des souches de *Candida* à six antifongiques testés est aussi déterminé par les deux tests.

LA LECTURE DES ZONES D'INHIBITION : Pour une meilleure lecture, les boîtes sont maintenues au-dessus d'un fond noir non réfléchissant qui est éclairé par la lumière réfléchie.

Tableau 4 : Interprétation de l'antifongigramme sur Comprimé Neo-Sensitabs

Ref.	Comprimé Neo- Sensitabs	Char ge	Code	Limites acceptables des diamètres de la zone d'inhibition en mm			Break-points CMI mg/ml	
				S	I	R	S	R
82512	Fluconazo le	25 µg	FLUC Z	≥ 19	18 – 15 (DD)	≤14	≤ 8	≥ 64
82312	Voriconaz ole	1 mg	VOR. 1	≥ 17	16 – 14(DD)	≤13	≤1	≥ 4
81012	Amphotéri cine B	10 mg	AMPH	≥ 15	14 – 10	≤10	≤1	≥ 2
81812	Itraconazo le	10 µg	ITRA C	≥ 23	22 – 14 (DD)	≤13	≤0.12	≥ 1
81912	Ketoconaz ole	15 µg	KETO C	≥ 28	27 – 21	≤20	≤0.12	≥ 0.5
82412 5	Caspofun gine*	5 µg	CASP 5	≥ 16	15 – 13	≤1 2	≤0.25	≥ 1
82612 N	Posaconaz ole	5 µg	POSA C	≥ 17	16 – 14(DD)	≤13	≤1	≥ 4

DD = dose dépendante, S=Sensible, I=Intermédiaire, R=Résistant

Tableau 5 : Tableau d'interprétation de la méthode Neo-sensitabs® pour les
antifongiques topiques

Sensible	≥ 20 mm	≥ 15 mm	≥ 10 mm
Intermédiaire	12 – 19 mm	10 – 14 mm	-
Résistant	≤ 11 mm	No zone	No zone
	Ciclopirox, Clotrimazole, Econazole, Miconazole, Terbinafine, Fluorocytosine 1µg (Shadomy agar)	Nystatine	Griséofulvine

Tableau 6 : Lecture et interprétation de l'antifongigramme sur disque Bio-rad : La correspondance diamètre/CMI/catégorisation clinique (S, I, R) est indiquée dans le tableau ci-dessous :

	Diamètre de la zone d'inhibition en mm	CMI en µg/ml	Interprétation
Pour les levures (<i>Candida albicans</i> et autres champignons levuriformes)			
5FC1	= 20	1,56	Sensible
	20-10	1,56-25	Intermédiaire
	= 10	25	Résistant
AB100	> 10	< 1	Sensible
	= 10	1	Intermédiaire ou résistant
NY100	>10	-	Sensible
	= 10	-	Résistant
EC50, CTR50, MCZ50, KET50 (imidazolés)	= 20	1,56	Sensible
	20-10	1,56 – 6,4	Intermédiaire
	=10	6,4	Résistant
Pour <i>Aspergillus fumigatus</i>			
5FC1	>10	-	Sensible
	=10	-	Intermédiaire ou résistant

Remarque :

- Pour les souches considérées résistantes (diamètre de la zone d'inhibition inférieur à 10 mm), il est conseillé de réaliser une détermination de la CMI ou d'adresser les souches à un laboratoire de référence en mycologie.
- Pour la 5 fluorocytosine, l'existence possible de petites colonies dans la zone d'inhibition correspond à des mutants résistants.

- Pour les imidazolés, l'évaluation est parfois difficile : certaines souches présentent deux zones d'inhibition :
 - Une grande zone
 - Une zone plus petite avec des petites colonies qui n'apparaissent pas résistantes lorsqu'on évalue à nouveau leur sensibilité.

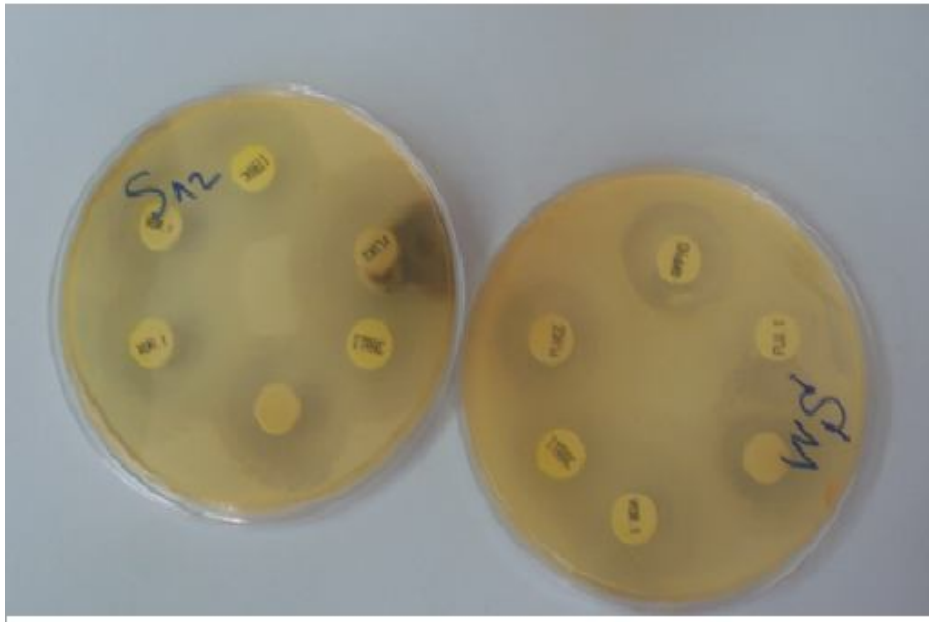


Figure10: Souche S12(*C.tropicalis*) sensible à tous les antifongiques, S11(*C.glabrata*) sensible à tous les antifongiques sauf 5-fluorocytosine.

[Photo du service de parasitologie-mycologie, HMIMV-Rabat]

II.4.4 Les antifongiques testés : Les six antifongiques suivants seront pris en compte dans notre étude :

- Amphotéricine B(AmB)
- Posaconazole(PSZ)
- Voriconazole(VCZ)
- Fluconazole(FCZ)
- Itraconazole(ITR)
- 5-Fluorocytosine (5-FC)



RESULTATS



III. RESULTAT

III.1 REPARTITION GLOBALE DES ESPECES ISOLEES

Après identification, 5 espèces différentes de *Candida* sont isolés: 15 souches de *Candida albicans*, 13 *Candida glabrata*, 5 *Candida tropicalis*, 4 *Candida krusei* et 1 *Candida dubliniensis*. La répartition des souches isolées est illustrée dans les tableaux 7 et 8 et par les figures 11 et 12.

Tableau 7 : Proportion des souches de *Candida albicans* et non *albicans*

Souches	N	%
<i>Candida albicans</i>	15	39,5
<i>Candida non albicans</i>	23	60,5
Totale	38	100

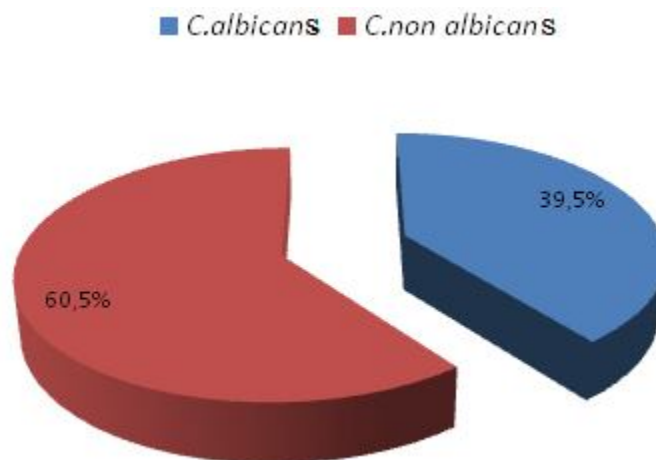


Figure 11:Proportion des espèces de *Candida*

Tableau 8 : Distribution des différentes espèces de *Candida*

Souches	N	%
<i>Candida albicans</i>	15	39
<i>Candida dubliniensis</i>	1	3
<i>Candida glabrata</i>	13	34
<i>Candida krusei</i>	4	11
<i>Candida tropicalis</i>	5	13

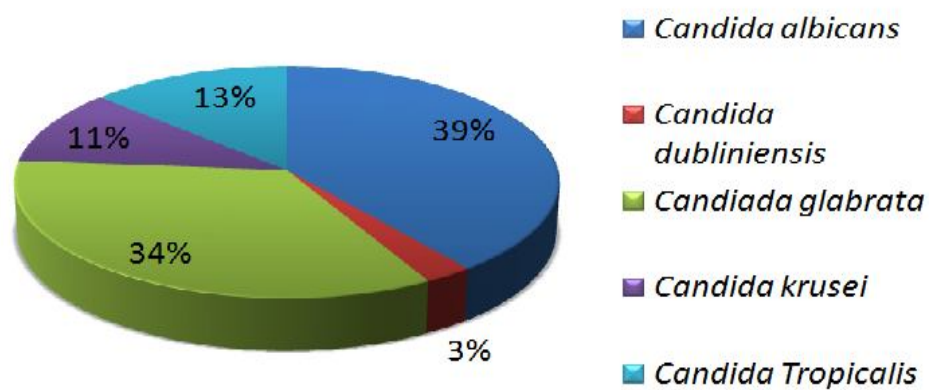


Figure 12:Répartition en fonction en fonction de l'espèce isolée

III.2 ETUDE COMPARATIVE DE DEUX METHODES TESTEES

La variabilité des mesures dépend de l'espèce, de la nature de l'antifongique testé et de la méthode utilisée, c'est pourquoi nous avons présenté des résultats selon l'espèce, l'antifongique et la méthode utilisée.

III.2.1 Tableau des résultats montrant les discordances et les concordances pour chaque souche isolée

Les résultats des 38 souches obtenues avec les différents tests ont été comparés et interprétés de la manière suivante :

Tableau 9 : *Candida albicans*

N°	Disque Bio-rad®						Comprimé Neo-sensitabs®					
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
1	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
2	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
3	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
4	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
5	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
6	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
7	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
8	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S
9	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
10	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
11	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R
12	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
13	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S
14	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S
15	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S

Discordance



Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur
disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

Tableau 10: *Candida dubliniensis*

N°	Disque Bio-rad®						Comprimé Neo-sensitabs®					
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
1	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S

Tableau 11 : *Candida glabrata*

N°	Disque Bio-rad®						Comprimé Neo-sensitabs®					
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
1	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S
2	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
3	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
4	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
5	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
6	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
7	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
8	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
9	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
10	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S
11	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
12	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S
13	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur
disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

Tableau 12: *Candida krusei*

N°	Disque Bio-rad®						Comprimé Neo-sensitabs®					
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
1	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
2	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
3	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S
4	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S

Tableau 13 : *Candida tropicalis*

N°	Disque Bio-rad®						Comprimé Neo-sensitabs®					
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
1	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
2	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
3	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur
disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

Tableau 14:Tableau de discordance entre les deux tests

DISCORDANCE													
N°	Souches	5-FC		ITR		FCZ		PSZ		VCZ		AmB	
		Bio R	Ne os	Bio R	Ne os	Bio R	Ne os	Bio R	Ne os	Bio R	Ne os	Bio R	Ne os
1	<i>C.albicans</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
2	<i>C.glabrata</i>	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S
3	<i>C.glabrata</i>	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
4	<i>C.glabrata</i>	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
5	<i>C.glabrata</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	<i>C.glabrata</i>	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
7	<i>C.glabrata</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	<i>C.krusei</i>	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
9	<i>C.krusei</i>	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
10	<i>C.Tropicalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
11	<i>C.Tropicalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
12	<i>C.Tropicalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
13	<i>C.Tropicalis</i>	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Au total nous avons 15 discordances

III.2.2 Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs selon l'espèce de *Candida*

Tableau 15: Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs pour *candida albicans*

<i>Candida albicans</i>						
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
%Concordance	100	100	100	100	93,3	100
%Discordance	-	-	-	-	6,7	-

Tableau 16: Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs pour *candida dubliniensis*

<i>Candida dubliniensis</i>						
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
%Concordance	100	100	100	100	100	100
%Discordance	-	-	-	-	-	-

Tableau 17: Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs pour *candida glabrata*

<i>Candida glabrata</i>						
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
%Concordance	69,2	100	92,3	84,6	100	100
%Discordance	30 ,8	-	7,7	15,4	-	-

Tableau 18: Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs pour *candida krusei*

<i>Candida krusei</i>						
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
%Concordance	50	100	100	100	100	100
%Discordance	50	-	-	-	-	-

Tableau 19: Pourcentages de concordance et discordance entre disque Bio-rad et comprimé Neo-sensitabs pour *candida tropicalis*

<i>Candida tropicalis</i>						
	5-FC	ITR	FCZ	PSZ	VCZ	AmB
%Concordance	20	100	100	100	100	100
%Discordance	80	-	-	-	-	-

Tableau 20: Proportion de concordance et discordances entre les 2 techniques pour chaque souche de candida étudiée

<i>Candida sp.</i>	CONCORDANCE		DISCORDANCE	
	Nombre	%	Nombre	%
<i>C.albicans</i>	89	99,9	1	0,1
<i>C.dubliniensis</i>	6	100	0	0
<i>C.glabrata</i>	70	87,75	8	10,3
<i>C.Krusei</i>	22	91,7	2	8,3
<i>C.tropicalis</i>	25	83,3	5	16,7

III.2.3 Répartition de la sensibilité des antifongiques en fonction du test utilisé

Nous avons testé la sensibilité des souches de tester vis-à-vis des six antifongiques suivants : 5-fluorocytosine, fluconazole et itraconazole, posaconazole, voriconazole, amphotéricine B.

Le pourcentage de réponses « sensible », « intermédiaire » et « résistante » en fonction de méthode utilisée pour chaque antifongique est représenté dans les tableaux 21-27 et par les figures 13-19.

Tableau 21: Taux de sensibilité au 5- fluorocytosine des différentes espèces de *Candida* isolées en fonction du test utilisé

Souches	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEO-SENSITABS			
	S		R		S		R	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C.albicans</i>	0	0	15	100	0	0	15	100
<i>C.dubliniensis</i>	0	0	1	100	0	0	1	100
<i>C.glabrata</i>	4	30,8	9	69,2	0	0	13	100
<i>C.Krusei</i>	4	100	0	0	2	50	2	50
<i>C.tropicalis</i>	5	100	0	0	1	20	4	80

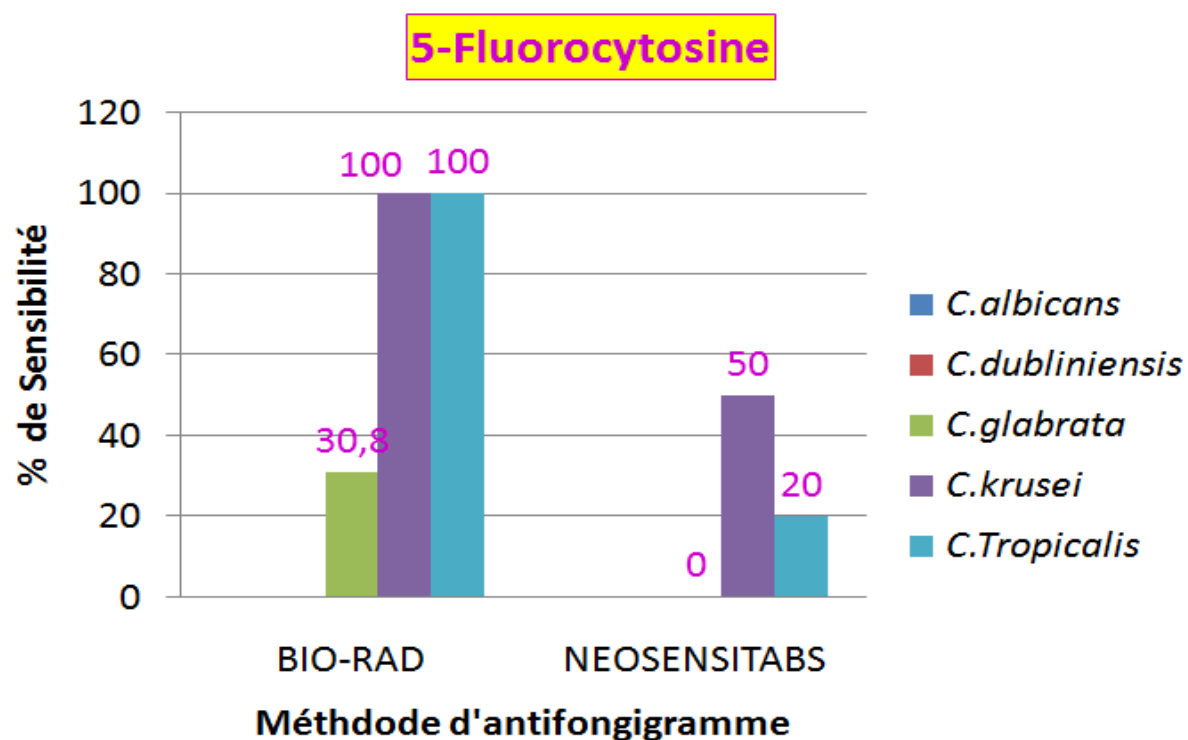


Figure 13: Répartition de la sensibilité de 5-fluorocytosine en fonction du test utilisé

Tableau 22 : Taux de sensibilité à l'itraconazole des différentes espèces de *Candida* isolées en fonction du test utilisé

Souches	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEOSENSITABS			
	S		R		S		R	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C.albicans</i>	0	0	15	100	0	0	15	100
<i>C.dubliniensis</i>	0	0	1	100	0	0	1	100
<i>C.glabrata</i>	7	53,8	6	46,2	7	53,8	6	46,2
<i>C.Krusei</i>	4	100	0	0	4	100	0	0
<i>C.tropicalis</i>	5	100	0	0	5	100	0	0

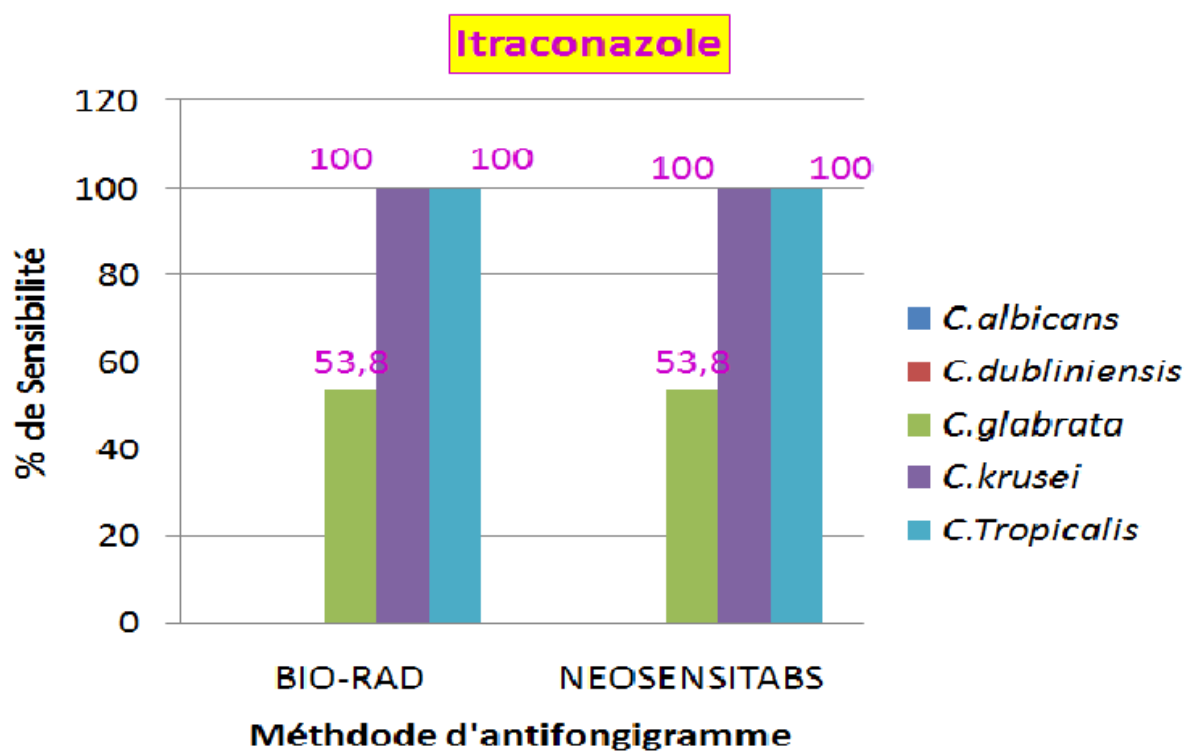


Figure 14 : Répartition de la sensibilité à l'itraconazole en fonction du test utilisé.

Tableau 23: Taux de sensibilité au fluconazole des différentes espèces de *Candida* isolées en fonction du test utilisé.

Souches	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEOSENSITABS			
	Sensible		Résistante		Sensible		Résistante	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C.albicans</i>	0	0	15	100	0	0	15	100
<i>C.dubliniensis</i>	0	0	1	100	0	0	1	100
<i>C.glabrata</i>	12	92,3	1	7,7	11	84,6	2	15,38
<i>C.Krusei</i>	0	0	4	100	0	0	4	100
<i>C.tropicalis</i>	5	100	0	0	5	100	0	0

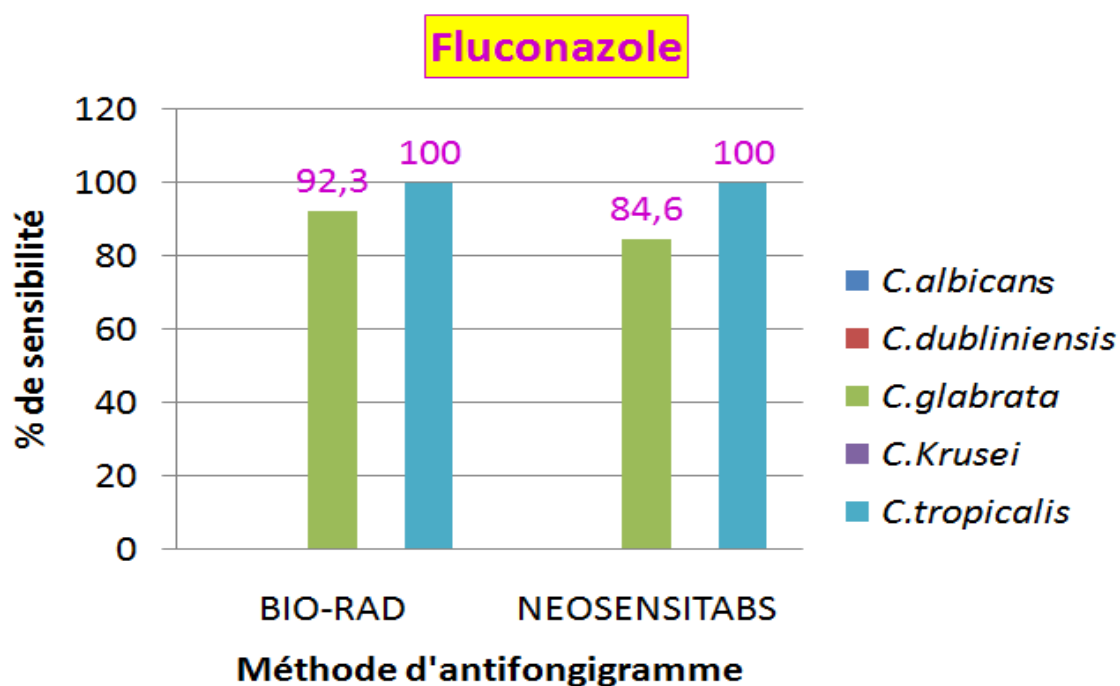


Figure 15 : Répartition de la sensibilité du fluconazole en fonction du test utilisé.

Tableau 24 : Taux de sensibilité au posaconazole des différentes espèces de *Candida* isolées en fonction du test utilisé.

Souches	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEOSENSITABS			
	S		R		S		R	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C.albicans</i>	2	13,3	13	86,7	2	13,3	13	86,7
<i>C.dubliniensis</i>	1	100	0	100	1	100	0	100
<i>C.glabrata</i>	13	100	0	0	11	84,6	2	15,4
<i>C.Krusei</i>	4	100	0	0	4	100	0	0
<i>C.tropicalis</i>	5	100	0	0	5	100	0	0

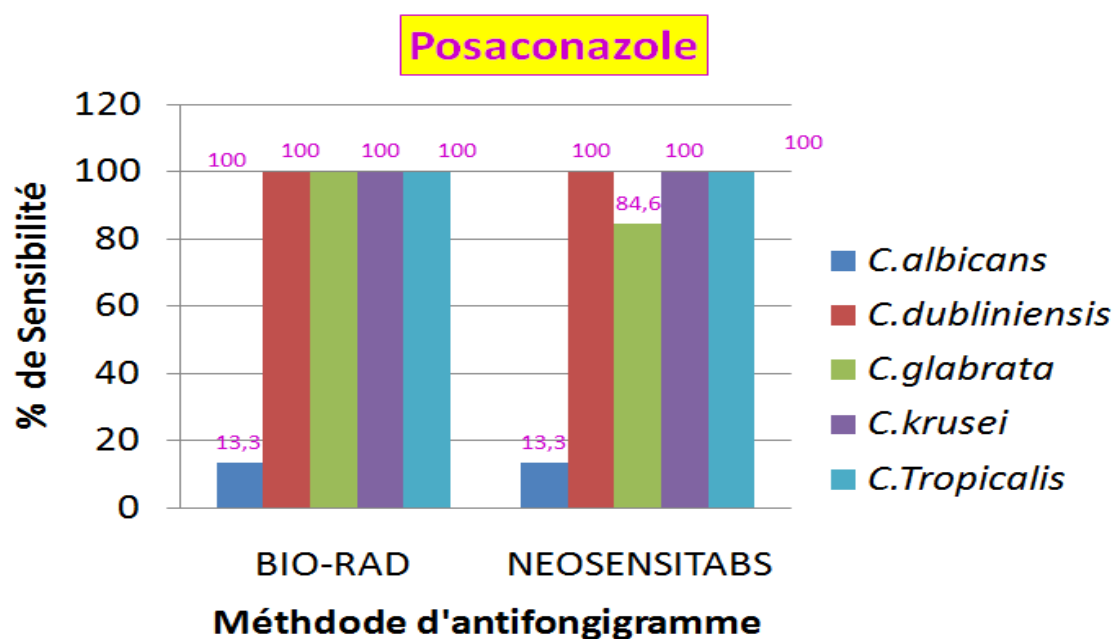


Figure 16 : Répartition de la sensibilité du posaconazole en fonction du test utilisé.

Tableau 25 : Taux de sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* isolées en fonction du test utilisé.

Souches	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEOSENSITABS			
	S		R		S		R	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C.albicans</i>	7	46,7	8	53,3	8	53,3	7	46,7
<i>C.dubliniensis</i>	1	100	0	0	1	100	0	0
<i>C.glabrata</i>	13	100	0	0	12	92,3	1	7,7
<i>C.Krusei</i>	4	100	0	0	4	100	0	0
<i>C.tropicalis</i>	5	100	0	0	5	100	0	0

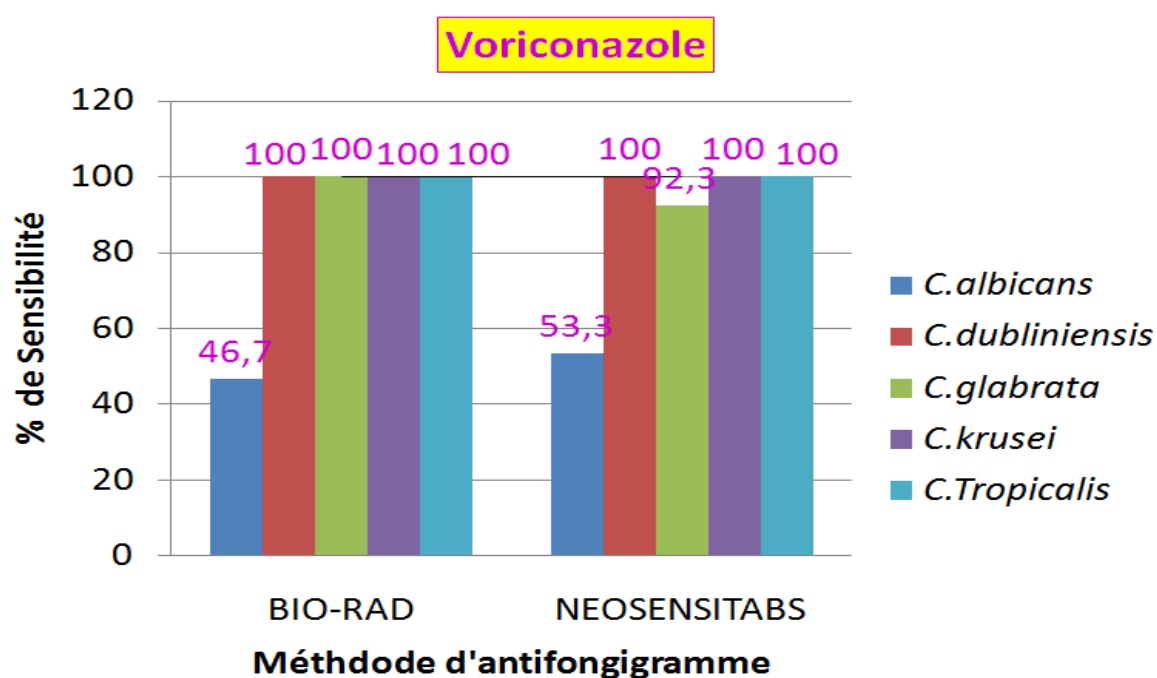


Figure 17 : Répartition de la sensibilité du voriconazole en fonction du test utilisé.

Tableau 26 : Taux de sensibilité à l'amphotéricine B des différentes espèces de Candida isolées en fonction du test utilisé.

Souches	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEOSENSITABS			
	S		R		S		R	
	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>C.albicans</i>	14	93,3	1	6,7	14	93,3	1	6,7
<i>C.dubliniensis</i>	1	100	0	0	1	100	0	0
<i>C.glabrata</i>	13	100	0	0	13	100	0	0
<i>C.Krusei</i>	4	100	0	0	4	100	0	0
<i>C.tropicalis</i>	5	100	0	0	5	100	0	0

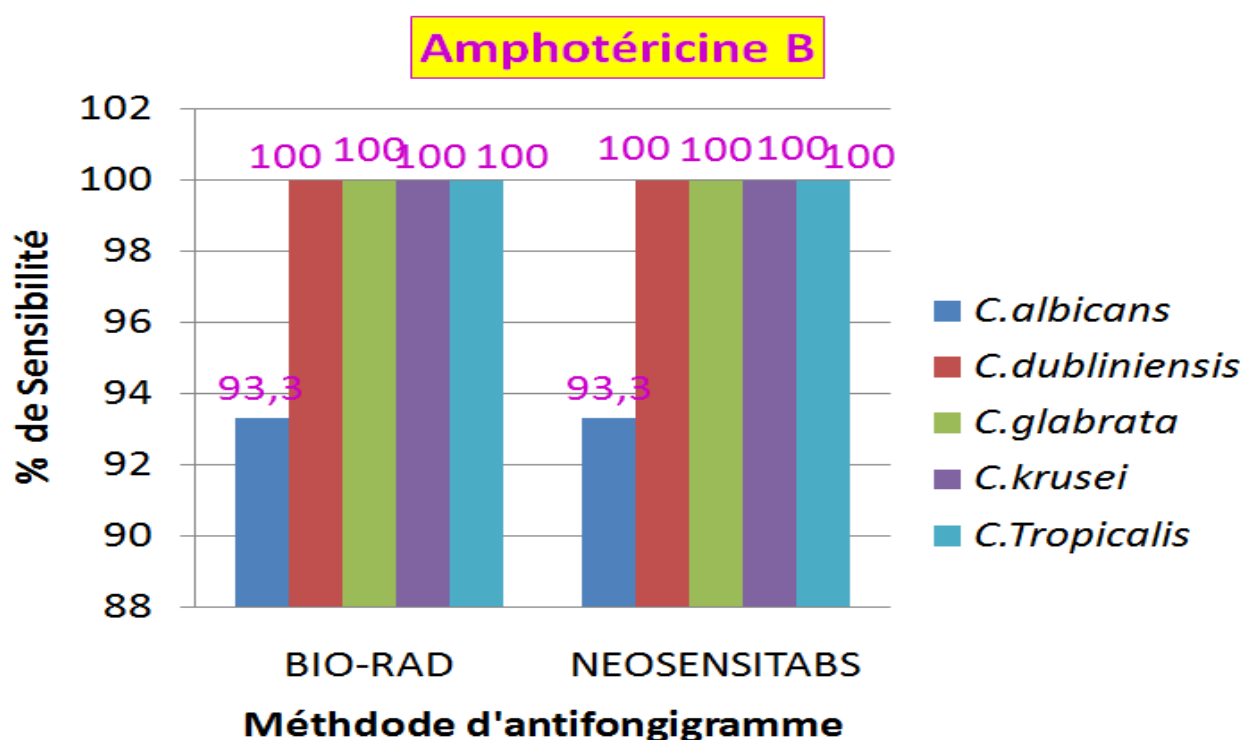


Figure 18 : Répartition de la sensibilité à l'Amphotéricine B en fonction du test utilisé

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur
disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

Tableau 27 : Taux de sensibilité aux antifongiques pour chaque test utilisé.

ANTIFONGIQUES	DISQUE BIO-RAD				COMPRIME NEO-SENSITABS			
	Sensible		Résistant		Sensible		Résistant	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Flucytosine	13	34,2	25	65,8	3	7,9	35	92,1
Itraconazole	16	40,1	22	57,9	16	40,1	22	57,9
Fluconazole	17	44,1	21	57,9	16	40,1	22	57,9
Posaconazole	25	65,8	13	34,2	23	60,53	15	39,47
Voriconazole	34	89,47	4	10,53	32	84,2	6	15,8
Amphotéricine	37	97,3	1	2,7	37	97,3	1	2,7

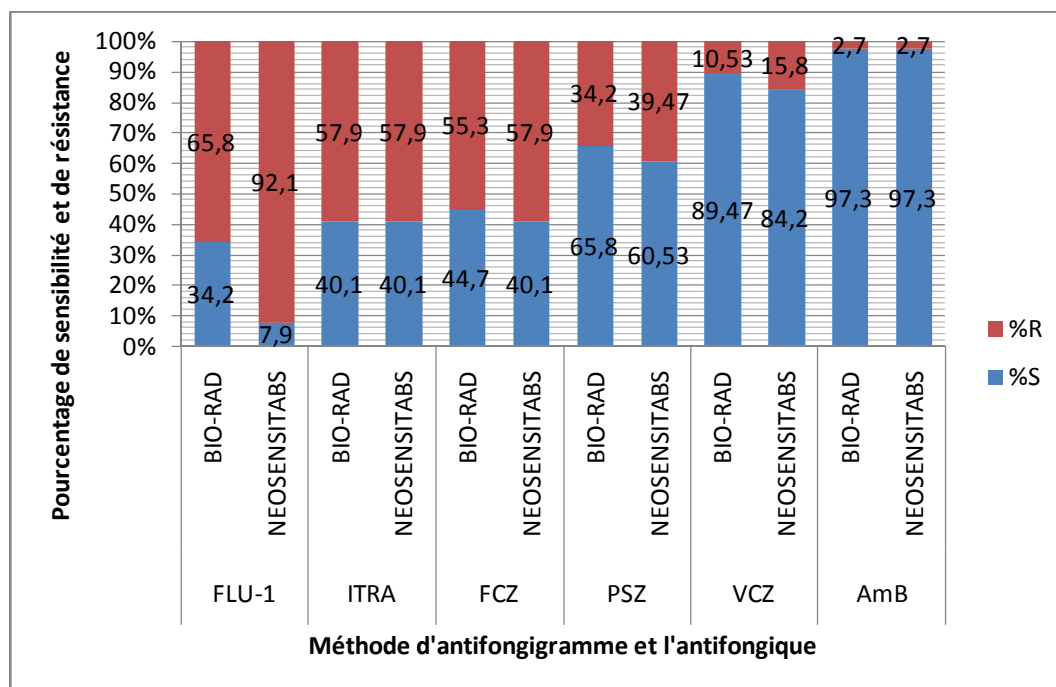


Figure 19 : Profil de sensibilité aux antifongiques pour chaque test utilisés.

III.1 Pourcentage de concordance et de discordance entre les deux techniques selon l'antifongique utilisé.

Tableau 28 : Proportion de concordance et discordances entre les 2 techniques pour chaque antifongique testé.

ANTIFONGIQUES	CONCORDANCE		DISCORDANCE	
	N	%	N	%
5-Fluorocytosine	28	73	10	27
Itraconazole	38	100	0	0
Fluconazole	37	97,4	1	2,6
Posaconazole	36	94,7	2	5,3
Voriconazole	36	94,7	2	5,3
Amphotéricine B	38	100	0	0



DISCUSSION



IV. DISCUSSION

Généralités: Les levures, essentiellement représentées par les *Candida*, sont des micro-organismes commensaux, endo- ou exogènes, diversement adaptés au parasitisme et dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisant, dits « facteurs de risque », locaux ou généraux. Les levures sont donc dans leur grande majorité des infections opportunistes dont les causes sont excessivement variées. La multiplicité de ces causes est en grande partie responsable des problèmes de définition, de diagnostic et de traitement rencontrés avec les levures. La seule présence de ces germes n'est pas synonyme de maladie, car l'isolat responsable de l'infection est le plus souvent celui que le malade héberge spontanément. Le spectre des symptômes rencontrés varie considérablement, de la candidose cutanée d'une grande fréquence en pratique de ville à la candidose disséminée rencontrée chez les patients hospitalisés cumulant de nombreux facteurs de risque et dont le pronostic est particulièrement sombre. Cette dernière est le prototype de l'infection nosocomiale, car résultant des traitements médicochirurgicaux de plus en plus spécialisés dispensés à l'hôpital chez des patients de plus en plus fragiles. Pour harmoniser sa prise en charge, des définitions qui intègrent chez des patients avec des facteurs de risque des critères cliniques, radiologiques et microbiologiques ont été proposées [20].

Sur le plan diagnostique, des progrès récents permettent une meilleure identification des espèces impliquées, ainsi qu'une plus grande rapidité d'obtention des résultats. Les progrès sont plus limités pour différencier colonisation et infection car peu de méthodes sont disponibles en routine pour permettre de conclure à la pathogénicité des levures. En revanche, sur le plan thérapeutique, nous sommes définitivement sortis du monopole de l'amphotéricine B déoxycholate pour le traitement des infections fongiques sévères avec la multiplication de formes galéniques nouvelles et la commercialisation de nouvelles classes d'antifongiques.

IV.1 Epidémiologie : Etude de la distribution des espèces de *Candida*

Les données épidémiologiques des infections à *Candida* sont très hétérogènes et dépendent de plusieurs facteurs :

- La zone géographique étudiée
- Le type de population étudiée : âge, pathologies sous-jacentes et facteurs de risques des patients en question

En effet, l'incidence des candidémies augmente avec l'âge [21].

Actuellement *Candida sp.* est la 4ème cause de septicémie nosocomiale aux Etats-Unis [22]. En Europe, celles-ci se situent entre la 6e à la 10e place [23]. En France, un rapport de l'INVS en 2006 basé sur 2337 établissements place *Candida sp.* à la 6e place des hémocultures positives, tout comme en Espagne [24]. En France, le rapport du CNR mycologie de 2009 a estimé l'incidence des candidémies sur Paris à 10.6/100 000, ce qui correspond à 6000 à 7000 cas par an.

Dans notre étude, la répartition des souches isolées montre une prédominance de *Candida non-albicans*(60,5%) par rapport aux *Candida albicans*(39,5%) et on constate une franche émergence d'espèces réputées moins sensibles aux antifongiques (*C.glabrata*, *C.krusei* et *C.dubliniensis* représentant au total 47,4% des espèces isolées). Parmi les 5 espèces différentes de candida isolés ,nous constatons la prédominance de *Candida albicans* ,suivie de *Candida glabrata*(34%), *Candida tropicalis*(13%), puis *Candida krusei* (11%)et finalement *Candida dubliniensis*(3%).

Dans la plupart des études, la distribution des espèces de *Candida* est semblable à celle retrouvée (tableau 29) ; cependant, la fréquence de *C. albicans* (39,5 %) est inférieure à celles d'autres études où elle est de 50-72,6 % [1,25-29] ,une autre particularité de notre étude est la proportion élevée d'infections due à *C. glabrata* (34 %), comparées à une incidence de 8-26,1% rapporté précédemment [1,25,26,28,29] sauf dans l'étude de S. S. Magill et al. réalisée aux Etats-unis [30] où la fréquence de *C.albicans* (36,6%) et *C.glabrata* (34 %) est très proche à celle de notre étude. Pfaller et Diekema ont rapporté une augmentation d'incidence de l'infection de *C. glabrata* entre 1992 et 2002, en particulier aux États-Unis, au Canada et l'Europe [31]. La

proportion d'isolats de *C. tropicalis* a été stable pendant les dix dernières années à environ 9 % [32,33] et 10,9 % dans l'étude du Collège de Bactériologie Virologie et Hygiène(ColBVH). *C. krusei* reste rare avec une incidence environ de 0,6-5,2 % *C.parapsilosis* [1, 25, 26, 28,29] et (3 % dans notre étude). L'incidence de *C. parapsilosis* est d'environ 5-14,4% et nulle dans notre étude. Des grandes variations sont observées selon les sites de prélèvements : la prévalence de *C.parapsilosis* et *C.krusei* est nulle dans le prélèvement vaginal [29] tandis qu'elle est élevée pour les hémocultures [1, 25,26, 28,29].

D'après l'analyse de nos résultats, une seule souche de *candida dubliniensis* a été isolée. *Candida dubliniensis* est une nouvelle espèce identifiée en 1995 dont l'incidence augmente depuis l'apparition du SIDA. Elle partage plusieurs caractères phénotypiques avec *Candida albicans* incluant la capacité de la production des tubes germinatifs et des chlamydospores [34-36]. La distinction entre *Candida dubliniensis* et *Candida albicans* a des implications épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques. La majorité des isolats de *Candida dubliniensis* a été découverte au niveau de la cavité buccale des sujets VIH positifs. Cependant, cette espèce a été isolée récemment dans d'autres sites incluant le poumon, le vagin et le sang, aussi bien chez des VIH positifs que des VIH négatifs. Ceci montre que *Candida dubliniensis* a très probablement les mêmes sites de localisation que *Candida albicans* [34-36].C'est une espèce opportuniste qui peut se développer anormalement lorsque *Candida albicans* est supprimé. Ceci explique sa prédominance chez des VIH positifs traités par le fluconazole à titre prophylactique.

Tableau 29: Epidémiologie : Distribution des espèces de *Candida sp.* selon les différents auteurs

Auteurs	Pays	Période d'observation	% <i>C. albicans</i>	% <i>C. glabrata</i>	% <i>C. parapsilosis</i>	% <i>C. tropicalis</i>	% <i>C. krusei</i>	%Autres <i>Candida</i>	Sites de prélèvements
S. S. Magill et al. [30]	Etats-Unis	2003 - 2004	36,6	34	14,4	9,8	4,6	0,6	Hémoculture
Kalkanci et al. [25]	Turquie	2005	62	8	5	11	0.6	13,4	Hémoculture + Sites périphériques
18^{ème} ECCMID Barcelone [26]	7 pays européens	2005 et 2006	57	17	7,5	4,9	5,2	8,5	Hémoculture + Sites périphériques
J.-P. Talarmin et al. [1]	Ouest de la France	2004	55	19	13	5	4	4	Hémoculture
P.Rieu et al. [28]	France	2004	50	26,1	6,5	10,8	2,2	4,4	Hémoculture
V.Djohan et al. [29]	Côte d'Ivoire	2008	72,6	14,5	0	9,7	0	4	Vaginal
Notre étude	MAROC	2012	39	34	0	13	11	3	Hémoculture + Sites périphériques

Particularités géographiques : Dans le monde, *C. albicans* est l'espèce la plus fréquemment isolée en clinique et plus de 90% des levures isolées appartiennent à 4 espèces : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, et *C. tropicalis* [37,38]. *C. glabrata* est retrouvé en 2^e position en Europe et aux Etats-Unis [39], tandis que dans les régions comme le Brésil, l'Amérique Latine et l'Espagne, *C. parapsilosis* occupe cette 2^e place [6,40-42].

IV.2 Traitement des candidoses invasives par les antifongiques

Les antifongiques sont des substances naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques capables d'inhiber ou d'arrêter la croissance des champignons à différentes concentrations.

Avant tout traitement, il faut diminuer voire supprimer les facteurs favorisants. Ensuite, un antifongique est administré au patient. Ce traitement est délicat car on utilise des produits devant être actifs sur le métabolisme de la cellule, d'où le nombre réduit d'antifongiques à disposition.

Il y a encore quelques années l'arsenal antifongique se résumait à l'unique représentant des polyènes : l'amphotéricine B par voie intraveineuse qui est chef de file chronologique des antifongiques systémiques et les triazolés avec le fluconazole et l'itraconazole. La flucytosine n'étant pas utilisée en monothérapie intervient en tant qu'antifongique d'appoint dans le cadre d'associations le plus souvent avec l'AmB. Jusqu'à ce jour l'AmB reste un antifongique de référence. Or les fréquents effets indésirables de l'AmB désoxycholate obligeant à cesser le traitement offraient peu d'alternatives thérapeutiques, mis à part l'itraconazole sous forme injectable ou le fluconazole dont le spectre ne couvre pas les champignons filamenteux.

La commercialisation de formes lipidiques d'AmB (ABELCET® en 1997, AMBISOME® en 1998), mieux tolérées que l'AmB désoxycholate puis plus récemment du voriconazole en 2002, plus actif que l'AmB dans le traitement des aspergilloses invasives constitue un réel progrès. Le voriconazole

apparaît dorénavant comme le traitement de première intention dans le traitement des aspergilloses invasives.

La mise sur le marché de la caspofungine en 2001 a marqué une nouvelle étape avec l'apparition d'une nouvelle classe d'antifongiques : les échinocandines agissant sur une autre cible que les autres antifongiques disponibles.

IV.2.1 Cibles d'action des antifongiques

Les antifongiques utilisés pour le traitement des mycoses invasives agissent principalement selon quatre mécanismes d'action différents. Nous notons, tout d'abord, les antifongiques qui agissent par altération du fonctionnement de la membrane cellulaire (amphotéricine B); par inhibition de la synthèse de l'ADN et de l'ARN (flucytosine); par inhibition de la synthèse de l'ergostérol nécessaire à la formation de la membrane de la cellule fongique (dérivés azolés); et, finalement, par inhibition de la synthèse des glucans de la paroi cellulaire (échinocandines) [43,44]. Ces mécanismes peuvent être visualisés à la figure 20.

.

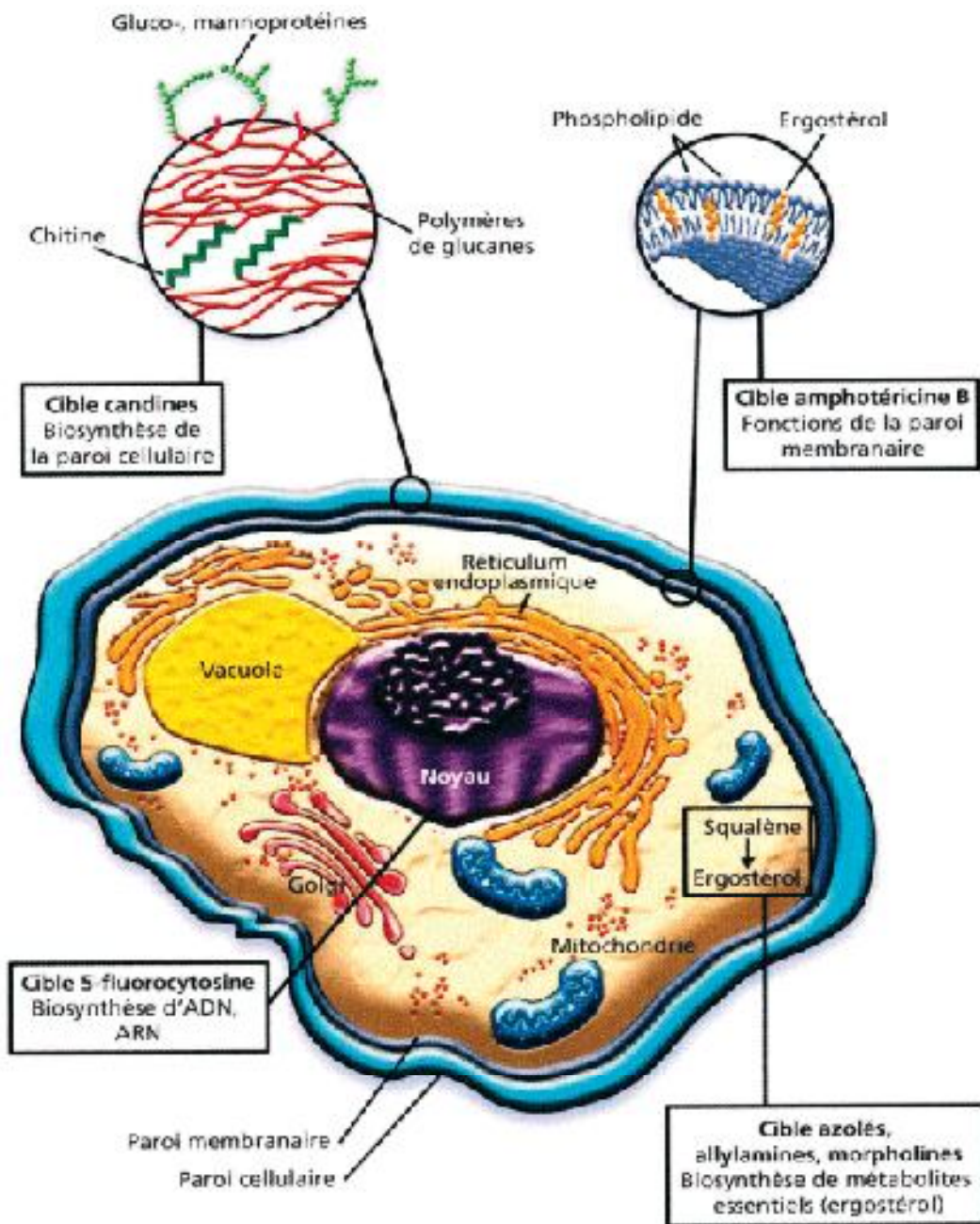


Figure 20 : Cibles des différents antifongiques [45].

Tableau 30 : Propriété fongicide/fongistatique des antifongiques

Polyènes	Fongicide
Echinocandines	Fongicide sur <i>Candida</i> Fongistatique sur <i>Aspergillus</i>
Azols	Fongistatique sur <i>Candida</i> (Voriconazole: fongicide sur <i>C. krusei</i> , <i>A. fumigatus</i>)
5-Fluorocytosine	Fongistatique

IV.2.2 Les classes d'antifongiques

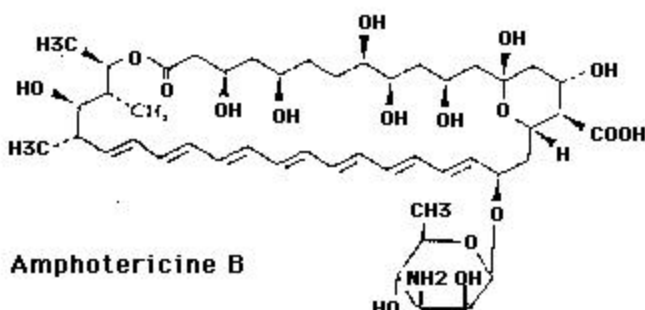
IV.2.2.2 Les Polyènes

Les deux principaux polyènes utilisés sont l'amphotéricine B et la nystatine. Plus de 200 molécules à action antifongiques élaborées par les actinomycètes appartiennent à cette famille.

a) Amphotéricine B

L'amphotéricine B fut isolée en 1956 à partir de *Streptomyces nodosus*.

Structure chimique



➤ **Mécanisme d'action :**

L'Amphotéricine B a une très forte affinité pour l'ergostérol qui est un constituant essentiel de la membrane cellulaire fongique. Cette fixation provoque une augmentation de la perméabilité par la formation de pores, une inhibition de la pompe Na/K. Cela se traduit par une fuite de potassium et une entrée massive de sodium aboutissant à la lyse cellulaire.

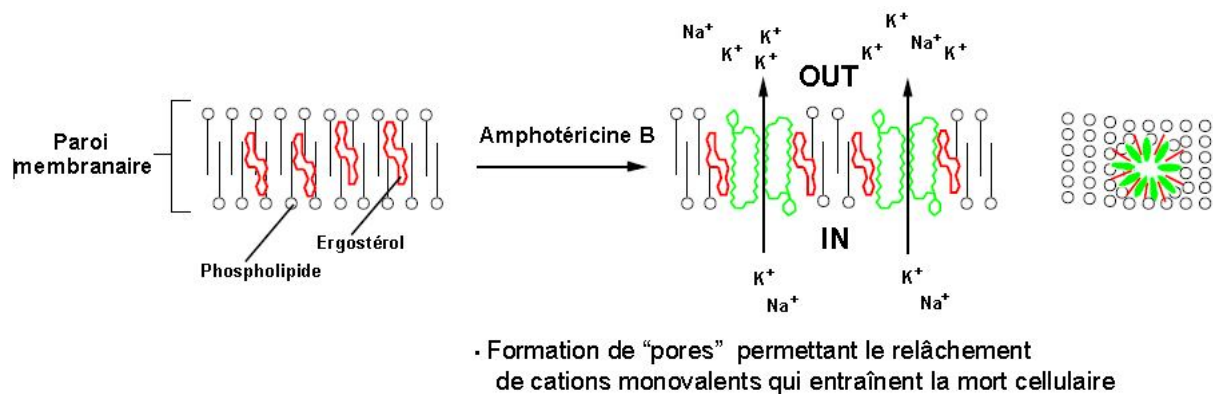


Figure 21: Mode d'action d'amphotéricine B [45]

➤ **Spectre :**

L'AmB présente un spectre très large qui en fait l'antifongique de référence.

Elle est active sur la plupart des *Candida* sp et des *Aspergillus* sp, certains *Candida* tels que *C.lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. guilliermondi*, *C. krusei* sont moins sensibles, de même que *A. terreus*.

D'autres espèces sont sensibles : *Cryptococcus neoformans*, *Absidia* sp, *Basidiobolus* sp, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Conidiobolus* sp, *Histoplasma capsulatum*, *Mucor* sp, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Rhizopus* sp, *Rhodotorula* sp, *Sporothrix schenckii*.

Le spectre inclut également un protozoaire tel que *Leishmania* sp.

La néphrotoxicité de l'AmB limite son utilisation.

La commercialisation des formes lipidiques d'AmB vise à réduire cet inconvénient majeur de l'AmB. Une récente étude démontre que la tolérance de l'AmB désoxycholate peut être considérablement améliorée en perfusant

le médicament sur 24 h au lieu de 4 h [47,48]. Une bonne hydratation doit être assurée.

➤ **Les formes lipidiques d'amphotéricine B :**

La structure de l'AmB comporte un macrocycle polyénique avec 7 doubles liaisons conjuguées qui lui confèrent un caractère hydrophobe et 7 radicaux hydroxyles et un sucre aminé (mycosamine) qui constituent le pôle hydrophile. Cette structure entraîne :

- une insolubilité à pH neutre [49,50] et le recours au désoxycholate qui permet d'obtenir une solution micellaire dans l'eau ou le glucose 5 % ; les micelles ont une taille d'environ 40 nm,

- La possibilité d'incorporer l'AmB dans des excipients lipidiques [51,52].

A ce jour seul deux formes sont développées : l'incorporation dans des liposomes ou l'incorporation à un complexe lipidique. La solubilisation en milieu lipidique permet d'augmenter la capture macrophagique et donc de diminuer la toxicité [50-52]. Le coût de ces formulations, qui permettent l'administration de posologie d'AmB plus importante, est élevé.

* **L'AmB liposomale** (AMBISOME®) : l'AmB est incorporée dans des liposomes unilamellaires constitués de phosphatidylcholine hydrogénée, cholestérol, distéaroyl phosphatidylglycérol dans un rapport de 2/1/0,8. Ce sont des sphères de 80 nm de diamètre.

* **Le complexe lipidique d'AmB** (ABELCET®) : l'AmB est incorporée dans un mélange de deux phospholipides: dimyristoyl phosphatidylcholine et dimyristoyl phosphatidylglycérol selon un ratio 1/3. Les particules forment un ruban de 1 600 à 11 000 nm de long pour une épaisseur de 2,5 nm.

* **Incorporation de l'AmB dans des émulsions lipidiques à 20 %**

L'incorporation de l'AmB dans des émulsions lipidiques à 20 % est interdite par l'AMM, bien que financièrement intéressante, en raison du manque de données quant à la stabilité de la préparation [51]. Il existe quelques études cliniques portant sur de petites séries qui ont démontré une moindre toxicité rénale par rapport à l'AmB désoxycholate [51,52]. L'efficacité clinique est moins bien documentée.

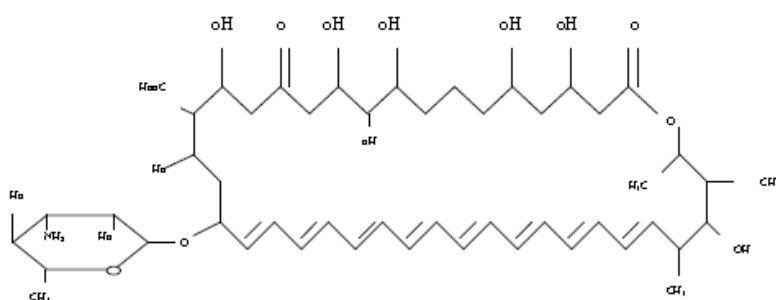
Tableau 31: Indications des différentes présentations d'amphotéricine B injectable

Amphotéricine B désoxycholate FUNGIZONE®	Mycoses systémiques à germes sensibles - Leishmaniose cutanéomuqueuse (en seconde intention car ce n'est pas un médicament de choix en 1ère intention). <i>Posologie</i> 0,5 à 1 mg/kg/j à atteindre progressivement. Certains auteurs la donnent d'emblée.
Amphotéricine B liposomale AMBISOME®	* Traitement des mycoses systémiques et/ou profondes à <i>Aspergillus</i> et <i>Candida</i> chez l'adulte et l'enfant et des cryptococcoses neuroméningées chez le sujet infecté par le VIH : - ayant développé une insuffisance rénale sous amphotéricine B (élévation de la créatininémie au dessus de 220 µmol/l ou abaissement de la clairance de la créatinine au dessous de 25 ml/min), - en cas d'altération préexistante et persistante de la fonction rénale (créatininémie supérieure à 220 µmol/l ou clairance de la créatinine inférieure à 25 ml/min). * Traitement empirique des infections fongiques présumées chez des patients neutropéniques fébriles. Le bénéfice maximal a été observé chez les patients adultes avec une neutropénie supérieure ou égale à 7 jours à partir de l'introduction de l'antifongique, recevant en même temps des médicaments néphrotoxiques. * Traitement des leishmanioses viscérales en cas de résistance prouvée ou probable aux antimonies <i>Posologie</i> : 3 mg/kg/j.
Complexe lipidique d'Amphotéricine B ABELCET®	Traitement des candidoses et des aspergilloses systémiques chez l'adulte et l'enfant : - chez les sujets ayant développé une insuffisance rénale sous amphotéricine B définie par l'élévation de la créatininémie au dessus de 220 µmol/l ou l'abaissement de la clairance de la créatinine au dessous de 25 ml/min, - en cas d'altération préexistante et persistante de la fonction rénale définie par la créatininémie supérieure à 220 µmol/l ou la clairance de la créatinine inférieure à 25 ml/min <i>Posologie</i> : 5 mg/kg/j.

b) Nystatine

La nystatine tire son nom du lieu de sa découverte (New York STATE). Il s'agit d'un tétraène diène et son mode d'action et ses propriétés antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'amphotéricine B. C'est une substance amphotère qui subit une détérioration en milieu acide. Son utilisation topique est présentement limitée à des infections légères à modérées. L'absence d'absorption intestinale et la toxicité en cas d'injection IM ou IV limitent sa prescription aux mycoses cutanées, vaginales et digestives.

Structure chimique :



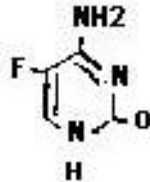
Nystatine (Tétraène)
 $C_{47}H_{75}O_{17}N$ PM 926,1

IV.2.2.3 Flucytosine

Les limites à l'utilisation de la 5-FC sont en rapport avec l'obligation de l'utiliser en association. Les associations avec l'AmB ou les dérivés azolés sont synergiques ou indifférentes [53]. Par ailleurs sa toxicité hématologique constitue un frein à son utilisation chez le patient neutropénique. En pratique ses indications se limitent à certaines localisations comme les infections du système nerveux central, de l'œil, des valves cardiaques, compartiments où les autres antifongiques diffusent mal.

➤ **Structure :**

Flucytosine
5-Fluorocytosine



➤ **Mécanisme d'action :**

La flucytosine est un analogue pyrimidique. Elle agit après conversion en fluorouracile (5FU) grâce à une enzyme : la cytosine désaminase. Le 5FU est inactif en tant que tel. Il doit être transformé en nucléotides pour être actif. Il existe deux voies d'activation :

- transformé en 5-fluorouridine triphosphate, il perturbe la synthèse protéique en s'incorporant à l'ARN à la place de l'uracile.
- transformé en 5-fluorodéoxyuridine monophosphate qui est un puissant inhibiteur de la thymidylate synthétase, il empêche la synthèse d'ADN.

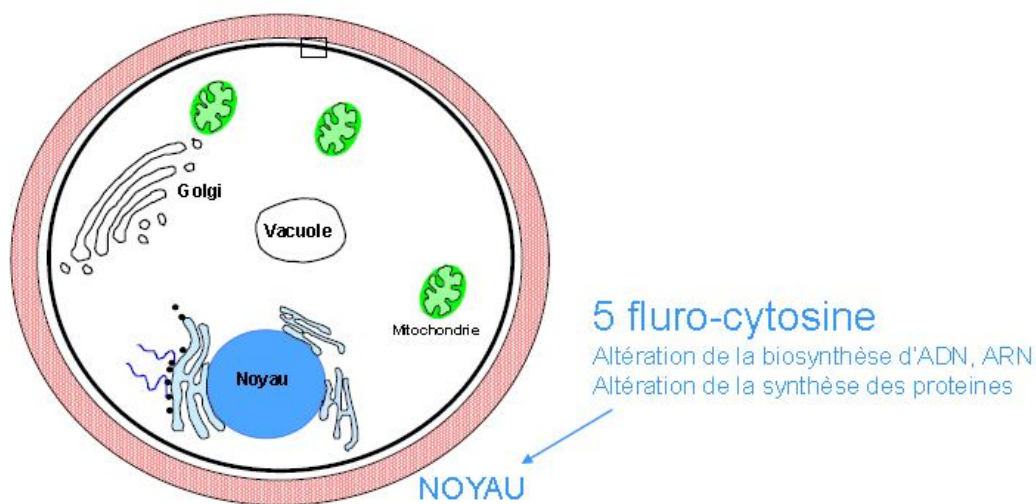


Figure 22: Mode d'action de flucytosine [45]

➤ **Spectre :**

Son spectre couvre essentiellement les levures : *Candida sp* et *Cryptococcus neoformans*. Environ 10 % de *C. albicans* présentent une résistance. Le *Candida tropicalis* présente parfois une résistance à l'encontre de cet antifongique.

IV.2.2.3 Les dérivés azolés

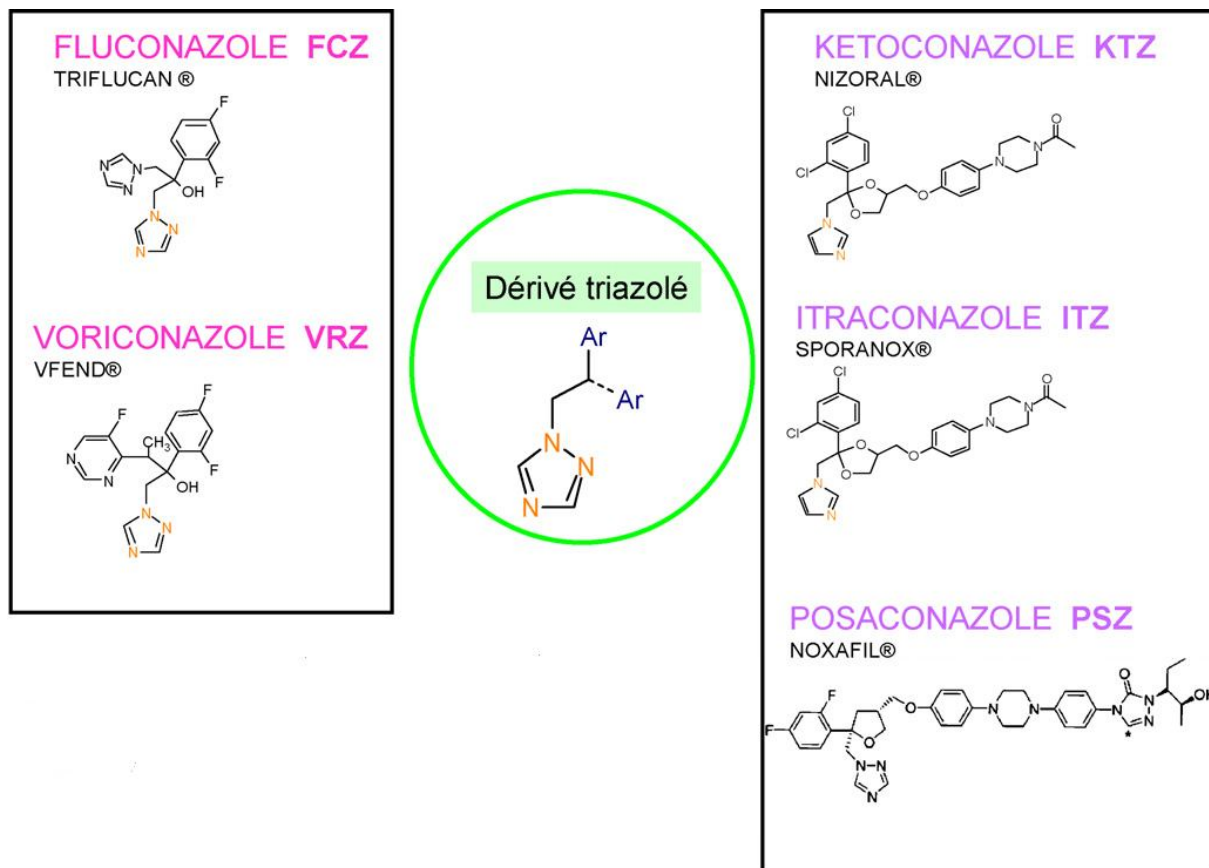
Les dérivés azolés sont caractérisés par la présence d'un noyau azolé, on distingue les imidazolés c'est-à-dire d'un cycle pentavalent comportant deux atomes d'azote et les triazolés contenant trois atomes d'azotes. Les différents radicaux et chaînes latérales qui peuvent venir s'y greffer influencent la pharmacocinétique, voire le spectre d'activité des molécules de cette famille (Carbon *et al.* 1994) [51].

Historiquement, trois générations de dérivés azolés sont reconnues (Grillot et Lebeau, 1999) [52]:

- Les azolés de première génération avec des imidazolés : le clotrimazole, l'énilconazole, le parconazole et le miconazole.
- La seconde génération est représentée par le kétoconazole
- Les triazolés : l'itraconazole, le fluconazole, le voriconazole et le posaconazole constituent la troisième génération.

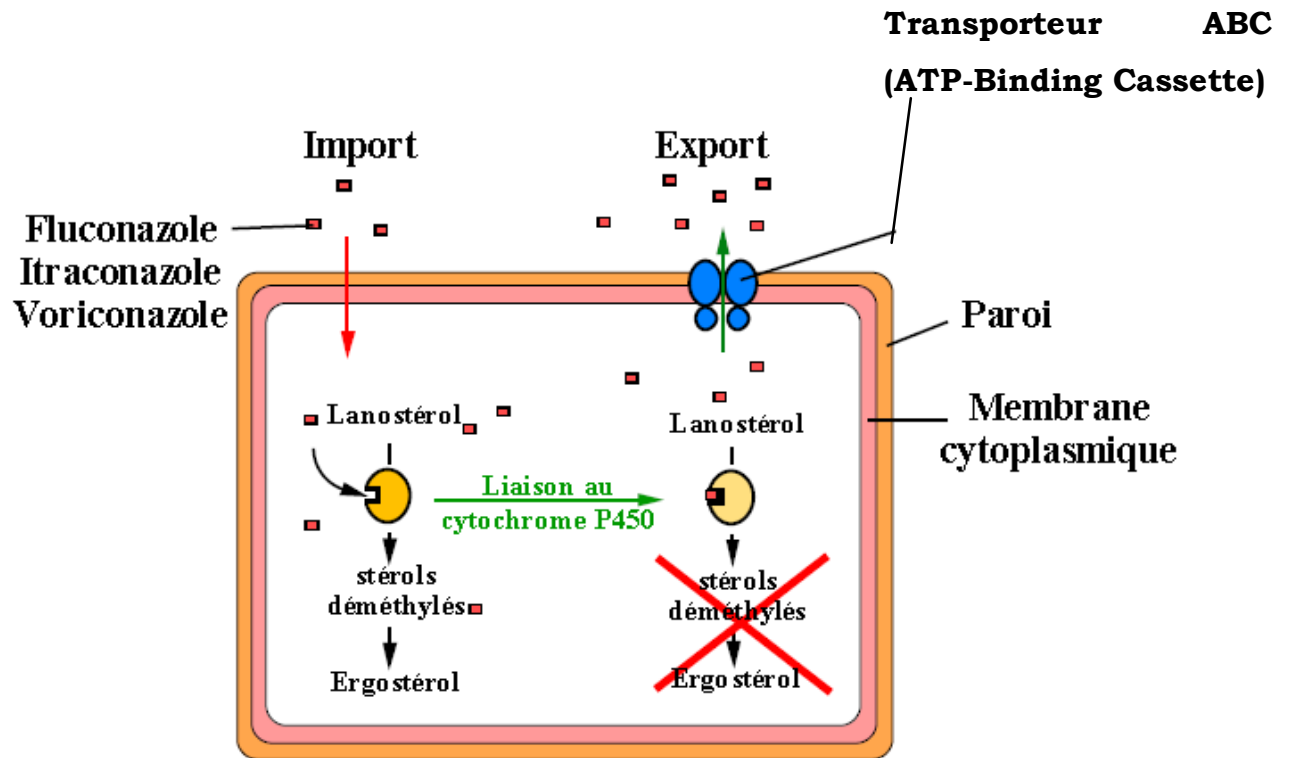
À l'exception du fluconazole, les azolés sont très peu solubles dans l'eau ; ils sont solubles dans les solvants organiques (sauf le miconazole) et généralement lipophiles.

STRUCTURE CHIMIQUES DES DERIVES AZOLES [53]



➤ Mécanisme d'action :

Les dérivés azolés agissent en bloquant une enzyme, la 14- α -déméthylase, par inhibition cytochrome P 450 qui assure la formation de l'ergostérol à partir du lanostérol.



Inhibition de la 14 alpha-déméthylase

(Déplétion d'ergostérol et accumulation de métabolites intermédiaires)

Figure 23 : Mode d'action des antifongiques azolés [45].

Biosynthèse d'ergostérol: une importante cible pour les antifongiques

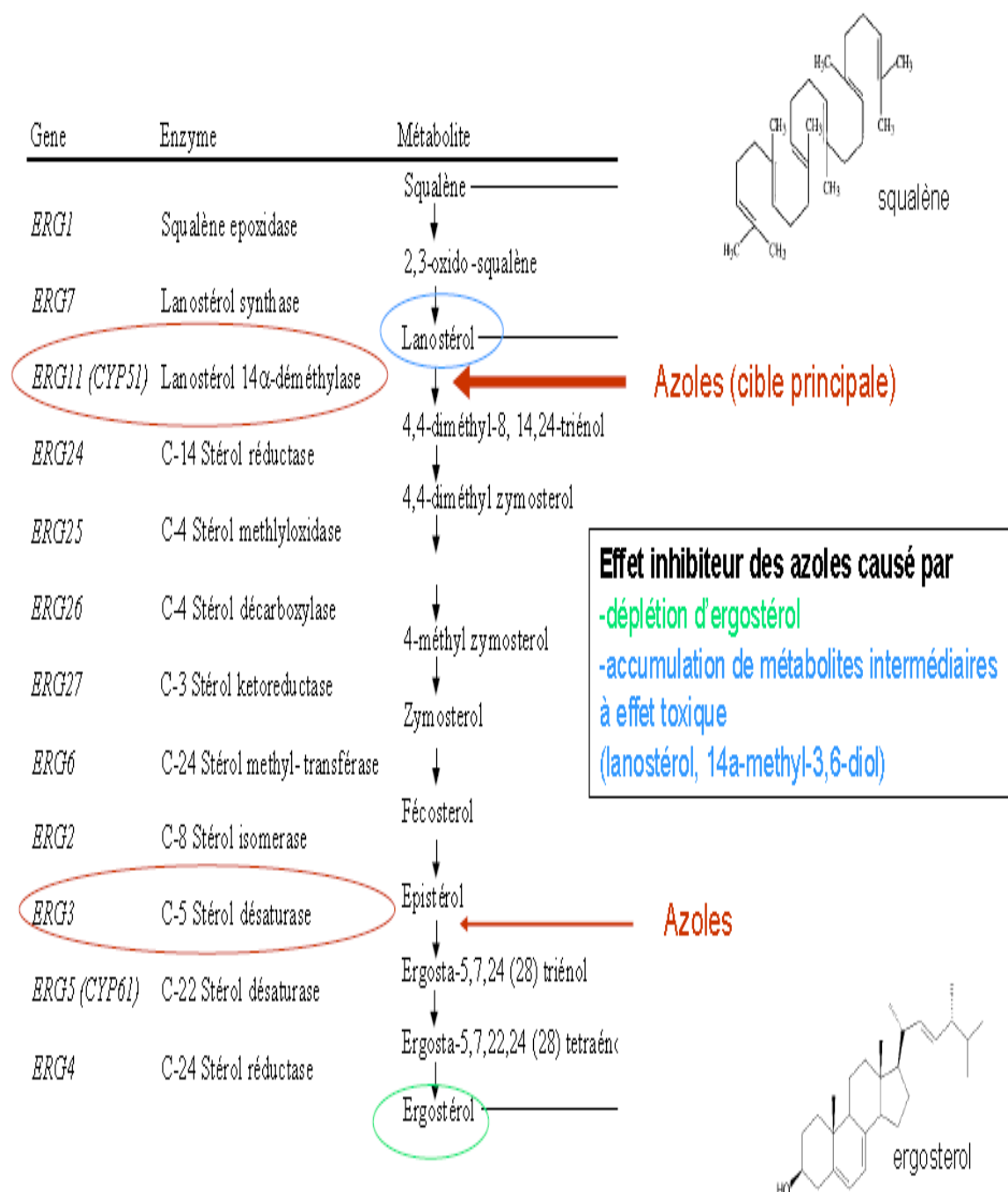


Figure 24 : Cascade métabolique de la synthèse de l'ergostérol à partir de l'acétylcoenzyme A, et lieu d'action des azolés [45].

➤ **Les différents antifongiques azolés :**

*** Kétoconazole**

Le kétoconazole présente un spectre couvrant les levures (*Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*) et les champignons dimorphiques (*Blastomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioïdes*, *Paracoccidioïdes*). Il est actif sur les dermatophytes mais inactif sur les moisissures.

Sa biodisponibilité est augmentée s'il est pris en cours d'un repas. Il présente l'inconvénient majeur d'avoir un puissant effet inhibiteur enzymatique à l'origine de nombreuses interactions médicamenteuses.

*** Fluconazole**

Le fluconazole présente un spectre étroit sur les levures, sauf *C. krusei*, mais il est actif sur tous les autres *Candida* non *albicans* responsables de candidoses disséminées (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*...). L'existence d'une forme injectable et l'excellente biodisponibilité des formes per os font de ce médicament, le traitement de 1ère intention dans les candidoses invasives liées aux espèces sensibles, ainsi qu'un traitement de relais per os appréciable.

L'utilisation large du fluconazole serait à l'origine de l'apparition de résistances de *C. albicans* et *C. glabrata*. Le fluconazole est inactif sur *C. krusei* et sur les moisissures (inconvénient majeur).

Le fluconazole a démontré une efficacité comparable à l'AmB tant chez le sujet neutropénique qu'immunocompétent [54]. Il est hydrosoluble, ce qui lui permet de se concentrer dans le LCR (traitement des cryptococcoses), la salive (traitement des candidoses oropharyngées chez le sidéen), et le rein (traitement des mycoses profondes).

*** Itraconazole**

L'itraconazole présente l'avantage par rapport au kétoconazole d'être actif sur *Aspergillus sp.* Il constitue de ce fait une alternative à l'AmB. Il est efficace grâce à son métabolite, l'OH-itraconazole, en traitement et en prophylaxie. Avant, il était disponible uniquement par voie orale, mais la formulation intraveineuse est également commercialisée actuellement.

*** Voriconazole [55]**

Il s'agit d'un antifongique triazolé à large spectre d'action. C'est un inhibiteur de la synthèse d'ergostérol. Les indications du voriconazole sont les infections fongiques invasives à *Aspergillus*, *Candida*, *Scedosporium*, *Fusarium*. Le voriconazole est apparu plus efficace et mieux toléré que l'amphotéricine B dans le traitement de l'aspergillose invasive.

L'intérêt du voriconazole réside dans l'existence des formes orale et injectable et d'un spectre englobant *C.krusei* résistant au fluconazole.

***Posaconazole [55]**

Il s'agit d'un nouvel antifongique de la classe des azolés. Il s'agit d'un inhibiteur de biosynthèse de l'ergostérol, constituant de la membrane fongique. Il a une activité antifongique à large spectre. Il couvre les levures du genre *Candida*, les moisissures du genre *Aspergillus*, les zygomycètes et le *Cryptococcus neoformans*.

IV.2.2.4 Echinocandines

Caspofungine

Anidulafungine

Micafungine

➤ **Mode d'action** [55]:

L'inhibition de la synthèse de beta 1,3 D-glucane, élément majeur de la structure de la paroi d'un grand nombre de champignons. L'absence de l'enzyme beta 1,3 D-glucane synthase chez les mammifères laisse présager une action très sélective avec un minimum de toxicité lié au mode d'action. Les champignons ayant peu ou pas de beta 1,3 D-glucane dans leur paroi sont résistants : c'est le cas de *Cryptococcus neoformans*, de *Trichosporon sp.* ou de *Rhodotorula sp.*

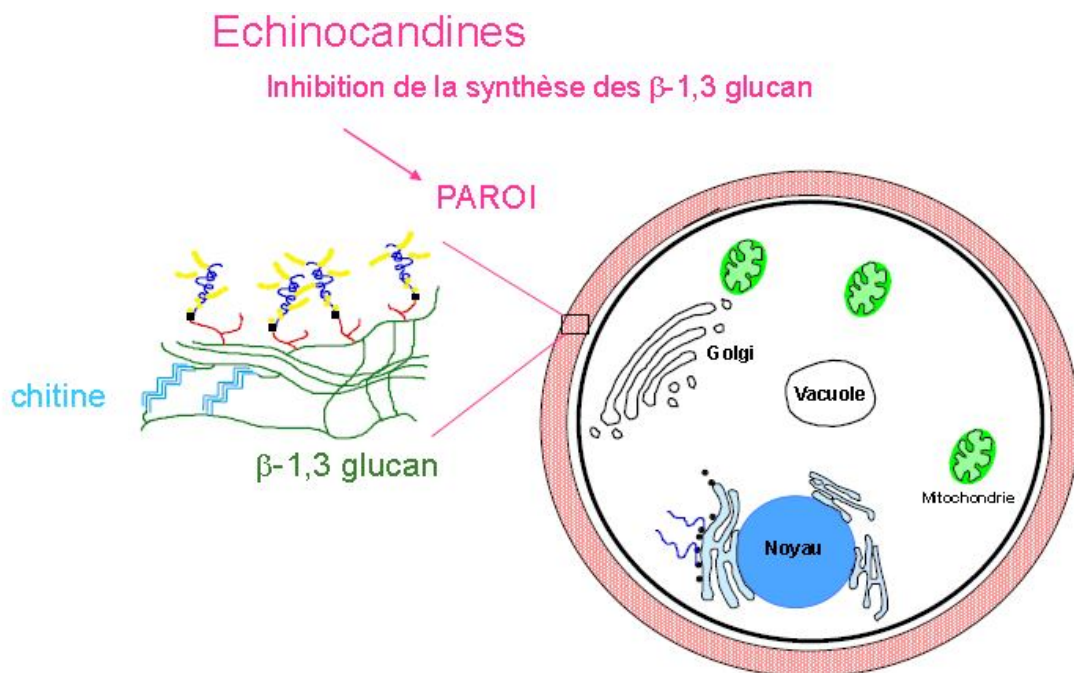


Figure 25: Mode d'action des échinocandines [45]

Tableau 32 : Antifongiques actuellement utilisés dans le traitement des candidoses profondes [46].

CLASSE	DCI	Année AMM
POLYENES	Amphotéricine B	1953
	AmB Lipid Complex	1996
	AmB Colloïd dispersion	1997
	AmB liposomale	1997
PYRIMYDINE	5-fluorocytosine	1957
AZOLES	Fluconazole	1990
	Itraconazole	1992
	Voriconazole	2001
	posaconazole	2006
ECHINOCANDINES	Caspofungine	2002

Tableau 33 : Sensibilité in vitro des espèces *Candida* à différents antifongiques [20, 26, 59,60].

Souches	FCZ	5-FC	ITR	VCZ	AmB	Caspo
C. <i>albicans</i>	S	S/R	S	S	S	S
C. <i>tropicalis</i>	S/SDD	S	S	S	S	S
C. <i>parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S ^c
C. <i>glabrata</i>	SDD/Ra	S	SDD/Ra	S/ SDDa	S/I	S
C. <i>krusei</i>	R	I/R	SDD/R	Sb	S/I	S
C. <i>lusitaniae</i>	S	S	S	S	S/R ^d	S

SDD : sensibilité dose dépendante ; C. : *Candida*.

a. 80 % des *C. glabrata* restent sensibles au fluconazole et à l'itraconazole, et doivent être considérés comme sensibles mais dose-dépendants.

b. Pour *C. krusei*, on n'observe pas de résistance croisée entre le voriconazole et les autres azolés, à l'inverse de *C. glabrata*.

c. La sensibilité in vitro de *C. parapsilosis* est souvent diminuée sans que cela semble avoir de traduction clinique.

d. La présence de stérols particuliers à *C. lusitaniae* explique sa sensibilité moindre à l'amphotéricine B, mais cette résistance n'est pas systématique in vitro.

Tableau 34 : Indications générales des antifongiques impliqués dans le traitement des candidoses invasives [61-64].

Classe thérapeutique	Molécule	Indications
Polyènes	Amphotéricine B	Infections systémiques à <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i>
	Nystatine	Candidoses digestives à l'exclusion de la candidose œsophagienne de l'immunodéprimé, prévention des candidoses chez les sujets à très haut risque
Analogues nucléosidiques	Flucytosine	Mycoses systémiques sévères à <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , chromomycoses en association avec un autre antifongique
Azolés	Fluconazole	Cryptococcoses neuroméningées, candidoses systémiques, candidoses œsophagiennes, candidoses urinaires
	Itraconazole	Mycoses systémiques ou viscérales à <i>Aspergillus</i> , sporotrichoses, chromomycoses, paracoccidioïdomycoses, histoplasmoses, mycoses superficielles
	Kétoconazole	Mycoses systémiques ou viscérales et cutanéomuqueuses à germes sensibles, en traitement curatif ou en prophylaxie. En pratique, le kétoconazole n'est plus prescrit que dans les infections cutanées à <i>Pityriasis versicolor</i>
	Voriconazole	Aspergilloses et candidoses invasives
	Posaconazole	Infections fongiques invasives : aspergilloses invasives, fusarioses, chromoblastomycoses et mycétomes, coccidioïmycoses
Échinocandines	Caspofungine	Candidoses disséminées, aspergilloses invasives

Tableau 35: Les effets indésirables les plus fréquents [61-64].

Classe thérapeutique	Molécule	Effets indésirables fréquents
Polyènes	Amphotéricine B	• Altération de la fonction rénale • Troubles du système nerveux (vertiges, céphalées, neuropathies périphériques, etc.) • Troubles de l'état général (frissons, fièvres, amaigrissement, etc.) • Troubles musculosquelettiques (myalgie, arthralgie, etc.)
Analogues nucléosidiques	Flucytosine	• Troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, etc.) • Troubles hématologiques : plus fréquents chez les insuffisants rénaux
Azolés	Fluconazole	• Troubles digestifs (nausées, douleurs abdominales, diarrhées, etc.) • Troubles cutanés (rash, toxidermie bulleuse, réaction anaphylactique, etc.)
	Itraconazole	• Troubles digestifs (dyspepsies, vomissements, diarrhées, constipation, etc.)
	Kétoconazole	• Troubles digestifs (nausées, douleurs abdominales, diarrhées, etc.)
	Voriconazole	• Troubles de la vision • Fièvre • Troubles hépatiques • Éruption cutanée • Troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales) • Céphalées • Œdèmes périphériques
Échinocandines	Caspofungine	• Troubles digestifs (douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhées, etc.) • Fièvre • Céphalées • Bouffées vasomotrices • Phlébites • Anémie • Troubles cutanés (rash, prurit, etc.)

Tableau 36 : Interactions médicamenteuses de l'amphotéricine B et de la caspofungine [61-64].

ANTIFONGIQUES	MÉDICAMENT	EFFET DE L'INTERACTION	CONDUITE À SUIVRE
Amphotéricine B	Aminosides	↗néphrotoxicité	Surveiller Cr, K, Mg et dosages de l'aminoside
	Cisplatine	↗ néphrotoxicité	Surveiller Cr, bonne hydratation
	Corticostéroïdes	↗hypokaliémie	Surveiller K
	Cyclosporine	↗néphrotoxicité	Surveiller Cr, K, Mg, dosages de Cyclosporine, considérer préparation lipidique ou liposomale d'AmB
	Digoxine	↗cardiotoxicité	Surveiller K, digoxinémie
	Diurétiques	↗hypokaliémie	Surveiller K
	Pentamidine	↗néphrotoxicité	Surveiller Cr
	Relaxants musculaires	↗cardiotoxicité	Surveiller les signes d'apnée
	Tacrolimus	↗néphrotoxicité	Surveiller Cr, K, Mg, dosages de tacrolimus, considérer préparation lipidique ou liposomale d'AmB
	Transfusions de GB	↗Toxicité pulm. aiguë	—
	Vancomycine	↗néphrotoxicité	Surveiller Cr, dosages de vancomycine
Caspofungine	Activateurs de la clairance médicamenteuse (efavirenz, rifampicine)	↓conc. caspofongine	↗dose de caspo à 70 mg die si aucune réponse
	Cyclosporine	↗conc. Caspofongine (AST, ALT)	Surveiller les enzymes hépatiques Hépatotoxicité possible
	Tacrolimus	↗conc. tacrolimus	Dosage de tacrolimus

↗ : augmentation, conc : concentration, GB : globule blanc, pulm : pulmonaire.

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur
disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

Tableau 37: Association contre-indiquées des dérivés azolés [61-64]

Antifongique azolé	Substrat Contre-indications
Fluconazole	Cisapride, pimozide, halofantrine : risque majoré de troubles du rythme ventriculaire, notamment de torsades de pointes.
Itraconazole	Cisapride, pimozide, halofantrine, bépridil, mizolastine, sertindole : risque majoré de troubles du rythme ventriculaire, notamment de torsades de pointes. Atorvastatine, simvastatine : risque majoré d'effets indésirables (concentration-dépendants) à type de rhabdomyolyse (diminution du métabolisme hépatique). Vardénafil, chez l'homme de plus de 75 ans : augmentation très importante des concentrations plasmatiques de vardénafil, avec risque d'hypotension sévère.
Kétoconazole	Cisapride, bépridil, pimozide mizolastine antihistaminiques H1 non sédatifs (astémizole, terfénadine) : risque majoré de troubles du rythme ventriculaire, notamment de torsades de pointes. Névirapine : augmentation des concentrations plasmatiques de névirapine par diminution de son métabolisme hépatique par le kétoconazole, d'une part, et diminution des concentrations plasmatiques du kétoconazole par augmentation de son métabolisme hépatique par la névirapine, d'autre part. Triazolam : augmentation des concentrations plasmatiques de la benzodiazépine par diminution de son métabolisme hépatique avec majoration importante de la sédation. Simvastatine, cérvastatine, atorvastatine (inhibiteurs de l'HMG CoA réductase), par extrapolation à partir de l'itraconazole : risque majoré d'effets indésirables (dose-dépendants) à type de rhabdomyolyse, par diminution du métabolisme de l'hypocholestérolémiant. Interrompre le traitement hypocholestérolémiant pendant le traitement par kétoconazole. En cas de traitement durable par azolé, préférer une autre statine. Tacrolimus : augmentation des concentrations plasmatiques du tacrolimus par inhibition de son métabolisme au niveau intestinal.
Posaconazole	Cisapride, pimozide, halofantrine terfénadine, astémizole, ou quinidine) pouvant induire une élévation des concentrations plasmatiques de ces médicaments, entraînant l'allongement de l'intervalle QTc et de rares épisodes de torsades de pointes. Alcaloïdes de l'ergot de seigle : possibilité d'augmentation des concentrations des alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine et dihydroergotamine), pouvant entraîner de l'ergotisme. Inhibiteurs de l'HMG CoA réductase (simvastatine, lovastatine et atorvastatine).
Voriconazole	Cisapride, pimozide, terfénadine, astémizole, ou quinidine, car une élévation des concentrations plasmatiques de ces médicaments peut entraîner un allongement de l'intervalle QTc et de rares épisodes de torsades de pointes.

IV.2.3 Recommandations d'association médicamenteuse pour les candidoses invasives

Les recommandations françaises sont d'associer la 5-FC à l'AmB dans les endocardites, les méningites et les endophtalmies, en raison de sa bonne diffusion [65]. L'IDSA en 2007 recommande l'association AmB plus 5-FC dans les mêmes situations que le consensus français, mais aussi potentiellement dans les candiduries et les atteintes sévères intra-abdominales [66].

IV.2.4 Antécédents de prise de fluconazole

Il a été constaté, depuis la généralisation de l'utilisation du fluconazole, l'apparition de souches de *C. albicans* ainsi que l'émergence de souches de *Candida non albicans* résistantes au fluconazole. Il paraît donc logique d'éviter cette molécule en cas de prise antérieure. Dans ce sens, tous les consensus sont d'accord pour préférer l'amphotéricine B en cas de prise récente de fluconazole :

- ✓ dans la conférence de consensus de 1997 [46] : chez le malade stable, en cas d'antécédents de prise de fluconazole, 17 experts sur 20 utilisent l'amphotéricine B. Sinon, tous optent pour le fluconazole ;
- ✓ dans le consensus allemand de 2002 [67] : en cas de prise récente de fluconazole chez le neutropénique, 13 experts sur 16 préfèrent l'amphotéricine B. Sinon, 17 sur 18 utilisent le fluconazole ;
- ✓ dans le consensus français de 2004 [68] : en cas de traitement antérieur par les azolés, l'amphotéricine B est utilisée.

Cette crainte de résistances au fluconazole dues à la pression de sélection d'un traitement antérieur doit néanmoins être nuancée :

L'apparition de mutants résistants a été constatée en premier dans les candidoses oropharyngées et œsophagiennes chez les patients atteints du SIDA, et traités au long cours par de faibles doses de fluconazole à titre prophylactique. De plus, elle semble rester cantonnée à ce type de malades, à l'exclusion des autres, notamment non neutropéniques [46].

Ces terrains présentent beaucoup de particularités favorisant l'apparition de résistances :

- ✓ l'immunodépression paraît favoriser l'hétérogénéité génétique de *Candida* qui accélère le développement de mutants résistants ;
- ✓ l'importance de l'inoculum et la variété des espèces colonisant la bouche, ainsi que le traitement au long cours et à faibles doses augmentent le taux d'exposition des *Candida* aux antifongiques [46] ;
- ✓ 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 et une activation de divers mécanismes de résistance chez les souches isolées des malades atteints du sida, alors que ces phénomènes sont exceptionnellement retrouvés chez les *Candida* isolés de sujets sains [46]. 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 [69], la prévalence de *C. albicans* est restée stable après deux ans, aussi bien chez les VIH positifs (de 87 à 83%) que négatifs (82 à 87%). Cela fait douter de l'importance du rôle de l'utilisation du 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 fluconazole n'ont pas mis en évidence d'augmentation du taux de résistance.

Enfin, aucune augmentation des concentrations minimales inhibitrices n'a été constatée dans une étude randomisée multicentrique comparant l'amphotéricine B au fluconazole dans les candidémies chez les malades non neutropéniques [46].

IV.3 Détermination de la sensibilité aux antifongiques

IV.3.1 Objectifs des tests de sensibilité des levures aux antifongiques [70]

Ils sont de plusieurs ordres :

- Guider la thérapeutique et, pour cela, obtenir des résultats reproductibles, ayant une valeur prédictive «raisonnable» pour l'issue du traitement.
- Aider au développement de nouvelles molécules antifongiques et tester les associations d'antifongiques.
- Surveiller l'apparition de souches résistantes aux antifongiques dans des études épidémiologiques, par exemple des souches de levures isolées d'hémocultures. Des variations géographiques peuvent exister.
- Déterminer le profil de sensibilité des souches de *Candida* et de *Cryptococcus neoformans* isolées de prélèvement cliniques aux nouveaux antifongiques.
- Surveiller l'émergence de résistances dans une population d'isolats initialement sensibles.

IV.3.2 Les indications de l'antifongigramme [70]:

- Les infections profondes ou septicémiques.
- Les évolutions chroniques défavorables ou en cas d'échec.
- Les levures isolées chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés dans des services à risque où les patients reçoivent une prophylaxie antifongique.
- Exceptionnellement, sur les souches impliquées chez l'immunocompétent dans des candidoses superficielles récidivantes et rebelles aux traitements.

IV.3.3 Qualités que doivent avoir les tests in vitro [70]

Ces tests doivent :

- Fournir une mesure fiable de l'activité relative de deux antifongiques ou plus.
- Etre corrélés à l'activité in vitro,
- Prédire l'évolution probable de la thérapeutique,
- Fournir un moyen de surveiller l'apparition de résistances dans une population de champignons normalement sensibles.

IV.3.4 Les facteurs qui influencent les tests de sensibilités aux antifongiques [70]

Les tests de sensibilité des levures sont compliqués par des variations liées à l'antifongique, à la souche et à la technique utilisée. Les facteurs suivants doivent être considérés lors de la conception, l'exécution et l'interprétation des tests de sensibilité des isolats aux différents antifongiques.

a. Facteurs spécifiques de l'espèce :

1. Caractéristiques variables de croissance.
2. Polymorphisme par exemple certains champignons poussent comme une forme de levure unicellulaire et se reproduisent par bourgeonnement tandis que d'autres peuvent être constitués d'une forme filamenteuse qui peuvent produire des spores asexuées.
3. La plupart des levures sont aérobies, même si certains peuvent se développer en anaérobiose.
4. Le milieu, le pH et La température d'incubation peut affecter la croissance et polymorphisme.

b. Facteurs spécifiques de l'antifongique :

1. Solubilité aqueuse limitée de certaines molécules.
2. Une inhibition partielle de la croissance sur une large gamme de concentration donnant l'effet de traine, habituellement observés avec les azolés.
3. Effets tampon et du pH sur l'activité.
4. Interaction avec les composants du milieu et le tampon utilisé.

c. Variables qui influent sur les résultats

1. Inoculum.
2. Formulation de milieu et de pH.
3. Agar contre bouillon.
4. Type de tampon (MOPS par rapport phosphate).
5. La température et la durée de l'incubation.
6. Critère de zone d'inhibition et de CMI.

IV.3.5 Méthodes d'antifongigramme

IV.3.5.1 Méthodes de référence

Actuellement, deux méthodes de standards internationaux pour la détermination de la sensibilité des levures et des moisissures aux agents antifongiques sont disponibles.

La première était publiée par CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute), anciennement appelé NCCLS [71,72]. La seconde a été développée par EUCAST (European Committee on Antimicrobial susceptibility testing) [73,74].

Ces deux procédures ont une grande reproductibilité inter et intralaboratoire, en distinguant les organismes ayant des CMI basses et hautes aux antifongiques [75]. Ces deux méthodes diffèrent selon l'inoculum, le milieu et la lecture des CMI (voir les tableaux 38 et 39).

Les points finaux suggérés par le CLSI ne peuvent être extrapolés aux méthodes EUCAST et vice-versa (voir le tableau 40).

IV.3.5.1.1 Méthodes par dilution en milieu liquide

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

IV.3.5.1.1.1 Standard américain: Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)

Les facteurs susceptibles de modifier la détermination de la CMI sont nombreux : inoculum, milieu de culture, température, durée d'incubation. L'absence de standardisation des techniques explique la mauvaise reproductibilité interlaboratoires, résultat qui contraste avec une habituelle bonne reproductibilité intralaboratoire [70].

C'est pour cette raison que dès 1982, aux Etats-Unis, s'est constituée au sein du comité de standardisation des techniques biologiques à utilisation médicale (National Committee for Clinical Laboratory Standards : NCCLS),

une sous-section chargée de la standardisation des tests de sensibilité des levures aux antifongiques.

En 1992, après 10 ans d'études, le NCCLS a proposé une technique de référence standardisée, technique de CMI en milieu liquide en tubes (voir figure 26), pour tester la sensibilité des levures vis-à-vis de l'amphotéricine B, de la flucytosine, du kétoconazole et du fluconazole. Cette technique, longue et laborieuse, a été améliorée par une adaptation en microdilutions [70].

C'est la méthode M27A, publiée en 1997 par le NCCLS, qui sert en pratique de référence, et qui définit le milieu de culture, la taille de l'inoculum, le temps d'incubation et la méthode de mesure finale pour les levures [76]. Elle a été depuis réactualisée par le CLSI (méthode M27A3 et son supplément M27-S3).

La technique du CLSI est une technique de détermination de CMI en milieu liquide dont tous les paramètres ont été standardisés (milieu RPMI 1640, PH7, inoculum de $0.5-2.5 \times 10^3$ /ml, incubation à 35°C pendant 48 heures, lecture à 50-100% d'inhibition de l'antifongique)

Initialement validée en macrométhode, elle a été ensuite adaptée en microméthode, plus simple à réaliser en routine.

Cette méthode a permis :

- ✓ De définir des « valeurs critiques » pour le fluconazole et l'itraconazole vis-à-vis des souches de Candida. Les levures ont été classées comme sensibles si les CMI étaient inférieures à 8 µg/ml pour le fluconazole et inférieures à 0,125 µg/ml pour l'itraconazole. De la même manière, les seuils de résistance pour le fluconazole et l'itraconazole ont été définis comme supérieurs ou égaux à 64 µg/ml et 1 µg/ml respectivement. Une nouvelle catégorie « sensible-dose dépendante », a été définie (entre 16 et 32 µg), nécessitant l'augmentation des posologies pour avoir une réponse optimale. Ces données ont été établies pour des

patients présentant une candidose oropharyngée à *C.albicans* et extrapolées pour les infections systémiques et celles dues à d'autres levures.

- ✓ De définir des souches de candida « contrôle de qualité » pour différents antifongiques [77].

En revanche, cette méthode reste lourde en routine, et la principale difficulté rencontrée a été la définition de la CMI pour les azolés. Celle-ci est particulièrement délicate en raison de l'inhibition partielle de croissance caractéristique des azolés qui se traduit par la persistance d'un voile de croissance même aux fortes concentrations d'antifongiques[78]. Ceci explique, qu'avec les azolés, les CMI soient souvent supérieures aux concentrations atteignables in vivo .Par ailleurs, elle ne permet pas de détecter les souches résistantes à l'amphotéricine B(le milieu Antibitic Medium 3 serait plus adapté) et la pousse *C.neoformans* est souvent lente. Pour les échnocandines comme la caspofungine, dont l'activité anti-candida est excellente, les corrélations entre sensibilité in vitro et évolution clinique ne sont pas recommandées [79].

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélifié sur disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

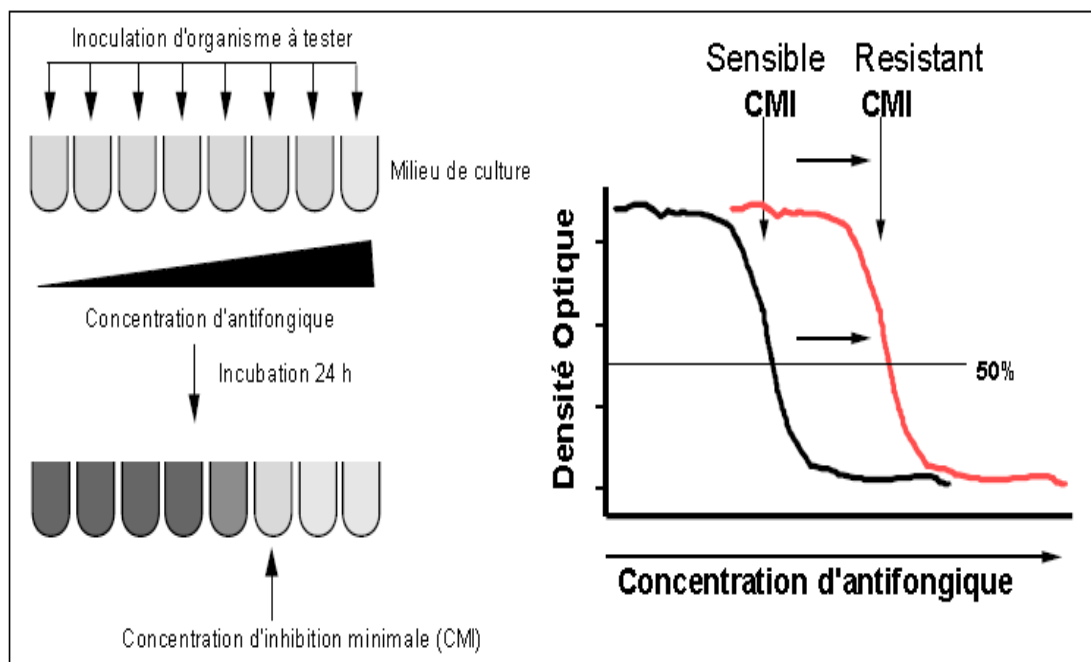
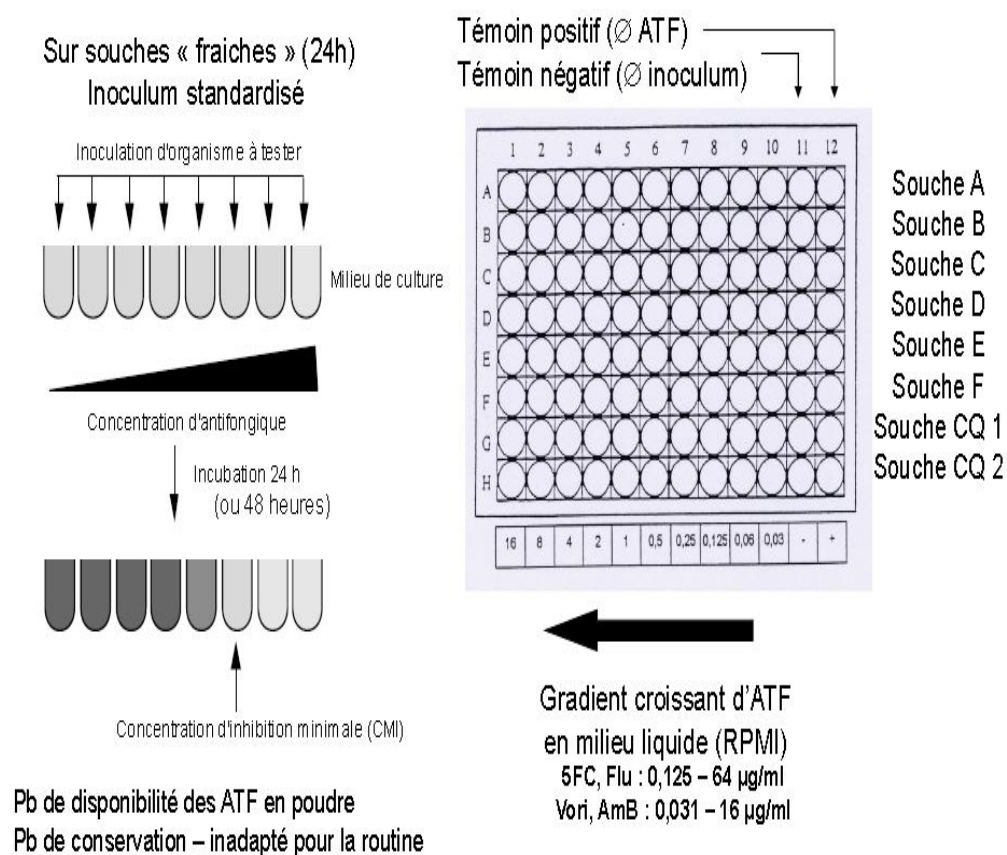


Figure 26 : Méthode de référence : dilution en microplaque CLSI [45]

IV.3.5.1.1.2 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. La technique EUCAST est proche de celle de CLSI, mais présentent quelques différences.

Dans la technique EUCAST, le milieu de culture utilisé (RPMI 1640) est additionné de 2% de glucose, et l'inoculum est 100 fois supérieur ce qui permet une lecture plus précoce après 24h d'incubation.

Les tests in vitro la sensibilité aux antifongiques des azolés contre *Aspergillus sp.* ont été normalisés à la fois par le CLSI et la EUCAST [80-82].

Tableau 38 : Différences de conditions de CLSI et EUCAST pour tester la sensibilité des levures aux antifongiques [75]

CARACTERISTIQUE	CLSI M 27 – A3	EUCAST–E.DEF.7.1
organismes	Levure	Levure fermentaire
Inoculum	0.5–2.5 x10 ³ CFU ml ⁻¹	0.5–2.5 x10 ⁵ CFU ml ⁻¹
standardisation de l'inoculum	0.5x McFarland	0.5x McFarland
Milieu du test	RPMI 1640 0.2% glucose	RPMI 2% glucose
Tampon	MOPS	MOPS
Plaques de microtitration	Puits en forme de U	Cupules à fond plat
Format	Microdilution	Microdilution
Température	35°C	35–37°C
Durée d'incubation	24–48 h	24 h
Lecture	visuellement	Photométrie
Point final/inhibition	100% amphotéricine B 50% azoles, échnocandines	50% 5- Flucytosine, azoles, échnocandines 90% amphotéricine B

Tableau 39 : Différences de conditions de CLSI et EUCAST pour tester la sensibilité des moisissures aux antifongiques [75]

Caractéristique	CLSI M38- A2	EUCAST-E. DEF 9.1
organismes	des champignons formant les Conidies et les spores	Les moisissures formant les conidies
Inoculum	0.4–5 x10 ⁴ CFU ml ⁻¹	2 à 5 x10 ⁵ CFU ml ⁻¹
standardisation de l'inoculum	spectrophotométrie	Hémocytométrie
Milieu du test	RPMI 1640 0.2% glucose	RPMI 2% glucose
Tampon	MOPS	MOPS
Plaques de microtitration	Puits en forme de U	Cupules à fond plat
Format	Microdilution	Microdilution
Température	35°C	35°C
Durée d'incubation	48 h	48 h
Lecture	visuellement	Visuellement
Point final/inhibition	Pas de croissance	Pas de croissance

Les valeurs seuils d'interprétation pour *Candida sp.* [83-87].

L'EUCAST-AFST a collecté 26 447 souches de *Candida sp* pour déterminer les CMI de fluconazole et a proposé les valeurs seuils d'interprétation ≤ 2 µg/ ml pour *C. albicans*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis*.

Ce sous-comité n'a pas attribué des les valeurs seuils d'interprétation pour fluconazole vis-à-vis de *C. krusei* et *C. glabrata*. *Candida krusei* présente une forte CMI, et cette espèce est considérée comme intrinsèquement résistante, alors que pour *C. glabrata*, la médiane de CMI était de 8 µg/ ml, la gamme était de 1-128µg / ml, la majorité des CMI allant de 4 à 161[84].

Pour le voriconazole, une réponse clinique de 76% a été atteinte dans les infections provoquées par *Candida sp.* quand les CMI étaient inférieures ou égales aux valeurs seuils épidémiologiques.

Par conséquent, les EUCAST-Afst a défini la sensibilité des populations de type sauvage de *C. albicans*, *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* (Résistant si $> 0,125 \mu\text{g} / \text{ml}$) [85].

Le CLSI appuie des les valeurs seuils d'interprétation du fluconazole, voriconazole, itraconazole et flucytosine pour *Candida sp.* et la méthodologie du CLSI. Un rapport dose / CMI d'environ 25 était favorable à des points d'arrêt pour le fluconazole et *Candida sp.* [86]. Pour le voriconazole, l'analyse de 249 patients ont démontré une corrélation statistiquement significative entre CMI et la réponse clinique [126]. Pour les échnocandines, le sous-comité CLSI a décidé de recommander seulement CMI $\leq 2 \mu\text{g} / \text{ml}$ comme le seuil sensible en raison de la rareté de résistance aux échinocandines dans la population de *Candida* isolée. Les isolats pour lesquels CMI supérieures à $2 \mu\text{g} / \text{m}$ doit être désigné non sensibles [87].

Le tableau 40 résume les valeurs seuils d'interprétation du CLSI et EUCAST pour *Candida sp.*

Tableau 40 : Principales valeurs seuils d'interprétation pour *Candida sp* [83].

Antifongique	EUCAST (Standard européen)			CLSI (Standard américain)		
	S	I	R	S	SDD	R
Fluconazole	≤ 2	4	> 4	< 8	16-32	≥ 64
Voriconazole	≤ 0.125	-	> 0.125	< 1	2	≥ 4
Caspofungine	NE	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE
Micafungine	NE	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE
Anidulafungine	NE	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE

*Les isolats de *Candida* avec une CMI $> 2 \text{ mg} / \text{l}$ ont été définis comme non sensible pour les échnocandines. Concepts seuils « Breakpoints pour définir S-DD et R n'ont pas encore été établies. NE: Non encore établie, S-DD sensibilité dose dépendant. CMI en mg / l .

***Cas particulier: amphotéricine B**

Pas de valeurs seuils d'interprétation approuvées par le CLSI ou l'EUCAST [128].

Candida sp : CMI > 1mg/L → Résistant

Aspergillus sp : CMI > 1mg/L → Résistant

***Cas particulier: azolés / filamenteux [80,89]**

Pas de valeurs seuils d'interprétation approuvées par le CLSI ou l'EUCAST

Tableau 41: Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories (S, I, R) d'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des antifongiques azolés actifs [83]

Antifongique	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Itraconazole	<2	2	>2
Voriconazole	<2	2	>2
Posaconazole	<0.5	0.5	>0.5

Expression des résultats de deux méthodes de référence en milieu liquide

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

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

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

IV.3.4.1.2 Méthode par Diffusion en milieu solide : Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI): M44-A2

Des tests de sensibilité sur disques sont pratiques, simple et économique. Il existe Une méthode de référence CLSI (M 44-A2) [26] dans les tests de sensibilité in vitro de *Candida sp.* comprend les critères d'interprétation de la zone d'inhibition pour le fluconazole et voriconazole. Elle est également appropriée pour déterminer l'activité des échinocandines sur les levures car elle produit une forte inhibition et des zones faciles à lire. Les valeurs seuils d'interprétation pour la technique de diffusion des disques ont été suggérées (tableau 42):

Tableau 42 : Les valeurs seuils d'interprétation pour la technique de diffusion des disques.

	Sensible	Intermédiaire	Résistant
Fluconazole	≥ 19 mm	15 -18 mm	≤14 mm
Voriconazole	≥ 17 mm	14 -16 mm	≤13 mm
Posaconazole	≥ 11mm	-	-

Le choix de support de la croissance apparaît essentiel; certains chercheurs utilisent RPMI-1640 agar additionné de 0,2% de glucose, alors que le CLSI recommande l'utilisation de gélose Mueller-Hinton supplémenté avec 2% de glucose et 0,5µg/ ml bleu de méthylène [90]. Bien que l'ajout du glucose fournisse une croissance favorable, l'addition du bleu de méthylène améliore des zones d'inhibition.

Le pH du milieu doit être compris entre 7,2 et 7,4 à la température ambiante après gélification. L'inoculum est normalisé à 0,5 McFarland en utilisant un densitomètre et les plaques sont incubées à 35 ° C pendant 24

heures. Certaines souches dont la croissance est lente doivent être lues après 48 heures d'incubation.

Pour les moisissures, la corrélation entre la taille de la zone et CMI est un peu variable [91]. Cependant, avec l'utilisation de Milieu YNB, les auteurs ont conclu que la technique est fiable, rentable et facile à réaliser, avec des résultats qui sont constants [92].

Tableau 13 : **Résumé du document CLSI M44-A** [93]

Paramètre	Valeur
Milieu du test	Mueller-Hinton agar + 2% glucose + 0.5 µg/ml bleu de méthylène
PH	7.2 to 7.4
Taille de l'inoculum	0.5 McFarland standard
Température et durée d'incubation	35°C pendant 20 à 24 h
	Certaines souches de <i>Candida glabrata</i> et <i>Candida krusei</i> ont souvent besoin de 48 h.
le contenu du disque	Fluconazole, 25 µg
	Voriconazole, 1 µg
	Posaconazole, 5 µg
Mesure de diamètre d'inhibition	Mesurer au millimètre près à partir du moment où il ya réduction importante de la croissance.
Breakpoints	Fluconazole: R≤14 mm; SDD, 15 à 18 mm; S≥19 mm.
	Voriconazole: R≤13 mm; SDD, 14 à 16 mm; S≥17 mm.
Souches de contrôle de qualité (diamètre d'inhibition)	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 (fluconazole: 22 à 33 mm; voriconazole, 28 à 37 mm; posaconazole, 25-36 mm)
	<i>C. krusei</i> ATCC 6258 (voriconazole, 16 à 25 mm; posaconazole, 23 à 31 mm)
	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028 (fluconazole, 28 à 39 mm; voriconazole, 31 à 42 mm; posaconazole, 24 à 34 mm)
	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 (fluconazole, 26 à 37 mm; posaconazole, 23 à 33 mm).

Les techniques de référence sont lourdes et mal adaptées à une utilisation de routine. Plusieurs tests commerciaux sont disponibles, en milieu liquide, semi-gélosé ou en gélosé. Ils sont soit qualitatifs, classant dans ce cas les isolats en catégories sensibles, intermédiaires ou résistants, soit quantitatifs, en fournissant une valeur chiffrée de la CMI.

Les normes de référence CLSI et EUCAST peuvent maintenant être utilisés pour développer et valider des méthodes alternatives qui peuvent être plus adaptés pour une utilisation de routine dans les laboratoires cliniques.

IV.3.5.2 Méthodes commercialisées

IV.3.5.2.1 Avantages et inconvénients par rapport aux méthodes de référence :

Avantages par rapport aux méthodes de référence :

- Faciles à utiliser en routine
- Plus économiques
- Résultats plus rapides
- Facilité d'interprétation
- Alternative pour la pratique clinique et screening pour le dépistage des souches avec des CMI hautes

Inconvénients par rapport aux Méthodes de référence :

- Ils n'ont pas développé leurs propres «valeurs seuils d'interprétation »mais proposent des valeurs obtenues par corrélation avec CLSI ou EUCAST
- L'utilisation des valeurs propres au CLSI et à l'EUCAST n'est pas recommandée.

IV.3.5.2.2 Méthodes colorimétriques [94-97]

1. Sensititre Yeastone®

Principe :

Le test de la sensibilité des levures Sensititre ® est un test de microdilution colorimétrique. Chaque plaque est dosée avec des dilutions appropriées d'agents antifongiques et un indicateur colorimétrique.

Après inoculation d'une suspension standardisée des souches isolées en milieu et incubation à 35 ° C pendant 24 à 48 heures, les CMI sont déterminées par l'observation de la plus faible concentration d'antifongique montrant l'inhibition de la croissance (comme en témoigne par aucun changement de couleur).

Tableau 44: Agents antifongiques et dilutions.

Agent Antifungique	Abréviation	Gamme de dilution (µg/ml)
Amphotéricine B	AB	0.12 -8
Anidulafungine	AND	0.015- 8
Caspofungine	CAS	0.008 – 8
Fluconazole	FZ	0.12 – 256
5 - Fluorocytosine	FC	0.06 – 64
Itraconazole	IZ	0.015 – 16
Micafungine	MF	0.008 – 8
Posaconazole	PZ	0.008 – 8
Voriconazole	VOR	0.008 – 8

MODE OPERATOIRE :

Procédure d'inoculation

Une densité de souche finale d'environ $1,5-8 \times 10^3$ CFU / ml est recommandée. Comme avec tous les tests de sensibilité, la densité de l'inoculum est importante et doit être standardisée à une norme de turbidité de 0,5 Mc Farland. La période de l'inoculation de l'eau est essentielle et ce transfert doit être effectué dans un délai maximum de 15 minutes. L'inoculum final dans le bouillon doit être inoculé dans les plaques YeastOne ® dans les 15 minutes.

1. A l'aide d'un écouvillon stérile en bois ou une anse bactériologique, plusieurs colonies bien isolé de diamètre > 1 mm sont prélevées à partir d'une culture pure de 24 heures. 5ml de l'eau stérile déminéralisée est transférée.
2. La suspension obtenue doit être agitée au vortex pendant 15 secondes. Il faut s'assurer que la suspension est uniforme. La turbidité peut être ajustée à la valeur standard de 0,5 McFarland à l'aide d'un néphélomètre Sensititre ® ou visuellement par comparaison à un standard 0,5 McFarland.
3. 20 µl de la suspension de levure sont transférés dans 11 ml de bouillon inoculum de YeastOne ®. Après Vortex ou mélanger vigoureusement. Il en résulte en $1,5-8 \times 10^3$ UFC / ml.
4. Une numération sur plaque de confirmation doit être effectuée pour vérifier la densité de l'inoculum en enlevant 10 µl de la régulation de la croissance et de bien placage sur Sabauroud dextrose agar (SDA). L'inoculum correcte produira 15-80 Colonies.

a. Inoculation manuelle

1. Verser l'inoculum dans un réservoir d'inoculum stérile.
2. En utilisant une pipette appropriée (par exemple, 8-canaux multi-pipette), inoculer soigneusement 100 µl dans chaque puits de la plaque Sensititre ®. Évitez l'élaboration des bulles d'air car ils interfèrent avec la distribution précise de l'inoculum. Depuis la pointe sera utilisée pour inoculer une série de puits, évitez de toucher la pointe vers le bas d'un puits.
3. Il est recommandé d'utiliser la suspension de levure en excès pour inoculer une plaque SDA pour vérifier la pureté. Incuber la plaque pendant 24-72 heures à 35 ° C.
4. Placer les pointes contaminées et le réservoir d'inoculum dans un récipient biohazard de sécurité approuvée.
5. Couvrir les plaques avec le joint de colle, en s'assurant que tous les puits sont couverts.

b. Ensemencement automatisé

1. Replacer le bouchon du tube avec un dosehead Sensititre ® et inoculer 100 µl dans chaque puits de la plaque de YeastOne Sensititre ® selon les instructions Autolnoculator ®.
2. Couvrir la plaque avec le joint de colle, assurant que tous les puits sont couverts

INCUBATION :

1. Placer les plaques dans une pile de moins de trois plaques.
2. Incuber les plaques pendant 24-25 heures à 35 ° C dans un incubateur sans CO₂. Les espèces de *Cryptococcus* doivent être incubées pendant 48-72 heures. L'incubation à des températures supérieures à 35 ° C peut affecter les performances de ces plaques.

LA LECTURE DES RÉSULTATS DU TEST :

Des plaques peuvent être lues visuellement sous un éclairage normal de laboratoire en utilisant un miroir de lecture qui affiche la partie inférieure du puits. La croissance de la levure dans les solutions antifongiques sera témoignée par un changement de l'indicateur de croissance colorimétrique du bleu (négatif) au rouge (positif). Certaines levures ne peuvent pas changer complètement l'indicateur au rouge, mais ils affichent plus une coloration pourpre de l'indicateur. Certains organismes peuvent présenter une coloration pourpre légère dans le fluconazole et l'itraconazole.

1. Examiner la croissance positive après 24 heures d'incubation. Si la croissance est positive, la coloration vire au rouge, les CMI de l'antifongigramme peuvent être interprétées. Si après incubation, la coloration bleu persiste ou elle est légèrement pourpre, incuber pendant 24 heures de plus pour examiner la croissance.
2. Avec les modifications apportées aux déterminations colorimétriques des points finaux de lecture doit être effectuée de manière similaire aux descriptions fournies dans Le document CLSI M27.

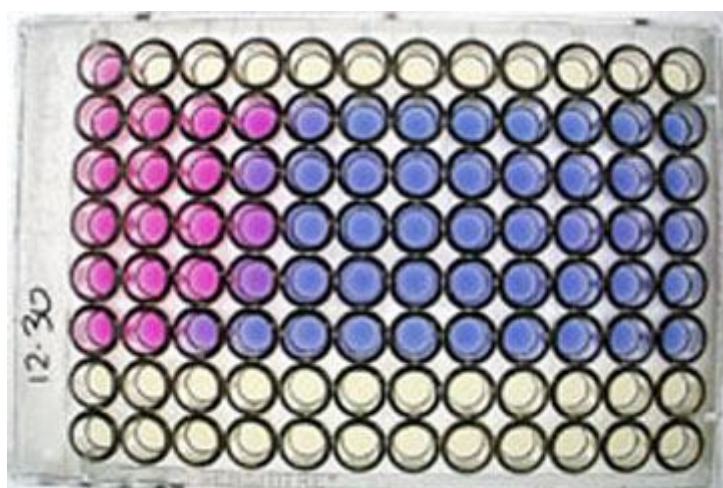


Figure 27: Panneau du test Sensititre® YeastOne™

Tableau 45 : Illustration et interprétation des résultats du test

	1	2	4	8	16	32	R = Rouge: indication positive de croissance B = BLEU: indication négative de croissance
A.	R	R	R	B	B	B	Modèle de croissance typique; le point de virage de CMI est à 8 µg / ml.
B.	R	R	R	R	R	R	Croissance dans tous les puits; le point de virage de CMI est > 32 µg / ml.
C.	B	B	B	B	B	B	Pas de croissance dans un puits; le point de virage de 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 cotes. Si plusieurs sauts devraient se reproduire dans une colonne, les résultats du test seraient invalidés
E.	R	R	B	B	R	R	Double « cupule sauté », les résultats devront être invalidés.

1 Avec une technique soigneuse ces événements sont rares.

Tableau 46: Les critères d'interprétation de CMI (µg/ml) pour les espèces de *Candida* selon CLSI M27

Agents antifongiques	Sensible	Sensible dose dépendant	Intermédiaire	Résistant	Non-sensible
Anidulafungine	≤2				>2
Caspofungine	≤2				>2
Fluconazole	≤8	16-32		≥64	
5 -Flucytosine	≤4		8-16	≥32	
Itraconazole	≤0.125	0.25-0.5		≥1	
Micafungine	≤2				>2
Voriconazole	≤1	2		≥4	

Avantages [94,95] :

- Dans l'ensemble, Sensititre YeastOne est un test fiable et reproductible, facile à mettre en place.
- Les points finaux sont clairement visibles et les résultats se situent dans la fourchette prévue.
- 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'oxydo-réduction rend la lecture des CMI beaucoup plus aisée.

Inconvénients [94,95] :

Le système Sensititre Yeast One Colorimetric antifungal panel (procédé Blue Alamar®) est disponible commercialement, mais il n'est pas encore approuvé par 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*).

2. FUNGITEST® [96,97]

PRINCIPE : Fungitest® permet d'étudier la croissance des levures en présence de 6 antifongiques à 2 concentrations. La méthode est dérivée de la dernière recommandation CLSI, le milieu de culture est le RPMI glucosé à 2% et tamponné, additionné d'un indicateur d'oxydo-réduction. L'inoculum est dilué à 10^3 levures par ml, et le temps d'incubation est de 48h. La croissance des levures se traduit par un virage du milieu du bleu au rose.

La microplaque Fungitest comporte 16 puits : deux puits réservés aux témoins négatifs, deux puits pour les témoins négatifs et 12 puits restant contiennent les six antifongiques à deux concentrations différentes : l'amphotéricine B (2 et 8 mg / ml), le fluconazole (8 et 64 mg / ml), itraconazole (0,5 et 4 mg / ml), kétoconazole (0,5 et 4 mg / ml), miconazole (0,5 et 8 mg / ml) et la 5-fluorocytosine (2 et 32 mg / ml).

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélifié sur disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

LE MODE OPERATOIRE EST ILLUSTRÉ PAR LE SCHEMA SUIVANT :

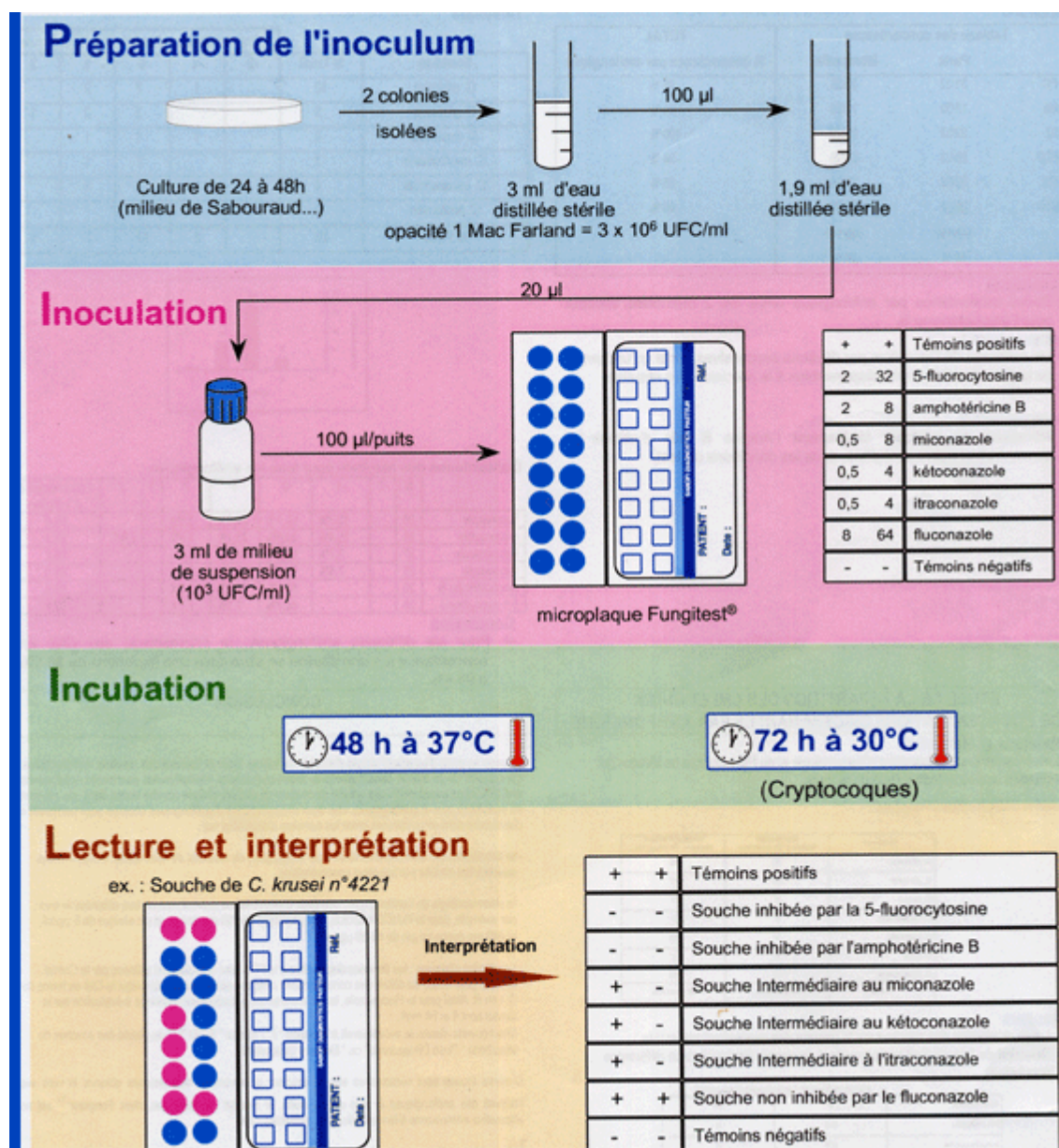


Figure 28 : Schéma qui illustre le mode opératoire de Fungitest®

Lecture et interprétation des résultats:

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

Rose-Bleu : faible croissance : souche intermédiaire

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

Avantages [96,97] :

- Le Fungitest® est facile à mettre en place
- Les points finaux sont clairement visibles.
- Une bonne condition de standardisation
- Une bonne corrélation par rapport à la méthode de référence CLSI pour les souches trouvées sensibles par cette dernière.

Inconvénients [96,97]:

La plupart des résultats sont dans la fourchette attendue, mais il peut être difficile de détecter les souches résistantes, en particulier pour fluconazole.

- Ce test n'est pas encore évalué sur les moisissures.
- Une corrélation moins bonne pour *Candida glabrata*.
- Une faible capacité du Fungitest pour détecter les souches résistantes : une proportion importante de souche de *Candida glabrata* intermédiaires ou résistantes par la technique M27 du CLSI sont retrouvés sensibles. De plus, les valeurs des concentrations critiques sont différentes de celles de CLSI.
- Elle ne dose que deux valeurs d'antifongiques.

IV.3.5.2.3 Méthode par diffusion-affusion

E-TEST

Principes d'E-test

E-test est basé sur une combinaison de concepts de dilution et des tests de diffusion. Comme les méthodes de dilution, E-test quantifie directement la sensibilité aux antifongiques en termes de valeurs de CMI. Comme E-test est constitué d'un gradient de concentration prédéfinie et continue, les valeurs de CMI obtenues peuvent être plus précise que les valeurs des procédures conventionnelles fondées sur la discontinuité de double dilutions successives. Bien que traitées comme le test de diffusion sur disque, le gradient de concentration préformé est stable dans E-test, ce qui le différencie des deux méthodes clairement. Contrairement à la diffusion du disque, les CMI d'E-test ne sont pas affectés par les propriétés des médicaments tels que le poids moléculaire, la solubilité aqueuse et la diffusion caractéristique ou en faisant varier les taux de croissance de levures différentes.

E-test se compose d'une bande de matière plastique mince, inerte et non poreuse (5 x 60 mm). Un côté de la bande est étalonné avec des valeurs de CMI en mg / ml et un code à deux lettres désignant l'identité de la molécule. Un gradient exponentiel prédéfini et de l'agent de séchage et stabilisant de l'antifongique sont immobilisé sur l'autre surface de la bande avec la concentration maximum et le minimum. Le gradient continu couvre une gamme de concentration correspondant à 15 double dilutions dans une procédure de dilution classique.

Lorsqu'elle est appliquée sur une plaque de gélose inoculée, il y a une libération immédiate de l'agent de la surface de matière plastique dans la matrice de gélose. Un gradient de concentration prédéfini, continu et stable de médicament est créé directement sous la bande. Après incubation, où la croissance devient visible, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long

de la bande est visible. La zone de bord coupe la bande à la valeur de CMI. Lorsque les différentes zones d'inhibitions de croissance sont vues, le point de final de CMI devrait être sélectionné en fonction de critères décrits dans l'interprétation.

REACTIFS

Tableau 47 : 100 unités par paquet des agents suivants sont disponibles:

Agent	Code	Gamme CMI (mg / ml)
L'amphotéricine B	PA	0,002 à 32
Flucytosine	FC	0,002 à 32
Fluconazole	FL	0.016 à 256
itraconazole	IT	0,002 à 32
Kétoconazole	KE	0,002 à 32

STOCKAGE

Tous les paquets non ouverts doivent être conservés à -20 ° C jusqu'à la date d'expiration donnée. Les bandelettes non utilisées stockés à -20 ° C dans un tube de stockage étanche à l'air ou un récipient avec un dessiccant peut être utilisé jusqu'à ce que le la date d'expiration.

MANIPULATION

Laisser revenir les bandelettes à température ambiante avant utilisation. Ouvrir l'emballage en blister en coupant au sommet d'un compartiment ou pour l'emballage en cartouche au sommet de l'emballage aluminium. Les E-test peuvent être saisis manuellement avec les doigts ou comme indiqué sous la rubrique « application de la bandelette ». Ne pas toucher la bandelette sur la surface contenant l'antibiotique, c'est-à-dire la face opposée à l'échelle de lecture.

PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

E-test est destiné à un usage diagnostique in vitro seulement. Bien qu'E-test soit une procédure très simple, un personnel entraîné aux techniques d'étude de la sensibilité des antimicrobiens est recommandé.

Mode Opérateur :

Milieu de culture : Milieu gélosé:

Bouillon RPMI 1640 + MOPS + 2% Glucose + 1.5% agar

Préparation de l'inoculum: La préparation se fait en émulsionnant dans un bouillon adapté avec NaCl à 0,85%, un nombre adéquat de colonies bien isolées à partir d'une culture pure d'une nuit. Les microorganismes à croissance difficile doivent être émulsionnés en bouillon et utilisés dans les 15 minutes. On compare la turbidité par rapport au standard McFarland approprié (0,5 McFarland pour *Candida sp*, 1 McFarland, pour *C. neoformans*).

Ensemencement: L'ensemencement se fait en plongeant un écouvillon stérile dans la suspension et en retirant l'excès de liquide en appuyant l'écouvillon contre la paroi interne du tube. On écouvillonne doucement toute la surface de la gélose dans trois directions. Le Retro C80 (ensemenceur rotatif) peut également être utilisé pour ensemer la surface de la gélose. On enseme deux fois la boîte en plongeant l'écouvillon dans la suspension entre les deux fois. Laisser absorber complètement l'humidité en excès et s'assurer que la surface de la gélose est complètement sèche avant le dépôt des bandelettes E-test.

Application des bandelettes: Il s'agit d'appliquer les bandelettes E-test à la surface de la gélose en s'assurant que l'échelle de CMI soit positionnée correctement (vers soi). On utilise une paire de pince, un applicateur manuel, le Nema C88 (stylo applicateur) ou le Simplex C76 (aplicateur automatique). Veiller à ce que tout le gradient antifongiques soit en contact avec la surface de la gélose. Une fois appliquée, on ne touche plus aux bandelettes E-test.

Incubation: Les boîtes sont incubées à 35 ° C pendant 24 à 48 heures pour les différentes espèces de *Candida* et 48 à 72 heures pour *Cryptococcus neoformans*.

Lecture: Lire la CMI de l'antibiotique au point d'intersection de l'ellipse d'inhibition et de la bandelette.

INTERPRÉTATION : Détermination de la sensibilité: Les concentrations critiques en CMI pour les différentes catégories de sensibilité comme proposées par le CLSI, peuvent être utilisées pour interpréter les valeurs de CMI données par E-test. Toujours arrondir les demi-dilutions de l'échelle de l'E-test à la valeur supérieure correspondante aux doubles dilutions standards avant de catégoriser les souches. Une vue d'ensemble des critères d'interprétation du CLSI est indiquée dans le tableau 48.

Tableau 48: document CLSI M27-A fournit des directives interprétatives ci-après:

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

GUIDE DE LECTURE E-TEST POUR LES LEVURES

Flucytosine

La lecture se fait à une inhibition presque complète, en ignorant les petites micro-colonies.



Figure 29a: CMI=1 µg/ml.

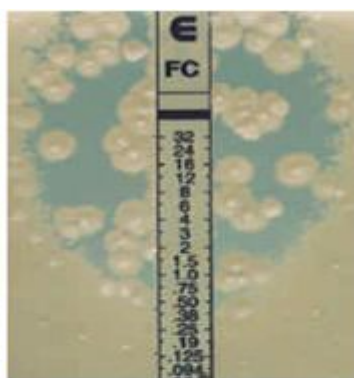


Figure 29b: CMI>32 µg/ml. (Macrocolonies en ellipse)

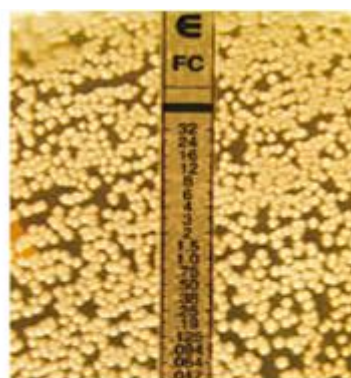


Figure 29c: CMI>32 µg/ml. (Résistance homogène)

L'amphotéricine B

(La lecture se fait à une inhibition complète de la croissance).

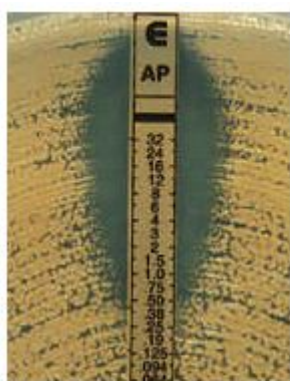


Figure 30a:
CMI=1 µg/ml.

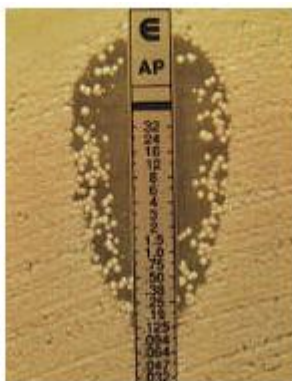


Figure 30b:
CMI=3 µg/ml.
(Macrocolonies en ellipse)

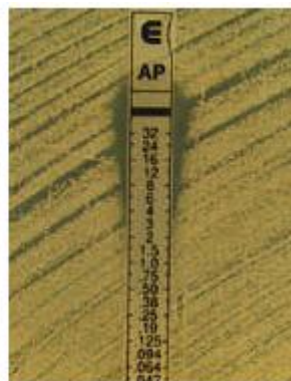


Figure 30c:
CMI=4 µg/ml.
(Petite ellipse et mince)

**Azoles (lecture au premier point de dire une inhibition significative soit
disant 80% d'inhibition).**

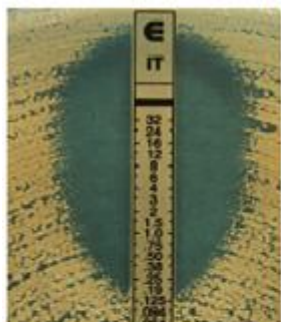


Figure 31a:
CMI=0,125
 $\mu\text{g/ml}$ (point
d'extrémité
pointu)



Figure 31b:
CMI=0,5 $\mu\text{g/ml}$
(Pelouse de
microcolonies
dans une
ellipse
discernable)



Figure 31c:
CMI>256 $\mu\text{g/ml}$
(Macrocolonies en
ellipse)

CONTRÔLE DE LA QUALITÉ

Afin de vérifier les performances de l'E-test en ce qui concerne la qualité et la cohérence des réactifs, le milieu, l'inoculum et la procédure utilisée, les tests sur les souches de contrôle de qualité sont spécifiés dans le tableau 1 comme décrit dans la procédure. La performance est satisfaisante si les valeurs de CMI obtenues sont conformes aux spécifications de contrôle de qualité fournis.

Tableau 49 : Les souches de contrôle de qualité de l'E-test

Agent	Code	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 90028
Amphotericin B	AP	0.5-2	0.25-2	0.25-2
Flucytosine	FC	≥32	0.125-0.5	0.25-2
Fluconazole	FL	≥256	2-16	0.125-1
Itraconazole	IT	0.125-0.5	0.064-0.25	0.064-0.25
Ketoconazole	KE	0.25-1	0.032-0.125	0.008-0.064

Avantages : Les études ont montré une bonne corrélation entre les valeurs de CMI de l'E-test avec celles de la méthode de référence NCCLS. E-test est concordant avec la microméthode NCCLS à plus de 90% pour *Candida sp* [99] et pour les champignons filamenteux [99]. L'avantage particulier de l'E-test est sa capacité de détecter les isolats résistants à l'amphotéricine B rencontrés notamment chez *C.lusitaniae* [100] et chez des espèces d'*Aspergillus non fumigatus* [101].

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 traine qui est observé chez 30 à 40% des souches de levures [102].

IV.3.5.2.4 Méthode de diffusion en milieu gélosé :

Dans cette catégorie d'antifongigramme, nous distinguons la méthode de disque Bio-rad® et celle de comprimé Neo-sensitabs® que nous avons comparé dans notre étude.

Neo-Sensitabs ® (fabriqué par Rosco au Danemark). Il s'agit d'une méthode simple de diffusion en milieu gélosé utilisant des comprimés pour déterminer la sensibilité des champignons aux antifongiques. Encore une fois, il ya eu des problèmes avec le choix du milieu à utiliser et de l'interprétation des points finaux. La plupart des utilisateurs ont amélioré la performance de la technique par modification de l'agar RPMI-1640 additionné de 0,2% de glucose et l'adoption des principes de base du CLSI pour rendre ce test plus standardisée. Cependant, des études récentes ont utilisé la gélose Mueller-Hinton supplémenté avec 2% de glucose et 0,5 mg / ml de bleu de méthylène comme milieu (voir CLSI M44-A) et un lecteur de plaque Biomic qui permet une lecture électronique et une interprétation des 16 zones d'inhibition. Un grand nombre d'antifongiques est disponible en comprimés; amphotéricine B (10 µg), kétoconazole (15 µg), itraconazole (8 µg), le fluconazole (25 µg), le voriconazole (1,0 µg), 5-fluorocytosine (1 et 10 µg) , clotrimazole (10 µg), miconazole (10 µg), éconazole (10 µg), natamycine (10 µg) et la nystatine (50 µg).

Neo-Sensitabs® ne coûte pas cher, les tests de diffusion sont faciles à mettre en place et montrent le potentiel pour le dépistage d'un grand nombre d'isolats résistants. Cependant, les diamètres des zones d'inhibition ne permettent pas de différencier entre souche sensible et souche sensible dose dépendante et la corrélation entre la zone d'inhibition et la CMI est plus variable. Pour cela, les isolats résistants doivent être confirmés en utilisant une méthodologie appropriée de la CLSI.

IV.3.5.2.5 ATB FUNGUS3® [103]

Principe :

Il permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et des *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques en milieu semi-liquide dans des conditions très proches de la technique de référence de microdilution. La galerie comporte 16 paires de cupules, la première sans antifongique servant de témoin de croissance. Les 15 paires suivantes contiennent 5 antifongiques à différentes concentrations permettant de déterminer des CMI. Pour déterminer cette CMI, il faut rechercher et quantifier dans chaque cupule une croissance par lecture visuelle. L'appréciation peut différer d'une personne à l'autre. L'appréciation par lecture automatique n'est pas disponible au laboratoire.

Matériel :

Composition d'un kit :

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

Matériel non fourni :

- NaCl

Matériel non fourni :

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

Mode opératoire :

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

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

Lecture et interprétation :

Pour faciliter la lecture, placer la galerie sur un fond noir.

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

Tableau 50 : Le score d'interprétation de l'ATB-Fungus 3®

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

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

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

Tableau 51 : Concentrations critiques des CMI (en mg/l) recommandées pour les *Candida* sp. en catégories cliniques

	SENSIBLE	INTERMEDIAIRE	RESISTANTE
FLUCYTOSINE	≤ 4	8 -16	≥ 32
AMPHOTERICINE B	Une CMI ≥ 2 suggère une résistance		
FLUCONAZOLE	≤ 8	16 - 32	≥ 64
ITRACONAZOLE	≤ 0.125	0.25 – 0.5	≥ 1
VORICONAZOLE	≤ 1	2	≥ 4

Note : Le *Candida krusei* est une espèce intrinsèquement résistante au fluconazole, le test doit être systématiquement interprété comme RESISTANT.

Tableau 52 : Concentrations critiques des CMI (en mg/l) recommandées pour les *Cryptococcus neoformans* en catégories cliniques

	SENSIBLE	INTERMEDIAIRE	RESISTANTE
FLUCYTOSINE	≤ 4	8 - 16	≥ 32
AMPHOTERICINE B	Une CMI ≥ 2 suggère une résistance		
FLUCONAZOLE	≤ 4	8	≥ 16
ITRACONAZOLE	Non défini		
VORICONAZOLE	Non défini		

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

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



Figure 32 : Galerie ATB FUNGUS2®, bioMérieux SA

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

NB : Les *Candida glabrata* poussent plus lentement que les autres espèces. De ce fait, les galeries ATB FUNGUS3® doivent être incubées 1 jour de plus.

Avantages et inconvénients de l'ATB FUNGUS3®

Avantage :

- Le matériel est fourni dans le kit, sauf le NaCl 0.85%
- Les CMI obtenues sont précises, grâce à plusieurs concentrations d'antifongiques différentes.
- Interprétation des résultats facilitée par rapport à l'E-test.
- Le prix est relativement bon marché

Inconvénients :

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

IV.3.5.2.6 Antifongigramme automatisé ^[103]

Carte Vitek AST-YS01®

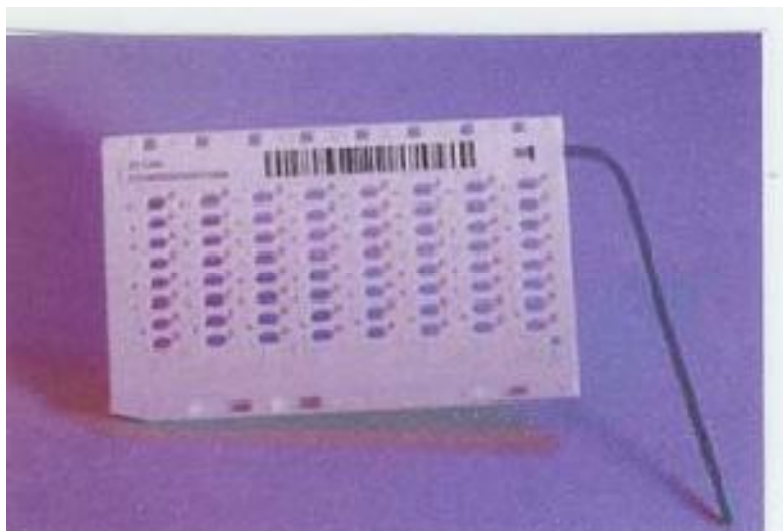


Figure 33 : Carte Vitek AST-YS01 (Source : Liste des produits 2007 bioMérieux)

L'automate :

Le Vitek2® dispose d'un système automatisé capable de traiter la majorité des tests de routine avec un rendu des résultats fiable et rapide. Il détecte des résistances même faiblement exprimées. Plus de 330 espèces microbiennes peuvent être identifiées grâce à une base de données optimisée. Cet appareil est composé de différents éléments essentiels :

La Station Compacte Satellite (SCS)

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

La cassette

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

La carte Vitek AST-YS01®

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

Les cartes sont inoculées avec les diverses suspensions. Le module de remplissage utilise une chambre à vide et une pompe. Lorsqu'une cassette atteint ce stade la pompe évacue l'air de la chambre. Puis, le vide est lentement rompu.

L'augmentation de la pression d'air dans la chambre pousse la suspension par le tube de transfert dans les canaux et les micro-cuves de la carte. Ensuite, les tubes de transfert sont scellés. La carte et son contenu sont ainsi hermétiquement fermés.

Incubation et lecture

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

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



Figure 34: Automate de Vitek AST-YS01®

Principe :

Cette technique permet également de déterminer la sensibilité des *Candida sp.* et des *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques en milieu semi-liquide. Cette carte comprend 64 cupules réactionnelles comprenant quatre antifongiques dont le fluconazole, le voriconazole, la flucytosine et l'amphotéricine B à quatre concentrations différentes.

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

Ensuite, il détermine la durée d'incubation de la carte. Dans la cupule contrôle, il évalue la vitesse de croissance du germe. La lecture s'arrêtera si

la croissance dans tous les puits est suffisante. Celle-ci sera considérée comme la plus haute pouvant être mesurée pour cet antibiotique.

Pour finir les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités.

Matériel :

Composition d'un kit :

- 20 cartes en emballage individuel avec déshydratant
- 1 notice

Matériel non fourni :

- NaCl 0.85%
- Tube en plastique stérile pour la dilution
- Ecouillons

Mode opératoire :

- A partir d'une culture fraîche sur COS, prélever quelques colonies à l'aide d'un écouillon stérile et les dissoudre dans environ 3 ml de NaCl 0,45%, afin de réaliser une suspension d'opacité équivalente à l'étalon 2 MacFarland.
- Contrôler la pureté de l'inoculum en l'isolat sur une gélose non sélective.
- Tout d'abord, il faut placer le portoir sur la station satellite qui est un poste de travail nous permettant de programmer les analyses à effectuer, le nom du germe etc. Le tube contenant la suspension est alors placé sur le portoir. Le code barre de la carte AST-YS01® est scanné, puis la carte est introduite dans le tube.
- Un tube vide est ajouté à côté du tube contenant la suspension. Le Vitek2® se charge automatiquement de la dilution à effectuer avec du 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*.

Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur disque Bio-rad® et sur comprimé Neo-sensitabs®

Lecture et interprétation :

N° Client bioMérieux :		Rapport du laboratoire		Imprimé 6 août 2008 03:12 CEST	
Référence du système :				Impression automatique	
Nom du patient :				ID du patient :	
Groupe d'isolats : 40614915-1					
Germe sélectionné : Candida albicans					
Commentaires :					
Informations sur l'identification					
Germe sélectionné		Candida albicans			
		Entré le : 5 août 2008 14:23 CEST		Par : Système	
Commentaire sur l'ident. :					
Résultats Antibiogramme		Carte : AST-YS01		N° de lot : 281103230	
		Terminée le : 6 août 2008 03:19 CEST		État : Final	
		Péremption : 11 oct. 2009 13:00 CEST		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 du laboratoire pour la lecture et l'interprétation de la Carte Vitek AST-YS01®

L'exemple d'un rapport de laboratoire ci-dessus montre qu'il s'agit d'un *candida albicans* et qu'il est sensible aux quatre antifongiques. Il montre également les différentes CMI et que l'analyse a duré environ 13 heures. Pour finir, l'automate interprète les résultats.

Tableau 53 : Concentrations critiques des CMI (en mg/l) recommandées pour les *Candida* sp. en catégories cliniques

	SENSIBLE	INTERMEDIAIRE	RESISTANTE
AMPHOTERICINE B	1	2	4
FLUCONAZOLE	≤ 8	16 - 32	≥ 64
FLUCYTOSINE	≤ 4	8 -16	≥ 32
VORICONAZOLE	≤ 1	2	≥ 4

NB : Pour les cartes Vitek le temps d'incubation est environ 13 h pour toutes les espèces de *Candida*.

Avantages et inconvénients de la carte Vitek AST-YS01®

Avantages :

- La préparation est simple et rapide.
- Facilité de stockage et pour l'élimination des déchets.
- Code barre individuel (reconnaissance du type de carte, traçabilité, carte périmée rejetée par le système).
- Tout le matériel est fourni, soit la carte. Il manque juste le NaCl pour faire la suspension.
- Les temps d'incubation prescrits sont plus ou moins corrects pour toutes les espèces de *Candida* ainsi que pour le *Cryptococcus neoformans*.
- Résultats rapidement disponibles.
- Méthode standardisée et automatisée.
- Reproductibilité excellente.
- Le contenu du kit est de 20 cartes et la date de péremption est de 14 mois, donc adapté à la consommation en routine.

Inconvénients :

- Le prix est plus élevé que pour l'ATB FUNGUS3®.
- Il manque l'itraconazole par rapport à la galerie ATB FUNGUS3®.

IV.3.6 Utilisation en pratique médicale des tests de sensibilité in vitro [70]

En épidémiologie

Différentes études font état de l'augmentation des candidémies à *Candida* non *albicans*, particulièrement à *C.glabrata* et *C.krusei*. Ce changement épidémiologique peut avoir des implications thérapeutiques en raison des moindres sensibilités, voire des résistances de certaines espèces. Si le profil général des souches de *Candida* le plus souvent isolées aux antifongiques « classiques » (amphotéricine B, la 5-fluocytosine, fluconazole, itraconazole) est mieux connu, des variations peuvent exister, pour une même espèce, selon le pays, et même selon les services cliniques, en fonction de la pathologie sous-jacente et d'utilisation plus ou moins importante des antifongiques en prophylaxie et/ou en traitement empirique.

Le suivi régulier des CMI des levures isolées chez les patients, en particulier dans les septicémies, peut permettre d'évaluer, dans un service donné, les profils de sensibilité ou des résistances des souches et leurs modifications éventuelles dans le temps.

En clinique

Pour que les tests de sensibilité aux antifongiques soient utiles pour guider la thérapeutique, les résultats doivent fournir une bonne réponse prédictive quant à l'efficacité du traitement qui sera utilisé. Or, aucune méthode actuellement disponible ne présente toutes les qualités requises pour que les résultats soient transposables, de façon absolue, en clinique. Un test ne doit donc pas être considéré comme un examen systématique. Les résultats doivent être associés, d'une part avec le site de l'infection et le degré d'immunosuppression du patient.

Le ColBVH en France a proposé une enquête rétrospective en 2002 aux membres du réseau afin d'évaluer l'activité de mycologie au sein de la microbiologie, la quantité d'antifongigramme (ATF) 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, 62/193, (32 %) ont répondu à l'enquête, ce qui représente environ 40 000 lits. L'activité mycologique est variable d'un centre à l'autre.

En moyenne, les isollements fongiques représentent 10,8 % des isollements microbiens, et les ATF représentent 2 % des études de sensibilité ; l'ATF est pratiqué dans 11,3 % des cas, contre 68,4 % des cas pour l'antibiogramme (ATB), soit en moyenne 82 ATF par hôpital en 2002. Trente-huit pour cent des répondants ne réalisent pas d'ATF dans leur laboratoire :

26 % les transmettent à un laboratoire spécialisé, 12 % n'en pratiquent jamais. Parmi les 88 % de répondants qui pratiquent ou transmettent au moins un ATF par an, les espèces testées appartiennent essentiellement au genre *Candida*. L'ATF est effectué en fonction de divers critères biologiques ou cliniques variés, souvent à la demande du clinicien. Les méthodes les plus utilisées sont l'ATB Fungus® bioMérieux (56 %) et l'Etest® AB Biodisk (41 %), ou une combinaison de deux ou plusieurs méthodes (38 %), conditionnant le choix des antifongiques testés en première intention : amphotéricine B dans 93 % des cas, fluconazole dans 49 % des cas. Les résultats sont interprétés en sensible--intermédiaire--résistant dans 98 % des cas. Un contrôle de qualité est utilisé, à intervalles réguliers, par

31% des laboratoires. Seules les souches issues d'hémocultures sont conservées par la majorité des centres. Quatre-vingt-quinze pour cent des répondants sont fortement demandeurs de recommandations consensuelles concernant les indications, la réalisation et l'interprétation de l'ATF et 98 % sont disposés à participer, de diverses façons, à un travail au sein du ColBVH sur ce thème. Leur étude a permis d'objectiver les pratiques au niveau de la fréquence de réalisation, des indications, des modalités techniques et de l'interprétation de l'ATF [70].

IV.3.7 Les recommandations [70]

Plusieurs démarches sont nécessaires :

- ✓ Il faut, en priorité, identifier l'espèce en cause. La connaissance de l'espèce de *Candida* est un guide utile pour le profil probable de sensibilité. Les laboratoires disposent actuellement de méthodes rapides d'identification des espèces les plus souvent isolées.
- ✓ Il faut ensuite sélectionner les indications. Pour certaines levures comme *C.glabrata*, pour lesquelles la sensibilité au fluconazole est variable. Quand la souche est « sensible dose-dépendante », il faut tenir compte de site de l'infection. En cas d'infection urinaire à *C.glabrata*, le fluconazole à 800mg/j peut être prescrit. En cas de septicémie ou d'infection osseuse, il ne doit pas l'être. Chez les patients très immunodéprimés, il est préférable d'utiliser un autre antifongique (Voriconazole ou Amphotéricine B). Pour *Cryptococcus neoformans*, les résistances primaires aux antifongiques sont rares, ne nécessitant pas de tests systématiques. En revanche, du fait de résistances secondaires, ces tests sont nécessaires en cas d'échec thérapeutique.
- ✓ Un test de sensibilité aux antifongiques est inutile pour le fluconazole et l'itraconazole lorsque la souche isolée est *C.Krusei*, cette souche étant le plus souvent résistante à ces antifongiques. La sensibilité aux voriconazole de ces souches permet, en revanche, de les traiter avec ce nouveau triazolé.

IV.3.8 Corrélation in vitro-in vivo

Les tests de sensibilité aux agents antifongiques effectués sur des levures devraient idéalement permettre la mesure comparative de l'activité de différents antifongiques, la surveillance du développement de résistance, l'évaluation de l'activité potentielle de nouveaux antifongiques, et surtout prédire l'issue d'un traitement. Or, la corrélation entre les valeurs des tests in vitro et les résultats in vivo n'a été jusqu'ici établie que dans un nombre de situations cliniques limité. Les résultats varient selon l'agent causal (*Candida albicans*, autres espèces de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*), le type d'antifongique (polyène, imidazole, 5-fluorocytosine), l'hôte (patient atteint de SIDA, autre cause d'immunodépression, patient non immunodéprimé) et le type d'infection (superficielle ou profonde). Un échec thérapeutique dû à une levure résistante reste rare en dehors des Unités de soins intensifs et du contexte des patients séropositifs pour le VIH ou atteints de SIDA, avec candidose oropharyngée récidivante, où de multiples études ont maintenant confirmé une bonne corrélation in vitro-in vivo entre résistance acquise in vitro et échec du traitement, particulièrement avec le fluconazole [142].

 A l'inverse, il faut en particulier souligner l'absence de corrélation in vitro-in vivo dans les situations suivantes [104]:

- i) candidoses vaginales récidivantes, avec isolement de souches de *C. albicans* uniformément sensibles au fluconazole;
- ii) candidémies dues à différentes espèces de *Candida* chez des patients non neutropéniques traités soit par amphotéricine B, soit par fluconazole;
- iii) méningites à cryptocoques récidivantes traitées par fluconazole ou par amphotéricine B.

 Parmi les raisons possibles d'une absence de corrélation in vitro-in vivo, on mentionnera [104]:

- i) une dispersion insuffisante des valeurs mesurées de CMI, en particulier de l'amphotéricine B vis-à-vis des Candida;
 - ii) des facteurs liés à l'hôte (immunodépression sévère; complexité des pathologies; présence de corps étrangers en particulier de cathéters intravasculaires colonisés; compliance; interaction médicamenteuse);
 - iii) des facteurs liés à la levure (rôle pathogène, virulence, colonisation);
 - iv) des facteurs liés à l'antifongique (biodisponibilité, pharmacocinétique).
- Aujourd'hui, il est nécessaire que les tests d'activité in vitro des antifongiques destinés aux cliniciens soient restreints aux situations où une corrélation in vitro-in vivo a été clairement établie.

 La règle des « 90-60 » [105,106]

La corrélation entre les CMI *in vitro* et l'efficacité *in vivo* est difficile à établir en mycologie.

Afin de tenter de corréler des deux, le concept de seuils (« breakpoints ») a été introduit en 1997. Ces breakpoints sont différents en fonction de l'antifongique en question.

La règle des « 90-60 » est souvent utilisée pour comparer le degré de corrélation des valeurs de CMI à l'évolution clinique. Une infection due à une souche sensible répond au traitement approprié dans 90% des cas et Une infection due à une souche résistante (ou traitée avec une molécule non adaptée) répond dans 60% des cas. Par exemple, Rex et al ont montré que la réponse positive au traitement par fluconazole a été vue chez 92% des 403 patients avec des isolats « sensibles », 82 % des 55 patients avec des isolats « sensibilité dose dépendant » et 56% des 61 patients avec des isolats « résistants ». Les corrélations entre la sensibilité déterminée *in vitro* et la réponse clinique ne sont pas claires, les facteurs d'hôtes (statut immunitaire, terrain du patient) jouent donc un rôle crucial dans l'évolution clinique.

Relation entre les critères d'interprétation des CMI(Breakpoints) et le succès ou l'échec thérapeutique [70]

Une CMI n'est pas une valeur absolue, mais le résultat de décisions plus ou moins arbitraires prises au cours de l'élaboration de la méthode.

La résistance clinique est définie par la persistance ou la progression de l'infection malgré une thérapeutique appropriée. La prédiction de l'évolution clinique pour un patient ayant une infection fongique souvent difficile. La sensibilité de la souche isolée n'est qu'un facteur parmi d'autres. Les facteurs liés à l'hôte ont souvent plus d'impact sur l'évolution que les tests de sensibilité in vitro : maladie sous-jacente, immunodépression, corps étranger (cathéter). Il faut également compte des caractéristiques pharmacocinétiques de l'antifongique : posologie inadaptée, pénétration insuffisante au site de l'infection, liaison aux protéines plasmatiques, interaction médicamenteuses,...

Il ne faut donc pas confondre résistance in vitro et échec thérapeutique. La résistance in vitro est souvent, mais pas toujours, prédictive d'échec thérapeutique. La sensibilité in vitro ne prédit pas toujours un succès thérapeutique.

Les modèles animaux peuvent offrir une solution pour éliminer les facteurs liés à l'hôte mais ce ne sont pas toujours des bons modèles pour les infections fongiques. Par ailleurs, des différences dans la pharmacocinétique peuvent rendre difficile l'extrapolation à l'homme des posologies utiles.

Les analyses pharmacodynamiques fournissent d'autres moyens d'étudier l'efficacité d'un antifongique. Trois paramètres sont en prendre en compte :

- ✓ Le temps pendant lequel la concentration plasmatique de l'antifongique dépasse la CMI.
- ✓ Le rapport concentration plasmatique maximale/CMI.
- ✓ Le rapport aire sous la courbe (ASC)/CMI.

La difficulté est de définir le paramètre à prendre en compte pour chaque antifongique.

Par exemple, pour le fluconazole et Candida, le rapport ASC(ou posologie)/CMI semble être le meilleur facteur prédictif de la réponse thérapeutique. Des études ont montré qu'un rapport supérieur ou égal à 25 était prédictif d'un succès thérapeutique (pour une CMI à 4µg/mlx25, une posologie de 100 mg/j est suffisante ; pour une CMI de 32 4µg/ml, une posologie de 800 mg/j est nécessaire).

Pour amphotéricine B et candida, la meilleure efficacité est obtenue avec un rapport concentration maximale/CMI d'environ 2.

La connaissance de la relation concentration plasmatique-efficacité et de l'effet postantifongique peut fournir une base plus rationnelle pour une meilleure stratégie antifongique : détermination de la posologie et de l'espacement des prises orales ou des perfusions permettant le maximum d'effets thérapeutiques et le minimum d'effets indésirables. Par exemple pour amphotéricine B et pour les échinocandines (caspofungine), la fongicide concentration plasmatique dépendante et l'effet postantifongique prolongé (> 12 heures) peuvent permettre une administration plus espacée de plus fortes doses pour optimiser le rapport concentration plasmatique maximale/CMI. Pour les azolés, l'effet fongistatique indépendant de la concentration et l'absence d'effet postantifongique nécessitent d'augmenter la durée d'exposition des levures à des concentrations plasmatiques de l'antifongique de deux à quatre fois la CMI. Pour la 5-fluocytosine, qui a une activité antifongistatique indépendante de la concentration plasmatique, un effet postantifongique prolongé (2-4 heures) et une faible CMI, il est possible d'utiliser des doses quotidiennes plus faibles de façon à diminuer la toxicité médullaire sans perte d'efficacité.

IV.4 Etude comparative des techniques testées

La variabilité des mesures dépend de l'espèce, de la nature de l'antifongique testé et de la méthode utilisée, c'est pourquoi nous avons conduit l'analyse des résultats selon l'espèce, l'antifongique et la méthode utilisée.

IV.4.1 Epidémiologie: comparaison avec les autres antifongiques

L'amphotéricine B est le plus efficace de tous les antifongiques testés avec le taux de sensibilité de 100% vis-à-vis des espèces de candida sauf pour *candida albicans* où la sensibilité est de 93,3%.

La résistance acquise des espèces de Candida à l'amphotéricine B est rare. L'augmentation des CMI à l'amphotéricine B a été décrite chez *C. lusitaniae*, *C. krusei* et *C. glabrata* [4,6]. La résistance acquise est associée à la modification du contenu des lipides de la membranaire cellulaire, en particulier des stérols. Les défauts dans le gène ERG3 qui est impliqué dans la synthèse de l'ergostérol provoque l'accumulation d'autres stérols de la membrane fongique. Des souches résistantes de Candida sont plus pauvres en ergostérol par rapport aux souches sensibles [4,6]. Plusieurs auteurs (J.-P. Talarmin et al. 2009, M.A. Pfaller et D.J.Diekema, 2010) ont publié que toutes les souches étaient sensibles in vitro à l'amphotéricine B, y compris la souche de *C.lusitaniae*. Il est intéressant de noter que l'amphotéricine B garde une très bonne activité in vitro sur toutes les souches pour lesquelles la sensibilité à cet antifongique a été étudiée, même si les polyènes sont moins utilisés depuis l'apparition de nouveaux antifongiques au profil de tolérance plus favorable, comme les échinocandines [1].

On note plus de souches résistantes au voriconazole qu'à l'amphotéricine B: seule une souche est résistante à l'amphotéricine B contre 8 pour le voriconazole. Le voriconazole semble plus efficace que les autres antifongiques azolés et ce sur toutes les espèces de candida suivi du posaconazole. Ces 2 antifongiques présentent une meilleure sensibilité sur les souches de *Candida dubliniensis* et *candida krusei* qui sont résistantes à

100 % au fluconazole. L'étude I.Colisi et al. publiée en 2009 confirme que toutes les souches de *C.albicans* et *C.Krusei* qui étaient résistantes au fluconazole, étaient sensibles au Voriconazole [4]. Bien que le voriconazole et posaconazole sont actifs contre la majorité de ces isolats, la croissance de résistance au sein de la classe des azolés pour *C. glabrata* et *C. rugosa* a été documentée.

Le fluconazole est le moins efficace des dérivés azolés car il montre une résistance à 100% aux 3 espèces de candida : *Candida albicans*, *candida dubliniensis* et au *Candida krusei* qui est une résistance naturelle mais il est sensible à 100% vis-à-vis des souches de *Candida tropicalis* et à 92,3 % (selon Bio-rad®) ; 84,6% (selon Neo-sensitabs) vis-à-vis des souches de *Candida glabrata*. Dans la littérature, la majorité de souches de *Candida* sp. pour lesquelles un antifongigramme a été réalisé, étaient sensibles au fluconazole (84,5 %). C'est notamment le cas de 97,5% des souches de *C.albicans* dans ce qui est habituellement constaté dans les grandes séries [1, 6, 107], ce n'est pas le cas de notre étude où la sensibilité de *C.albicans* est nulle au fluconazole. Une publication a récemment rapporté une augmentation de la fréquence des souches de *C.glabrata* de sensibilité dose-dépendante au fluconazole dans un hôpital taïwanais, passant de 27 à 75% en l'espace de huit ans [108] ; ce n'est pas le cas dans notre série, où 84,6%-92,3 % des souches de *C.glabrata* sont sensibles au fluconazole.

Une résistance à 100 % des souches de *candida albicans* et *candida dubliniensis* à l'itraconazole est enregistrée tandis que cette molécule est sensible à 100% vis-à-vis des *C. krusei* et *C.tropicalis*.

La sensibilité des espèces de candida aux 5-Fluorocytosine varie selon la technique utilisée : *C.krusei* et *C.tropicalis* sont sensibles à 100 % à cette molécule selon le test de Bio-rad® tandis que la sensibilité de ces 2 espèces est respectivement 50% et 20% selon le test Neo-sensitabs®.

IV.4.2 Epidémiologie: résistances croisées

La résistance croisée varie selon le test utilisé, on a constaté plus de résistance avec la méthode Neo-sensitabs® que celle de Bio-rad®.

Dans cette étude, ce sont les souches de *C.albicans* qui présentent plus de résistance aux antifongiques testés. Les données de la littérature confirment que cette espèce est généralement sensible à la plupart des antifongiques^[109,110]. En effet, M.A. Pfaller et D.J.Diekema ont publié en 2010 une étude montrant que 97.0 % des souches de *C. albicans* sont sensibles au flucytosine 99.3% au fluconazole, 99.9% au posaconazole et voriconazole, et 100% à l'amphotéricine B^[110] (tableau 54). Cette discordance entre cette étude et la nôtre, peut s'expliquer par notre échantillon qui n'est pas statiquement important, par l'épidémiologie de résistance de *candida sp.* qui varie selon les pays et par la technique utilisée (Méthode diffusion en milieu gélosé dans notre étude contre méthode de référence CLSI 27-M dans la série de M.A. Pfaller et D.J.Diekema)

Ce sont les souches de *C.tropicalis* qui présentent moins de résistance aux antifongiques testés, elles sont sensibles à toutes les antifongiques sauf pour la méthode Neo-sensitabs® où 80% des souches sont résistantes aux 5-fluorocytosine.

Pour *C. krusei*, toutes les souches résistantes au fluconazole, sont sensibles à l'itraconazole, posaconazole, voriconazole et l'amphotéricine B. L'étude de M.A. Pfaller, et D.J.Diekema, publiée en 2010 a montré qu'en plus de sa résistance intrinsèque au fluconazole, *C. krusei* montre également une sensibilité réduite à la flucytosine^[109].

Pour *C.dubliniensis*, toutes les souches résistantes au 5-fluorocytosine, itraconazole et fluconazole, sont sensibles au posaconazole, voriconazole et l'amphotéricine B. Ces résultats sont concordants avec la littérature car *Candida dubliniensis* développe rapidement une résistance aux antifongiques azolés essentiellement le fluconazole^[4, 110,111]. Les taux rapportés sont variables de 3 %^[111] à 17 %^[110]. Toutes les études rapportent

une sensibilité de 100 % des souches de *Candida dubliniensis* à l'amphotéricine B et à ses formulations lipidiques. Ces molécules peuvent présenter des alternatives au fluconazole pour le traitement des mycoses à *Candida dubliniensis* [4, 110,111]. Par ailleurs, *Candida dubliniensis* présente un pouvoir pathogène plus faible que *Candida albicans*. Cette espèce est en effet moins adaptable aux stress et plus sensibles aux réactions de défense immunes que *Candida albicans* [112-114]. Par ailleurs, elle reste le plus souvent sous forme de levure alors que *Candida albicans* se transforme en forme filamenteuse [112,113]. Ceci peut expliquer l'incidence faible des formes sévères chez des sujets prédisposés comme les sujets VIH positifs. Bien que *Candida dubliniensis* semble exercer son rôle pathogène chez les sidéens en cas de traitement préalable par le fluconazole, les facteurs favorisant sa survenue chez des sujets immunocompétents restent inconnus. Pour préciser son incidence, son rôle pathogène et sa susceptibilité à développer une résistance aux antifongiques, il est indispensable de différencier les deux espèces d'une façon systématique.

Une seule souche de *C.albicans* est résistante à l'amphotéricine B mais elle est sensible au voriconazole.

Toutes les souches de *C.albicans* sont résistantes aux 3 antifongiques : 5-fluorocytosine, itraconazole et fluconazole.

17 souches présentent une résistance à au moins 3 des antifongiques étudiés: 15 *C.albicans*, 1 *C.dubliniensis* et 1 *C.glabrata* (selon Bio-rad®) ou 14 *C.albicans*, 1 *C.dubliniensis* et 2 *C.glabrata* (selon Neo-sensitabs)

Dans plusieurs publications, une résistance croisée entre les différents azolés vis-à-vis de *C.glabrata* a fréquemment été rapportée, et de nombreux auteurs recommandent la plus grande prudence avant d'envisager de traiter une infection invasive à *C.glabrata* par un antifongique de cette famille, notamment lorsqu'il existe une préexposition au fluconazole [1, 6, 30,115].

Tableau 54: Comparaison de pourcentages de sensibilité entre notre étude à ceux de l'étude de M.A.Pfaller et D.J.Diekema

		M.A. Pfaller, et D.J.Diekema.2010 (n=82 à 5208)	Notre étude (n=38)	
Techniques		CLSI M27-A	Bio-rad®	Neo- sensitabs®
Candida sp.	Antifongique	% S	% S	% S
<i>C. albicans</i>	5-FC	97.0	0	0
	FCZ	99.3	0	0
	ITR	96.1	0	0
	PSZ	99.9	13,3	13,3
	VCZ	99.9	46,7	53,3
	AmB	100	93,3	93,3
<i>C. glabrata</i>	5-FC	99.0	30,8	0
	FCZ	53.1	92,3	84,6
	ITR	2.3	53,8	53,8
	PSZ	79.6	100	84,6
	VCZ	91.1	100	100
	AmB	100	100	100
<i>C. tropicalis</i>	5-FC	92.0	100	100
	FCZ	99.2	100	20
	ITR	53.0	100	100
	PSZ	99.9	100	100
	VCZ	99.8	100	100
	AmB	100	100	100
<i>C. krusei</i>	5-FC	5.0	100	50
	FCZ	1.3	0	0
	ITR	1.0	100	100
	PSZ	99.0	100	100
	VCZ	99.7	100	100
	AmB	100	100	100

IV.4.3 Comparaison des techniques: Praticabilité

Cette étude compare deux techniques d'antifongigramme, qui se déroulent en milieu gélosé : disque Bio-rad® et comprimé Neo-sensitabs®. Le principe de réalisation et de lecture de ces techniques est le même : diffusion en milieu gélosé et une mesure de diamètre d'inhibition.

Avantages et inconvénients de la méthode Neo-sensitabs®

Avantages :

- ✓ Simple méthode de diffusion en milieu gélosé
- ✓ Grand nombre d'antifongique est disponible en comprimé
- ✓ Amélioration de la performance de cette technique par la modification de l'agar RPMI-1640 qui est complété avec 0,2% de glucose
- ✓ Permet d'évaluer la sensibilité des espèces de candida, Cryptococcus et les champignons filamenteux sporulés tels qu'Aspergillus aux antifongiques
- ✓ Une méthode qui se fait dans des conditions très proches de ceux de la technique de référence CLSI M44-A
- ✓ Méthode validée et standardisée par rapport à la méthode de référence CLSI
- ✓ La reproductibilité de cette méthode est environ 97,1% et elle est supérieure aux autres méthodes commercialisées comme ATB-Fungus®, Candifast®, ... [116].
- ✓ Méthode spécialement intéressante pour étudier la sensibilité aux dérivés triazolés in vitro [116].

Inconvénients ^[117] :

- ✓ Difficultés au niveau du choix du milieu à utiliser et de l'interprétation des points finaux
- ✓ Manque de méthode directe et précise pour la détermination et l'interprétation des résultats en fonctions des CMI

Avantages et inconvénients de la technique de disque Bio-rad®:

Avantages :

- ✓ Facile d'emploi
- ✓ Permet d'évaluer les sensibilités des espèces de candida, Cryptococcus et les champignons filamenteux sporulés tels qu'aspergillus aux antifongiques

Inconvénients :

- ✓ Technique ancienne.
- ✓ Aucune étude comparative n'est réalisée avec les techniques de référence CLSI et EUCAST
- ✓ Peu d'antifongique sont disponibles par rapport à la méthode Neo-sensitabs®

IV.4.4 Comparaison des techniques: résultats

Dans notre étude, si on examine l'itraconazole et l'amphotéricine B, une bonne corrélation entre les techniques Neo-sensitabs® et Bio-rad® a été observée pour toutes les espèces de *Candida* c'est-à-dire que les deux techniques pourraient être considérées comme équivalentes pour déterminer la sensibilité à l'amphotéricine B et à l'itraconazole de toutes les espèces de *Candida*.

Dans le cas où l'antifongique à tester est le 5-fluorocytosine, les deux méthodes sont discordantes pour *C.glabrata*, *C.krusei* et *C.tropicalis*, lorsqu'il s'agit de *C.albicans* et *C.dubliniensis*, les deux méthodes sont équivalentes. Les 2 techniques testées pourraient être choisies pour déterminer la sensibilité à la 5-fluorocytosine chez *C. albicans* et *C.dubliniensis*.

D'après l'analyse des résultats les deux techniques étudiées sont concordantes à 97,4% pour le fluconazole, nous constatons une seule discordance pour la souche *C. glabrata*.

L'analyse des résultats indique que les techniques Neo-sensitabs® et Bio-rad® sont en accord à 94,7% pour posaconazole et voriconazole. Ces deux techniques sont équivalentes pour posaconazole sur toutes les souches de *Candida* sauf une seule souche de *Candida albicans* et elles sont concordantes pour voriconazole sauf deux souches de *C.glabrata* où les deux tests sont discordants.

Nous remarquons que la corrélation entre les techniques Neo-sensitabs® et Bio-rad® est moindre pour *C. glabrata* que pour les autres espèces.

En comparant les résultats, nous nous apercevons que c'est au niveau du 5-fluorocytosine qu'il y a le plus de discordances.

Cette étude est la première à s'intéresser spécifiquement à la comparaison de la technique Neo-sensitabs® à celle de Bio-rad®.

Plusieurs études sur la comparaison de l'antifongigramme ont été publiées [4, 9, 13, 14, 17, 28, 117,118]. Certains auteurs ont comparé la méthode Neo-sensitabs aux autres méthodes (tableaux 55 et 56) [4, 28,75].

Dans l'étude de Colisi et *al.* publiée en 2009, la méthode de Neo-sensitabs a été comparée à celui d'E-test, ils ont obtenu une concordance de 100%, 100% et 98,92% pour le fluconazole, le voriconazole et la caspofungine respectivement. Une plus faible concordance de 90,32% a été observée pour l'amphotéricine B. Les résultats de cette étude ont montré la performance de la méthode Neo-sensitabs® pour tester le fluconazole, le voriconazole et la caspofungine, tandis que pour l'amphotéricine B, le degré de corrélation entre les deux méthodes était faible.

Selon l'étude de Cuenca Estrella et *al.* publiée en 2005, la corrélation entre les résultats obtenus avec EUCAST et quatre techniques commerciales a été évaluée pour une collection de 93 isolats cliniques de *Candida sp.* Dans l'ensemble, l'accord entre la méthode EUCAST et les méthodes YeastOne Sensititre et Etest était de 75% et 90,4%, respectivement. Les indices de corrélation ($p < 0,01$) entre les méthodes EUCAST et commerciales étaient de 0,92 pour Sensititre YeastOne ; 0,89 pour Etest ; 0,90 pour les Neo-Sensitabs, et de 0,95 pour Fungitest. Les CMI de l'amphotéricine B obtenues par Sensititre YeastOne étaient toujours plus élevés qu'avec la méthode EUCAST et, bien que des erreurs très importantes n'aient pas été observées, 91% de CMI ont été mal classées. Les résistances des isolats cliniques à l'amphotéricine B et au fluconazole ont été identifiées correctement avec Sensititre YeastOne, Etest et Fungitest. Neo-Sensitabs a identifié des souches résistantes à l'amphotéricine B, mais a rendu > 5% des souches résistantes au fluconazole comme sensibles. Les méthodes commerciales, en particulier Etest et Fungitest, semblaient être des alternatives appropriées à la procédure EUCAST pour les tests de sensibilité des souches de *Candida* aux antifongiques.

Tableau 55: Comparaison de résultats de concordance entre Neo-sensitabs® et autres méthodes selon les différents auteurs en fonction de l'antifongique testé

Agents antifongiques	Auteurs et méthodes comparées à Neo-sensitabs®		
	M. Cuenca-Estrella et al. <i>Clin Microbiol Infect</i> 2005	Ioana COLOSI et al. <i>Sc. Parasit.</i> , 2009	Notre étude
	Indice de corrélation entre Neo-sensitabs® et EUCAST	% de concordance entre Neo-sensitabs® et E-test®	% de concordance entre Neo-sensitabs® et Bio-rad®
Amphotéricine B	0.89	90.32 %	100%
fluconazole	0.93	100 %	97,4%
voriconazole	ND	100%	94,7%
Flucytosine	0.90	-	73 %
Itraconazole	0.88	-	100%
Posaconazole	-	-	94,7%
Caspofungine	-	98.92%	-
Ketoconazole	0.89	-	-

ND : Non disponible

Tableau 56: Comparaison de résultats de concordance entre Neo-sensitabs et autres méthodes selon les différents auteurs en fonction de l'espèce de *Candida*.

Espèce de <i>Candida</i>	Auteurs et méthodes comparées à Neo-sensitabs	
	M. Cuenca-Estrella et al. <i>Clin Microbiol Infect</i> 2005	Notre étude
	Indice de corrélation entre Neo-sensitabs® et EUCAST	% de concordance entre Neo-sensitabs® et Bio-rad®
<i>C. albicans</i>	0.93	99,9
<i>C. glabrata</i>	0.89	87,75
<i>C. krusei</i>	0.90	91,7
<i>C. tropicalis</i>	0.91	83,3
<i>C. dubliniensis</i>	-	100
<i>C. parapsilosis</i>	0.9	-
<i>C. lusitaniae</i>	0.91	-
<i>C. guilliermondii</i>	0.92	-

IV.4.5 Comparaison des techniques : Coût

Le coût des disques Bio-rad® est légèrement plus élevé que celui des comprimés Néo-sensitabs® (Tableaux 57 et 58).

Tableau 57: Les prix de comprimé Neo-sensitabs®

Nomenclature	Prix	Description
<u>Amphotéricine B</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Caspofungine</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Clotrimazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Econazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Fluconazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Fluorocytosine 1µg</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Itraconazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Kétoconazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Miconazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Nystatine</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés
<u>Voriconazole</u>	376.14Dhs	5 x 50 comprimés

Source : <http://www.bioconnections.co.uk/>

Tableau 58 : Les prix de disque Bio-rad®

Description	Conditionnement	Prix
Disque d'antifongigramme pour chaque agent antifongique	1cartouchex50 disques	400Dhs

IV.5 La résistance aux antifongiques chez les levures appartenant au genre *Candida*

IV.5.1 Définition [119,120]

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 donnée. La CMI50 et CMI90 correspondent respectivement à l'inhibition de 50% et 90% de même ou différentes espèces à une concentration d'antifongique donnée.

IV.5.2 Types de résistance [119,120]

Le phénomène de résistance est complexe et fait intervenir la notion de «**résistance clinique**», comprenant des facteurs liés à l'hôte et aux caractéristiques pharmacologiques des molécules antifongiques, et celle de «**résistance microbiologique**», incluant la **résistance primaire** d'une espèce donnée et **la résistance acquise** d'isolats.

Les résistances aux antifongiques peuvent être **naturelles** (primaires, caractère d'espèce ; par exemple, *C. krusei* et fluconazole) ou **acquises** (secondaires, caractère de souche, résultant de mutations et de la surexpression de certains gènes).

❖ **Exemple de résistance innée aux antifongiques**

Ex.: Résistance au fluconazole chez *C. krusei*

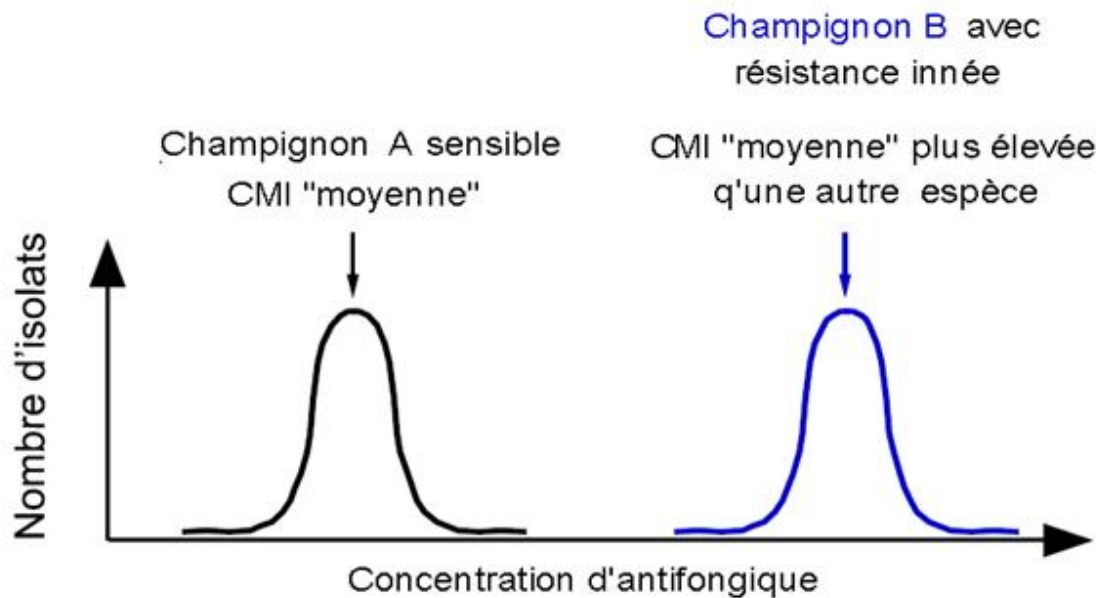


Figure 36: La résistance innée de *C.Krusei* au fluconazole [119,120]

❖ **Exemple de résistance acquise aux antifongiques**

Ex.: Résistance au fluconazole chez *C. albicans*

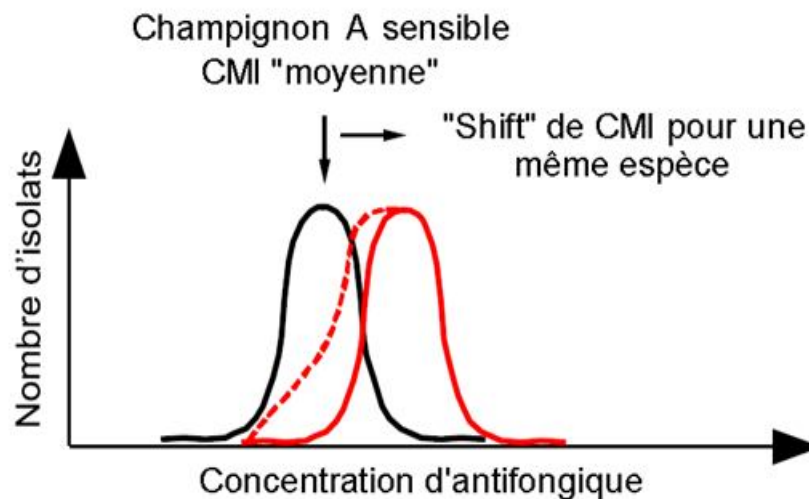


Figure 37: La résistance acquise de *C.albicans* au fluconazole [119,120]

IV.5.3 Les facteurs de risques de résistance [119,120]

Facteurs liés à l'hôte

- Pathologie sous-jacente
- Niveau d'immunosuppression
- Site de l'infection
- Matériel étranger
- Observance
- Co-administration médicamenteuse
- Traitement antifongique antérieur

Facteurs liés au champignon

- Espèce en cause
- Résistance microbiologique (initiale ou acquise en cours de traitement)
- Co-infection et/ou formation d'un biofilm
- Taille de l'échantillon

Facteurs liés à l'antifongique

- Propriété fongistatique ou fongicide
- Caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques
- Profil de tolérance
- Interactions médicamenteuses
- Posologie

IV.5.4 Mécanisme de résistance aux antifongiques

IV.5.4.1 Résistance aux polyènes

La résistance aux polyènes reste un événement relativement rare chez les isolats cliniques de champignons pathogènes [121]. Si la plupart des espèces fongiques sont considérées comme sensibles aux antifongiques polyéniques, il semble que certaines espèces leur soient naturellement peu sensibles, comme *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* et *Aspergillus terreus* [122].

Les polyènes n'ont pas besoin d'agir au niveau intracellulaire pour exercer leur activité lytique puisqu'ils s'intègrent à la membrane plasmique par sa face externe.

Ils échappent ainsi à une éventuelle métabolisation par les enzymes intracellulaires ainsi qu'aux systèmes d'efflux, dont l'hyperactivité est à l'origine de la majorité des résistances.

Ainsi, la seule possibilité pour la cellule fongique de résister à l'action des polyènes est de modifier leur cible (l'ergostérol) ou de diminuer l'accessibilité de la membrane.

Une mutation d'un gène codant une enzyme non indispensable de la voie de biosynthèse de l'ergostérol permet à la cellule d'échapper à l'antifongique. Ainsi, l'inactivation du gène *ERG6* conduit à une résistance à l'AmB chez *C. lusitaniae*. Une modification de la structure de la paroi fongique chez *C. lusitaniae* entraîne la diminution de l'accessibilité de la membrane.

IV.5.4.2 Resistance aux azolés [119,120]

Il existe quatre mécanismes de résistance à cette classe médicamenteuse, qui peuvent dans certains cas être intriqués.

- Mécanisme d'efflux : dû à la surexpression de «multidrug efflux transporter gènes», majoritairement MDR1 mais aussi CDR1 et CDR2 chez *C. albicans*, CgCDR1 et PDH1 chez *C. glabrata*, CdCDR1 chez *C. dubliniensis*. Les concentrations intracellulaires en antifongiques sont alors insuffisantes pour pouvoir exercer une activité fongistatique.

- Modification de la cible : la substitution d'acides aminés de la cible Erg11p entraîne une fixation moindre aux azolés. C'est d'ailleurs le mécanisme de résistance principal de *C.glabrata* aux azolés.

-Augmentation de la cible Erg11 : provenant de la dérepression du gène ERG11, ce mécanisme semble moins impliqué que les autres.

- Altération de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (*ERG3* principalement). C'est notamment le cas pour *C. albicans*, chez qui la mutation du gène ERG3 aboutit à une résistance aux azolés.

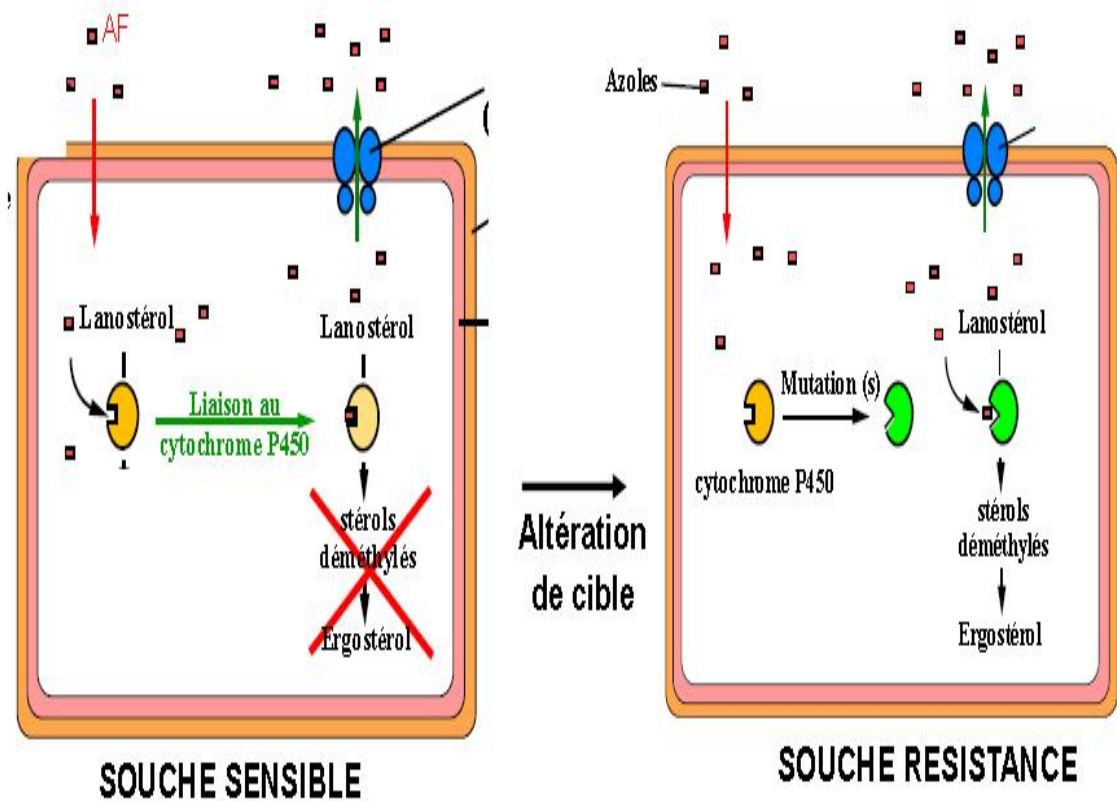


Figure 38 : Résistance aux antifongiques azolés par **altération de la cible** [45]

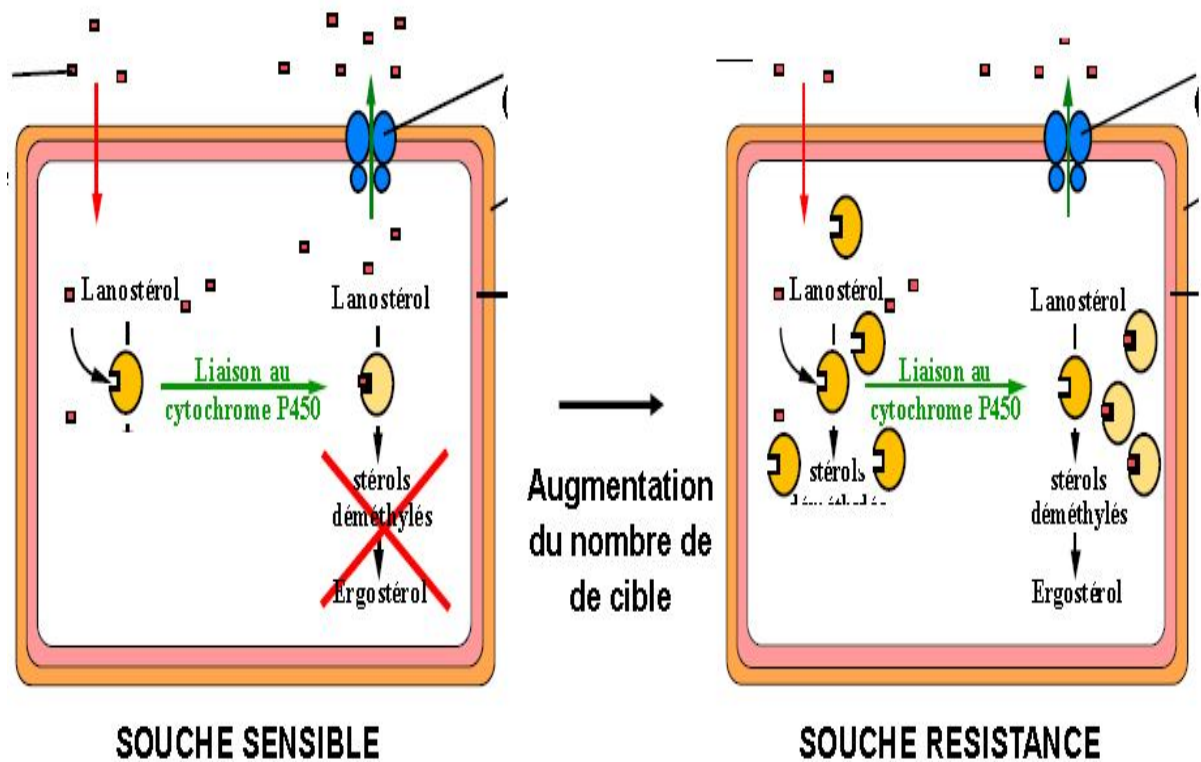


Figure 39 : Résistance aux antifongiques azolés par **augmentation du nombre de cibles de cible [45]**

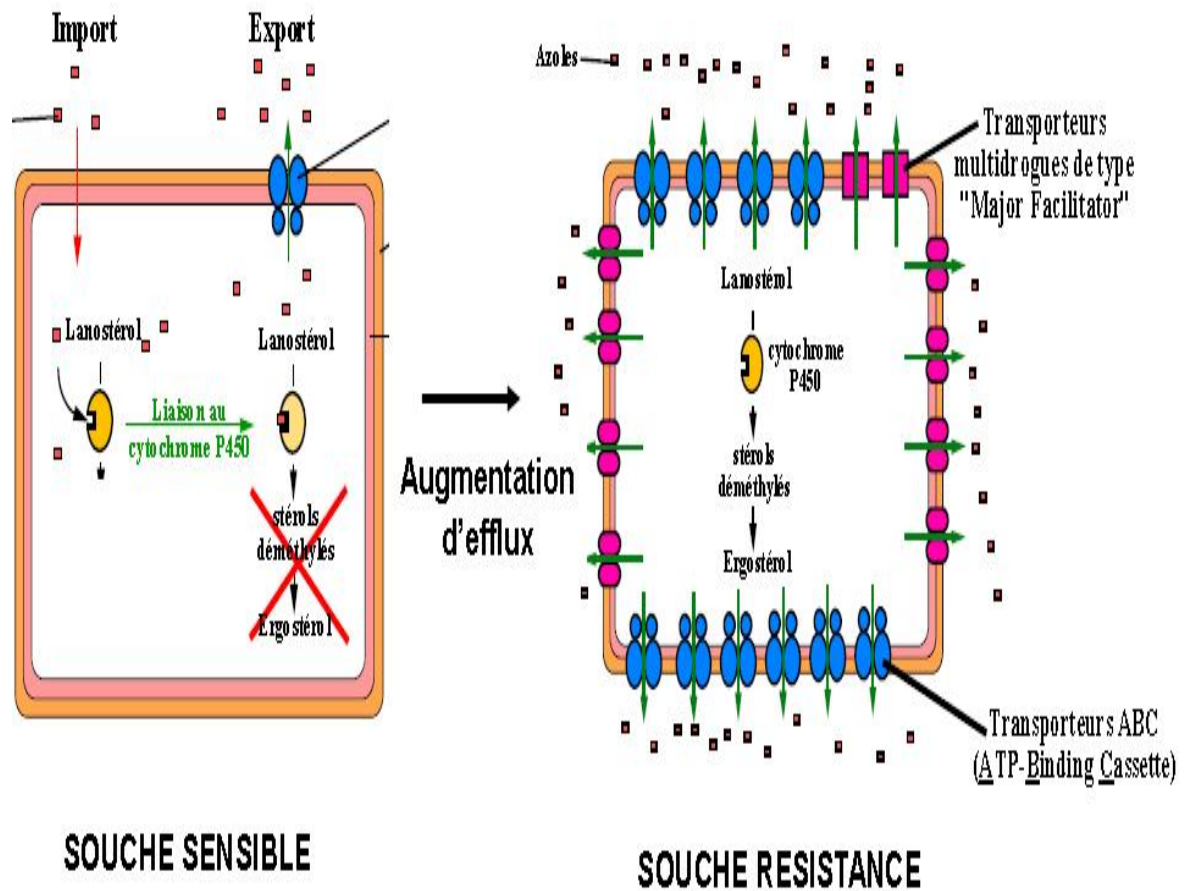


Figure 40: Résistance aux antifongiques azolés par **altération de transport (augmentation d'efflux)** [45]

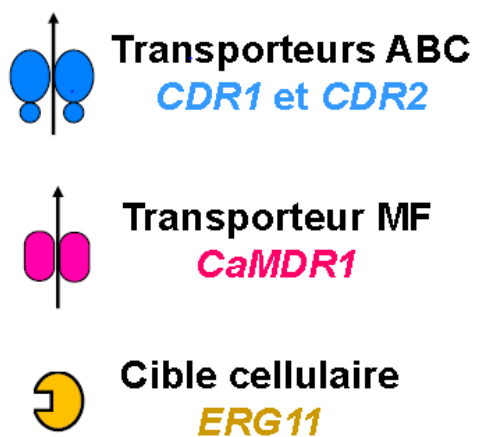
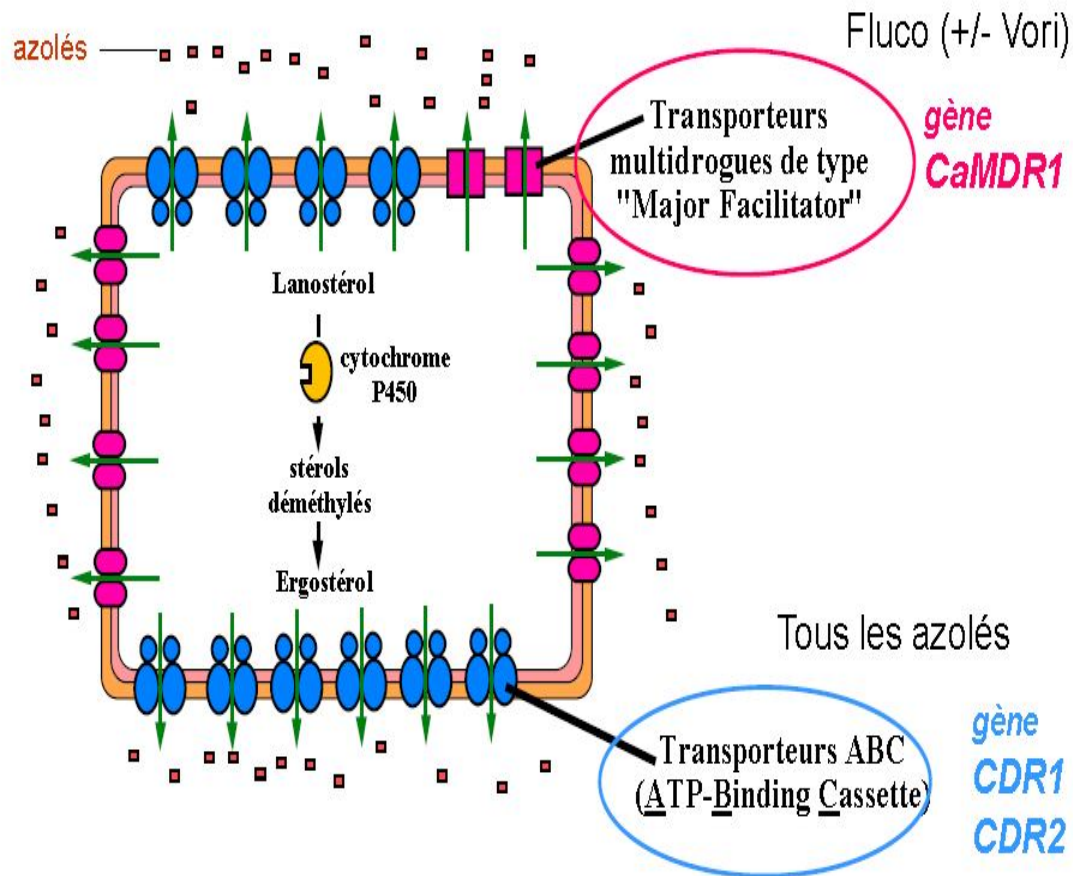


Figure 41: Exemple de mécanismes de résistance chez *C. albicans* [45]

IV.5.4.3 Résistance à la 5-fluorocytosine [121,122]

La résistance à la 5-FC est un phénomène relativement fréquent. Elle peut être intrinsèque (*C. tropicalis*) ou acquise.

Ces mécanismes de résistance peuvent être regroupés en deux catégories :

- ✓ Mutation d'un gène codant une enzyme impliquée dans le métabolisme de la 5-FC notamment une mutation sur le gène FUR1 ;
- ✓ Induction du métabolisme des pyrimidines

IV.5.4.4 Résistance aux échinocandines

Depuis son introduction en clinique en 2001, il n'y a pas d'émergence de résistances décrites à cette classe médicamenteuse, mais uniquement des échecs de traitement par caspofungine à partir de 2005 (tableau 58).

Les différences de sensibilité aux échinocandines et/ou les échecs thérapeutiques peuvent relever de différents phénomènes :

- Polymorphisme dans le gène FKS 1 ou FKS 2 (gènes codant pour la β (1-3) D-glucane synthase) : *C. parapsilosis* et *C. guilliermondii* possèdent des mutations ponctuelles dans *FKS1*, d'où leur sensibilité moindre. Les 3 membres du complexe *parapsilosis* possèdent eux aussi une mutation ponctuelle en position 606 dans *FKS1* entraînant le remplacement d'une proline en alanine, et *C. guilliermondii* possède quant à lui 3 mutations ponctuelles dans une région « hot-spot » de *FKS1* (région à l'intérieur d'un gène où les mutations sont fréquentes). Concernant *C. glabrata*, les CMI plus élevées aux échinocandines sont la conséquence de mutations dans *FKS2*. Ces différentes mutations entraînent une fixation diminuée des échinocandines à leur cible cellulaire : les β (1-3) D-glucane synthase.

- Augmentation de la synthèse des chitines : la paroi fongique est une structure dynamique, et l'inhibition de la synthèse d'un des composants (β (1-3) D-glucane) peut entraîner l'augmentation de la synthèse d'un autre

composant, en particulier celle de la chitine. Une préexposition aux échinocandines peut induire ce phénomène de «sauvetage» [124,125].

- Phénomène paradoxal d'Eagle : Effet observé *in vitro* dont la corrélation *in vivo* est controversée, il consiste en une absence de pousse à des concentrations faibles mais une pousse fongique à des concentrations plus élevées en échinocandines (8 à 32 mg/l). Ce phénomène observé est différent selon les espèces étudiées, et la méthode de détermination de la sensibilité aux antifongiques joue grandement dans la mise en évidence de cet effet (Méthode CLSI vs EUCAST) [124].

Tableau 58: Cas décrits d'échecs de traitement par échinocandines [124].

Selected cases of echinocandin therapy failure.

Clinical setting	Pathogen	Echinocandin therapy & duration	CAS MIC (µg/ml)	FKS1 mutation	Reference
Oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS (2 courses)	>64	ND	Hernandez et al. (2004)
Prosthetic aortic valve endocarditis	<i>C. parapsilosis</i>	CAS + FCZ for 6 weeks	>16	ND	Moudgal et al. (2005)
Disseminated (abdominal surgery)	<i>C. krusei</i>	CAS for 15 days	2	ND	Pelletier et al. (2005)
Disseminated	<i>C. albicans</i>	CAS	4	S645F	Park et al. (2005)
Candidaemia	<i>C. krusei</i>	CAS	32	R1361G	Park et al. (2005)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS, AMB, VRC	>8	S633P	Dodgson et al. (2005)
Azole refractory oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS then MFG for total of 10 months	2	S645F, R1361H	Laverdiere et al. (2006)
Recurrent oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS, 2 courses with dose escalation	8	S645P (homo)	Miller et al. (2006)
Candidaemia (Acute Myeloid Leukaemia)	<i>C. krusei</i>	CAS for 17 days	8	F655C (Het)	Hakki et al. (2006) and Kahn et al. (2007)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS (3 courses)	>16	ND	Daneman et al. (2006)
Candidaemia	<i>C. parapsilosis</i>	CAS (+phenytoin)	0.25	ND	Cheung et al. (2006)
Not reported	<i>C. glabrata</i>	Not reported	4	F659 V of Fks2	Katiyar et al. (2006)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	VRC, CAS for 136 days	>8	ND	Krogh-Madsen et al. (2006)
Oesophagitis (AIDS)	<i>C. albicans</i>	CAS, 2 courses	2	F641S	Baixench et al. (2007)
Oesophagitis (AML)	<i>C. tropicalis</i>	CAS	4	ND	Pasquale et al. (2008)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS	>4	D632E	Cleary et al. (2008)
Candidaemia	<i>C. glabrata</i>	CAS for 61 days	8	F659 V of Fks2	Thompson III et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. parapsilosis</i>	CAS for 41 days	1	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. parapsilosis</i>	CAS for 50 days	1	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. guilliermondii</i>	CAS for 26 days	0.5	ND	Kabbara et al. (2008)
Candidaemia (AML)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 16 days	4	S645P (Het)	Garcia-Effron et al. (2008b)
Candidaemia (HSCT)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 44 days	4	S645P (Het)	Garcia-Effron et al. (2008b)
Candidaemia (cancer)	<i>C. tropicalis</i>	CAS for 21 days	1	F641L (homo)	Garcia-Effron et al. (2008b)
Disseminated	<i>C. albicans</i>	CAS for 34 days	1 (>32 Etest)	S645P	Arendrup et al. (2009)
Not reported	<i>C. glabrata</i> ^a	CAS therapy or prophylaxis	>2	Fks1,2 ^a	Garcia-Effron et al. (2009a)

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

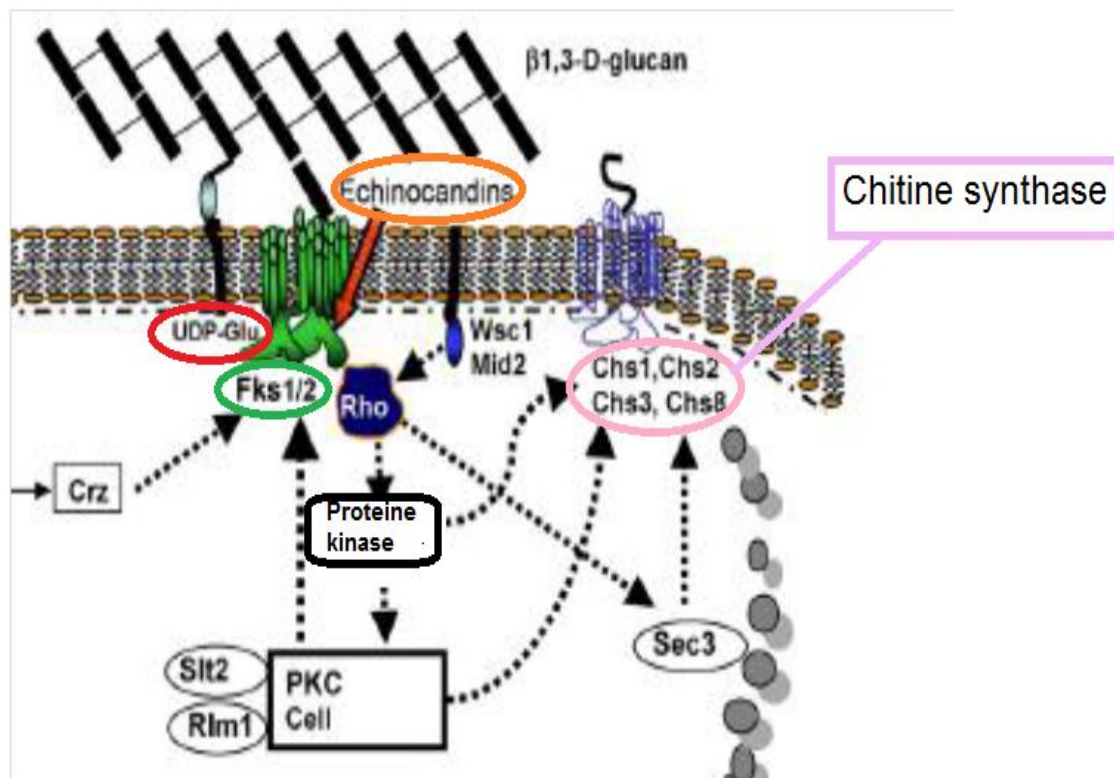


Figure 42: mécanisme de résistance aux échinocandines [123]

IV.6 Les limites d'études

- ✚ Etude monocentrique.
- ✚ Impossibilité d'étudier la reproductibilité de méthodes testées à cause de l'absence de souche de contrôle de qualité : Pour bien assurer le contrôle de qualité et la standardisation d'une technique d'antifongigramme, il est nécessaire de tester la reproductibilité en utilisant les souches de contrôle de qualité
- ✚ Les techniques testées ne sont pas comparées aux techniques de référence : La comparaison de techniques commercialisées aux techniques de référence est nécessaire dans le but de définir l'efficacité, la performance, la standardisation et la validation de ces méthodes par rapport à la technique de référence.
- ✚ Rareté des études similaires, ce qui a limité la discussion de nos résultats.

IV.7 Perspectives

- ✚ Il serait intéressant de tester en parallèle d'autres méthodes d'antifongigrammes produites par différents fournisseurs comme par exemple E-test®, Fungitest®, EUCAST, CLSI,....
- ✚ Ceci permettrait de comparer de manière élargie toutes les techniques actuellement sur le marché, ou de tester d'autres espèces de *Candida* comme *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. norvegensis*, *C. robusta* ou *C. famata*.
- ✚ Un autre point intéressant serait de tester la nouvelle classe d'antifongiques comme la caspofungine.
- ✚ Nous pourrions également tester plus de souches ce qui nous permettrait d'avoir un meilleur aperçu des capacités de ces méthodes.
- ✚ Il serait intéressant de faire une enquête sur la pratique de l'antifongigramme auprès des biologistes médicaux et des cliniciens pour définir la pratique de l'antifongigramme au Maroc dans l'intérêt du patient.



CONCLUSION



V. Conclusion :

Des grands progrès ont été réalisés ces dernières années dans le domaine des tests de sensibilité des levures aux antifongiques. Des améliorations restent à apporter sur le plan technique (élimination du «phénomène de trainé» pour les azolés), mais aussi des critères d'interprétation. Des études complémentaires sont également nécessaires dans le domaine des associations d'antifongiques (tests in vitro et corrélations cliniques). Il faut surtout se rappeler que le test de sensibilité aux antifongiques n'est qu'un élément parmi les autres permettant de guider le clinicien dans le choix de l'antifongique et de sa posologie. Le dialogue entre cliniciens et mycologues est plus que jamais indispensable dans le domaine des sensibilités aux antifongiques.

Dans les candidoses invasives, une bithérapie par polyène et 5-FC est justifiée dans le traitement des infections de sites dans lesquels la pénétration des antifongiques est difficile, comme les endocardites, les méningites et les endophtalmies. L'association caspofungine plus 5-FC pourrait s'avérer intéressante comme alternative dans le traitement de certaines infections sévères à *Candida sp.*

Des données actuelles suggèrent pourtant que la règle des «90-60 %» pourrait être applicable aux tests de sensibilité aux antifongiques dans de nombreux cas [27]. Même si le succès thérapeutique reste étroitement lié au statut immunitaire de l'hôte, l'antifongique peut être considéré comme un test de détection des résistances, permettant d'augmenter les posologies ou d'éviter l'usage d'une molécule avec laquelle il y aurait une perte de chance pour le patient, et constituer ainsi un apport supplémentaire dans la prise en charge de l'infection fongique. Des nouvelles approches telles que la mesure de la concentration minimale fongicide, de la concentration minimale efficace ou l'utilisation de paramètres pharmacodynamiques sont régulièrement proposées [27].

Cette étude témoigne de la fréquence des *Candida* sp, le profil de sensibilité aux antifongiques et la performance des techniques d'antifongigrammes à l'HMIMV-Rabat. Si la majorité des auteurs confirment que *C.albicans*, demeure largement sensible aux antifongiques, et prédominant, l'émergence de résistance de cette souche et d'autres souches de *C. non albicans* comme *C.glabrata* doit inciter à la prudence dans le choix du traitement initial, en raison de leur résistance potentielle à la famille des azolés. Il semble indispensable de poursuivre la surveillance épidémiologique des infections invasives à *Candida* sp. afin de détecter rapidement toute modification de l'épidémiologie et de la sensibilité aux antifongiques de ces pathogènes responsables d'une lourde morbidité.

Notre étude conduit à plusieurs réflexions et certains résultats devront être confirmés dans des études ultérieures. C'est le cas des résultats concernant la résistance élevée des antifongiques pour *C. albicans* puisque cela n'a pas été décrit dans la littérature à ce jour. De même, la sensibilité de 5-FC pour *C. krusei* obtenue par la technique de Bio-rad® et la sensibilité élevée de l'itraconazole pour *C.krusei*, *C.tropicalis* et *C.glabrata* devront être confirmées. Pour cela, il faudrait conduire des analyses statistiques avec un grand nombre de souches pour augmenter la puissance du test. Les souches de contrôle de qualité pourraient aider les biologistes dans la progression de cette réflexion. Le choix par le biologiste de la technique d'antifongigramme devrait être espèce et antifongique dépendant.

Au vu de nos résultats, il semble que les deux techniques d'antifongigramme testées obtiennent des résultats plus ou moins équivalents.

Les diamètres des zones d'inhibition sont bien définis et faciles à lire, ce qui prouve que les deux méthodes Neo-Sensitabs® et Bio-rad® sont très simple à utiliser. En outre, le coût de la technique Bio-rad® est légèrement supérieur à celui de la méthode Néo-sensitabs®.

Le principal inconvénient de deux méthodes testées réside dans l'absence de valeurs de CMI. En outre, pour la méthode Bio-rad®, les diamètres des zones d'interprétation ne sont pas encore disponibles pour tous les agents antifongiques. Compte tenu des données de la littérature, la méthode de diffusion sur comprimé Neo- Sensitabs® peut représenter une alternative rentable et simple dans les laboratoires cliniques aux méthodes de référence (EUCAST et CLSI) ou commercialisées (E-test®, Fungitest®) pour tester la sensibilité des espèces de *Candida* aux antifongiques.



RESUMES



Le résumé

Titre de la thèse : Comparaison de deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé sur Disque Bio-rad® et sur Comprimé Neo-sensitabs®

Auteur : UWINGABIYE Jean

Mots-clés : Antifongigrammes- Comprimés Neo-sensitabs®-Disques de diffusion Bio-rad®-concordance

Introduction : Le but de notre étude est d'évaluer les performances des deux techniques d'antifongigramme en milieu gélosé par disques Bio-rad® et comprimés Neo-Sensitabs®.

Matériels et méthodes : Une étude prospective menée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'HMIMV du 07 février au 07 août 2012. Dès la réception des hémocultures et des prélèvements des sites périphériques, l'identification des souches de *Candida* est effectuée et la réalisation de l'antifongigramme est faite sur disque Bio-rad® et comprimé Neo-sensitabs®.

Résultats : Au total 38 souches de *Candida sp* testées ; 39,5%(n=15) de *C.albicans* et 60,5%(n=23) de *C.non albicans*. La méthode Neo-sensitabs ®est comparée à celle de Bio-rad®, nous avons obtenu une concordance de 100% ; 100% ; 97,4% ; 94,7% ; 94,7% et 73% pour l'amphotéricine B, itraconazole, fluconazole, voriconazole, posaconazole et 5-fluorocytosine respectivement.

Discussion : *C.albicans* est l'espèce prédominante. L'amphotéricine B est le plus efficace des antifongiques testés. Les résultats de cette étude montre une bonne corrélation entre la méthode Neo-sensitabs®et Bio-rad® pour l'amphotéricine B, itraconazole, fluconazole, voriconazole, posaconazole le voriconazole et tandis que pour 5-fluorocytosine, le pourcentage de concordance entre les deux méthodes est faible.

Conclusion : Au vu de nos résultats, il semble que les deux méthodes d'antifongigramme testées obtiennent des résultats plus ou moins équivalents.

ABSTRACT

Thesis title: Comparison Of two antifungals tests on gar method: Bio-Rad® disc and Neo-Sensitabs® tablet

Author: Jean UWINGABIYE

Keywords: Susceptibility testing- Neo-Sensitabs® tablets-Bio-Rad® disc diffusion -correlation.

Introduction: The aim of our study is to evaluate the performance of the two antifungal's technics agar on Bio-Rad® discs and Neo-Sensitabs® tablets.

Materials and Methods: A prospective study at the laboratory of Parasitology-Myecology of HMIMV from february07th to august 7th2012. Upon receipt of blood culture samples and peripheral sites, identification of strains of *Candida* is performed and achieving an antifungal testing is made on Bio-Rad® the disc and Neo-Sensitabs® tablet.

Results: A total of 38 strains of *Candida sp* tested, 39.5% (n = 15) *C.albicans*, 60.5% (n = 23) *C.non albicans* .Neo-Sensitabs® method is compared with Bio-rad®, we obtained a concordance of 100%, 100%, 97.4%, 94.7%, 94.7% and 73% for amphotericin B, itraconazole, fluconazole, voriconazole, posaconazole and 5 -fluorocytosine respectively.

Discussion: *C. albicans* is the species most frequently isolated. Amphotericin B is the most effective of all antifungals. The results of this study showed a good correlation between the Neo-Sensitabs® method and Bio-Rad® for amphotericin B, itraconazole, fluconazole, voriconazole, posaconazole and voriconazole whereas 5-fluorocytosine, the percentage of agreement between both methods is low.

Conclusion: In light of our results, it seems that both antifungals methods tested get results more or less equivalent.

ملخص

العنوان: مقارنة بين تقنيتين مستخدمتين في قياس حساسية الفطريات المجهرية للأقراص المشبعة بالمضاد الفطري على سطح وسط زرع صلب : أقراص Bio-rad®, وحبات Neo-sensitabs®.

الكاتب: UWINGABIYE Jean

الكلمات الرئيسية: Antifongigramme , حبات Neo-Sensitabs®, أقراص Bio-rad®, مقارنة، تطابق، الفطريات المبيضة (candida) , مضادات الفطريات

مقدمة: الهدف الرئيسي لهذه الدراسة هو تقييم كفاءة تقنيتي ل Antifongigramme المستعملة في الدراسة : تقنية أقراص Bio-rad® و تقنية حبات Neo-Sensitabs®.

الطرق والوسائل: دراسة مستقبلية أجريت في مختبر علم الطفيليات و علم الفطريات بالمستشفى العسكري محمد الخامس بالرباط من 07 فبراير إلى غاية 07 غشت 2012 . عند استلام عينات زرع الدم و العينات الأخرى يتم تحديد نوع سلالة الفطريات المبيضة (candida) وكذلك تطبيق ل Antifongigramme بتقنيتي الأقراص Bio-rad® و الحبات Neo-Sensitabs® على جميع العينات.

النتائج: في المجموع، 38 سلالة من الفطريات المبيضة *Candida sp* تم تحديدها، 39.5 % (n=15) *Candida albicans* و 60.5% (n=23) *Candida non albicans*. تم مقارنة تقنية Bio-rad® و Neo-Sensitabs® وحصلنا على تطابق على التوالي بالنسبة ل 73% , 94,7% , 94,7% , 97,4% ; 100% ; 100% 5 فليوروسيتوزين, بوزاكونازول, فوريكونازول, فليكونازول , إيتراكونازول, امفوتيريسين ب.

المناقشة *Candida albicans* تعتبر النوع الأكثر انتشارا و امفوتيريسين المضاد الطفيلي الأكثر فعالية بين باقي مضادات الطفيليات المدروسة. بينت نتائج هذه الدراسة بأن هناك تطابق كبير بين تقنية Neo-Sensitabs® و Bio-rad® بالنسبة لبوزاكونازول, فوريكونازول, فليكونازول , إيتراكونازول, امفوتيريسين ب. و فيما يخص 5 -فليوروسيتوزين فنسبة التطابق ضعيفة بين التقنيتين.

خاتمة في ضوء النتائج التي حققناها يتضح لنا أن التقنيتين اللتان تم اختبارهما متطابقتين شيئا ما.



BIBLIOGRAPHIE



Références bibliographiques:

- [1] **Talarmin JP, Boutoille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P, Ansart S, Chennebault JM, Hutin P, Léautez-Nainville S, Gay-Andrieu F, Raffi F, Gericco L.**Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. *Médecine et maladies infectieuses* **2009**; 39:877–885.
- [2] **Hobson RP.** The global epidemiology of invasive Candida infections—is the tide turning? *J Hosp Infect* **2003**;55:159–68, quiz 233.
- [3] **Eloy O, Blanc V, Pina P, Gaudart A, Bressolle ML, Plainvert C, et al.** Epidemiology of candidemia: Results of a one month French hospitals-based surveillance study in 2004. *Pathol Biol (Paris)* **2006**; 54:523–30.
- [4] **Colisi I, Faure O, Lebeau B ,Colisie H, Junie M, Pelloux H.**Comparison of two methods, E-test® and Neo-Sensitabs® tablet diffusion assay, for testing susceptibility of 93 *Candida* strains to amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and caspofungin. *Sc. Parasit.*, **2009**; 1-2:112-122.
- [5] **Ruan SY, Hsueh PR.** Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc.* **2009**; 108(6):443-51.
- [6] **Pfaller MA et Diekema DJ.** Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* **2007**; 20(1):133-63.
- [7] **Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution susceptibility testing of yeasts: approved standard, 2nd Edit. Document M27-A2. *Clinical and Laboratory Standard, Wayne PA.***2002**
- [8] **Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline. Document M44-A. *Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA.***2004.**
- [9] **Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudella JL.** Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* sp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing and four commercial techniques, *Clin Microbiol Infect* **2005**; 11:486-92.

- [10]**La Croix C, Dubach M, Feulhade M.** Les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiques Echinocandins: a new class of antifungal agents. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2003** ; 33 (4): 183-91.
- [11]**Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, et al.** Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by E test. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:339-42.
- [12]**Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A.** Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **1998** ; 32(3):223-7.
- [13]**Espinel-Ingroff A, Canton A, Gibbs D, Wang A.** Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with broth microdilution M27-A2 and disk diffusion M44-A results for testing susceptibilities of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* to amphotericin B, caspofungin, fluconazole, itraconazole, and voriconazole, *J Clin Microbiol* **2007**;45(3):858-64.
- [14]**Espinel-Ingroff A.** Comparison of three commercial assays and a modified disk diffusion assay with two broth microdilution reference assay for testing zygomycetes, *Aspergillus* sp., *Candida* sp., and *Cryptococcus neoformans* with posaconazole and amphotericin, B. *J Clin Microbiol* **2006**;44(10):3616-22.
- [15]**Matar MJ, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez J R, Chen E, REX JH.** Correlation between E-Test, Disk Diffusion, and Microdilution Methods for Antifungal Susceptibility Testing of fluconazole and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47(5):1647-51.
- [16]**Sewell DL, Pfaller MA, Barry AL.** Comparison of broth macrodilution, broth microdilution, and E-test antifungal susceptibility tests for fluconazole. *J Clin Microbiol*, **1994**; 32:2099-102.
- [17]**Espinel-Ingroff A., Canton E.** Comparison of Neo-Sensitabs Tablet Diffusion Assay with CLSI Broth Microdilution M38-A and Disk Diffusion Methods for Testing Susceptibility of Filamentous Fungi with Amphotericin B, Caspofungin, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, **2008**:1793–1803.

- [18] **Canton E, Peman J, Carrillo-Munoz A, Orero A, Ubeda P, Viudes A, and Gobernado M.** Fluconazole susceptibilities of blood stream *candida* sp. isolates as determined by National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A2 and two other methods. *J. Clin. Microbiol.* **1999**; 37: 2197–2200.
- [19] **Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, and Verschraegen G.** Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth microdilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J. Clin. Microbiol.* **2002**; 40:918–921.
- [20] **Develoux M, Bretagne S.** Candidoses et levures diverses. *EMC-Maladies Infectieuses* **2005**; 2 : 119–139.
- [21] **Zilberberg MD, Shorr AF, Kollef MH.** Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2008**; 29: 978-80.
- [22] **Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM et al.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* **2004**; 39: 309-17.
- [23] **Mean M, Marchetti O, Calandra T.** Bench-to-bedside review: Candida infections in the intensive care unit. *Crit Care* **2008**; 12: 204.
- [24] **Picazo JJ, Gonzalez-Romo F, Candel FJ.** Candidemia in the critically ill patient. *Int J Antimicrob Agents* **2008**; 32 Suppl 2: S83-5.
- [25] **Kalkanci A, Berk E, Aykan B, Caglar K, Hizel K, Arman D, Kustimur S.** Epidemiology and antifungal susceptibility of Candida species isolated from hospitalized patients. *Journal de Mycologie Médicale* **2007**; 17: 16-20.
- [26] **18e ECCMID Barcelone, Espagne, avril 2008.** Stratégies thérapeutiques efficaces pour le traitement des infections fongiques invasives : un traitement précoce approprié pour chaque patient. *Médecine et maladies infectieuses* **2008** ; 38 :1-7.
- [27] **Blanc V, Eloy O, Sanchez R.** Pratique de l'antifongigramme dans 62 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* **2005** ; 15 :197–210.
- [28] **Rieu P, Eloy O, Bertout S, Mallié M, Bain P, Blanc V.** Sensibilité comparée par CLSI, EUCAST, E-test et ATBW Fungus 2 des souches de

Candida sp. isolées au cours d'une enquête épidémiologique sur les candidémies dans des hôpitaux non universitaires. *Journal de Mycologie Médicale* **2009** ; 19 :94-103.

[29] Djohan V, Angora KE, Vanga-Bosson AH, Konaté A, Kassi FK, Yavo W, Kiki-Barro PC, Menan H, Koné M. Sensibilité in vitro des souches de *Candida albicans* d'origine vaginale aux antifongiques à Abidjan (Côte d'Ivoire). *Journal de Mycologie Médicale* **2012** ; 22 :129-133.

[30] Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. .Resistance croisée aux dérivés triazolés chez *Candida* sp.: Observation, fréquence dans les isolats sanguins et implications pour les traitements antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale* **2007** ; 17 : S1 -S10.

[31] Pfaller MA, Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect* **2004**; 10(suppl. 1):11-23.

[32] Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* **2004**; 38:311-20.

[33] Anane SK, Kallel E, Kaouech S, BelHaj, Chaker E. *Candida dubliniensis* : une nouvelle espèce émergente. *Ann Biol Clin* **2007** ; 65 (1) : 13-9.

[34] Pfaller MA, Diekema DJ. Role of sentinel surveillance of candidemia: trends in species distribution and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* **2002**; 40:3551-7.

[35] Anane S, Khalfallah F. Diagnostic des candidoses systémiques : difficultés et perspectives. *Pathol Biol* 2006: 11; sous presse.

[37] Sandven P, Bevanger L, Digranes A et al. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 1977-81.

[38] Marchetti O, Bille J, Fluckiger U et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* **2004**; 38: 311-20.

- [39] **Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H et al.** Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2004**; 23: 317-22.
- [40] **Colombo AL, Nucci M, Park BJ et al.** Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 2816-23.
- [41] **Massanet P, Corne P, Conseil M, Perrigault P F, Lachaud L, Jaber S, Calvet B, Jonquet O, Reynes J.** Traitements antifongiques des candidémies chez les patients non neutropéniques : évaluation des pratiques en réanimation. *Médecine et maladies infectieuses* **2010** ; 40 :644–649.
- [42] **Picazo JJ, Gonzalez-Romo F, Candel FJ.** Candidemia in the critically ill patient. *Into J Antimicrob Agents* **2008**; 32Suppl 2: S83-5.
- [43] **Yashuda JM.** An update on Antifungal Therapy: A Focus on Systemic Agents for Invasive Fungal Infections. *California J Health-System Pharm* **2001**: 4-12.
- [44] **McTaggart B, Wong G.** Invasive Fungal Infection: *Review and Update of Drug Management.* *Can J Hosp Pharm* **2002**; 55 (2):1-19.
- [45] **Sanglard D, Odds FC.** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002; **2**: 73-85.
- [46] **Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, Faroudy M, Ababou A, Lazreq C, Sbihi A.** Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale* **2006** ; 16 :16–25
- [47] **Aliff TB, Maslak PG, Jurcic JG, Heaney ML, Cathcart KN, Sepkowitz KA, Weiss MA.** Refractory *Aspergillus* pneumonia in patients with acute leukemia: successful therapy with combination caspofungin and liposomal amphotericin. *Cancer* **2003**; 97(4): 1025-32.
- [48] **Amoulay E, Schlemmer B.** Faut-il proposer une prophylaxie antifongique aux patients non neutropéniques de réanimation in *Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte, conférence de consensus commune.* Paris. *Elsevier ed* **2004** : 87-92.

- [49] **Andrès E, Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R.** Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. *Revue de la littérature. Rev Med Int* **2001**; 22: 141-50.
- [50] **Parcheesi F, Schimizzi AM, Najvar LK, Bocanegra R, Caselli F, Di Cesare S et al.** Interactions of posaconazole and flucytosine against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(5): 1355-9.
- [51] **Carbon C, Régnier B, Saimot G, Vildé JL, Yeni P.** Médicaments anti-infectieux. *Flammarion médecine-sciences, Paris, 1994* : 503.
- [52] **Grillot R, Lebeau B.** Antifongiques systémiques. *In Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques* (Bry skier A ed), *Ellipse, Paris, 1999* : 1 104-1 132.
- [53] **Billaud EM.** Interactions métaboliques des antifongiques azolés. *Journal de Mycologie Médicale* **2007** ; 17 :168-176
- [54] **Rex JH, Bennet JE, Sugar AM, Pappas PG, Van Der Horst CM, Edwards JE et al.** A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patients without neutropenia. *N Engl J Med* **1994**; 331(20): 1325-30.
- [55] **DuPont B.** Nouveaux antifongiques : voriconazole et caspofungine. *Archives de pédiatrie* **2003** ; 10 Suppl. 5 :592-598s.
- [56] **Mora-Duarte J, Betts R, Rotstein C, Colombo AL, Thompson-Moya L, Smietana J, Lupinacci R, Sable C, Kartsonis N, Perfect J.** Caspofungin Invasive Candidiasis Study Group. Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. *N Engl J Med* **2002**; 347(25):2020-9.
- [57] **Walsh TJ, Teppler H, Donowitz GR, Maertens JA, Baden LR, Dmoszynska A et al.** Caspofungin versus liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med* **2004**; 351(14): 1391-402.
- [58] **Dautremer G, Lanternier F, Dannaoui E, Lortholary O.** Associations antifongiques dans les infections fongiques invasives. *La Revue de médecine interne* **2010** ; 31 :72-81.

- [59] **Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh T, Edwards JE; Infectious Diseases Society of America.** Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* **2004**; 38:161-89.
- [60] **Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Huynh H, Hollis RJ.** Clinical evaluation of a frozen commercially prepared microdilution panel for antifungal susceptibility testing of seven antifungal agents, including the new triazoles posaconazole, ravuconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol* **2002**;40:1694-7.
- [61] **Datry A, Bart-Delabesse E.** La caspofungine : du mécanisme d'action aux applications thérapeutiques. *Rev Méd. Intern* **2006** ; 27 : 32-9.
- [62] **Delaunay P, Fissore C.** Interactions médicamenteuses des antifongiques systémiques. *Journal of Medical Mycology* **2007**, 16 : 152-8.
- [63] **Denes E.** Les infections fongiques systémiques. *Actualités pharmaceutiques hospitalières* **2005** ; 3 : 11-4.
- [64] **Millet A et al.** Traitement des infections fongiques systémiques. *Actualités pharmaceutiques hospitalières* **2005** ; 3 : 15-28.
- [65] **Choukroun G, Thirion M, Lortholary O, Scatton O, Conti F., Calmus Y, et al.** Antifungal alternatives for invasive candidiasis refractory to caspofungine in liver transplant recipients: a report of two cases. *Transplantation* **2006**;82:1385-6.
- [66] **Regnier BAM, Bezie Y, Blanc V, Buzyn A, Choutet P, Mimoz O, et al.** Prise en charge des aspergilloses et candidoses invasives de l'adulte. Conférence de consensus commune SFAR, SPILF, SRLF. *Ann Fr Anesth Reanim* **2004**:5-13 [numéro spécial].
- [67] **Büchner T, Fegeler W, Bernhardt H, Brockmeyer N.** Treatment of severe Candida infections in high-risk patients in Germany: consensus formed by a panel of interdisciplinary investigators. *EUR J Clin Microbiol Infect Dis* **2002**;21:337-52.
- [68] **Vargas K, Messer SA, Pfaller M.** Elevated phenotyping switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive patients individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:3595-607.

- [69]Conférence de consensus commune organisée conjointement par la SFAR, la SPILF et la SRLF.** Prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives de l'adulte. *J Mycol Med***2004**;14:142–6.
- [70] Piens MA, Monbrisonde F, Picot S.** Etude de la sensibilité des levures aux antifongiques en pratique médicale. La lettre de l'infectiologue-Tome XVIII-n°6-**2003**.
- [71] Clinical Laboratory Standard Institute.** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved standard. M38-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute, **2008**.
- [72] Clinical Laboratory Standard Institute.** Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard, M27-A3.Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute, **2008**.
- [73] Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.** EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* **2008**; 14: 398–405.
- [74] Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology infectious Diseases.** Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds.**2007**.
- [75] Cuenca-Estrella M, Arenderup M, Chryssanthou E et al.** Multicentre determination of quality control strains and quality control ranges for antifungal susceptibility testing of yeasts and filamentous fungi using the methods of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* **2007**; 13: 1018–1022.24.
- [76] Rodriguez-Tudela J, Cazar-Fuoli L, Mellado E, Astruey-Izquierdo A, Monzon A, Cuenca-Estrella M.** Epidemiological cutoffs and cross-resistance

to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52: 2468–2472.

[77]Barry AL, Pfaller MA, Brown SD et al. Quality control limits for broth microdilution susceptibility tests of ten antifungal agents. *J Clin Microbiol* **2000**; 38:3457-9

[78]Lee SC, Fung CP, Huang JS et al. Clinical correlates of antifungal macrodilution susceptibility test results for non-AIDS patients with severe *Candida* infections treated with fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother***2000**; 44:2715-8.

[79]Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin infect Dis* **2002**; 35:1073-80.

[80]Clinical Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved standard. M38-A2. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standard Institute, **2008**.

[81]Lass-Floßl C, Cuenca-Estrella M, Denning D, Rodriguez-Tudela J. Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus* sp. according to EUCAST methodology. *Med Mycol* **2006**; 44(1): 319–325.

[82]Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M. Comparison of the EUCAST-AFST 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: 901–904.

[83]Lass-Florl C, Perkhofer S and Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods.*Mycoses***2009**; 53:1–11

[84]Arendrup M, Kahlmeter G, Rodriguez-Tudela JL, Donnelly JP. Breakpoints for susceptibility testing should not divide wild-type distributions of important target species. *Antimicrob Agents Chemother* **2009**; 53: 1628–1629.

[85]Subcommittee of Antifungal Susceptibility Testing of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.EUCAST technical note on voriconazole. *Clin Microbiol Infect***2008**; 14: 985–987.

- [86]Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretive breakpoints for fluconazole and Candida revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **2006**; 19: 435–447.
- [87]Pfaller MA, Diekema DJ, Rex J et al. Correlation of MIC with outcome for Candida species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 819–826.
- [88]Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L et al. Correlation of MIC with outcome for Candida species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 2620–2629.
- [89]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**
- [90]Clinical Laboratory Standard Institute. Methods for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M44-A. Wayne, A: Clinical Laboratory Standard Institute, **2004**.
- [91]Rex JH, Pfaller M, Rinaldi MG, Polak A, Galgani NJ. Antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* **1993**; 6: 367–381.
- [92]Therese K, Bagyalakshmi R, Madhavan N, Deepa P. In-vitro susceptibility testing by agar dilution method to determine the minimum inhibitory concentrations of amphotericin B, fluconazole and kétoconazole against ocular fungal isolates. *Indian J Med Microbiol* **2007**; 24:273–279
- [93]Espinel-Ingroff A. Standardized Disk Diffusion Method for Yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter* **2007**; 29: 13
- [94]Espinel-Ingroff A, Pfaller M A, Messer SA et al. Multicenter comparison of the Sensititre YeastOne colorimetric antifungal panel with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A reference method for testing clinical isolates of common and emerging *Candida sp.*, *Cryptococcus spp.*, and other yeasts and yeast-like organisms. *J Clin Micro* **1999**; 37:591-595.
- [95]Ellis DH et al. Evaluation of the Sensititre YeastOne microtitre panel, Etest and Neo-sensitabs disk methods for antifungal susceptibility tests

against 4 reference yeasts. Abstract MP3.24 9th IUMS International Congress of Mycology, Sydney. **1999**.

[96]Witthuhn F, Toubas D, Beguinot I et al. Evaluation of the Fungitest kit by using strains from human immunodeficiency virus-infected patients: study of azole drug susceptibility. *J Clin Micro* **1999**;37:864-6.

[97]Linass MD, Cassaing S. Méthodes d'évaluation des antifongiques : étude comparative des différents tests. *Revue française des Laboratoires* **2001**; 2001(332):49-56.

[98]Wanger A, Millis 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 Chemother* **1995**; 39:2520-2.

[99]Pfaller MA, Messer SA, Millis K, Bolmstrom A. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of E-test and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* **2000**; 38/3359-61.

[100]Peyron F, Favel A, Michel A, Pfaller MA. Contemporary Tools for Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases* **2006**; 43:S15-27

[101]Szekely, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing for molds. *J Clin Microbiol* **1999**,37:1480-3

[102]Grillot R, Lebeau B, Alderbert D, Faure O, Bille J, Woff M. Corelation in vitro/in vivo. Détermination de la résistance et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : *Optimed* **2003** :47-71.

[103]Ariane G. Comparaison de méthode de deux antifongiques : ATB FUNGUS3® et Carte Vitek AST-YSO1®. ICH, laboratoire de bactériologie, Sion. Travail de diplôme; **2008-2009**.

[104]Bellej. Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against yeasts. *Journal de mycologie médicale* **1996**; 6(3):118-122.

- [105] **Rex JH, Pfaller M, Galgiani JN et al.** Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Infect Dis* **1997**; 24: 235-47.
- [106] **Rex JH, Pfaller MA.** Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis* **2002**; 35: 982-9.
- [107] **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.
- [108] **Ruan SY, Chu CC, Hsueh PR.** In vitro susceptibilities of invasive isolates of *Candida* species: Rapid increase in rates of fluconazole susceptible dose dependent *Candida glabrata* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2008**; 52:2919–22.
- [109] **Pfaller MA, and Diekema D J.** Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology* **2010**; 36(1): 1–53
- [110] **Quindos G, Carrillo-Munoz AJ, Arevalo MP, et al.** In vitro susceptibility of *Candida dubliniensis* to current and new antifungal agents. *Chemotherapy* **2000**; 46: 395-401.
- [111] **Fotedar R, Al Hedaithy SSA.** *Candida dubliniensis* at a university hospital in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol* **2003**; 41: 1907-11.
- [112] **Villa MM, Kamei K, Sano A, et al.** Pathogenicity and virulence of *Candida dubliniensis*: comparison with *Candida albicans*. *Med Mycol* **2002**; 40: 249-57.
- [113] **Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Bachmann SP, Patterson TF.** Replacement of *Candida albicans* with *Candida dubliniensis* in human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis treated with Fluconazole. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 3135-9.

- [114] **Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, et al.** Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* **2004**; 4: 369-76.
- [115] **Carrillo-Muñoz AJ, Abarca L, Quindós G, Arévalo P, Bornay F, Cabañes FJ, Casals JB, Estivill D, Gonzalez-Lama Z, Iglesias I, Hernández-Molina JM, Linares MJ, Martín-Manuel's E, Payá MJ, Pereiro MJ, Millán RS and Rubio M.** Multicenter evaluation of Neo-Sensitabs, a standardized diffusion method for yeast susceptibility testing. *Rev Iberia Micol* **1999**; 16: 92-96
- [116] **Panackal AA, Gribskov JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr KA.** Clinical significance of azole antifungal drug cross-resistance in *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* **2006**; 44:1740-3.
- [117] **Bertout S, Dunyach C, Drakulovski P, Reynes J, Mallie M.** Comparison of the Sensititre YeastOne1 dilution method with the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 microbroth dilution reference method for determining MIC of eight antifungal agents on 102 yeast strains. *Pathologie Biologie* **2011**; 59:48-51.
- [118] **Kiraz N, Dag I, Oz Y, Yamac M, Kiremitci A, Kasifoglu N.** Correlation between broth microdilution and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of caspofungin, voriconazole, amphotericin B, itraconazole and fluconazole against *Candida glabrata*. *Journal of Microbiological Methods* **2010**; 82:136-140
- [119] **Noël T.** The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. *Journal de Mycologie Médicale* **2012**; 22:73-178.
- [120] **Kouidhi B, Ben Gaied L, Mhadhebi M., Bakhrouf A, Bouraoui A.** Les pompes à efflux en mycologie médicale : mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques. *Journal de Mycologie Médicale* **2010** ; 20 :304-314.
- [121] **Ellis D.** Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* **2002**;49:7-10.

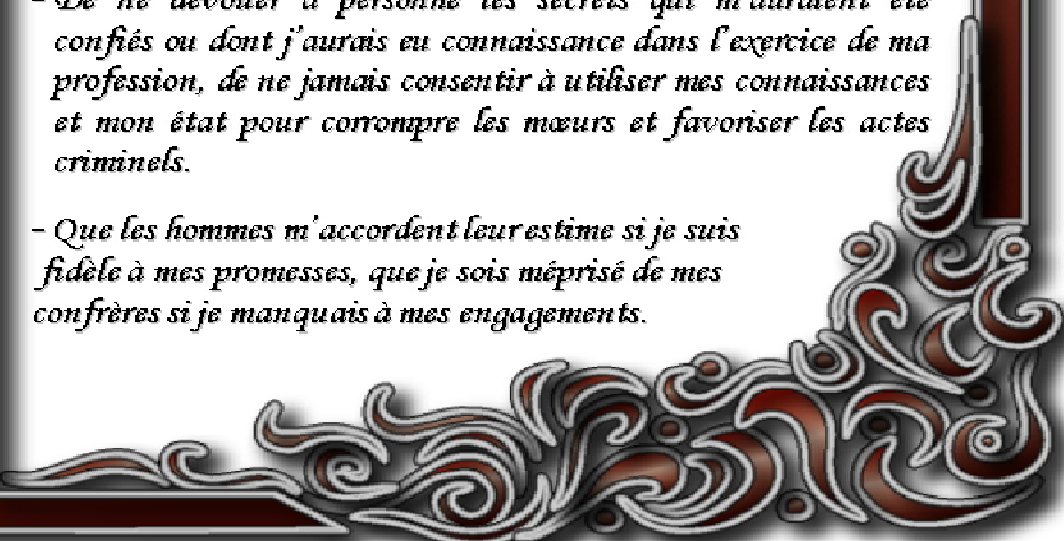
[122] Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* **2008**; 46:120-8.

[123] Perlin D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resist Updat* **2007**; 10(3): 121–130

[124] Walker LA, Gow NA, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol* **2010**; 47: 117-26.

Serment de Galien

Je jure en présence des maîtres de cette faculté :

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

جامعة محمد الخامس
كلية الطب والصيدلة
- الرباط -

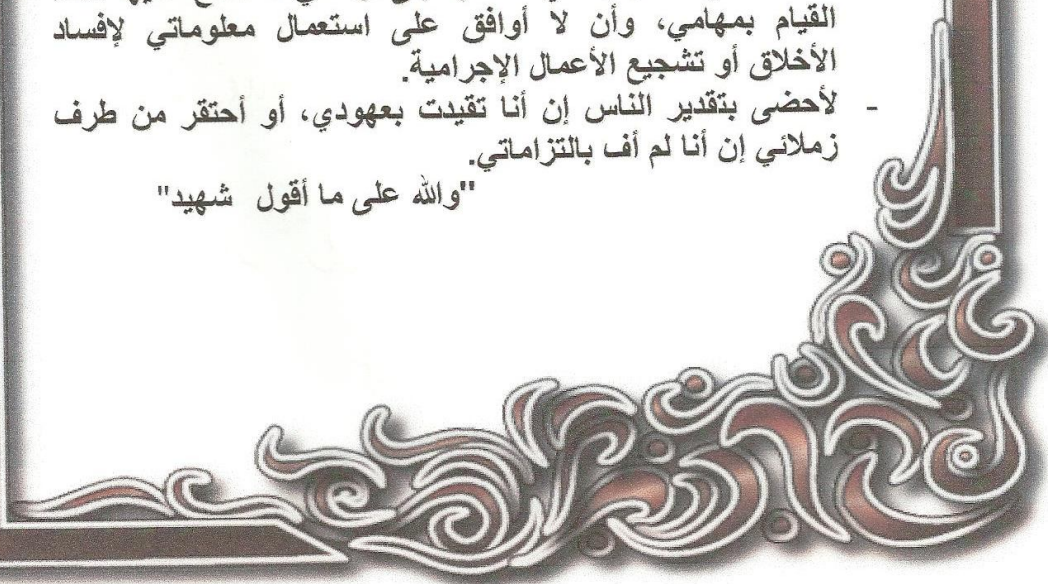
قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحس بالله العظيم

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

"والله على ما أقول شهيد"



سنة : 2013

أطروحة رقم: 53

**مقارنة بين تقنيتين مستخدمتين
في قياس حساسية الفطريات المجهريّة للأقراص المشبعة
بالمضاد الفطري على سطح وسط زرعّي صلب : أقراص بيوراد®،
وحبات نيو - سونسيتاب®**

أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم :

من طرفه

السيد: جين إيوينكابي

المزاد في: 04 يوليوز 1986 ب جيسي (رواندا)

داخلي بالمركز الاستشفائي الجامعي ابن سينا بالرباط

لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: أونتي فونجي غرام – أقراص بيوراد® – حبات نيوسونسيتاب® – مقارنة، تطابق –
الفطريات المبيضة – مضادات الفطريات.

تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

رئيس

مشرف

أعضاء

السيد: إدريس لحلو أمين
أستاذ في علم الأحياء الدقيقة

السيد: بدر الدين الميموني
أستاذ في علم الطفيليات

السيدة: نزهة مسعودي

أستاذة مبرزة في علم الدم البيولوجي
السيد : أحمد بنانة

أستاذ مبرز في التدبير الصيدلاني
السيدة: نادية بنسفاج

أستاذة مبرزة في علم المناعة