

ANNEE: 2011

THESE N°: 60

**SENSIBILITÉ IN VITRO AU VORICONAZOLE  
DE 72 SOUCHES DE CANDIDA ISOLÉES  
À L'HÔPITAL MILITAIRE D'INSTRUCTION MOHAMMED V  
( SEPTEMBRE 2010 – MAI 2011 )**

**THESE**

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

PAR

**Mlle. Houda ALEM**

*Née le 04 Novembre 1986 à Rabat*

*Pour l'Obtention du Doctorat en Pharmacie*

**MOTS CLES:** Genre *Candida* – Antifongogramme – Voriconazole – Sensibilité in vitro – Surveillance.

*JURY*

**Mme. W. EL MELLOUKI**

Professeur de Parasitologie

**PRESIDENT**

**Mr. B. E. LMIMOUNI**

Professeur de Parasitologie

**RAPPORTEUR**

**Mr. C. HAIMEUR**

Professeur d'Anesthésie-Réanimation

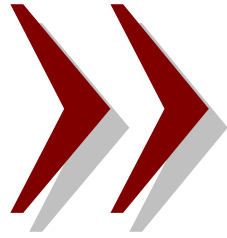
**Mr. J. LAMSAOURI**

Professeur Agrégé de Chimie Thérapeutique

**Mr. M. BENMIMOUN**

Directeur Médical des Laboratoires Pfizer (Membre associé)

**JUGES**



سبحانك لا علم لنا إلا ما  
علمتنا إنك أنت العليم  
الحكيم

﴿

سورة البقرة: الآية: 31

اللهم اننا نسألك علما نافعا و قلبا خاشعا و شفاء



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

**DOYENS HONORAIRES :**

**1962 – 1969 : Docteur Abdelmalek FARAJ**

1969 – 1974 : Professeur Abdellatif BERBICH  
1974 – 1981 : Professeur Bachir LAZRAK  
1981 – 1989 : Professeur Taieb CHKILI  
1989 – 1997 : Professeur Mohamed Tahar ALAOUI  
1997 – 2003 : Professeur Abdelmajid BELMAHI

**ADMINISTRATION :**

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

**PROFESSEURS :**

**Février, Septembre, Décembre 1973**

1. Pr. CHKILI Taieb

Neuropsychiatrie

**Janvier et Décembre 1976**

2. Pr. HASSAR Mohamed

Pharmacologie Clinique

**Mars, Avril et Septembre 1980**

3. Pr. EL KHAMLICHI Abdeslam

Neurochirurgie

Pr. MESBAHI Redouane

Cardiologie

**Mai et Octobre 1981**

5. Pr. BOUZOUBAA Abdelmajid

Cardiologie

6. Pr. EL MANOUAR Mohamed

Traumatologie-Orthopédie

7. Pr. HAMANI Ahmed\*

Cardiologie

8. Pr. MAAZOUZI Ahmed Wajih

Chirurgie Cardio-Vasculaire

9. Pr. SBIHI Ahmed

Anesthésie – Réanimation

Pr. TAOBANE Hamid\*

Chirurgie Thoracique

**Mai et Novembre 1982**

11. Pr. ABROUQ Ali\*

Oto-Rhino-Laryngologie

12. Pr. BENOMAR M'hammed

Chirurgie-Cardio-Vasculaire

13. Pr. BENSOUA Mohamed

Anatomie

14. Pr. BENOSMAN Abdellatif

Chirurgie Thoracique

15. Pr. LAHBABI ép. AMRANI Naïma

Physiologie

### **Novembre 1983**

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

Pneumo-phtisiologie  
Pédiatrie  
Neurochirurgie  
Rhumatologie  
Cardiologie

### **Décembre 1984**

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

Neurochirurgie  
Radiothérapie  
Médecine Interne  
Anesthésie -Réanimation  
Immuno-Hématologie  
Chirurgie

### **Novembre et Décembre 1985**

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

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

### **Janvier, Février et Décembre 1987**

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

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

### **Décembre 1988**

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

Chirurgie Pédiatrique  
Radiologie  
Urologie  
Traumatologie Orthopédie  
Médecine Interne

### **Décembre 1989 Janvier et Novembre 1990**

49. Pr. ADNAOUI Mohamed
50. Pr. AOUNI Mohamed
51. Pr. BENAMEUR Mohamed\*
52. Pr. BOUKILI MAKHOUKHI Abdelali
53. Pr. CHAD Bouziane
54. Pr. CHKOFF Rachid
55. Pr. FARCHADO Fouzia ép.BENABDELLAH
56. Pr. HACHIM Mohammed\*
57. Pr. HACHIMI Mohamed

Médecine Interne  
Médecine Interne  
Radiologie  
Cardiologie  
Pathologie Chirurgicale  
Pathologie Chirurgicale  
Pédiatrique  
Médecine-Interne  
Urologie

58. Pr. KHARBACH Aïcha  
 59. Pr. MANSOURI Fatima  
 60. Pr. OUZZANI Taïbi Mohamed Réda  
 61. Pr. SEDRATI Omar\*  
 62. Pr. TAZI Saoud Anas

Gynécologie -Obstétrique  
 Anatomie-Pathologique  
 Neurologie  
 Dermatologie  
 Anesthésie Réanimation

**Février Avril Juillet et Décembre 1991**

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

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

**Décembre 1992**

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

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

**Mars 1994**

100. Pr. AGNAOU Lahcen  
 101. Pr. AL BAROUDI Saad  
 102. Pr. BENCHERIFA Fatih

Ophtalmologie  
 Chirurgie Générale  
 Ophtalmologie

103.	Pr. BENJAAFAR Nouredine	Radiothérapie
104.	Pr. BENJELLOUN Samir	Chirurgie Générale
105.	Pr. BEN RAIS Nozha	Biophysique
106.	Pr. CAOUI Malika	Biophysique
107.	Pr. CHRAIBI Abdelmjid	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
108.	Pr. EL AMRANI Sabah ép. AHALLAT	Gynécologie Obstétrique
109.	Pr. EL AOUDAD Rajae	Immunologie
110.	Pr. EL BARDOUNI Ahmed	Traumato-Orthopédie
111.	Pr. EL HASSANI My Rachid	Radiologie
112.	Pr. EL IDRISSE LAMGHARI Abdennaceur	Médecine Interne
113.	Pr. EL KIRAT Abdelmajid*	Chirurgie Cardio- Vasculaire
114.	Pr. ERROUGANI Abdelkader	Chirurgie Générale
115.	Pr. ESSAKALI Malika	Immunologie
116.	Pr. ETTAYEBI Fouad	Chirurgie Pédiatrique
117.	Pr. HADRI Larbi*	Médecine Interne
118.	Pr. HASSAM Badredine	Dermatologie
119.	Pr. IFRINE Lahssan	Chirurgie Générale
120.	Pr. JELTHI Ahmed	Anatomie Pathologique
121.	Pr. MAHFOUD Mustapha	Traumatologie – Orthopédie
122.	Pr. MOUDENE Ahmed*	Traumatologie- Orthopédie
123.	Pr. OULBACHA Said	Chirurgie Générale
124.	Pr. RHRAB Brahim	Gynécologie –Obstétrique
125.	Pr. SENOUCI Karima ép. BELKHADIR	Dermatologie
126.	Pr. SLAOUI Anas	Chirurgie Cardio-Vasculaire

#### **Mars 1994**

127.	Pr. ABBAR Mohamed*	Urologie
128.	Pr. ABDELHAK M'barek	Chirurgie – Pédiatrique
129.	Pr. BELAIDI Halima	Neurologie
130.	Pr. BRAHMI Rida Slimane	Gynécologie Obstétrique
131.	Pr. BENTAHILA Abdelali	Pédiatrie
132.	Pr. BENYAHIA Mohammed Ali	Gynécologie – Obstétrique
133.	Pr. BERRADA Mohamed Saleh	Traumatologie – Orthopédie
134.	Pr. CHAMI Ilham	Radiologie
135.	Pr. CHERKAOUI Lalla Ouafae	Ophtalmologie
136.	Pr. EL ABBADI Najia	Neurochirurgie
137.	Pr. HANINE Ahmed*	Radiologie
138.	Pr. JALIL Abdelouahed	Chirurgie Générale
139.	Pr. LAKHDAR Amina	Gynécologie Obstétrique
140.	Pr. MOUANE Nezha	Pédiatrie

#### **Mars 1995**

141.	Pr. ABOUQUAL Redouane	Réanimation Médicale
142.	Pr. AMRAOUI Mohamed	Chirurgie Générale
143.	Pr. BAIDADA Abdelaziz	Gynécologie Obstétrique
144.	Pr. BARGACH Samir	Gynécologie Obstétrique
145.	Pr. BEDDOUCHE Amoqrane*	Urologie
146.	Pr. BENZAOUZ Mustapha	Gastro-Entérologie
147.	Pr. CHAARI Jilali*	Médecine Interne
148.	Pr. DIMOU M'barek*	Anesthésie Réanimation
149.	Pr. DRISSI KAMILI Mohammed Nordine*	Anesthésie Réanimation

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| 150. Pr. EL MESNAOUI Abbas          | Chirurgie Générale                             |
| 151. Pr. ESSAKALI HOUSSYNI Leila    | Oto-Rhino-Laryngologie                         |
| 152. Pr. FERHATI Driss              | Gynécologie Obstétrique                        |
| 153. Pr. HASSOUNI Fadil             | Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène |
| 154. Pr. HDA Abdelhamid*            | Cardiologie                                    |
| 155. Pr. IBEN ATTYA ANDALOSSI Ahmed | Urologie                                       |
| 156. Pr. IBRAHIMY Wafaa             | Ophtalmologie                                  |
| 157. Pr. MANSOURI Aziz              | Radiothérapie                                  |
| 158. Pr. OUZZANI CHAHDI Bahia       | Ophtalmologie                                  |
| 159. Pr. RZIN Abdelkader*           | Stomatologie et Chirurgie Maxillo-faciale      |
| 160. Pr. SEFIANI Abdelaziz          | Génétique                                      |
| 161. Pr. ZEGGWAGH Amine Ali         | Réanimation Médicale                           |

**Décembre 1996**

- |  |                                    |
|--|------------------------------------|
| 162. Pr. AMIL Touriya*                 | Radiologie                         |
| 163. Pr. BELKACEM Rachid               | Chirurgie Pédiatrie                |
| 164. Pr. BELMAHI Amin                  | Chirurgie réparatrice et plastique |
| 165. Pr. BOULANOUAR Abdelkrim          | Ophtalmologie                      |
| 166. Pr. EL ALAMI EL FARICHA EL Hassan | Chirurgie Générale                 |
| 167. Pr. EL MELLOUKI Ouafae*           | Parasitologie                      |
| 168. Pr. GAOUZI Ahmed                  | Pédiatrie                          |
| 169. Pr. MAHFOUDI M'barek*             | Radiologie                         |
| 170. Pr. MOHAMMADINE EL Hamid          | Chirurgie Générale                 |
| 171. Pr. MOHAMMADI Mohamed             | Médecine Interne                   |
| 172. Pr. MOULINE Soumaya               | Pneumo-phtisiologie                |
| 173. Pr. OUADGHIRI Mohamed             | Traumatologie-Orthopédie           |
| 174. Pr. OUZEDDOUN Naima               | Néphrologie                        |
| 175. Pr. ZBIR EL Mehdi*                | Cardiologie                        |

**Novembre 1997**

- |                                |                         |
|--------------------------------|-------------------------|
| 176. Pr. ALAMI Mohamed Hassan  | Gynécologie-Obstétrique |
| 177. Pr. BEN AMAR Abdesselem   | Chirurgie Générale      |
| 178. Pr. BEN SLIMANE Lounis    | Urologie                |
| 179. Pr. BIROUK Nazha          | Neurologie              |
| 180. Pr. BOULAICH Mohamed      | O.R.L.                  |
| 181. Pr. CHAOUIR Souad*        | Radiologie              |
| 182. Pr. DERRAZ Said           | Neurochirurgie          |
| 183. Pr. ERREIMI Naima         | Pédiatrie               |
| 184. Pr. FELLAT Nadia          | Cardiologie             |
| 185. Pr. GUEDDARI Fatima Zohra | Radiologie              |
| 186. Pr. HAIMEUR Charki*       | Anesthésie Réanimation  |
| 187. Pr. KANOUNI NAWAL         | Physiologie             |
| 188. Pr. KOUTANI Abdellatif    | Urologie                |
| 189. Pr. LAHLOU Mohamed Khalid | Chirurgie Générale      |
| 190. Pr. MAHRAOUI CHAFIQ       | Pédiatrie               |
| 191. Pr. NAZI M'barek*         | Cardiologie             |
| 192. Pr. OUAHABI Hamid*        | Neurologie              |
| 193. Pr. SAFI Lahcen*          | Anesthésie Réanimation  |
| 194. Pr. TAOUFIQ Jallal        | Psychiatrie             |
| 195. Pr. YOUSFI MALKI Mounia   | Gynécologie Obstétrique |

### **Novembre 1998**

196. Pr. AFIFI RAJAA  
197. Pr. AIT BENASSER MOULAY Ali\*  
198. Pr. ALOUANE Mohammed\*  
199. Pr. BENOMAR ALI  
200. Pr. BOUGTAB Abdesslam  
201. Pr. ER RIHANI Hassan  
202. Pr. EZZAITOUNI Fatima  
203. Pr. KABBAJ Najat  
204. Pr. LAZRAK Khalid ( M)

### **Novembre 1998**

205. Pr. BENKIRANE Majid\*  
206. Pr. KHATOURI ALI\*  
207. Pr. LABRAIMI Ahmed\*

### **Janvier 2000**

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

### **Novembre 2000**

227. Pr. AIDI Saadia  
228. Pr. AIT OURHROUI Mohamed  
229. Pr. AJANA Fatima Zohra  
230. Pr. BENAMR Said  
231. Pr. BENCHEKROUN Nabih  
232. Pr. CHERTI Mohammed  
233. Pr. ECH-CHERIF EL KETTANI Selma  
234. Pr. EL HASSANI Amine  
235. Pr. EL IDGHIRI Hassan  
236. Pr. EL KHADER Khalid  
237. Pr. EL MAGHRAOUI Abdellah\*  
238. Pr. GHARBI Mohamed El Hassan  
239. Pr. HSSAIDA Rachid\*

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

Hématologie  
Cardiologie  
Anatomie Pathologique

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

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

240. Pr. LACHKAR Azzouz  
 241. Pr. LAHLOU Abdou  
 242. Pr. MAFTAH Mohamed\*  
 243. Pr. MAHASSINI Najat  
 244. Pr. MDAGHRI ALAOUI Asmae  
 245. Pr. NASSIH Mohamed\*  
 246. Pr. ROUMI Abdelhadi

Urologie  
 Traumatologie Orthopédie  
 Neurochirurgie  
 Anatomie Pathologique  
 Pédiatrie  
 Stomatologie Et Chirurgie Maxillo-Faciale  
 Neurologie

**Décembre 2001**

247. Pr. ABABOU Adil  
 248. Pr. AOUAD Aicha  
 249. Pr. BALKHI Hicham\*  
 250. Pr. BELMEKKI Mohammed  
 251. Pr. BENABDELJLIL Maria  
 252. Pr. BENAMAR Loubna  
 253. Pr. BENAMOR Jouda  
 254. Pr. BENELBARHDADI Imane  
 255. Pr. BENNANI Rajae  
 256. Pr. BENOUACHANE Thami  
 257. Pr. BENYOUSSEF Khalil  
 258. Pr. BERRADA Rachid  
 259. Pr. BEZZA Ahmed\*  
 260. Pr. BOUCHIKHI IDRISSE Med Larbi  
 261. Pr. BOUHOUCHE Rachida  
 262. Pr. BOUMDIN El Hassane\*  
 263. Pr. CHAT Latifa  
 264. Pr. CHELLAOUI Mounia  
 265. Pr. DAALI Mustapha\*  
 266. Pr. DRISSI Sidi Mourad\*  
 267. Pr. EL HAJOUI Ghziel Samira  
 268. Pr. EL HIJRI Ahmed  
 269. Pr. EL MAAQILI Moulay Rachid  
 270. Pr. EL MADHI Tarik  
 271. Pr. EL MOUSSAIF Hamid  
 272. Pr. EL OUNANI Mohamed  
 273. Pr. EL QUESSAR Abdeljlil  
 274. Pr. ETTAIR Said  
 275. Pr. GAZZAZ Miloudi\*  
 276. Pr. GOURINDA Hassan  
 277. Pr. HRORA Abdelmalek  
 278. Pr. KABBAJ Saad  
 279. Pr. KABIRI EL Hassane\*  
 280. Pr. LAMRANI Moulay Omar  
 281. Pr. LEKEHAL Brahim  
 282. Pr. MAHASSIN Fattouma\*  
 283. Pr. MEDARHRI Jalil  
 284. Pr. MIKDAME Mohammed\*  
 285. Pr. MOHSINE Raouf  
 286. Pr. NABIL Samira  
 287. Pr. NOUINI Yassine  
 288. Pr. OUALIM Zouhir\*  
 289. Pr. SABBAAH Farid  
 290. Pr. SEFIANI Yasser  
 291. Pr. TAOUFIQ BENCHEKROUN Soumia

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

292. Pr. TAZI MOUKHA Karim

**Décembre 2002**

293. Pr. AL BOUZIDI Abderrahmane\*  
294. Pr. AMEUR Ahmed \*  
295. Pr. AMRI Rachida  
296. Pr. AOURARH Aziz\*  
297. Pr. BAMOU Youssef \*  
298. Pr. BELMEJDOUB Ghizlene\*  
299. Pr. BENBOUAZZA Karima  
300. Pr. BENZEKRI Laila  
301. Pr. BENZZOUBEIR Nadia\*  
302. Pr. BERNOUSSI Zakiya  
303. Pr. BICHRA Mohamed Zakariya  
304. Pr. CHOHO Abdelkrim \*  
305. Pr. CHKIRATE Bouchra  
306. Pr. EL ALAMI EL FELLOUS Sidi Zouhair  
307. Pr. EL ALJ Haj Ahmed  
308. Pr. EL BARNOUSSI Leila  
309. Pr. EL HAOURI Mohamed \*  
310. Pr. EL MANSARI Omar\*  
311. Pr. ES-SADEL Abdelhamid  
312. Pr. FILALI ADIB Abdelhai  
313. Pr. HADDOUR Leila  
314. Pr. HAJJI Zakia  
315. Pr. IKEN Ali  
316. Pr. ISMAEL Farid  
317. Pr. JAAFAR Abdeloïhab\*  
318. Pr. KRIOULE Yamina  
319. Pr. LAGHMARI Mina  
320. Pr. MABROUK Hfid\*  
321. Pr. MOUSSAOUI RAHALI Driss\*  
322. Pr. MOUSTAGHFIR Abdelhamid\*  
323. Pr. MOUSTAINE My Rachid  
324. Pr. NAITLHO Abdelhamid\*  
325. Pr. OUIJILAL Abdelilah  
326. Pr. RACHID Khalid \*  
327. Pr. RAISS Mohamed  
328. Pr. RGUIBI IDRISSE Sidi Mustapha\*  
329. Pr. RHOU Hakima  
330. Pr. SIAH Samir \*  
331. Pr. THIMOU Amal  
332. Pr. ZENTAR Aziz\*  
333. Pr. ZRARA Ibtisam\*

**PROFESSEURS AGREGES :**

**Janvier 2004**

334. Pr. ABDELLAH El Hassan  
335. Pr. AMRANI Mariam  
336. Pr. BENBOUZID Mohammed Anas  
337. Pr. BENKIRANE Ahmed\*

Urologie

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

- Ophtalmologie  
Anatomie Pathologique  
Oto-Rhino-Laryngologie  
Gastro-Entérologie

338. Pr. BENRAMDANE Larbi\*  
 339. Pr. BOUGHALEM Mohamed\*  
 340. Pr. BOULAADAS Malik  
 341. Pr. BOURAZZA Ahmed\*  
 342. Pr. CHAGAR Belkacem\*  
 343. Pr. CHERRADI Nadia  
 344. Pr. EL FENNI Jamal\*  
 345. Pr. EL HANCHI ZAKI  
 346. Pr. EL KHORASSANI Mohamed  
 347. Pr. EL YOUNASSI Badreddine\*  
 348. Pr. HACHI Hafid  
 349. Pr. JABOUIRIK Fatima  
 350. Pr. KARMANE Abdelouahed  
 351. Pr. KHABOUZE Samira  
 352. Pr. KHARMAZ Mohamed  
 353. Pr. LEZREK Mohammed\*  
 354. Pr. MOUGHIL Said  
 355. Pr. NAOUMI Asmae\*  
 356. Pr. SAADI Nozha  
 357. Pr. SASSENOU ISMAIL\*  
 358. Pr. TARIB Abdelilah\*  
 359. Pr. TIJAMI Fouad  
 360. Pr. ZARZUR Jamila

**Janvier 2005**

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

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

- Chirurgie Réparatrice et Plastique  
 Chirurgie Générale  
 Microbiologie  
 Rhumatologie  
 Néphrologie  
 Ophtalmologie  
 Radiologie  
 Rhumatologie  
 Pédiatrie  
 Stomatologie et Chirurgie Maxillo Faciale  
 Ophtalmologie  
 Cardiologie  
 Ophtalmologie  
 Radiologie  
 Ophtalmologie  
 Biophysique  
 Microbiologie  
 Cardiologie  
 Pédiatrie  
 Radiologie  
 Ophtalmologie  
 Cardiologie  
 Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Parasitologie  
 Rhumatologie

386. Pr. RAGALA Abdelhak  
 387. Pr. SBIHI Souad  
 388. Pr. TNACHERI OUAZZANI Btissam  
 389. Pr. ZERAIDI Najia

**AVRIL 2006**

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

**Octobre 2007**

458. Pr. LARAQUI HOUSSEINI Leila  
 459. Pr. EL MOUSSAOUI Rachid  
 460. Pr. MOUSSAOUI Abdelmajid  
 461. Pr. LALAOU SALIM Jaafar \*  
 462. Pr. BAITE Abdelouahed \*  
 463. Pr. TOUATI Zakia  
 464. Pr. OUZZIF Ez zohra \*

Gynécologie Obstétrique  
 Histo-Embryologie Cytogénétique  
 Ophtalmologie  
 Gynécologie Obstétrique

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

Anatomie pathologique  
 Anesthésie réanimation  
 Anesthésier réanimation  
 Anesthésie réanimation  
 Anesthésie réanimation  
 Cardiologie  
 Biochimie

465. Pr. BALOUCH Lhousaine \*  
 466. Pr. SELKANE Chakir \*  
 467. Pr. EL BEKKALI Youssef \*  
 468. Pr. AIT HOUSSA Mahdi \*  
 469. Pr. EL ABSI Mohamed  
 470. Pr. EHIRCHIOU Abdelkader \*  
 471. Pr. ACHOUR Abdessamad\*  
 472. Pr. TAJDINE Mohammed Tariq\*  
 473. Pr. GHARIB Noureddine  
 474. Pr. TABERKANET Mustafa \*  
 475. Pr. ISMAILI Nadia  
 476. Pr. MASRAR Azlarab  
 477. Pr. RABHI Monsef \*  
 478. Pr. MRABET Mustapha \*  
 479. Pr. SEKHSOKH Yessine \*  
 480. Pr. SEFFAR Myriame  
 481. Pr. LOUZI Lhoussain \*  
 482. Pr. MRANI Saad \*  
 483. Pr. GANA Rachid  
 484. Pr. ICHOU Mohamed \*  
 485. Pr. TACHFOUTI Samira  
 486. Pr. BOUTIMZINE Nourdine  
 487. Pr. MELLAL Zakaria  
 488. Pr. AMMAR Haddou \*  
 489. Pr. AOUI Sarra  
 490. Pr. TLIGUI Houssain  
 491. Pr. MOUTAJ Redouane \*  
 492. Pr. ACHACHI Leila  
 493. Pr. MARC Karima  
 494. Pr. BENZIANE Hamid \*  
 495. Pr. CHERKAOUI Naoual \*  
 496. Pr. EL OMARI Fatima  
 497. Pr. MAHI Mohamed \*  
 498. Pr. RADOUANE Bouchaib\*  
 499. Pr. KEBDANI Tayeb  
 500. Pr. SIFAT Hassan \*  
 501. Pr. HADADI Khalid \*  
 502. Pr. ABIDI Khalid  
 503. Pr. MADANI Naoufel  
 504. Pr. TANANE Mansour \*  
 505. Pr. AMHAJJI Larbi \*

**Mars 2009**

Pr. BJIJOU Younes  
 Pr. AZENDOUR Hicham \*  
 Pr. BELYAMANI Lahcen \*  
 Pr. BOUHSAIN Sanae \*  
 Pr. OUKERRAJ Latifa  
 Pr. LAMSAOURI Jamal \*  
 Pr. MARMADE Lahcen

Biochimie  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Chirurgie cardio vasculaire  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie générale  
 Chirurgie plastique  
 Chirurgie vasculaire périphérique  
 Dermatologie  
 Hématologie biologique  
 Médecine interne  
 Médecine préventive santé publique et hygiène  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Virologie  
 Neuro chirurgie  
 Oncologie médicale  
 Ophtalmologie  
 Ophtalmologie  
 Ophtalmologie  
 ORL  
 Parasitologie  
 Parasitologie  
 Parasitologie  
 Pneumo phtisiologie  
 Pneumo phtisiologie  
 Pharmacie clinique  
 Pharmacie galénique  
 Psychiatrie  
 Radiologie  
 Radiologie  
 Radiothérapie  
 Radiothérapie  
 Radiothérapie  
 Réanimation médicale  
 Réanimation médicale  
 Traumatologie orthopédie  
 Traumatologie orthopédie

Anatomie  
 Anesthésie Réanimation  
 Anesthésie Réanimation  
 Biochimie  
 Cardiologie  
 Chimie Thérapeutique  
 Chirurgie Cardio-vasculaire

Pr. AMAHZOUNE Brahim\*  
 Pr. AIT ALI Abdelmounaim \*  
 Pr. BOUNAIM Ahmed \*  
 Pr. EL MALKI Hadj Omar  
 Pr. MSSROURI Rahal  
 Pr. CHTATA Hassan Toufik \*  
 Pr. BOUI Mohammed \*  
 Pr. KABBAJ Nawal  
 Pr. FATHI Khalid  
 Pr. MESSAOUDI Nezha \*  
 Pr. CHAKOUR Mohammed \*  
 Pr. DOGHMI Kamal \*  
 Pr. ABOUZAHIR Ali \*  
 Pr. ENNIBI Khalid \*  
 Pr. EL OUENNASS Mostapha  
 Pr. ZOUHAIR Said\*  
 Pr. L'kassimi Hachemi\*  
 Pr. AKHADDAR Ali \*  
 Pr. AIT BENHADDOU El hachmia  
 Pr. AGADR Aomar \*  
 Pr. KARBOUBI Lamya  
 Pr. MESKINI Toufik  
 Pr. KABIRI Meryem  
 Pr. RHORFI Ismail Abderrahmani \*  
 Pr. BASSOU Driss \*  
 Pr. ALLALI Nazik  
 Pr. NASSAR Ittimade  
 Pr. HASSIKOU Hasna \*  
 Pr. AMINE Bouchra  
 Pr. BOUSSOUGA Mostapha \*  
 Pr. KADI Said \*

#### **Octobre 2010**

Pr. AMEZIANE Taoufiq\*  
 Pr. ERRABIH Ikram  
 Pr. CHERRADI Ghizlan  
 Pr. MOSADIK Ahlam  
 Pr. ALILOU Mustapha  
 Pr. KANOUNI Lamya  
 Pr. EL KHARRAS Abdennasser\*  
 Pr. DARBI Abdellatif\*  
 Pr. EL HAFIDI Naima  
 Pr. MALIH Mohamed\*  
 Pr. BOUSSIF Mohamed\*  
 Pr. EL MAZOUZ Samir  
 Pr. DENDANE Mohammed Anouar  
 Pr. EL SAYEGH Hachem  
 Pr. MOUJAHID Mountassir\*  
 Pr. RAISSOUNI Zakaria\*  
 Pr. BOUAITY Brahim\*

Chirurgie Cardio-vasculaire  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Générale  
 Chirurgie Vasculaire Périphérique  
 Dermatologie  
 Gastro-entérologie  
 Gynécologie obstétrique  
 Hématologie biologique  
 Hématologie biologique  
 Hématologie clinique  
 Médecine interne  
 Médecine interne  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Microbiologie  
 Neuro-chirurgie  
 Neurologie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Pneumo-phtisiologie  
 Radiologie  
 Radiologie  
 Radiologie  
 Rhumatologie  
 Rhumatologie  
 Traumatologie orthopédique  
 Traumatologie orthopédique

Médecine interne  
 Gastro entérologie  
 Cardiologie  
 Anesthésie Réanimation  
 Anesthésie réanimation  
 Radiothérapie  
 Radiologie  
 Radiologie  
 Pédiatrie  
 Pédiatrie  
 Médecine aérologique  
 Chirurgie plastique et réparatrice  
 Chirurgie pédiatrique  
 Urologie  
 Chirurgie générale  
 Traumatologie orthopédie  
 ORL

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

Ophthalmologie  
Hématologie  
Anatomie pathologique  
Anatomie pathologique  
Physiologie  
Biochimie chimie  
Microbiologie

## **ENSEIGNANTS SCIENTIFIQUES**

### **PROFESSEURS**

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

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

\* *Enseignants Militaires*

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots...  
Tous les mots ne sauraient formuler les phrases...  
Pour exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la  
reconnaissance...  
Aussi, c'est tout simplement que...*



*Je dédie cette Thèse... *

## *A ma très chère mère*

*BENAIIDA Fatima*

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

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

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

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

*Je t'aime*

## *A mon très cher père*

*ALEM Driss*

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

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

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

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

*Je t'aime*

## *A mon très cher grand frère*

*ALEM Adil*

*Ton humour, ta joie de vivre, ton sourire et ton rire sont des caractères et des expressions de visage que je verrai toujours en toi plus qu'autre chose. C'est vrai qu'on se fâche pour un jour, mais il est beaucoup vrai qu'on est frère et sœur pour toujours.*

*Petite, tu m'as tant aimé, tu m'as tant protégé. Tu étais l'ange gardien, le compagnon et l'ami. Grande, tu me conseilles toujours, tu me protèges toujours et tu me soutiens encore.*

*Sache grand frère que l'amour et le respect que je porte pour toi sont uniques. Tu es et tu resteras mon exemple et le frère dont je suis fière.*

*En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Reçoit ce travail, cher frère, en témoignage de mon attachement.*

*Puisse DIEU, le tout puissant, exhausser tes vœux et te procurer une vie meilleure.*

*Je t'aime*

## *A ma très chère petite sœur*

### *ALEM Mouna*

*Tu as grandi vite, le temps s'est écoulé trop vite. A mes yeux, tu es encore la petite blonde de 3 ans qui pleure quand maman quitte la maison, qui crie quand elle veut quelque chose à tout prix, qui sursaute partout à travers la maison. Aujourd'hui, je te vois grandir. Tu es devenue la copine, la complice et la sœur.*

*J'espère que tu pourras réaliser tout tes rêves dans cette vie. Je te souhaite un monde meilleur ou régnera la sagesse et l'honnêteté. Mon vœu serait de te voir épanouie, heureuse et satisfaite. Crois en toi comme je crois en toi, crois en tes rêves, aime ce que tu fais et fais ce que tu aimes. Quoiqu'il en soit, ta grande sœur sera toujours à côté de toi.*

*Pour toute l'ambiance dont tu m'as entouré, pour toute la spontanéité et ton élan chaleureux, je te dédie, chère sœur, ce travail en témoignage de mon affection.*

*Puisse DIEU le tout puissant exhausser tous tes vœux et te procurer une vie meilleure.*

*Je t'aime*

## *A ma très chère grand-mère maternelle*

### *Zhor*

*Que j'ai la chance d'avoir dans ma vie. Tu es ma maman à la retraite. Ton cœur est un chef d'œuvre de tendresse, un océan d'affections sans limites et un vaste ciel d'amour dont le soleil illumine ma vie.*

*A chaque fois que tu me serras, je sentais des vagues de chaleur qui inondaient au comble mon cœur de confiance et de paix. A chaque fois que tu prias pour moi, je voyais une plage de larmes dans tes yeux,*

*Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que tu n'as cessé de formuler dans tes prières.*

*Que DIEU tout puissant te réserve santé et longue vie pour te combler à mon tour. Inchallah*

## *A la mémoire de mon grand-père maternel*

### *Driss*

*Le destin a fait que tu partes trop tôt, avant même de te connaître. Je regrette de ne t'avoir jamais connu. Je te dédie ce travail en priant DIEU d'accueillir ton âme dans sainte miséricorde.*

## *A la mémoire de mes grands-parents paternels*

### *Lakhdar et Rahma*

*Toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite. Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir de ce bonheur et cueillir vos bénédictions interminables.*

*Que DIEU, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.*

### *A ma cousine chérie ALEM Anissa*

*En souvenir de tous les étés dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments à Oujda ou à Rabat. Pour tout l'amour dont tu m'as entouré, pour ton élan chaleureux, je te dédie ce travail, en témoignage de mon amour et de mon affection.*

### *A ma cousine ELHARTI Jihane*

*En souvenir de la tendre enfance que nous avons partagée et de tous les gracieux moments qu'on a passés ensemble. Je te dédie ce travail, en témoignage de mon attachement et de mon affection.*

## *A ma grande famille ALEM*

*Dont je suis fière de porter le nom.*

*Je cite particulièrement mon tendre oncle **Abderahman**, sa douce femme **Zohra** et sa petite famille.*

*A mes oncles, ma chère tante ainsi que mes cousins et cousines.*

*Puisse ce travail témoigner de ma profonde attachement.*

## *A la famille BENAIDA*

*A ma chère tante **Aicha**, à mes oncles: **Abdelmajid**, **Abdelouahab**, **Dr.Mustapha**, **Ahmed**, particulièrement **Abdelilah** et leurs familles.*

*Je ne pourrais jamais exprimer le respect que j'ai pour vous. Quelque part, vous avez participé à mon épanouissement, vous m'avez encouragé et soutenu. Vous m'étiez toujours proches. A tout stade de ma vie, vous étiez là.*

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

## *A mes amies*

*A.Housna : La compatriote, la complice.*

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

*E.M.Safaa : La copine, l'aimable.*

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

*B.Fatimazahra et B.Houda :*

*Les joyeux moments qu'on a passés ensemble resteront gravés dans ma mémoire. Nous avons partagé tant de choses, aussi simples soient elles, nous ont uni par les innocents liens d'amitié. Une amitié qui ne peut demeurer qu'éternelle à mes yeux.*

*E.H.Mariam et B.Meriem : Mes binômes, mes compatriotes.*

*Pour longtemps, nous avons formé un trinôme, nous avons partagé ensemble la soif du savoir et de la science. A travers ces années, nous avons tissé les liens d'une très belle amitié qui restera toujours dans mon cœur.*

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

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

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

*A tous mes amis de la Faculté des Sciences de RABAT*

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

*A.A Mariam, B. Naila, Z. Salwa*

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

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

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

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

*A tous mes professeurs*

*Particulièrement :*

*Le Professeur **Badre Eddine LMIMOUNI***

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

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

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

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

*A tous les Internes et Résidents*

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

*Je cite en particulier,*

*OUALI-ALAMI Hoda*

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

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

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

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

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

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

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

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

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



# *Remerciements*

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



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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

*A notre Maître et Juge de Thèse,  
Monsieur Le Médecin Colonel  
CHARKI HAIMEUR  
Professeur d'Anesthésie - Réanimation  
Chef de service de Réanimation Médicale de l'HMIMV*



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

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

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

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

*A notre Maître et Juge de Thèse,  
Monsieur Le Pharmacien Commandant  
JAMAL LAMSAOUIRI  
Professeur agrégé de Chimie Thérapeutique*



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

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

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

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

*A notre Maître et Juge de Thèse,  
Monsieur MOSTAFA BENMIMOUN  
Directeur Médical des Laboratoires Pfizer*



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

*Nous admirons vos qualités professionnelles et l'intérêt que vous portez au bien être des patients, à l'image de votre laboratoire pharmaceutique de premier plan, acteur de santé publique au Maroc. L'intérêt que vous portez à notre Faculté à travers votre implication personnelle dans la commission de recherche nous touche énormément.*

*Vos qualités scientifiques, pédagogiques et surtout humaines seront, certainement, pour nous un exemple à suivre dans l'exercice de notre profession.*

*Nous voudrions être dignes de la confiance que vous nous avez accordée et vous prions, Monsieur, de trouver en ce travail le témoignage de notre sincère reconnaissance et profonde gratitude.*

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



*Merci pour votre aide, votre encouragement et pour l'ambiance et le milieu favorable de travail que vous créez au sein du laboratoire. Grâce à vous le travail au laboratoire est un vrai plaisir.*

*Je cite en particulier, **OVALI-ALAMI Hoda***



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

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

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

# SOMMAIRE

I.	Introduction .....	1
II.	Matériels et méthodes .....	5
	II.1 Lieu et période de l'étude .....	6
	II.2 Critères d'inclusion .....	6
	II.3 Méthodologie .....	6
III.	Résultats .....	16
	III.1 Répartition des espèces isolées .....	17
	III.2 Répartition des espèces selon le type de prélèvement .....	19
	III.3 Sensibilité <i>in vitro</i> au voriconazole des espèces isolées.....	20
	III.4 Sensibilité selon le type de prélèvement .....	22
	III.5 Sensibilité selon les espèces.....	25
IV.	Discussion .....	29
	IV.1 Etude de la sensibilité <i>in vitro</i> aux antifongiques .....	29
	IV.1.1 Indications et objectifs .....	29
	IV.1.2 Moyens d'étude de la sensibilité <i>in vitro</i> .....	32
	1. Méthodes par dilution .....	32
	1.1 En milieu solide .....	32
	1.2 En milieu semi solide .....	33
	1.3 En milieu liquide .....	35
	2. Méthodes par diffusion.....	45
	3. Méthode par dilution affusion : E-Test .....	50
	4. La technologie Vitek .....	54
	IV.1.3 Interprétation des résultats .....	59
	IV.1.4 Corrélation <i>in vitro/in vivo</i> .....	61
	1. Particularité de la bonne corrélation <i>in vitro/in vivo</i> .....	61
	2. Problème de mauvaise corrélation <i>in vitro/in vivo</i> .....	62
	3. Facteurs compliquant la corrélation <i>in vitro/in vivo</i> .....	63
	IV.1.5 Complexité de la standardisation des techniques d'antifongigramme	65
	IV.1.6 Moyen d'étude des associations antifongiques <i>in vitro</i> .....	66

IV.1.7 Evaluation de la pratique de l'antifongigramme .....	69
IV.2 Voriconazole .....	73
IV.2.1 Chimie .....	73
IV.2.2 Activités pharmacologiques .....	74
IV.2.3 Posologies et administration .....	77
IV.2.4 Pharmacodynamie .....	78
IV.2.5 Pharmacologie .....	87
1. Pharmacocinétique .....	87
2. Critères pharmacocinétiques .....	90
3. Interactions médicamenteuses .....	95
IV.2.6 Efficacité clinique .....	99
IV.2.7 Tolérance du voriconazole .....	107
1. Effets indésirables .....	107
2. Contre indications .....	111
IV.2.8 Données pharmacoéconomiques .....	112
IV.3 Résistances .....	112
IV.3.1 Résistances aux antifongiques.....	112
1. Définition .....	112
2. Types de résistances.....	113
3. Causes des résistances aux antifongiques .....	114
IV.3.2 Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés .....	114
1. Diminution de l'affinité pour la cible .....	115
2. Multiplication des copies de 14 $\alpha$ déméthylase .....	115
3. Blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol .....	115
4. Surexpression des pompes à efflux .....	116
IV.4 Données épidémiologiques.....	117
IV.4.1 Epidémiologie des résistances aux antifongiques de <i>Candida</i> .....	117
1. Résistances aux azolés chez les patients VIH <sup>+</sup> .....	117
2. Résistance au fluconazole .....	120
3. Résistance croisée aux azolés chez <i>Candida glabrata</i> .....	120
IV.4.2 Facteurs de risque d'émergence des résistances aux antifongiques .	124
IV.4.3 Evolution de l'épidémiologie des résistances .....	124

1. Intérêt de la surveillance .....	124
2. Evolution de l'épidémiologie des résistances .....	125
V. Conclusion .....	139
Résumés .....	142
Références bibliographiques .....	146

# *Introduction*

## **I. Introduction :**

L'incidence des infections fongiques sévères augmente régulièrement depuis ces vingt dernières années jusqu'à devenir un véritable problème de santé publique. D'après le National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS), le nombre d'infections fongiques nosocomiales a doublé de 1980 à 1990 <sup>[1]</sup>. Elles représentent ainsi la septième cause de septicémie en Europe et la quatrième aux États-Unis <sup>[2]</sup>. Cela est principalement dû à l'intensification des chimiothérapies et au nombre croissant de patients fortement immunodéprimés tels que les patients atteints de cancer, transplantés d'organes ou de moelle osseuse, et les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine entraînant des états d'immunodépression profonds et durables <sup>[3,4]</sup>.

Ces infections fongiques invasives sont déterminées par deux types de micro-organismes, les champignons filamenteux et les levures. Parmi ces dernières, le genre *Candida* est de loin le plus représenté. Selon le National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS), *Candida sp.* est responsable de 85,6% des infections fongiques nosocomiales dont 76% sont causées par *C.albicans* <sup>[5]</sup>. Par ailleurs, l'augmentation de la fréquence des infections à levures s'est également accompagnée d'une augmentation de l'incidence de certaines espèces auparavant peu représentées entraînant une modification de leur distribution. De nouvelles espèces de *Candida* sont de plus en plus souvent incriminées comme *C.tropicalis*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.guilliermondii*, *C.krusei*, *C.lusitaniae*, ou nouvellement décrites comme *C.dublinsiensis* <sup>[5-7]</sup>. Elles ont parfois une virulence moindre que *C.albicans* mais leur sensibilité aux antifongiques est diminuée <sup>[8-10]</sup>.

Les candidoses systémiques constituent, aujourd'hui, une menace majeure en termes de morbidité et de mortalité <sup>[6, 8, 11, 12]</sup>. Le taux élevé de mortalité varie de 40% à 60% chez les patients immunodéprimés. Cette mortalité est due en partie à la difficulté d'établissement d'un diagnostic rapide et spécifique, devant une présentation clinique paucisymptomatique qui retarde la mise en route du traitement <sup>[13]</sup>, mais aussi aux moyens thérapeutiques eux-mêmes. Bien que l'apparition de nouvelles molécules performantes ait considérablement étoffé l'arsenal thérapeutique disponible, la difficulté thérapeutique s'illustre par un nombre limité d'antifongiques systémiques pour satisfaire aux critères de toxicité chez le patient <sup>[2]</sup>. Après le kétoconazole, premier dérivé azolé systémique disponible par voie orale, puis le fluconazole

et l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole et le ravuconazole représentent les trois derniers-nés de cette grande famille des azolés. Ces trois dérivés ont en commun un spectre élargi à toutes les espèces de *Candida* et à de nombreux champignons filamenteux dont les *Aspergillus*, couvrant ainsi la grande majorité des espèces pathogènes. Seul le voriconazole (Vfend®) a une autorisation de mise sur le marché marocain [14]. L'introduction sur le marché de nouvelles molécules tel que le voriconazole constitue un réel espoir et une alternative intéressante dans le traitement des infections fongiques invasives, surtout que l'émergence de résistances aux molécules déjà disponibles rendent aléatoire l'efficacité du traitement.

Avec l'utilisation intensive des antifongiques, des résistances sont apparues. Depuis quelques années, des espèces fongiques naturellement peu sensibles à certains antifongiques ont émergées [15-17]. Certaines souches naturellement sensibles ont acquis des résistances [18-20]. Des résistances au fluconazole sont apparues [21-23], notamment dans les candidoses oropharyngées récidivantes des patients infectés par la Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et traités par le fluconazole [24]. De plus, des résistances croisées vis-à-vis de l'ensemble des antifongiques triazolés ont été décrites pour *C.albicans* et *C.tropicalis* aux USA [25,26]. Aussi *C.glabrata*, considérée come moins virulente que *C.albicans* présente une difficulté thérapeutique particulière car elle peut être intrinsèquement résistante aux antifongiques triazolés ou peut acquérir cette résistance après des périodes relativement courtes d'exposition à ces médicaments [27].

Ce phénomène a évidemment soulevé un intérêt grandissant pour la mise en œuvre de tests de détermination de la sensibilité des levures *in vitro* dans le but d'identifier l'antifongique de choix pour traiter une infection fongique donnée. Parallèlement, un certain nombre de méthodes, commercialisées ou non, permettant d'évaluer la sensibilité *in vitro* des champignons aux antifongiques ont été développées [28-35].

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

Ainsi les objectifs de notre étude sont :

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

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

# *Matériels et méthodes*

## **II. Matériels et méthodes :**

### **II.1 Lieu et période de l'étude :**

Il s'agit d'une étude prospective qui s'est déroulée au sein du service de parasitologie/mycologie de l'HMIMV sur une durée de 9 mois (Septembre 2010 - Mai 2011).

### **II.2 Critères d'inclusion :**

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

### **II.3 Méthodologie:**

#### **1. Prélèvement :**

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

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

#### **2. Culture et identification:**

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

A partir du flacon positif, l'échantillon est ensuiteensemencé sur milieu chromogène Candiselect 4<sup>TM</sup>. Il s'agit d'un milieu de primo-isolement permettant l'isolement et l'identification directe de *C.albicans*, espèce de *Candida* la plus fréquemment isolée, ainsi que l'identification présomptive de *C.tropicalis*, *C.glabrata* et *C.krusei*. La lecture est effectuée après une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

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

### **3. Lecture des résultats:**

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

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

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

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

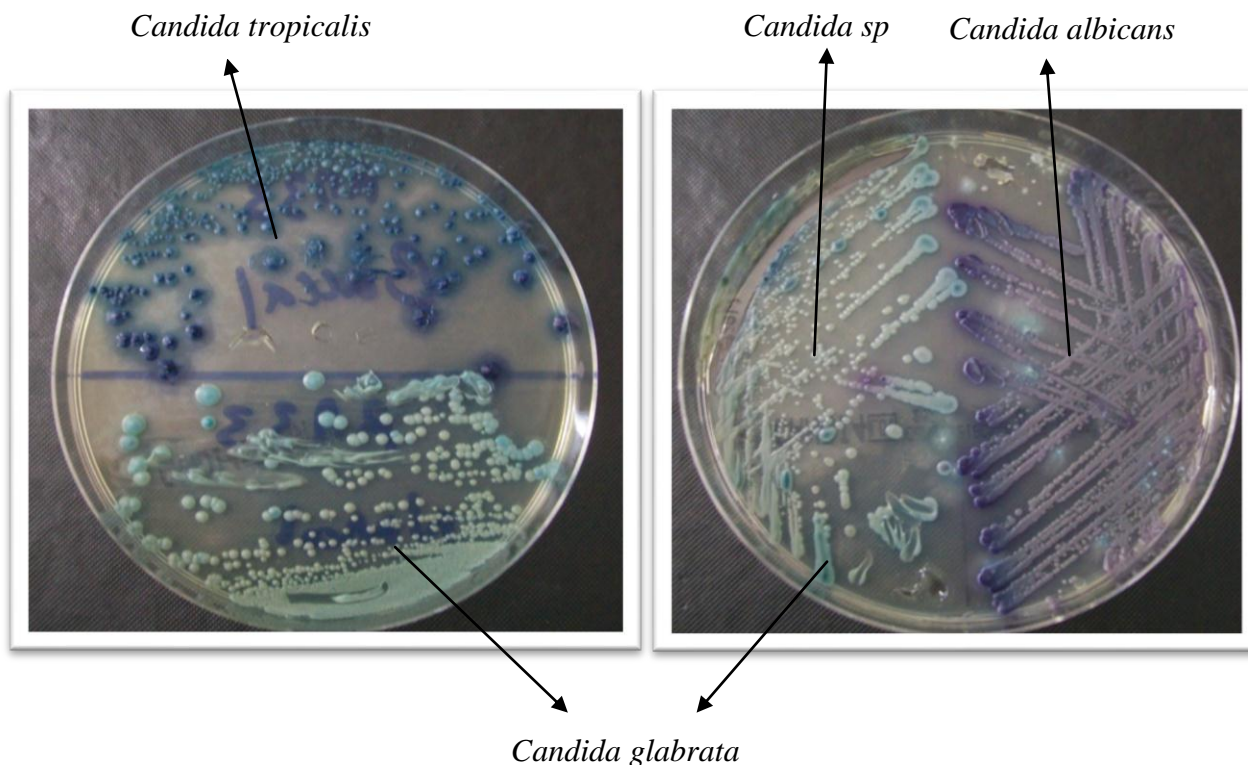
Colonies turquoise, d'aspect sec, à contours irréguliers – morphotype rugueux (R) → *C.krusei* → *Krusei* Color

Colonies blanches → autres espèces de levures → galerie biochimique d'identification API

*Etude de la sensibilité au Voriconazole de 72 souches de Candida isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.*



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



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

#### **4. Antifongogramme : profil de résistance phénotypique**

Le but de l'antifongogramme est de déterminer la Concentration Minimum Inhibitrice (CMI) d'une souche fongique vis-à-vis de divers antifongiques pour détecter une éventuelle résistance. Par définition, la CMI est la plus faible concentration d'antifongique capable de provoquer une inhibition complète de la croissance d'une souche donnée après une certaine période d'incubation.

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

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

notre travail nous nous sommes limités à l'étude du voriconazole. Les autres antifongiques font l'objet également d'autres travaux.

**Principe :** Des disques de papier imprégnés avec une concentration déterminée d'antifongique sont déposés à la surface du milieu MHGBM (Muller-Hinton + 2% de glucose + 0,5 µg/mL de bleu de méthylène) préalablement ensemencé avec un inoculum calibré, préparé à partir d'une culture pure de la levure à tester. Un gradient de concentration d'antifongique s'établit autour des disques dans la gélose. Après incubation, le diamètre des zones d'inhibition observées autour des disques permet de déduire les concentrations minimum inhibitrices (CMI) de l'antifongique testé pour la souche testée et la catégorisation clinique : Résistant (R), Sensible Dose Dépendant (SDD), Sensible (S).

**Présentation :** Les disques fabriqués à partir de papier absorbant de qualité supérieure ont 6,5 mm de diamètre et sont imprégnés d'antifongiques à des concentrations précises.

Ces disques sont clairement identifiés par un symbole comportant 3 lettres, suivi de la charge exprimée en µg, imprimé de chaque côté du disque.

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

**Tableau 1 :** Caractéristiques du disque du voriconazole

	Charge du disque	Symbole	Conditionnement
<b>Voriconazole</b>	1µg	VCZ1	1 x 50 disques

**Mode opératoire :** Le référentiel M44-A du CLSI/NCCLS recommande l'utilisation du milieu MHGBM : Muller-Hinton avec 2% de glucose et 0,5 µg/mL de bleu de méthylène.

Après avoir préparé ce milieu de culture, nous versons 25 mL dans une boîte de Petri ronde de diamètre de 90mm. Après solidification, nous laissons sécher 15 minutes à 37°C avant utilisation.

L'inoculum standardisé à 0,5 McFarland est préparé à partir d'une culture pure de 24 heures, de levure de genre *Candida*, obtenue sur un milieu d'isolement (Sabouraud Chloramphénicol). Pour ce fait, l'équivalent de 5 colonies bien isolées de 1mm de diamètre sont mises en suspension dans du sérum physiologique stérile. Après homogénéisation au

vortex de la suspension ainsi préparée, l'opacité est ajustée à 0,5 McFarland, soit par addition de sérum physiologique soit pas ajout de colonies supplémentaires.

Dans les 15 minutes suivant l'ajustement de l'inoculum à 0,5 McFarland, on plonge un écouvillon de coton dans la suspension et on tourne plusieurs fois. L'excès de liquide est éliminé en pressant fortement l'écouvillon contre la paroi du tube au-dessus du niveau du liquide. Après séchage du milieu 15 minutes à 37°C, la totalité de la surface estensemencée à l'aide de l'écouvillon selon la méthode standard. On répète l'écouvillonnage plusieurs fois en tournant la boîte de 60°, de manière à s'assurer de l'homogénéité de la répartition de l'inoculum sur toute la surface, y compris sur les bords.

La boîteensemencée est laissée ouverte pendant 3 à 5 minutes (sans dépasser 15 minutes) de manière à laisser absorber l'excès d'humidité avant de déposer les disques sur le milieu.

Après application des disques d'antifongiques, la boîte est incubée à 35 +/- 2°C dans un délai de 15 minutes. La durée d'incubation est de 24 heures.

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

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

Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés avec précision. La correspondance diamètre, concentration minimum inhibitrice (CMI) et catégorisation clinique est résumée dans le tableau suivant :

**Tableau 2 :** Interprétation des résultats de l'antifongigramme

Disque	Charge	Symbole	Diamètre de la zone d'inhibition en mm			Concentration minimum inhibitrice CMI en µg/mL		
			R	SDD	S	R	SDD	S
<b>Voriconazole</b>	1µg	VCZ 1	≤ 13	14 - 16	≥ 17	≥ 4	2	≤1

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

**Tableau 3 :** Souche de contrôle qualité de l'antifongogramme

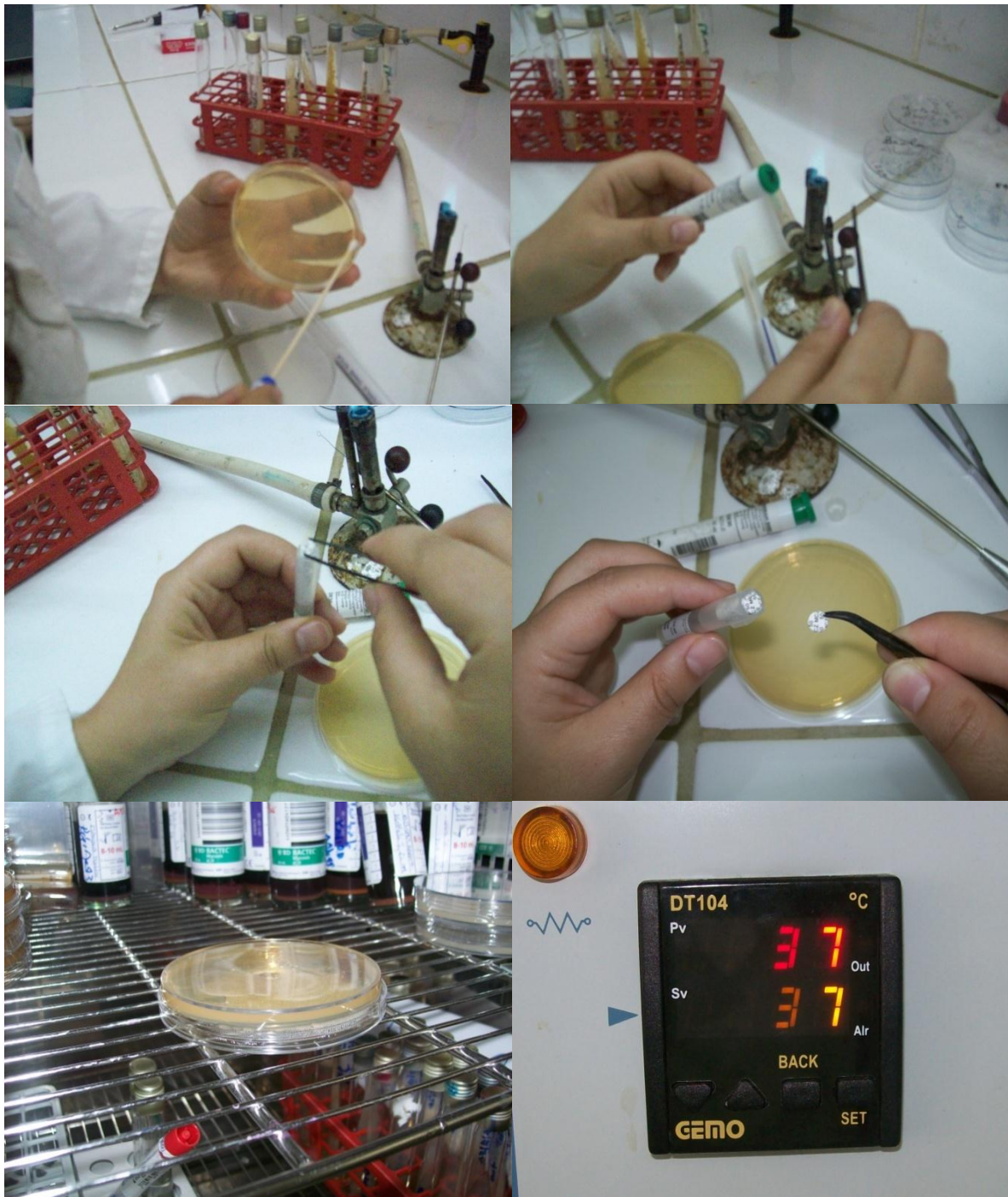
<b>Disque</b>	<b>Charge</b>	<b>Symbole</b>	<b><i>Candida albicans</i> ATCC 90028</b>	<b><i>Candida tropicalis</i> ATCC 22019</b>	<b><i>Candida krusei</i> ATCC 6258</b>
<b>Voriconazole</b>	1µg	VCZ 1	31 - 42	28 - 37	16 - 25

*Etude de la sensibilité au Voriconazole de 72 souches de Candida isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.*



**Figure 3 :** Préparation de l'inoculum à 0,5 McFarland. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

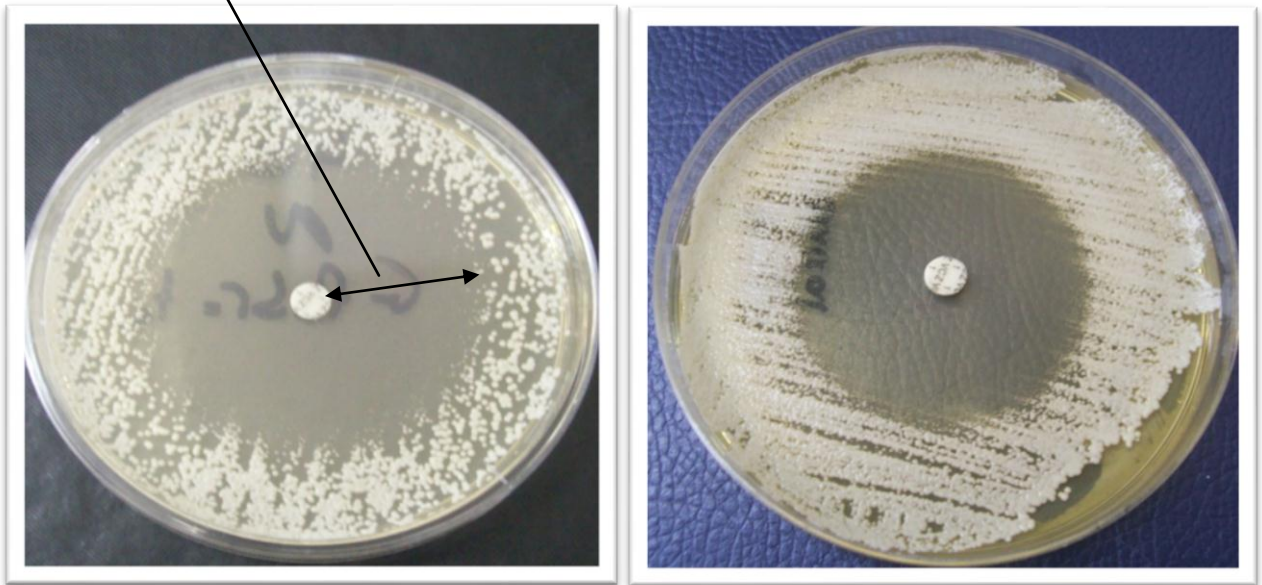
*Etude de la sensibilité au Voriconazole de 72 souches de Candida isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.*



**Figure 4 :** Ensemencement de la souche et dépôt du disque de l'antifongique. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

**Etude de la sensibilité au Voriconazole de 72 souches de *Candida* isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.**

Diamètre de la zone  
d'inhibition



**Souches sensibles**



**Souches résistantes**

**Figure 5 :** Lecture des résultats de l'antifongogramme. [Photos du laboratoire de parasitologie mycologie de l'HMIMV de Rabat]

# *Résultats*

### III. Résultats :

Durant la période de l'étude, 72 souches de *Candida sp.* sont isolées. 12 souches sont isolées à partir des hémocultures, alors que 60 souches sont isolées à partir des différents sites périphériques (buccal, nasal, vaginal, rectal...).

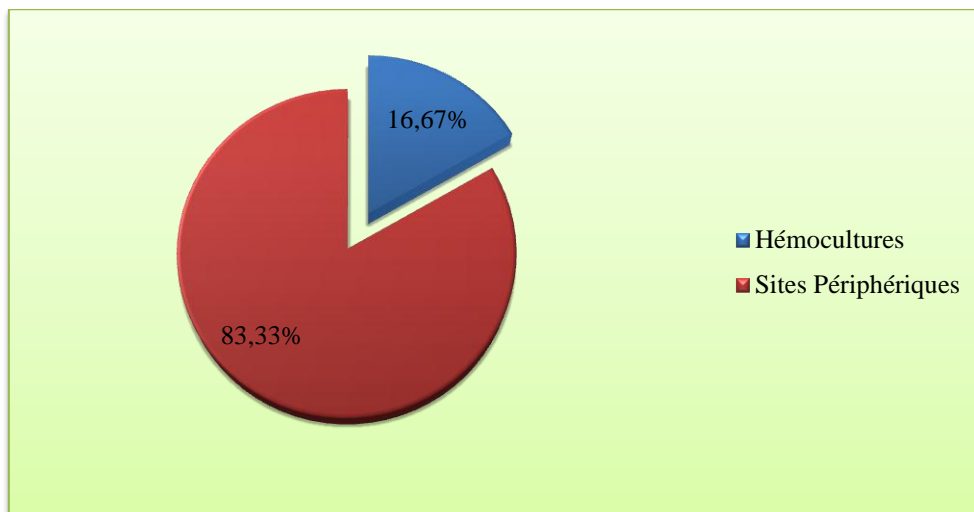


Figure 6 : Types de prélèvements effectués

#### III.1 Répartition des espèces isolées :

La répartition des espèces montre une prédominance de *Candida non albicans* (39 souches) par rapport à *Candida albicans*.

Tableau 4 : Pourcentages de *Candida albicans* et de *Candida non albicans* isolées

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Candida albicans</i>	33	45,83%
<i>Candida non albicans</i>	39	54,17 %
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>100%</b>

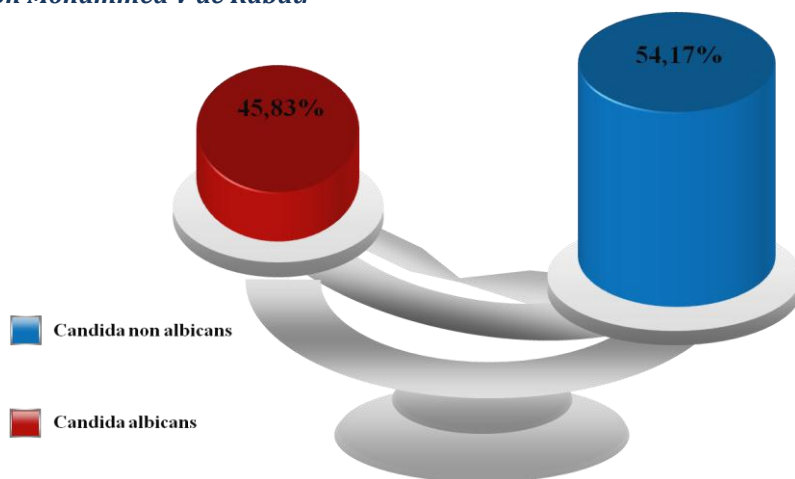


Figure 7 : Prédominance de *Candida non albicans* sur *Candida albicans* parmi les souches isolées

Au total, 4 espèces différentes de *Candida* sont isolées. *Candida albicans* est l'espèce majoritaire avec 33 souches. La répartition globale des souches isolées est retrouvée dans le tableau suivant :

Tableau 5 : Répartition des différentes espèces de *Candida* isolées

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Candida albicans</i>	33	45,83%
<i>Candida glabrata</i>	19	26,39%
<i>Candida tropicalis</i>	12	16,67%
<i>Candida krusei</i>	1	1,39%
<i>Candida sp.</i>	7	9,72%
<b>Total</b>	<b>72</b>	<b>100%</b>

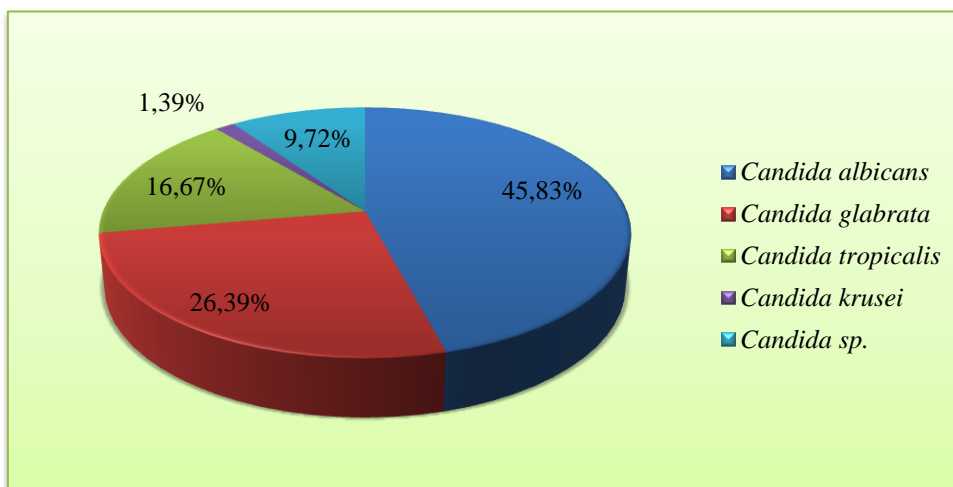


Figure 8 : Répartition des différentes espèces de *Candida* isolées

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

#### ✿ Hémocultures :

A partir des hémocultures, seules *Candida albicans* et *Candida glabrata* sont isolées.

Tableau 6 : Pourcentages des espèces de *Candida* isolées des hémocultures

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Candida albicans</i>	3	25
<i>Candida glabrata</i>	9	75
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100%</b>

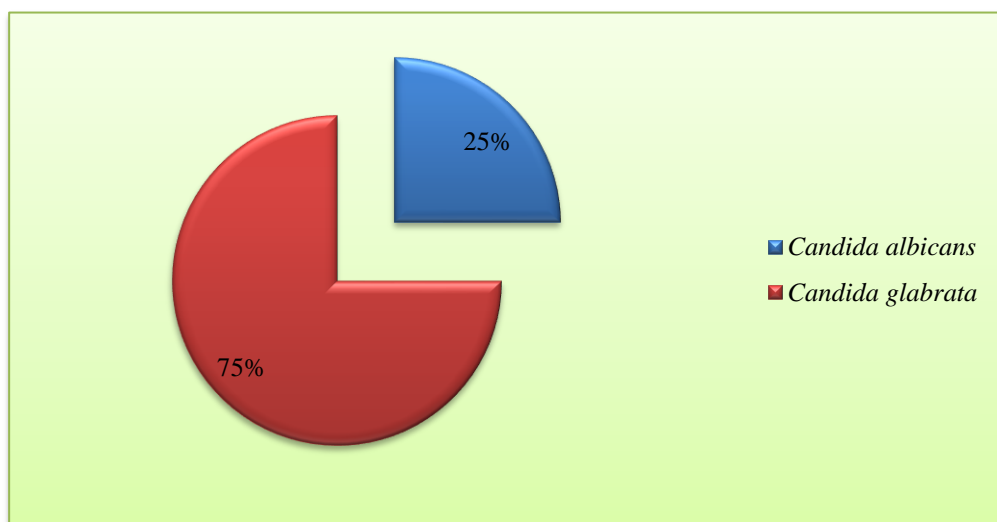


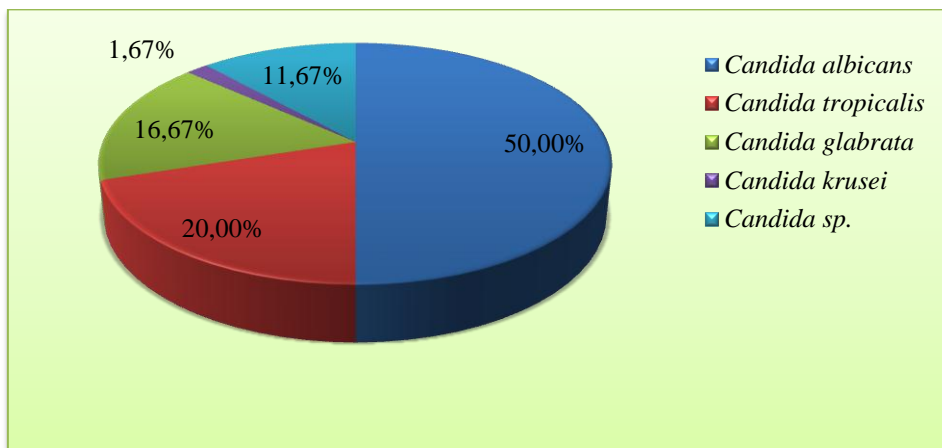
Figure 9 : Répartition des espèces de *Candida* isolées des hémocultures

#### ✿ Sites périphériques :

A côté des hémocultures, des sites périphériques ont servi à l'isolement de plusieurs espèces de *Candida*. Sur 60 prélèvements positifs, à l'inverse des hémocultures, c'est *Candida albicans* qui est majoritairement représentée avec un pourcentage de 50% suivie de *Candida tropicalis* avec 20%. *Candida glabrata*, occupe la troisième place avec 16,67%.

Tableau 7 : Pourcentage des espèces de *Candida* isolées des sites périphériques

Espèces	Nombre	Pourcentage
<i>Candida albicans</i>	30	50%
<i>Candida tropicalis</i>	12	20%
<i>Candida glabrata</i>	10	16,67%
<i>Candida krusei</i>	1	1,67%
<i>Candida sp.</i>	7	11,67%
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100%</b>



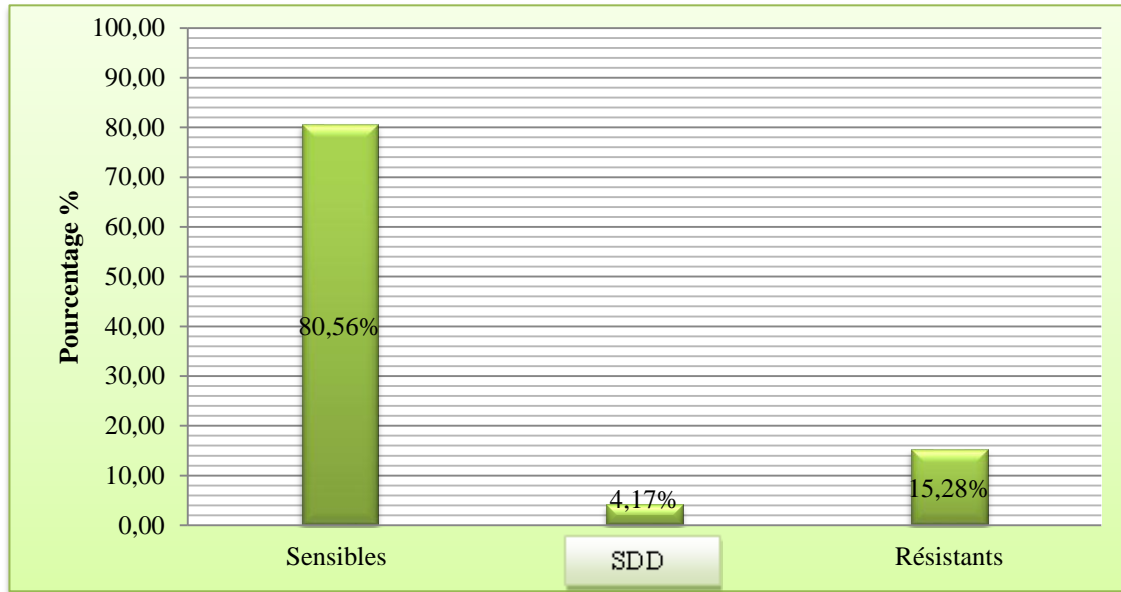
**Figure 10 :** Répartition des espèces de *Candida* isolées des sites périphériques

### III.3 Sensibilité *in vitro* au voriconazole des espèces isolées:

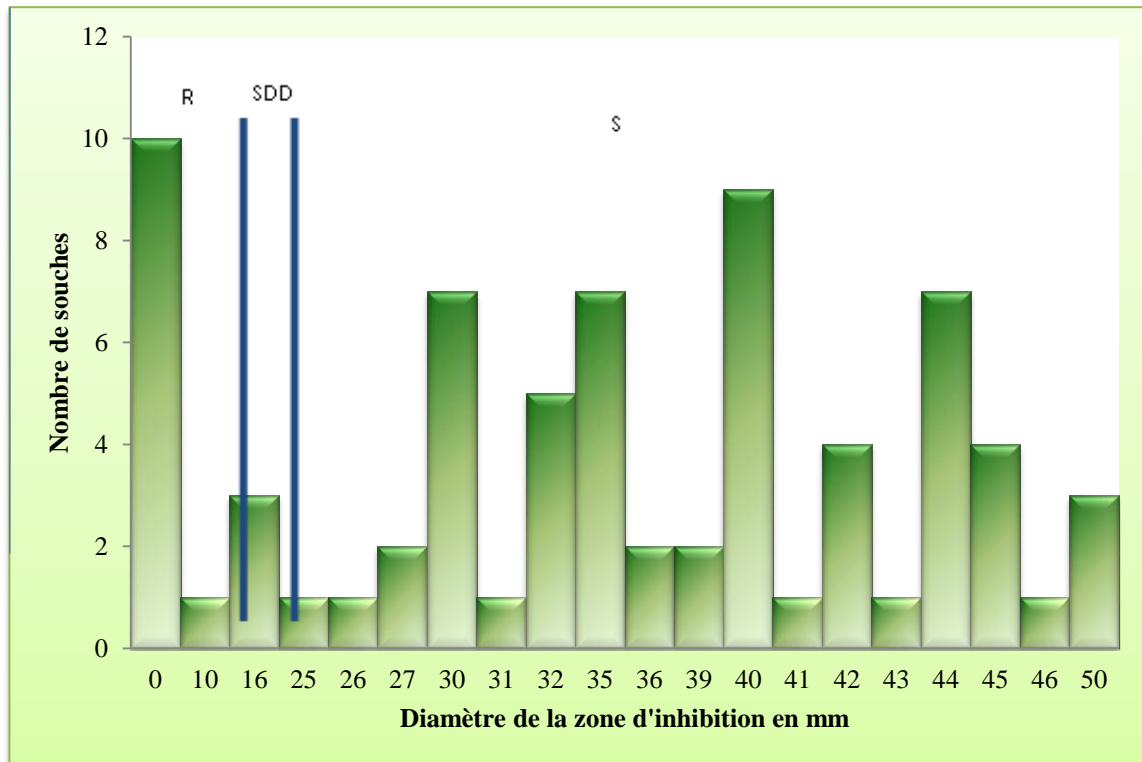
La figure 11 décrit l'activité du voriconazole vis-à-vis de l'ensemble des espèces isolées. L'antifongique est significativement actif sur *Candida*. Plus de 80% des souches de *Candida sp.* sont sensibles, 4% Sensibles Dose Dépendantes (SDD) et 15% des souches sont résistantes. La figure 12, quant à elle, indique la distribution des diamètres des zones d'inhibition et de leur catégorie respective de sensibilité.

**Tableau 8 :** Pourcentage des souches entrant en dans chaque catégorie (Sensible, Sensibiliser Dose Dépendante, Résistant) pour l'ensemble des souches isolées

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage
<b>Sensibles</b>	58	80,56%
<b>SDD</b>	3	4,17%
<b>Résistants</b>	11	15,28%
<b>Total</b>	72	100%



**Figure 11 :** Sensibilité des souches de *Candida* isolées de l'ensemble des prélèvements



**Figure 12 :** Diamètres de zone d'inhibition et catégorie de sensibilité

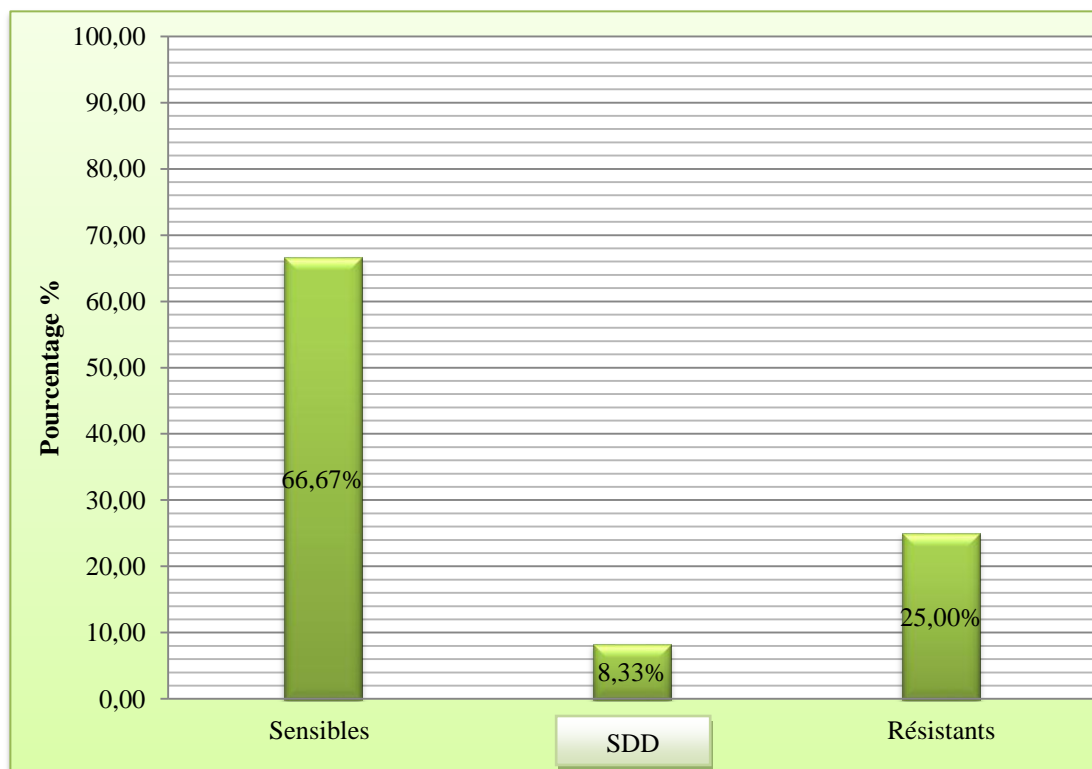
### III.4 Sensibilité selon le type de prélèvement :

#### ✿ Hémocultures :

Les isolats provenant des hémocultures sont moins sensibles aux voriconazole par rapport aux isolats des sites périphériques avec une sensibilité ne dépassant pas les 70%. Les pourcentages des souches entrant dans chaque catégorie (S, SDD, R) sont de 66,67%, 8,33% et de 25%.

**Tableau 9 :** Pourcentage des souches entrant en dans chaque catégorie (Sensible, Sensible Dose Dépendant, Résistant) pour les souches provenant des hémocultures

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage
<b>Sensibles</b>	8	66,67%
<b>SDD</b>	1	8,33%
<b>Résistants</b>	3	25,00%
<b>Total</b>	12	100,00%



**Figure 13 :** Sensibilité des souches de *Candida* isolées des hémocultures

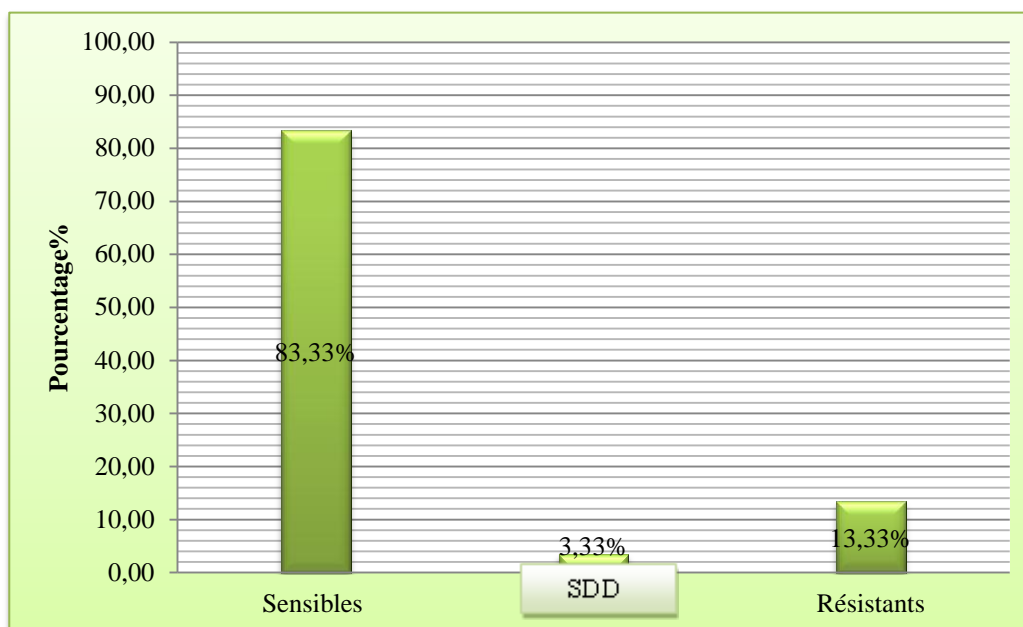
#### ✿ Sites périphériques :

Contrairement aux hémocultures, les souches provenant des différents sites périphériques prélevés sont plus sensibles aux voriconazole avec un pourcentage dépassant les 80%. Les

pourcentages des souches entrant dans chaque catégorie (S, SDD, R) sont de 83,33%, 3,33% et de 13,33%.

**Tableau 10 :** Pourcentage des souches entrant en dans chaque catégorie (Sensible, Sensible Dose Dépendant, Résistant) pour les souches provenant des sites périphériques

Catégorie clinique	Nombre	Pourcentage
<b>Sensibles</b>	50	83,33%
<b>SDD</b>	2	3,33%
<b>Résistants</b>	8	13,33%
<b>Total</b>	60	100%



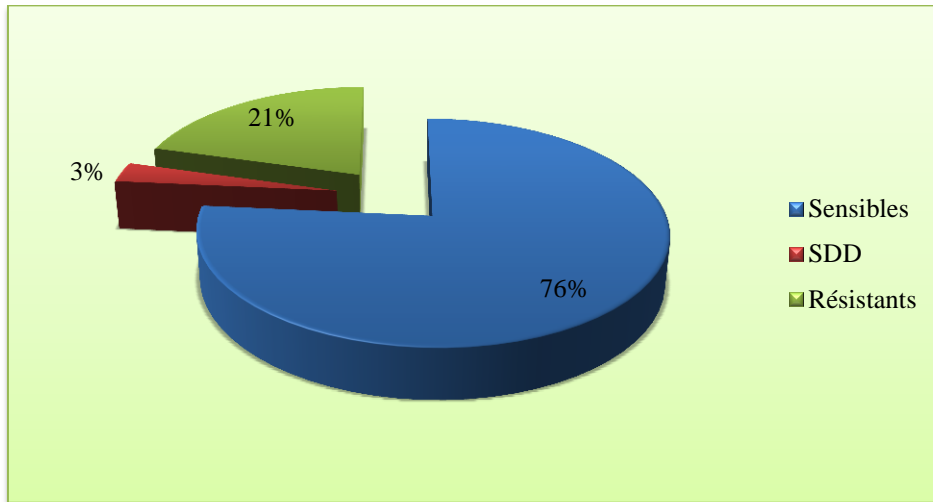
**Figure 14 :** Sensibilité des souches de *Candida* isolées des sites périphériques

➤ **Sites buccal :**

Des 34 souches isolées du site buccal, 26 sont sensibles au voriconazole tandis que 7 sont résistantes.

**Tableau 11 :** Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées du site buccal

	Nombre	Pourcentage (%)
<b>Sensibles</b>	26	76
<b>SDD</b>	1	3
<b>Résistants</b>	7	21
<b>Total</b>	34	100



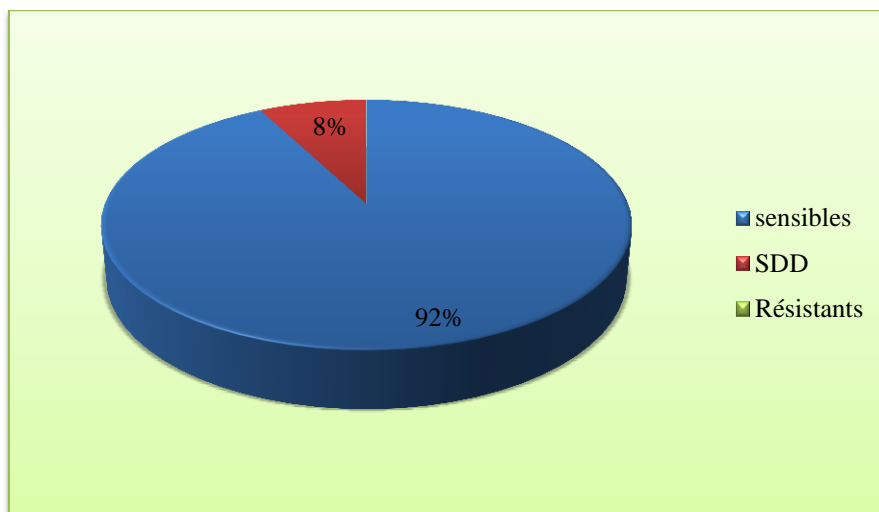
**Figure 15 :** Sensibilité des souches de *Candida* isolées du site buccal

➤ **Urines :**

Des 13 souches isolées des urines, 12 souches sont sensibles. Aucune souche n'est résistante.

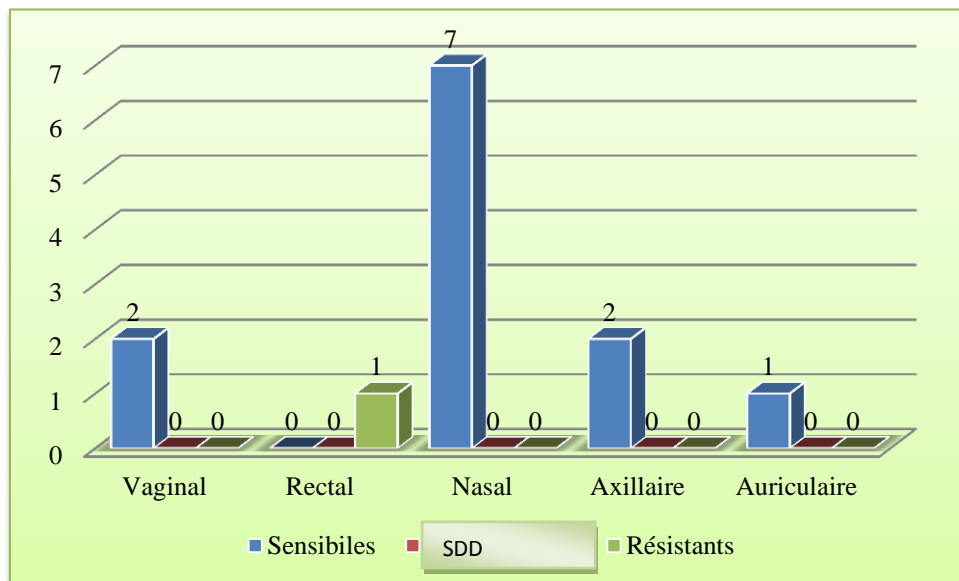
**Tableau 12 :** Nombres et pourcentages des souches de *Candida* isolées des urines

	Nombre	Pourcentage (%)
<b>Sensibles</b>	12	92
<b>SDD</b>	1	8
<b>Résistants</b>	0	0
<b>Total</b>	13	100



**Figure 16 :** Sensibilité des souches de *Candida* isolées du site buccal

Pour le reste des sites prélevés (vaginal, rectal, nasal, axillaire, auriculaire), le nombre des souches sensibles, sensibles dose dépendantes et résistantes est représenté dans la figure 17. La seule souche isolée du site rectal est résistante tandis que l'ensemble des souches des autres sites sont sensibles.



**Figure 17 :** Sensibilité des souches de *Candida* isolées des sites vaginal, nasal, rectal, axillaire et auriculaire

### III.5 Sensibilité selon les espèces :

#### ✿ Pour la totalité des souches :

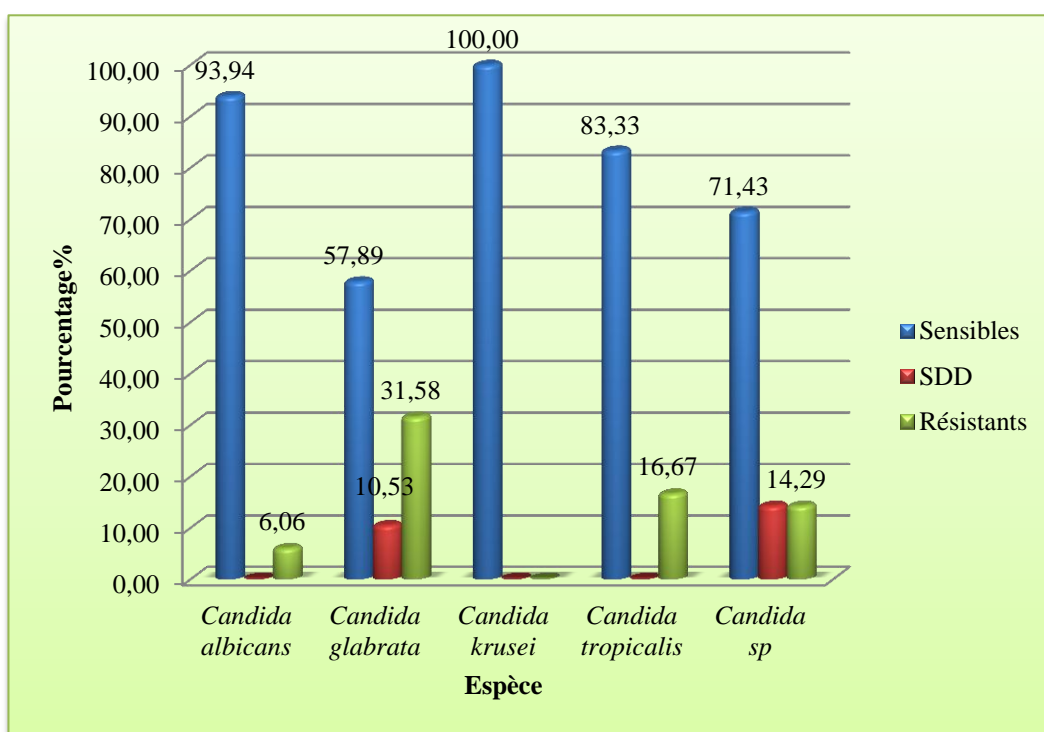
Le voriconazole est significativement actif contre toutes les espèces de *Candida*.

Le voriconazole est plus actif sur *Candida albicans* (taux de sensibilité = 93,94%) et *Candida tropicalis* (taux de sensibilité = 83,33%). Pour *Candida krusei*, une seule souche est isolée et elle est sensible. Une sensibilité diminuée au voriconazole est observée pour *Candida glabrata* (taux de sensibilité = 57,89%).

On voit clairement que le voriconazole présente une sensibilité diminuée vis-à-vis de *Candida glabrata* avec un taux de résistance aux alentours de 32%. Ce taux est de près de 17% pour *Candida tropicalis*, alors qu'il est uniquement de 6% pour *Candida albicans*.

**Tableau 13 :** Taux de sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques et des hémocultures

Espèces	Nombre	Sensibilité					
		Sensibles		SDD		Résistants	
		N	%	N	%	N	%
<i>Candida albicans</i>	33	31	93,94	0	0	2	6,06
<i>Candida glabrata</i>	19	11	57,89	2	10,53	6	31,58
<i>Candida krusei</i>	1	1	100	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	12	10	83,33	0	0	2	16,67
<i>Candida sp</i>	7	5	71,43	1	14,29	1	14,29



**Figure 18 :** Sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques et des hémocultures

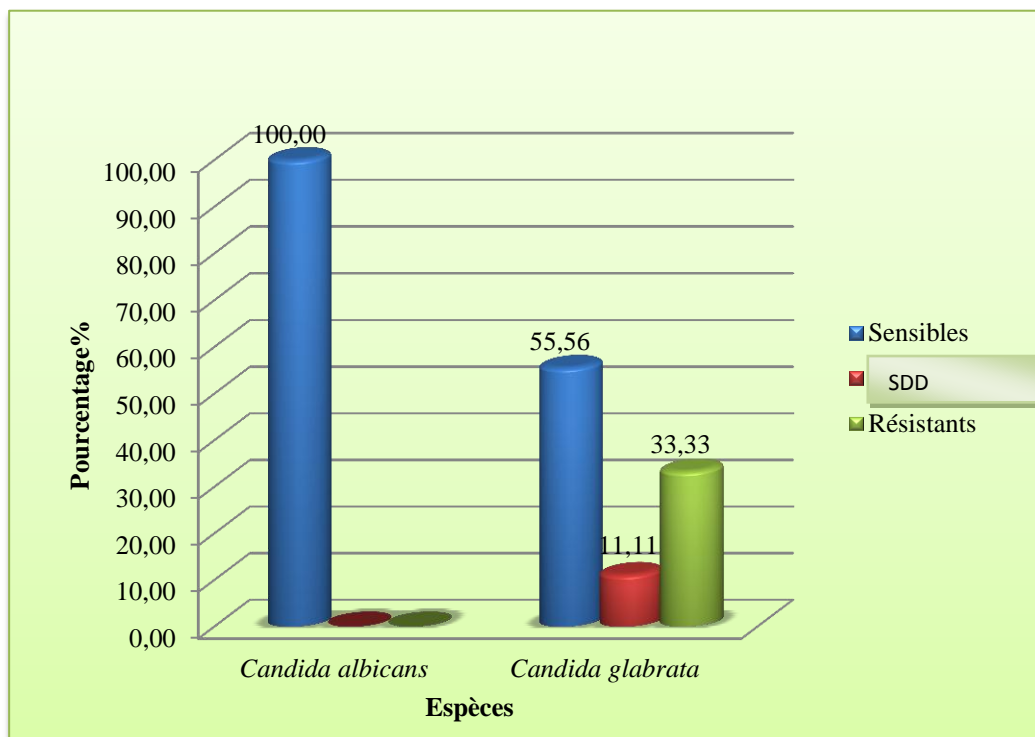
✿ **Pour les souches provenant des hémocultures :**

Le voriconazole est nettement plus actif sur les souches de *Candida albicans* isolées à partir des hémocultures que sur *Candida glabrata*. Le taux de sensibilité au voriconazole est de 100% pour *Candida albicans* contre uniquement 55% pour *Candida glabrata*.

Les souches de *Candida glabrata* sont nettement plus résistantes au voriconazole avec un taux de résistance dépassant les 30%. Aussi, environ 11% des souches présentent une sensibilité dose dépendantes.

**Tableau 14 :** Taux de sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des hémocultures

Espèces	Nombre	Sensibilité					
		Sensibles		SDD		Résistants	
		N	%	N	%	N	%
<i>Candida albicans</i>	3	3	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Candida glabrata</i>	9	5	55,56	1	11,11	3	33,33



**Figure 19 :** Sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des hémocultures

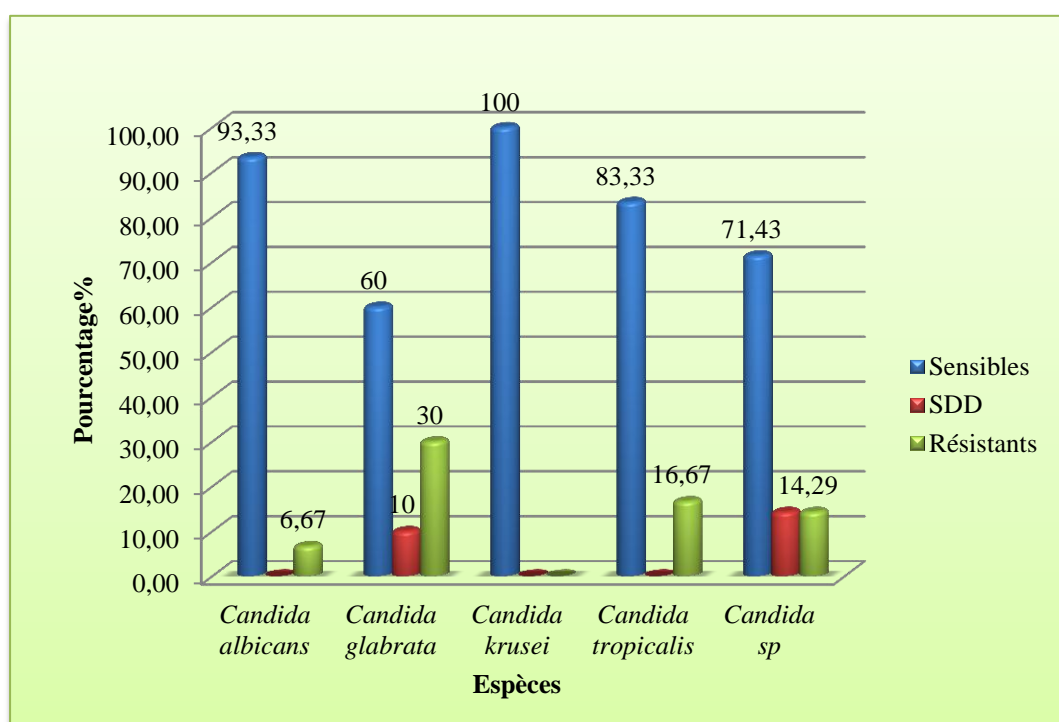
✿ **Pour les souches provenant des sites périphériques :**

Le voriconazole a été plus actif sur *Candida albicans* (taux de sensibilité = 93,33%) et *Candida tropicalis* (taux de sensibilité = 83,33%). Pour *Candida krusei*, une seule souche a été isolée et elle s'est révélée sensible. Une sensibilité diminuée au voriconazole a été observée pour *Candida glabrata* (taux de sensibilité = 60%).

Ici, et encore une fois, on voit clairement que le voriconazole présente une sensibilité diminuée vis-à-vis de *Candida glabrata* avec un taux de résistance de 30%. Ce taux est de près de 17% pour *Candida tropicalis*, alors qu'il est uniquement de 6,67% pour *Candida albicans*.

**Tableau 15 :** Taux de sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques

Espèces	Nombre	Sensibilité					
		Sensibles		SDD		Résistants	
		Nbr	%	Nbr	%	Nbr	%
<i>Candida albicans</i>	30	28	93,33	0	0	2	6,67
<i>Candida glabrata</i>	10	6	60	2	10	6	30
<i>Candida krusei</i>	1	1	100	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	12	10	83,33	0	0	2	16,67
<i>Candida sp</i>	7	5	71,43	1	14,29	1	14,29



**Figure 20 :** Sensibilité au voriconazole des différentes espèces de *Candida* provenant des sites périphériques

# *Discussion*

#### **IV. Discussion :**

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

###### **IV.1.1 Indications et objectifs:**

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

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

Elles doivent être réservées :

⇒ Aux infections profondes ou septicémiques ou dans les localisations cutanéomuqueuses secondaires à une diffusion systémique, afin de vérifier la sensibilité de la souche aux antifongiques systémiques;

⇒ Aux évolutions cliniques défavorables ou en cas d'échec malgré un traitement adapté et bien conduit;

⇒ Aux levures isolées de malades immunodéprimés ou hospitalisés dans les services à risque : réanimations médicale, chirurgicale, services d'oncohématologie, de transplantation d'organes, de néonatalogie, quelle que soit l'origine du prélèvement. Ceci permet de vérifier si une résistance aux antifongiques n'apparaît pas secondairement <sup>[36]</sup>.

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

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

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

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

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

En ce qui concerne les antifongiques déjà utilisés depuis un certain nombre d'années, la surveillance de l'évolution sur 5/10 ans de la sensibilité des isolats cliniques locaux permet d'anticiper sur des modifications subtiles, difficiles à mettre en évidence en dehors d'une surveillance longitudinale, locale, régionale ou nationale <sup>[37]</sup>.

**Activités de recherche :** La plupart des infections fongiques surviennent chez les patients sévèrement immunodéprimés, dont les défenses immunitaires ne peuvent contribuer à éradiquer les microorganismes dont les champignons. Afin d'améliorer le pronostic des infections fongiques extrêmement graves et sévères, il est important de se donner les moyens de développer et de tester de nouveaux antifongiques seuls ou en associations. Tester la sensibilité aux antifongiques dans un cadre de recherche est capital. En particulier pour évaluer l'activité *in vitro* de nouveaux antifongiques et des combinaisons d'antifongiques, afin de détecter des synergies mais aussi des antagonismes *in vitro*. Également, l'effet fongicide demande à être étudié, car actuellement les données manquent en termes de valeurs de laboratoire. Les modèles pharmacodynamiques et l'étude des mécanismes de résistance vont dans le sens d'une amélioration de la connaissance des microorganismes fongiques et donc de pouvoir opposer une réponse thérapeutique plus ciblée et plus efficace <sup>[37]</sup>.

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

La réalisation d'antifongigramme et l'évaluation des CMI est facile pour les levures, par contre elle est plus délicate pour les champignons filamenteux (*Aspergillus*, *Fusarium*) car l'association de spores et de filaments forme un inoculum hétérogène difficilement standardisable. Les antifongiques étudiés seront avant tout ceux actifs dans les mycoses profondes [36].

##### 1. Méthodes par dilution :

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

##### 1.1 En milieu solide :

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

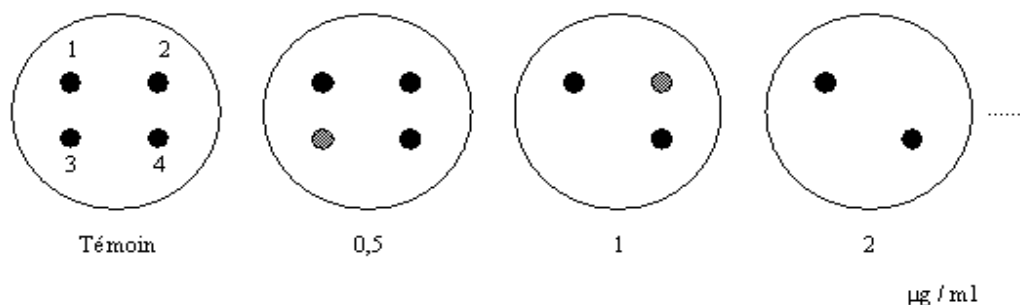


Figure 21 : Détermination de la CMI par dilution en milieu gélosé

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

- La CMI de la souche 3 vis-à-vis de l'antifongique incorporé à la gélose est de 1 µg/mL.
- La CMI de la souche 2 est de 2 µg/mL.

- Les déterminations des CMI des souches 1 et 4 nécessiteraient de tester des concentrations plus fortes en antifongique.

Le milieu casitone a permis d'améliorer la lecture pour les azolés. Il existe une bonne corrélation avec les microméthodes en milieu liquide [36].

### 1.2 En milieu semi-solide :

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

- **ATB-Fungus®** : (Bio-Mérieux) C'est un test commercialisé qui permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et de *Cryptococcus neoformans* aux antifongiques dans des conditions très proches de la technique de référence de microdilution [38].

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

Il existe la galerie ATB-Fungus3® et le modèle précédent ATB-Fungus2®. La différence entre les deux réside en la présence d'un cinquième agent antifongique dans la galerie ATB-fungus3® qui est le voriconazole [38,39].

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

**Tableau 16** : Antifongiques des deux modèles de la galerie ATB-Fungus [38, 39, 40,41]

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

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

d'incubation à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , la croissance dans les puits est lue visuellement par deux techniciens indépendants [38,39].

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

Absence de réduction de croissance → score = 4

Légère réduction de croissance → score = 3

Réduction marquée de croissance → score = 2

Très faible croissance → score = 1

Absence de croissance → score = 0

Pour ce qui est de l'amphotéricine B, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 0, donc une inhibition complète. Pour le fluconazole, la flucytosine, l'itraconazole et le voriconazole, du fait du phénomène de croissance résiduelle, la CMI correspond à la concentration d'antifongique la plus faible permettant d'obtenir un score de 2,1 ou 0 [38-41].



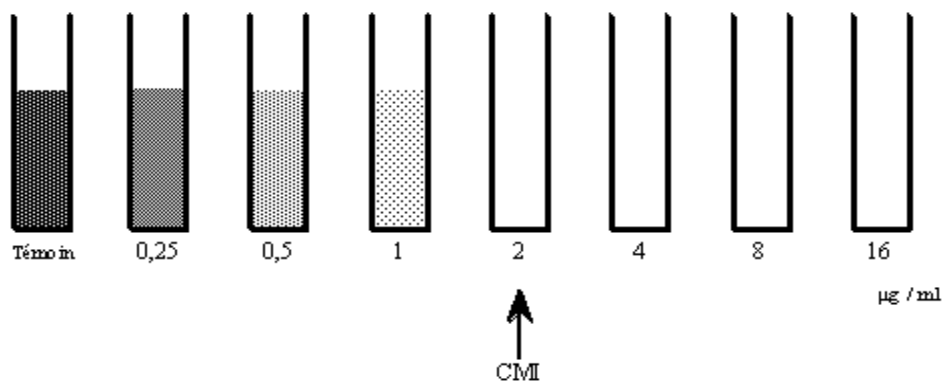
**Figure 22 :** Lecture des résultats de la galerie ATB Fungus2®, bioMérieux.

**Avantages :** La méthode est rapide, reproductible et automatisable. Les CMI sont précises (plusieurs concentrations) [36,38].

**Inconvénients :** Pour cette méthode, la lecture de la quantification de la croissance est relativement difficile au début et peut varier selon les personnes donc le résultat dépend de notre jugement. Ce résultat est parfois peu clair du fait d'une mauvaise préparation ou d'une incubation inadéquate. Le temps d'incubation est de 24 heures pour toutes les espèces, sauf pour *C.glabrata* (48 heures). Après 48 heures, les cupules de la galerie sont parfois sèches et ininterprétables [38].

### 1.3 En milieu liquide :

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



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

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

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

**1- Standard américain : Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) :** l'absence de reproductibilité des concentrations minimales inhibitrices entre les laboratoires a imposé

la nécessité d'obtenir des méthodes standardisées et reproductibles. Beaucoup d'effort ont été entrepris pour obtenir des méthodes rapides, fiables et de routine au sein des laboratoires. Beaucoup d'effort ont été entrepris pour par le NCCLS depuis 1985 afin d'obtenir des méthodes rapides, fiables et de routine au sein des laboratoires. Les buts princeps étaient d'obtenir des résultats reproductibles et définir des souches contrôle, de constituer une référence pour l'évaluation des autres méthodes, d'évoluer vers des méthodes de pratique courante et construire pour le mycologue une trousse de routine.

Ainsi, en 1982, une première section chargée de la standardisation des tests de sensibilité des levures aux antifongiques a été créée aux Etats-Unis au sein du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Suite aux études initiées, depuis 1982, par le Subcommittee on Antifungal Susceptibility Tests (sous comité sur les essais de sensibilité aux antifongiques), le NCCLS a publié en 1997 une méthode de référence officielle de microdilution en bouillon (Approved Standard M27-A) et ses variantes de microdilution pour tester *in vitro* les activités des composés antifongiques contre *Candida sp.* et *C.neoformans* [33]. La méthode M27-A est une macrométhode longue et laborieuse réalisée en tube avec une détermination visuelle des CMI.

Pour pallier à la lourdeur de la mise en œuvre de cette technique, le NCCLS a proposé une microméthode adaptée pour une utilisation en microplaques avec lecture spectrophotométrique des CMI. Elle est bien corrélée avec la macrométhode mais elle reste une technique lourde non utilisée en routine. Ainsi, la publication de la méthode M27-A a été suivie en 1998 du Proposed Standard M38-A, qui décrit des méthodes de microdilution et de microdilution en bouillon pour des essais de sensibilité des champignons filamenteux (*Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus oryzae*....) [32].

**Tableau 17 :** Paramètres de mise en œuvre des méthodes M27 et M38 de microdilution du CLSI

	<b>M27-A</b>	<b>M38-A</b>
<b>Format</b>	Microdilution en milieu liquide, volume final : 1mL	Microdilution
<b>Organismes</b>	<i>Candida sp.</i> <i>Cryptococcus sp.</i>	<i>Aspergillus sp.</i> <i>Fusarium sp.</i> <i>Rhisopus sp.</i> <i>Sporothrix schenkii</i> <i>Pseudallescheria boydii</i>

Milieu	RPMI 1640 + 0.165M MOPS (pH=7.0)	RPMI 1640 + 0.165M MOPS (pH=7.0)
Taille de l'inoculum	0.5 – 2.5 x 10 <sup>3</sup> organismes/mL	0,4 – 5 x 10 <sup>4</sup> conidies/mL
Température d'incubation	35°C	35°C
Durée d'incubation	48h ( <i>Candida sp.</i> ) 72h ( <i>Cryptococcus neoformans</i> )	24h <i>Rhizopus</i> 48h <i>Aspergillus, Fusarium, S.schenckii</i> 72h <i>P.boydii</i>
Point final	CMI - 0: amphotéricine B CMI - 2: azolés, 5fluorocytosine, caspofungine, anidulafungine, micafungine	CMI - 0 : amphotéricine B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, ravcuconazole CMI - 2 et MEC : caspofungine, anidulafungine, micafungine

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

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

**(EUCAST) :** Un test de dilution en bouillon pour tester la sensibilité des levures normalisé par le Comité Européen sur les Essais de Sensibilité aux Antifongiques (EUCAST), Sous-Comité sur les Essais de Sensibilité aux Antifongiques (AFST), est également disponible et initialement documenté en 1999 <sup>[43]</sup>. Le test est similaire à la méthode de dilution en bouillon du CLSI, sauf que le milieu RPMI 1640 est supplémenté de 2% de glucose, la densité d'inoculum est de 1-5 x 10<sup>5</sup> cellule/mL, et les résultats sont lus à 24h au lieu de 48h pour le CLSI. Une évaluation multicentrique de la méthode de l'EUCAST a montré qu'elle donne des résultats reproductibles <sup>[44]</sup> et des études comparatives suggèrent une bonne corrélation (taux d'accord 92%) entre la méthode du CLSI et celle de l'EUCAST <sup>[45]</sup>.

Des paramètres optimaux pour les tests de sensibilité d'*Aspergillus sp.* aux antifongiques ont également été proposés par EUCAST-AFST. Il s'agit notamment de l'utilisation de RPMI 1640 supplémenté à 2% de glucose comme le milieu d'essai, d'un inoculum d'une densité de 1-2,5 x 10<sup>5</sup> conidies/mL, d'une température d'incubation de 35°C pendant 48h,

et une lecture visuelle des CMI à CMI-0 [46]. Un taux d'accord global de 92,5% a été atteint entre la méthode d'EUCAST et la méthode du CLSI lors d'un essai qui a englobé le posaconazole et le voriconazole contre *Aspergillus* [47].

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

- **CMI** (mg/L) = Concentration Minimale Inhibitrice : Plus petite concentration d'antifongique qui donne une réduction visible de la croissance de l'inoculum/témoin.
- **CME** (mg/L) = Concentration Minimale Efficace : Plus petite concentration d'antifongique pour laquelle on observe des hyphes courtes, trapues et compactes/témoin.
- **CMF** (mg/L) = Concentration Minimale Fongicide : Plus petite concentration d'antifongique qui tue  $\geq 99,9\%$  de l'inoculum ou qui diminue de 3 log au moins la densité de l'inoculum/témoin [48].

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

**a) Pour *Candida sp.* [49]:**

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

**Tableau 18 :** Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories de *Candida* vis-à-vis des antifongiques selon l'EUCAST et le CLSI

Antifongique	EUCAST			CLSI		
	Sensible	SDD	Résistant	Susceptible	SDD	Résistant
Fluconazole	$\leq 2$	4	$> 4$	$< 8$	16 – 32	$\geq 4$
Voriconazole	$\leq 0,125$	-	$> 0,125$	$< 1$	2	$\geq 4$
Caspofungine	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE	NE
Micafungine	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE	NE
Anidulafungine	NE	NE	NE	$\leq 2^*$	NE	NE

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

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

Les données sont exprimées en mg/L.

**b) *Aspergillus fumigatus* :**

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

pour tester la sensibilité des filamenteux aux azolés. Mais il existe des propositions de valeurs seuils pour les différentes catégories (S, I, R) d'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des antifongiques azolés actifs.

**Tableau 19 :** Proposition de valeurs seuils pour les différentes catégories (S, I, R) d'*Aspergillus fumigatus* vis-à-vis des antifongiques azolés actifs

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

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

Il n'existe pas de valeurs seuils d'interprétation approuvées par le CLSI ou l'EUCAST concernant l'amphotéricine B [50,51].

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

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

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

Plusieurs méthodes colorimétriques sont utilisées tels que Sensititre YeastOne. Des méthodes non commercialisées sont également utilisées (celles qui utilisent les sels de tétrazolium) [53,54]. Alamar blue ou d'autres indicateurs colorimétriques peuvent être ajoutés au RPMI. En utilisant Alamar blue, le bleu indique l'absence de croissance, le violet indique une inhibition partielle de la croissance, et le rouge indique la présence d'une croissance. Ces résultats peuvent également être évalués par spectrophotométrie. Dans l'autre cas, où c'est les sels de tétrazolium qui sont utilisés, le changement de couleur reflète l'activité métabolique et peut être évaluée par spectrophotométrie en mesurant la densité optique. Le sel de tétrazolium jaune vire au violet quand il est réduit en formazan [42].

Parmi ces méthodes colorimétriques commercialisées on citera:

**a) Sensititre Yeast One®:** (Trek Diagnostic Systems) <sup>[55]</sup>

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

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

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

**Tableau 20 :** Antifongiques à tester par le Sensititre Yeast One

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

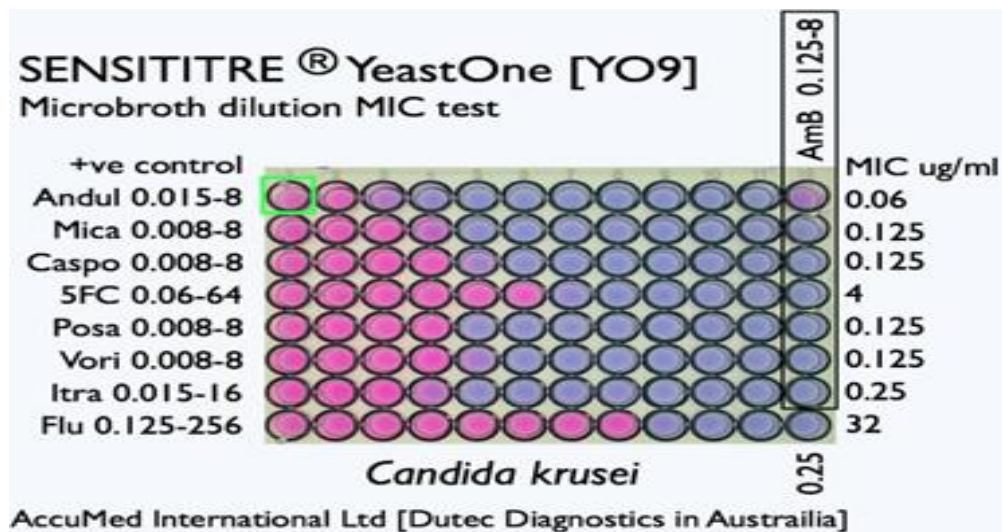
**Mode opératoire:** Plusieurs colonies de levures bien isolées, de plus de 1mm de diamètre, sont prélevées d'une culture pure de 24 heures et émulsifiées dans l'eau stérile. La densité est ensuite ajustée à 0,5 McFarland. 20 mL de la suspension est transféré dans 11 ml de milieu liquide d'inoculum YeastOne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

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

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

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

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



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

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

**Tableau 21 :** Illustration et interprétation des résultats des tests que l'on peut rencontrer

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

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

**Avantages :** Selon les évaluations publiées, ce test présente une concordance de plus de 85% avec les résultats obtenus avec la méthode M27-A. La présence d'un indicateur d'oxydoréduction rend la lecture des CMI beaucoup plus aisée [56].

**Inconvénients :** Le système Sensititre Yeast One Colorimetric Antifungal Panel (procédé BlueAlamar®) est disponible commercialement, mais il n'est pas encore approuvé par la FDA aux USA ni enregistré en France par l'AFSSAPS. Des améliorations sont encore nécessaires concernant la détection des résistances à l'amphotéricine B et la croissance des isolats à développement lent (*cryptococcus neoformans*) [37].

#### **b) Fungitest®:**

**Principe :** Cette technique permet d'étudier la croissance des levures *in vitro* en milieu liquide en présence de six antifongiques testés à deux concentrations différentes. Elle dérive de la dernière recommandation du NCCLS. Le milieu de culture utilisé est RPMI glucosé à 2% et tamponné. Il est additionné d'un indicateur d'oxydoréduction qui traduit la croissance des levures par virage de sa couleur du bleu au rose [57,58].

La microplaque contient 16 puits :

Deux puits réservés aux témoins négatifs, deux puits réservés aux témoins positifs et

douze puits contenant les six antifongiques cités avec deux concentrations différentes sous forme déshydratées [59].

**Antifongiques** [59] : Les antifongiques utilisés sont :

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

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

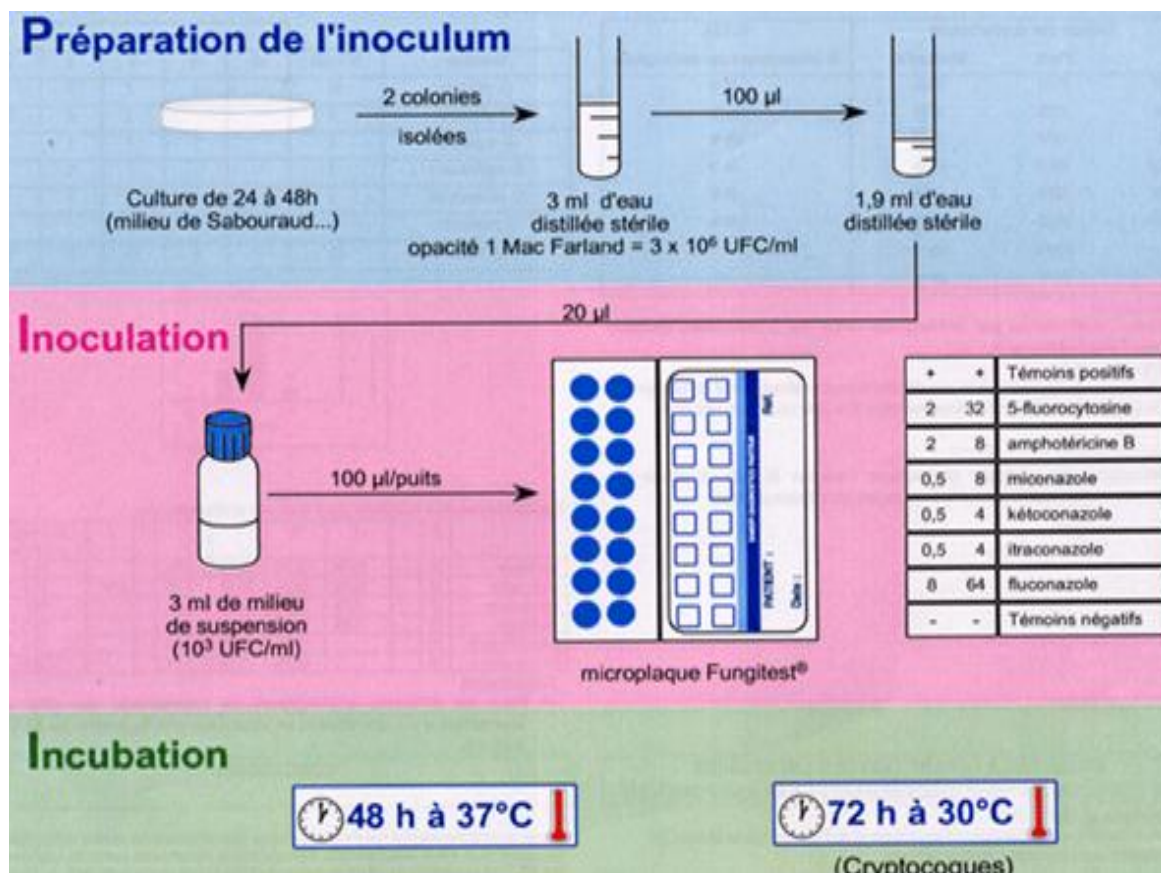


Figure 25 : Mode opératoire du Fungitest

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

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

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

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

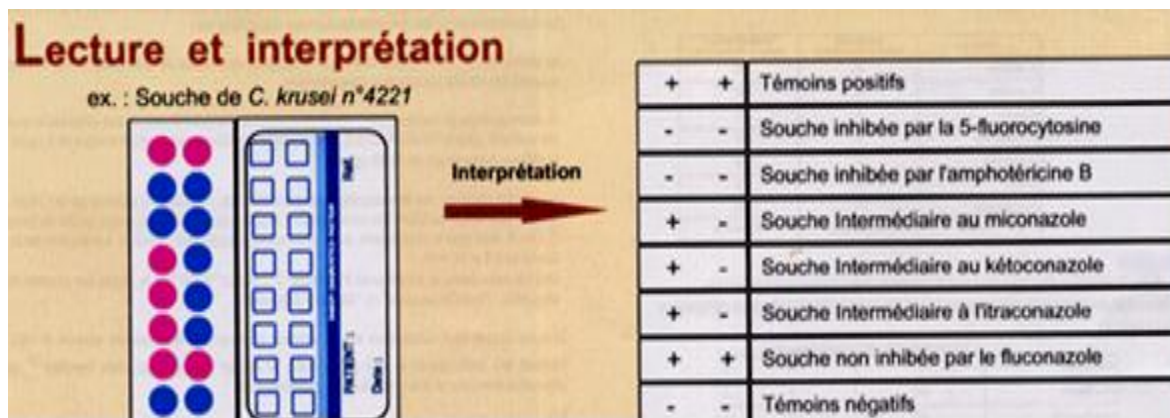


Figure 26 : Lecture et interprétation des résultats du Fungitest

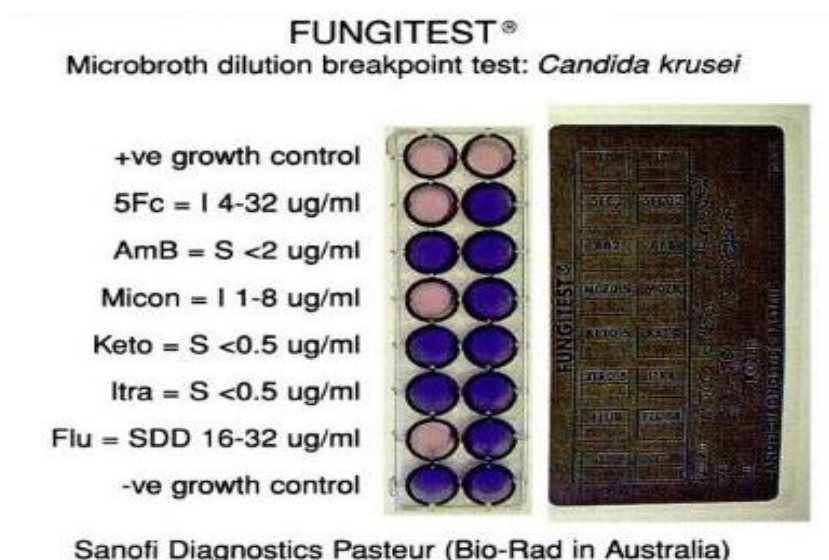


Figure 27 : Lecture des résultats du Fungitest® en fonction de la couleur des cupules

**Avantages :** Cette technique présente une bonne condition de standardisation et a une bonne corrélation par rapport à la méthode de référence du NCCLS pour les souches trouvées sensibles [57].

**Inconvénients :** Le Fungitest a une faible capacité de détecter les souches résistantes. Par rapport à la méthode de référence du NCCLS, une proportion importante de *C.glabrata* trouvée intermédiaire ou résistante par cette technique se retrouve sensible par le Fungitest. Aussi, les valeurs des CMI sont différentes de celles du NCCLS. L'autre limite de cette technique est qu'elle ne peut doser que deux valeurs d'antifongiques [57].

## 2. Méthode par diffusion :

- **Méthode de diffusion des disques du CLSI :** Après le succès du développement de méthodes standardisées de dilution en bouillon pour tester la sensibilité aux antifongiques des champignons, l'étape suivante pour le CLSI était de simplifier cette approche et la rendre plus attrayante pour les essais de petits volumes. La diffusion en disque est depuis longtemps une technique populaire et simple pour tester la sensibilité et cette méthodologie a été adaptée par le CLSI aux antifongiques. Ainsi, sur la base d'études du fluconazole et du voriconazole contre *C.albicans* <sup>[60,61]</sup>, une méthode normalisée de la susceptibilité des levures, particulièrement *Candida*, aux antifongiques (fluconazole et voriconazole) par la diffusion des disques (M44-A) est disponible <sup>[62]</sup>. Elle est utilisée pour les études de surveillance antifongique <sup>[10]</sup>.

Cette méthode utilise les règles de base, à savoir, un milieu agar de Mueller-Hinton complété par du glucose à 2% et 0,5µg/mL de bleu de méthylène (pH 7,2 - 7,4 à température ambiante après gélification). Bien que l'ajout du glucose fournisse une croissance favorable, l'addition du bleu de méthylène améliore la définition des contours de la zone d'inhibition <sup>[63]</sup>. La densité de l'inoculum doit être ajustée par une solution saline à 0,5 McFarland visuellement ou par spectrophotométrie à 530 nm, pour avoir une concentration finale de 1-5 x 10<sup>6</sup> cellules/ ml. Les résultats se lisent à 80% de la croissance après incubation des plaques pendant 24h à 35°C. La période d'incubation peut être prolongée à 48h pour les isolats qui ne se développent pas suffisamment à 24h <sup>[42]</sup>. Pour l'interprétation des résultats, elle se fait en fonction des diamètres d'inhibition.

**Tableau 22 :** Critères d'interprétation de la méthode de diffusion pour le fluconazole et le voriconazole contre *Candida*

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

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

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

↪ **Une souche de sensibilité dose dépendante** est une souche pour laquelle le succès thérapeutique est imprévisible. Ces souches forment un ensemble hétérogène pour lequel les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas prédictifs d'un succès thérapeutique.

En effet, ces souches :

Peuvent présenter un mécanisme de résistance dont l'expression *in vitro* est faible, avec pour conséquence leur classement dans la catégorie sensible. Cependant, *in vivo*, une partie de ces souches apparaît résistante au traitement ;

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

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

↪ **Une souche résistante** est une souche pour laquelle il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique quels que soient le type de traitement et la dose d'antibiotique utilisée.

Même si elle n'est pas encore normalisée et/ou documentée, la méthode de diffusion est sous enquête pour d'autres drogues: tels que le posaconazole vs *Candida* [65,66]; caspofungine vs *Candida* [67]; amphotéricine B, la flucytosine, et azolés [68]; caspofungine et micafungine vs *Aspergillus* et *Fusarium* [69,70]; posaconazole vs *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Scedosporium* et *Fusarium* [71,72]; posaconazole, voriconazole, itraconazole, l'amphotéricine B, et la caspofungine vs *Absidia*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Bipolaris*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, et *Scedosporium* [73]; itraconazole, terbinafine, voriconazole, et ravuconazole vs *Microsporum* et *Trichophyton* [74], et terbinafine et naftifine vs *Microsporum*, *Epidermophyton*, et *Trichophyton* [75]. Les résultats de ces études, en général, suggèrent un degré acceptable de corrélation entre la diffusion des disques et les dosages de la méthode de dilution de référence du CLSI.

Cependant, la méthode de référence de diffusion des disques peut parfois donner des

résultats qui diffèrent de ceux obtenus par la méthode de dilution en bouillon [60, 63, 76]. Certains isolats qui sont sensibles au fluconazole peuvent être classés comme résistants par le test de diffusion des disques. De plus, ce test peut ne pas différencier les isolats résistants au fluconazole de ceux sensibles dose dépendant. Plus important encore, certains isolats résistants au fluconazole peuvent être classés comme sensibles par un test de diffusion des disques. La méthode de référence de dilution en bouillon reste le gold standard pour la catégorisation correcte de la sensibilité, en particulier lorsque l'étude de résistance aux antifongiques est effectuée à des fins de routine et pour guider le traitement antifongique [42].

- **Méthode de diffusion des comprimés Néo-sensitabs<sup>TM</sup>**: Il s'agit d'un test de diffusion qui utilise des comprimés d'antifongiques commercialisés au lieu des disques. Cette méthode a été étudiée en comparaison avec le test de référence de diffusion du CLSI. Jusqu'ici, elle a donné des taux acceptables d'accord avec la méthode de diffusion des disques de référence et les méthodes de dilution en bouillon, dans des essais sur le fluconazole, le voriconazole, l'itraconazole, et la caspofungine contre *Candida* ou *C.neoformans* [77,78].

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

Des études récentes ont utilisé l'agar Mueller Hinton additionné de 2% de glucose et de 0,5µg/mL de bleu de méthylène comme milieu et un lecteur de plaques Biomic qui permet une lecture électronique et une interprétation des 16 zones d'inhibition [79].

**Antifongiques** : La liste des agents antifongiques disponibles depuis le 1er janvier 2009 pour la technique de Néo-Sensitabs est représentée dans le tableau ci-dessous [80]:

**Tableau 23 :** Antifongiques à tester par le Néo-Sensitabs

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

**Mode opératoire** <sup>[80]</sup>: A partir d'une culture fraîche de 24h, quelques colonies sont prélevées pour préparer une suspension de levures. La densité de l'inoculum préparé doit être de 0,5 McFarland. Avec un écouvillon stérile, la boîte contenant le milieu agar de Mueller-Hinton complété par du glucose à 2% et 0,5µg/ml de bleu de méthylène doit êtreensemencée sur toute la surface. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24-48 heures pour *Candida*. Pour *Cryptococcus* l'incubation se fait à 30°C pendant 42-48 heures. Une durée d'incubation plus longue peut entraîner une fausse résistance contre les imidazolés. Les boîtes doivent toujours être examinées après une incubation d'une nuit et si les zones d'inhibition sont visibles, elles doivent être mesurées. Si la croissance n'est pas encore visible, les plaques peuvent être remises en incubation pendant 24 heures de plus.

**Lecture des résultats** <sup>[80]</sup>: Pour les polyènes (amphotéricine B, nystatine) la zone claire sans croissance visible est mesurée. Les colonies à l'intérieur de la zone d'inhibition doivent être considérées comme des mutants résistants.

Pour les azolés, caspofungine et terbinafine (*Candida*), les zones doivent être mesurées à la

hauteur de colonies de taille normale. Il y a souvent une zone de croissance des colonies partiellement inhibées (plus petites) à la limite de la zone réelle. Ils ne doivent être considérés comme des mutants résistants.

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

**Interprétation des résultats:**

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

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

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

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

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

All MIC breakpoints from EUCAST are tentative  
\* *C. krusei* should always be reported as resistant to fluconazole.

**Avantages :** Le NéoSensitabs est une méthode facile à mettre en place et a un potentiel pour le dépistage d'un grand nombre de souches résistantes [79].

**Inconvénients :** Il existe une mauvaise corrélation entre les diamètres de la zone d'inhibition et la CMI, aussi ces diamètres ne permettent pas de différencier entre souche sensible et souche sensible dose dépendante. C'est la raison pour laquelle les souches résistantes doivent être confirmées en utilisant une méthodologie appropriée de la CLSI [79].

### 3. Méthode par dilution-affusion :

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

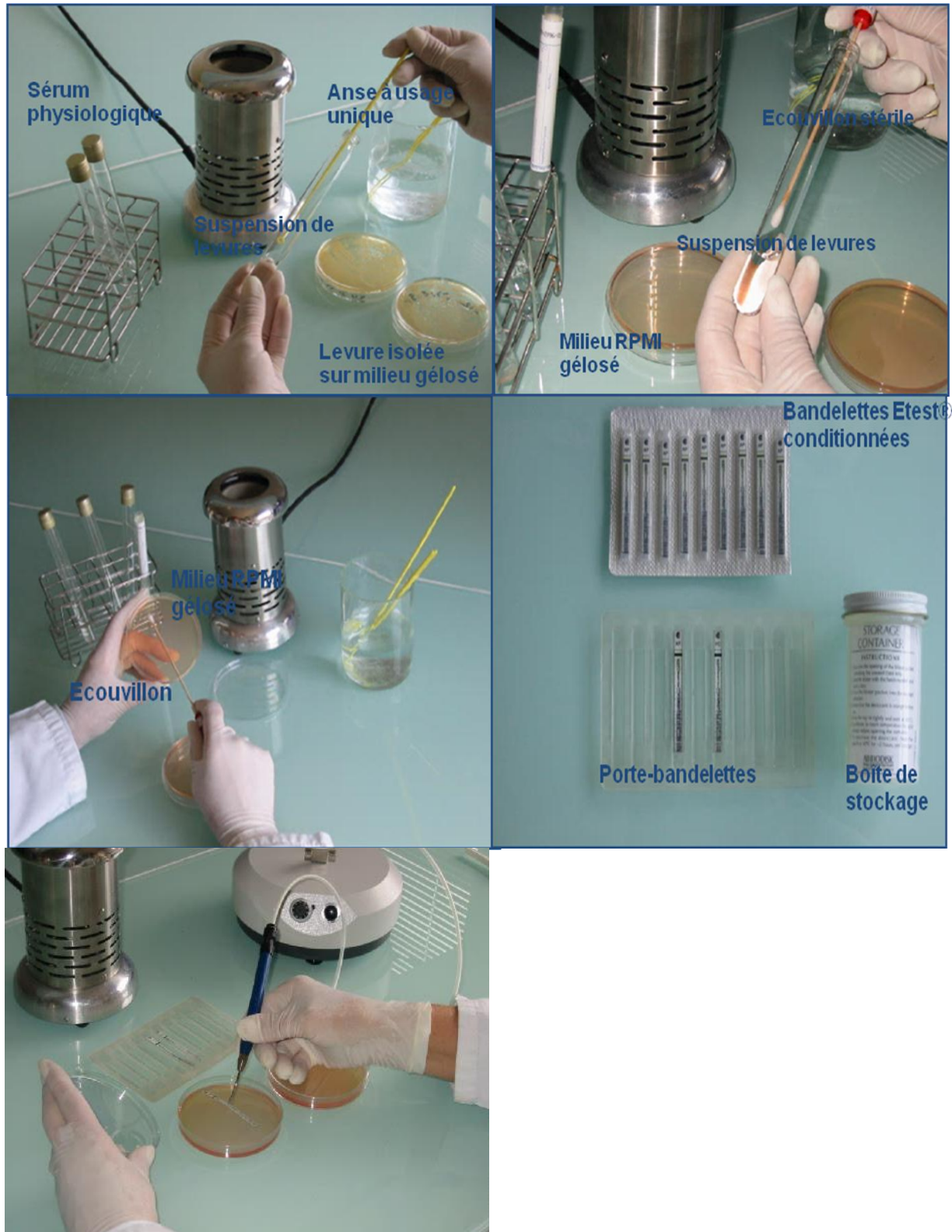
**Principe :** L'E-test est une technique quantitative pour la détermination sur milieu gélosé de la concentration minimale inhibitrice des agents antifongiques vis-à-vis des champignons et pour la détection des mécanismes de résistance. Elle est basée sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient exponentiel prédéfini de l'antifongique à étudier sur une face et une échelle de lecture sur une autre face. Lorsqu'une bandelette E-test est appliquée sur la surface d'une géloseensemencée, le gradient exponentiel préformé de l'agent antifongique est immédiatement transféré dans la

matrice de l'agar. Le gradient de concentration, continu et prédéfini, établi le long de la bandelette reste stable pendant une longue période de temps. Après une période d'incubation, d'une nuit ou plus, une ellipse d'inhibition symétrique centrée le long de la bandelette est formée [89].

**Antifongiques :** Le gradient d'antifongique couvre des valeurs très étendues de 0,016 à 256 µg/ml pour le fluconazole et de 0,002 à 32 µg/ml pour la 5-FC, le kétoconazole, l'amphotéricine B et l'itraconazole [36]. Par ailleurs, la gamme d'antifongiques disponibles est en cours d'élargissement pour les médicaments ayant récemment bénéficiés d'une AMM (voriconazole, caspofungine, anidulafungine).

**Mode opératoire :** La préparation de l'inoculum (densité de 0,5 McFarland) se fait en émulsionnant dans un bouillon adapté (3mL de NaCl) un nombre adéquat de colonies bien isolées à partir d'une culture pure de 24 heures. Ensuite l'ensemencement se fait à l'aide d'un écouvillon stérile. Toute la surface de la gélose est écouvillonnée dans les trois directions. Les bandelettes sont appliquées ensuite à la surface de la gélose en s'assurant que l'échelle de CMI soit positionnée correctement (vers soi). L'incubation des boîtes s'effectue sur le couvercle dans les conditions appropriées pour chaque microorganisme étudié [89].

*Etude de la sensibilité au Voriconazole de 72 souches de Candida isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.*



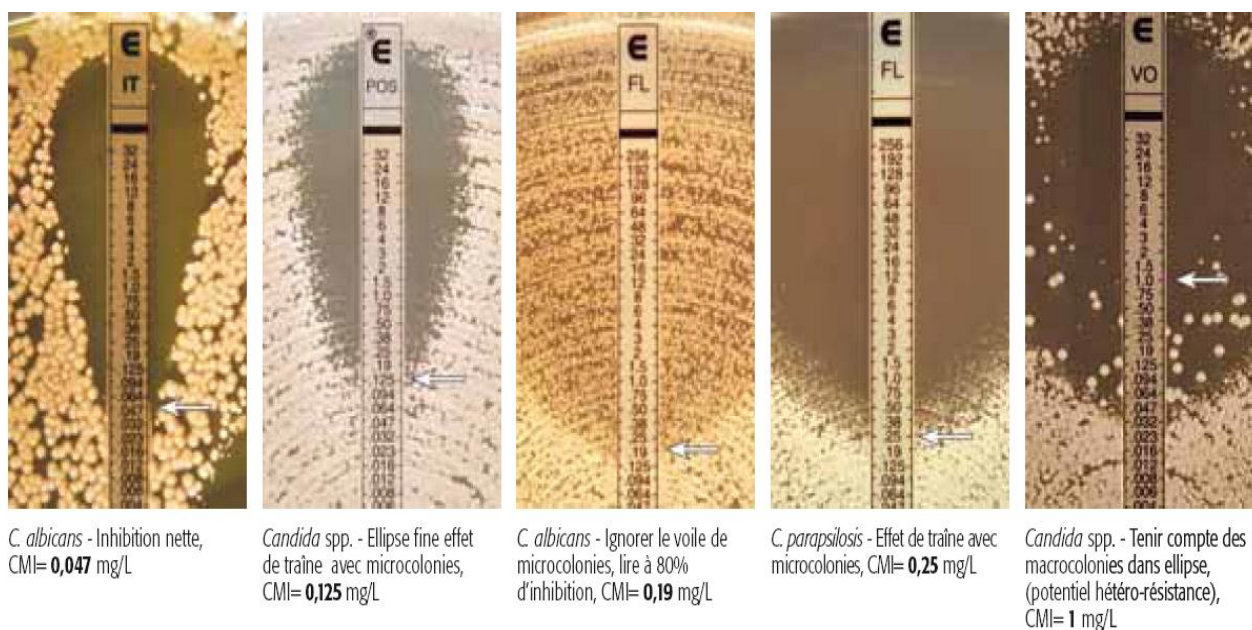
**Figure 28** : différentes étapes du mode opératoire du E-Test

**Lecture des CMI et interprétation des résultats :** La lecture de la CMI d'une souche donnée est déterminée par le point d'intersection de l'ellipse d'inhibition avec la bandelette imprégnée d'antifongique sur laquelle est portée une échelle de lecture exprimée en µg/mL permettant une interprétation immédiate.

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

**Tableau 24 :** Détermination de la sensibilité par la méthode Etest selon <sup>[56]</sup>

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



**Figure 29 :** Fiche de lecture des résultats de l'Etest pour les azolés. BioMérieux

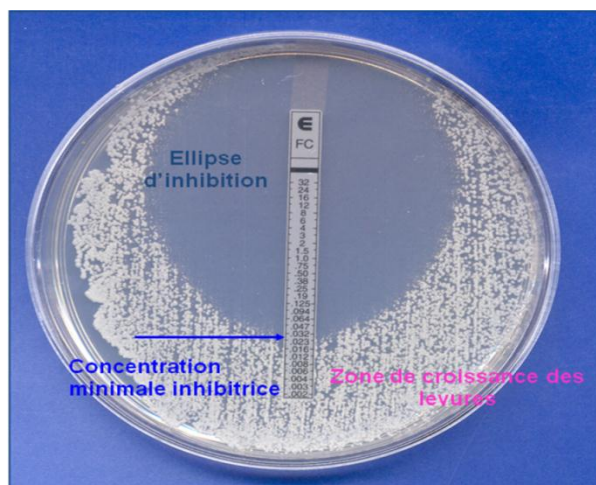


Figure 30 : Lecture des résultats de l'Etest

**Avantages :** La méthode est standardisée et des souches de contrôle qualité sont définies. Des études récentes montrent une bonne corrélation avec la microméthode du NCCLS. Une très bonne concordance ( $\geq 96\%$ ) avec la méthode de référence (NCCLS) a été obtenue pour *Candida sp* [90] et pour les filamenteux [91]. L'avantage particulier de l'E-test est celui de permettre la détection d'isolats résistants à l'amphotéricine B rencontrés notamment chez *C.lusitaniae* [92] et chez des espèces d'*Aspergillus non fumigatus* [93].

**Inconvénients :** La principale difficulté repose sur certaines difficultés de lecture, surtout pour les azolés, en raison de la présence possible de micro ou macrocolonies dans l'ellipse d'inhibition. Il s'agit d'un phénomène de traîne qui est observé chez 30 à 40% des souches de levures [37].

#### 4. La technologie Vitek®:

Les méthodes traditionnelles de test de sensibilité aux antifongiques sont lentes et requièrent beaucoup de travail. De nouvelles méthodes à l'intention des laboratoires cliniques sont maintenant disponibles [94]. Grâce à la technologie Vitek2, l'antifongigramme est automatisé, standardisé et rapide. Avec la technologie Vitek2, les résultats sont disponibles en 13 heures seulement [95].



**Figure 31 :** Système automatisé Vitek2, bioMérieux

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

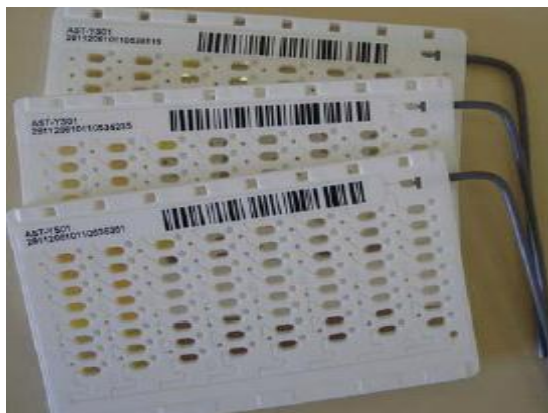
La carte Vitek comprend 64 cupules réactionnelles comprenant quatre antifongiques à quatre concentrations différentes.

La lecture s'effectue à 660 nm. L'analyse du taux de croissance est effectuée toutes les 15 minutes en cinétique. Puis, pour chaque antifongique, un algorithme spécifique convertit les valeurs brutes (RTU) en CMI calculée. Pour calculer les CMI, l'automate contrôle le remplissage des cupules, puis vérifie les valeurs brutes. Ensuite, il détermine la durée d'incubation de la carte. Dans la cupule contrôle, il évalue la vitesse de croissance du germe. La lecture s'arrêtera si la croissance dans tous les puits est suffisante. Celle-ci sera considérée comme la plus haute pouvant être mesurée pour cet antifongique. Pour finir, les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités <sup>[38]</sup>.

**Matériel :** Le Vitek2® dispose d'un système automatisé capable de traiter la majorité des tests de routine avec un rendu des résultats fiable et rapide. Il détecte des résistances même faiblement exprimées. 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. Elle comprend 64 cupules réactionnelles comprenant quatre antifongiques dont le fluconazole, le voriconazole, la flucytosine et l'amphotéricine B à quatre concentrations différentes. Les cartes sont inoculées avec les diverses suspensions avec un module de remplissage qui utilise une chambre à vide et une pompe. Cette carte miniature prête à l'emploi permet d'améliorer la productivité du laboratoire par :  
Un haut niveau d'automatisme assuré par le concept original de la carte, aucun réactif ajouté, une carte scellée pour une sécurité maximale et un code-barre pré imprimé pour une plus grande traçabilité. Elle permet aussi de réduire le temps/délai de résultat par une lecture cinétique toutes les 15 minutes et un délai moyen de résultat en 6 à 8 heures [38].



**Figure 32 :** Carte Vitek AST-YS01[bioMérieux]

**Antifongiques :** Les antifongiques disponibles pour ce test sont : le fluconazole, le voriconazole, la 5 flucytosine et l'amphotéricine B [38].

**Mode opératoire :** A partir d'une culture fraîche, une suspension d'opacité de 2 McFarland est préparée en prélevant et dissolvant quelques colonies à l'aide d'un écouvillon stérile dans environ 3 ml de NaCl 0.45%. Ensuite, le tube contenant la suspension est alors placé sur le portoir sur la station satellite. Le code barre de la carte AST-YS01® est scanné, puis la carte est introduite dans le tube. Un tube vide est ajouté à côté du tube contenant la suspension. Le Vitek2® se charge automatiquement de la

dilution à effectuer avec du NaCl 0.45%. Il homogénéise la suspension par aspiration et refoulement, puis il inocule les cartes. Pour finir, les cartes sont isolées de l'extérieur et l'analyse commence. Il n'y a ainsi pas de risque de contamination pour le personnel. BioMérieux® assure des résultats dans les 13 heures pour les *Candida* et 20 heures pour les *Cryptococcus neoformans* [38].

**Lecture des résultats et interprétation :** Dans la cupule contrôle, l'automate évalue la vitesse de croissance du germe. L'analyse du taux de croissance est effectuée toutes les 15 minutes en cinétique. La lecture s'effectue à 660 nm et s'arrêtera si la croissance dans tous les puits est suffisante. Pour calculer les CMI, l'automate contrôle le remplissage des cupules, puis vérifie les valeurs brutes. Ensuite, il détermine la durée d'incubation de la carte. Pour chaque antifongique, un algorithme spécifique convertit les valeurs brutes (RTU) en CMI calculée. Pour finir, les résultats de CMI sont interprétés en S-I-R en fonction des concentrations critiques spécifiques des différents comités [38].

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

**Etude de la sensibilité au Voriconazole de 72 souches de *Candida* isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V de Rabat.**

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 : <i>Candida albicans</i>					
Commentaires :					
Informations sur l'identification					
Germe sélectionné		Candida albicans			
Commentaire sur l'ident. :		Entré le : 5 août 2008 14:23 CEST		Par : Système	
Résultats Antibiogramme		Carte : AST 3201	N° de lot : 281103230	Péremption : 11 oct. 2009 13:00 CEST	
Terminée le : 6 août 2008 03:19 CEST		État : Final		Heure de l'analyse : 12,75 heures	
Antibiotique	CMI	Interprétation	Antibiotique	CMI	Interprétation
Fluconazole	<= 1	S	Amphotéricine B	0,5	S
Voriconazole	<= 0,12	S	Flucytosine	<= 1	S
+= Antibiotique déduit * = Modification AES ** = Modification Utilisateur					
Résultats AES :		Dernière modification : 23 juin 2008 17:29 CEST		Normes/Phénotype : ICHV	
Niveau de fiabilité :		Expertise non exécutée			

**Figure 33 :** Rapport de laboratoire et résultats de l'automate Vitek2. [ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion]

**Avantages :** L'antifongigramme automatisé présente plusieurs avantages : Sa préparation est simple et rapide. Le code barre individuel permet une reconnaissance du type de carte, une traçabilité, et un rejet d'une carte périmée par le système automatiquement. Les temps d'incubation prescrits sont plus ou moins corrects pour toutes les espèces de *Candida* ainsi que pour le *Cryptococcus neoformans*. Le contenu du kit est de 20 cartes et la date de péremption est de 14 mois, ce qui rend la méthode adaptée à la consommation en routine. De plus, grâce à l'automatisation, les résultats d'identification s'obtiennent dans la journée et contribuent ainsi à une meilleure prise en charge des patients, puisque les résultats sont rapidement disponibles. C'est une méthode standardisée et automatisée qui présente une reproductibilité excellente [38].

**Inconvénients :** L'inconvénient majeur de l'antifongogramme automatisé reste le prix élevé. On remarque aussi le manque d'itraconazole par rapport aux galeries disponibles [38].

#### **IV.1.3 Interprétation des résultats de l'antifongogramme :**

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

#### **Facteurs influençant l'interprétation de la CMI :**

► **Le milieu :** Le milieu utilisé dans les tests de détermination de CMI ne doit pas contenir de substances qui interfèrent avec les antifongiques. Par exemple, l'action de la 5-flucytosine peut être inhibée par les purines ou les pyrimidines contenues dans certains tampons (MOPS-tris : acide morpholine propane sulfonique), les stérols interfèrent avec les polyènes. La composition de l'agar varie en fonction des différents fabricants. Le RPMI 1640 tamponné pH 7,0 est le milieu de référence utilisé par le NCCLS. Le milieu synthétique HR et le milieu casitone sont des bonnes alternatives pour évaluer la CMI du fluconazole pour les levures [36].

► **Le pH :** Le pH du milieu peut influencer la croissance des levures ou modifier l'activité de l'antifongique. À pH acide, les valeurs de CMI sont augmentées pour l'amphotéricine B et les azolés, mais diminuées pour la 5-FC. Les variations de pH sont neutralisées par l'adjonction de tampon [36].

► **L'inoculum :** L'inoculum peut également influencer les résultats. La technique utilisée pour la préparation de l'inoculum ainsi que sa taille influencent la valeur de la CMI. La méthode spectrophotométrique est la plus standardisable. Il semble que la taille idéale soit d'environ 0,5 McFarland à 530 nm [36].

► **L'incubation : (durée et température)** La durée d'incubation est fonction de la vitesse de croissance de la souche. L'allongement de la durée d'incubation tend à

augmenter la valeur des CMI. Si les CMI de l'amphotéricine B sont peu modifiées entre 24 et 48 heures, les CMI des azolés le sont. Le NCCLS recommande une incubation de 48 heures pour les *Candida*. AB Biodisk recommande la détermination des CMI à 24 heures par la méthode E-test. La température d'incubation idéale est de 35°C [36].

► **Les concentrations critiques :** Les concentrations critiques n'ont été établies que pour le fluconazole et l'itraconazole vis-à-vis de *Candida sp.* à l'exclusion de *C.krusei*, essentiellement sur la base de candidoses oropharyngées chez les patients positifs au VIH avant l'avènement des trithérapies et à partir d'une centaine de cas des candidoses disséminées [37]. Ainsi des points finaux, classant les CMI du fluconazole et de l'itraconazole en sensible (S), sensibilité dose-dépendante (S-DD) et résistante (R) ont été établis. En effet, les valeurs seuils de résistance pour la CMI du fluconazole et de l'itraconazole ont été établies respectivement à 64 µg/mL et à 1µg/mL. La sensibilité à ces antifongiques est indiquée par des valeurs de CMI maximales de 8µg/mL pour le fluconazole et de 0,125µg/mL pour l'itraconazole. Entre ces deux valeurs seuils (résistance et sensibilité) les valeurs de CMI indiquent que les souches sont sensibles dose dépendantes [19].

**Tableau 25 :** Guide d'interprétation des CMI pour les tests de sensibilité *in vitro* sur *Candida* pour le fluconazole et l'itraconazole

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

S : sensible ; S-DD : sensible dose dépendant ; R : résistant.

D'autre part, concernant la 5 fluocytosine, des points finaux ont été fixés arbitrairement (S<4mg/mL, I=8-16mg/mL, R>32mg/mL) [5]. Ainsi, les CMI prédictives de succès ou d'échec thérapeutique vis-à-vis de *Candida sp* sont ≤4mg/L pour les souches sensibles, entre 8 et 16 mg/1 pour les souches dites sensibles dose dépendantes et ≥32mg/L pour les souches résistantes [96].

La détermination du point final reste donc la source majeure de variation inter-laboratoires pour les azolés et le 5-FC. La détermination de la valeur de la CMI à 80% d'inhibition de croissance pour la microméthode en milieu liquide donne la détermination

la plus reproductible et la plus concordante avec les modèles *in vivo* [36].

► **L'antifongique :** Les antifongiques sont difficiles à évaluer *in vitro*, en raison de leurs caractères physicochimiques. Certains ne sont pas solubles dans l'eau d'où la nécessité d'employer des solvants. En conséquence, il est important que les différentes dilutions soient effectuées dans des solutions adéquates évitant la précipitation du principe actif. Le NCCLS suggère que l'amphotéricine B et le kétoconazole soient dissouts dans le diméthyl sulfoxyde. Plus encore, l'amphotéricine B et les azolés ont tendance à se détériorer quand ils sont stockés sous forme diluée ou sèche dans les disques. La toxicité, la voie d'administration, les propriétés pharmacocinétiques, les interactions médicamenteuses et enfin la capacité à parvenir sur le site de l'infection sont autant de paramètres qui compliquent toute corrélation *in vitro/in vivo* dans l'analyse des propriétés d'un antifongique [36].

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

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

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

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

Une analyse critique de la littérature, montre qu'en dehors de la situation très particulière de la candidose oropharyngée du sidéen, les données *in vitro* n'ont aucune valeur prédictive de l'évolution thérapeutique *in vivo* [19,37]. En effet, la sensibilité *in vitro* n'est pas prédictive de succès thérapeutique, de même la résistance *in vitro* n'est pas prédictive d'un échec thérapeutique.

Il existe une excellente corrélation *in vitro/in vivo* pour le fluconazole et l'itraconazole chez les patients infectés par le VIH et présentant une candidose oropharyngée. Des relations ont pu être établies, surtout pour les dérivés azolés, entre les CMI et le devenir des patients atteints. Les CMI prédictives de succès ou d'échec thérapeutique vis-à-vis de

*Candida sp.* sont établies [19]. Il faut signaler, pour l'itraconazole, qu'il est également important de prendre en compte les dosages sériques chez les patients à risque : on observe en effet des variations intra-individuelles et inter-individuelles importantes des concentrations sériques du produit chez les immunodéprimés [96].

L'étude de Walmsley, est une des contributions mettant en évidence une corrélation entre tests de sensibilité *in vitro* et évolution clinique. Chez ces patients positifs au VIH ayant une candidose oropharyngée, le taux d'échec clinique est associé à 61% de souches de *Candida* résistantes ou sensibles dose dépendantes, alors que lorsque les souches causant l'infection sont sensibles ou sensibles dose dépendantes, le taux de succès atteint 86% [97].

**Tableau 26:** fluconazole dans le traitement de la candidose oropharyngée chez des patients VIH+ : corrélations *in vitro* et *in vivo*.

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

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

Il existe d'importants problèmes d'interprétation des CMI, voire une mauvaise corrélation *in vitro/in vivo* dans les autres infections fongiques pour le fluconazole et l'itraconazole. Citons à titre d'exemple que les résistances à l'amphotéricine B sont difficilement évaluables (CMI > 1mg/mL). La M27 ne permet pas de les identifier et *C.lusitaniae* montre souvent une résistance primaire. Les résultats suggérant une corrélation sont essentiellement historiques et basés sur des constructions pharmacocinétiques. Enfin, aucune donnée clinique n'est disponible pour l'amphotéricine B ni pour les candines [5].

L'étude de JH Rex et al. parue en 1995 comparant fluconazole et amphotéricine B dans le traitement des candidémies chez les patients non neutropéniques illustre bien l'absence de corrélation clinique et *in vitro* [98]. La sensibilité *in vitro* a été testée par la méthode NCCLS M27 sur 232 souches de *Candida sp.* isolées à partir d'hémoculture de patients traités soit par fluconazole (400mg/j) soit par amphotéricine B (0.5 mg/kg/j). Les CMI pour l'amphotéricine B sont très serrées (0.125 à 1µg/MI) et il n'est pas trouvé d'isolat résistant *in vitro*, ni de corrélation entre l'augmentation des CMI et l'échec du traitement. Pour le fluconazole, les CMI vont de 0.125 à plus de 64 µg/MI. Il n'a pas été trouvé là non plus de corrélation entre l'augmentation des CMI et l'échec du traitement.

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

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

► **La méthodologie** : Opérer en *in vitro* n'est certainement pas opérer en *in vivo* et une CMI n'est pas une valeur absolue comme l'est une mesure physique ou chimique. Quelque soit la méthode utilisée, elle mesure « une » CMI et non « la » CMI. En effet, les conditions expérimentales ont une influence considérable sur le résultat. En témoignent les observations faites au cours du développement de la méthode du NCCLS, pour les souches données connues comme sensibles (S) ou résistantes (R) d'après des modèles animaux, les valeurs de CMI obtenues peuvent être multipliées par un facteur de 2 à 16 selon le milieu et les conditions expérimentales déterminées <sup>[37]</sup>. L'objectif serait donc de corriger les défauts observés pour aboutir à une méthode fiable qu'on pourra considérer comme une méthode de CMI capable de donner une probabilité d'échec thérapeutique.

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

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

Par conséquent, face à une situation d'échec thérapeutique, en particulier dans les traitements impliquant le fluconazole, une analyse précise des facteurs à prendre en

compte pour documenter une éventuelle résistance doit être effectuée. Cette approche constitue le seul moyen d'établir une corrélation *in vitro/in vivo* et de progresser dans la définition des concentrations critiques <sup>[37]</sup>.

► **Les modèles animaux :** Pour palier au problème des interférences liées au patient et lorsqu'on veut corréler des résultats *in vitro* à l'évolution *in vivo*, la réalisation de modèles expérimentaux animaux constitue la solution. Néanmoins, même dans les modèles animaux des résultats sont parfois contradictoires, et ceci pourrait évidemment être un argument pour nier toute corrélation entre CMI et issue thérapeutique. Etant donné la complexité de la physiopathologie de l'invasion fongique, force est de reconnaître que les modèles animaux ne reproduisent que très imparfaitement l'infection humaine. Par ailleurs, ces modèles peuvent être éminemment complexes par les différences de pharmacodynamie et de pharmacocinétique des antifongiques chez l'animal peuvent rendre difficile l'adaptation des doses. Malgré cela, cette approche peut donner des données initiales très utiles <sup>[37]</sup>. D'après une revue portant sur 17 études impliquant des modèles expérimentaux animaux, 12 montraient une relation cohérente entre les données obtenues *in vitro* et l'efficacité thérapeutique, pour l'amphotéricine B, la flucytosine et divers dérivés azolés. Les progrès sont encourageants <sup>[19]</sup>.

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

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

Par exemple, dans le cas du fluconazole et *Candida*, il apparaît que le rapport ASC/CMI constitue le meilleur facteur prédictif d'efficacité thérapeutique <sup>[37]</sup>.

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

La difficulté d'interprétation des CMI obtenues par l'antifongigramme n'est pas le seul problème qui se heurte à son utilisation et sa pratique. L'antifongigramme est aussi difficile à standardiser. En effet, l'absence de reproductibilité des CMI entre les laboratoires (variation jusqu'à 50 000 fois) a imposé la nécessité d'obtenir des méthodes standardisées et reproductibles <sup>[5]</sup>. L'étape de standardisation de l'antifongigramme a constitué un préliminaire pour le NCCLS, dont le but initial a été d'obtenir, pour des souches de levures données, des CMI reproductibles non seulement au sein d'un même laboratoire mais aussi d'un laboratoire à l'autre.

En dépit des critiques évoquées, les efforts développés par le NCCLS depuis 1985 restent considérables pour réduire la complexité de cette standardisation. Ces travaux ont consisté à examiner le rôle de l'ensemble des variables susceptibles d'intervenir dans la reproductibilité des résultats, notamment pour les antifongiques azolés qui sont particulièrement influencés par les conditions environnementales : densité de l'inoculum, temps et température d'incubation, composition du milieu, « endpoints ». Cette stratégie a abouti à la publication de documents définissant les conditions opératoires pour les levures (M27-A juin 1997) et qui servent aujourd'hui de référence <sup>[37]</sup>. Cette méthode standard est toutefois lourde, et de nouvelles approches ont été proposées :

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

Effectivement, comme la méthode M27-A ne fait pas clairement la différence entre les levures qui sont sensibles et celles qui sont potentiellement résistantes à l'amphotéricine B, le remplacement du bouillon RPMI-1640 standard par le milieu antibiotique 3 a été suggéré pour la détermination de la CMI de l'amphotéricine B <sup>[99]</sup>.

Pour le NCCLS l'objectif n'était pas de proposer une méthode destinée à être utilisée en pratique courante au laboratoire. Mais le but princeps était, outre l'obtention de résultats reproductibles et la définition de souches contrôles, de constituer une référence pour

l'évaluation des autres méthodes existantes. La macrométhode initiale devant ensuite évoluer vers une trousse de routine avec un format en microdilution plus pratique [37]. Par ailleurs, divers problèmes ont surgi tels que le phénomène de traîne. Des problèmes qui devraient être corrigés et faire l'objet de nouvelles recommandation du NCCLS.

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

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

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

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

Selon les recommandations de la société américaine de microbiologie, en pratique, avec une variabilité de  $\pm 1$  log de dilution, un index FIC  $\leq 0,5$  correspond à une synergie, un index FIC  $> 0,5$  et  $\leq 4$  à une additivité ou indifférence et un index FIC  $> 4$  à un antagonisme [100].

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

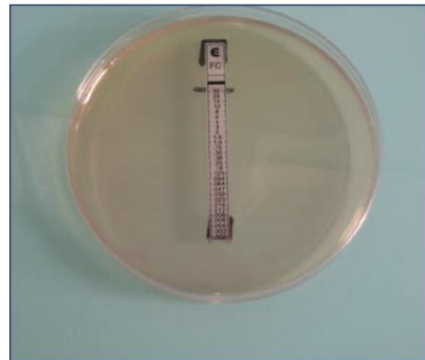
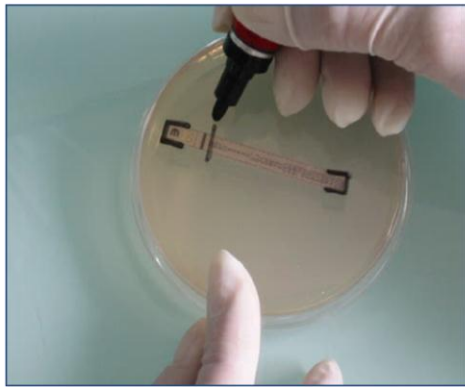
**Association**

**Dépôt de la bandelette du premier antifongique:**



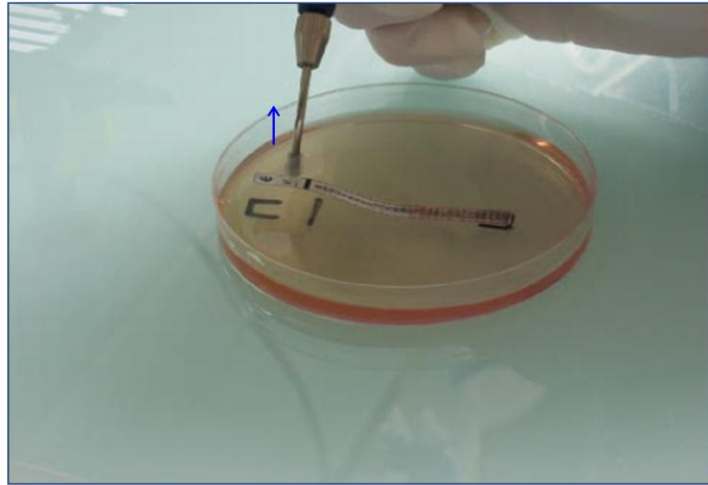
**Appliquer la technique classique du Etest®  
Transfert du gradient d'antifongique dans la gélose (60 min.,  
température ambiante)**

**Préparation et repérage:**

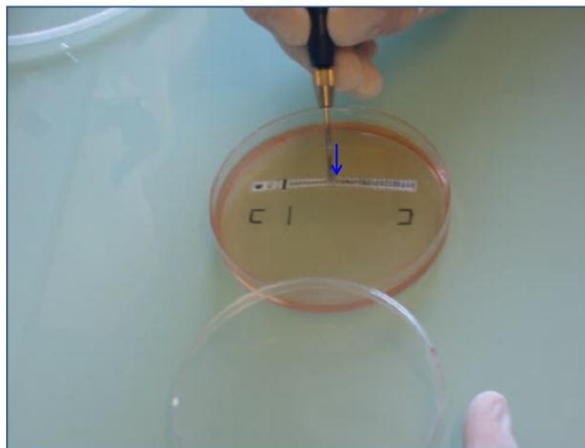


**Repérer PRÉCISÉMENT sur l'envers de la boîte la position de la  
première bandelette**

**Retirer la première bandelette :**



**Dépôt de la bandelette du deuxième antifongique**



Déposer la deuxième bandelette en superposant les gradients maximum

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

Incuber 24-48h à 35°C



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

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

Ainsi les microbiologistes du Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) ont souhaité engager une réflexion sur ce thème et réaliser une évaluation de la pratique de l'antifongigramme au sein du groupe <sup>[101]</sup>. Plusieurs études ont été menées par ce centre visant à faciliter de choix d'une méthode de routine fiable d'antifongigramme, face à une demande de plus en plus fréquente des cliniciens (notamment les réanimateurs) en ce qui concerne l'identification rapide de la souche isolée et de sa sensibilité vis-à-vis des principaux antifongiques utilisés.

Le ColBVH est un réseau de 213 biologistes, répartis dans 193 hôpitaux non universitaires couvrant géographiquement l'ensemble du territoire français. Une enquête rétrospective au moyen d'un questionnaire, portant sur l'année 2002, a été proposée aux membres du réseau

afin d'évaluer l'activité de mycologie au sein de la microbiologie, la quantité d'antifongogrammes réalisés, leurs indications, les méthodes utilisées, les molécules testées, l'interprétation des résultats, les difficultés et les attentes des microbiologistes concernant cette partie de leur activité.

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

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

Parmi les 88 % de répondants qui pratiquent ou transmettent au moins un antifongogramme par an, les espèces testées appartiennent essentiellement au genre *Candida*. L'antifongogramme est effectué en fonction de divers critères biologiques ou cliniques variés, souvent à la demande du clinicien.

Concernant les indications de l'antifongogramme, hormis les sept laboratoires qui, quelle que soit l'indication potentielle, ne font ni ne transmettent aucun antifongogramme au moment de l'enquête, la décision de réaliser l'antifongogramme est globalement fondée sur un ensemble de critères intégrant à la fois l'espèce de *Candida* impliquée, la nature du prélèvement, des critères microbiologiques et le contexte clinique (76% des cas), mais

aussi la demande du clinicien (23% des cas). Aucun laboratoire ne réalise systématiquement l'antifongigramme.

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

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

Les méthodes les plus utilisées sont Fungus® bioMérieux (56%) et le 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, sensible dose dépendant, résistant dans 98% des cas. Un contrôle de qualité est utilisé, à intervalles réguliers, par 3% des laboratoires. Seules les souches issues d'hémocultures sont conservées par la majorité des centres.

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

- Un choix fréquemment inapproprié des antifongiques testés, puisque la plupart des systèmes commercialisés ne permettent pas de tester l'ensemble des antifongiques d'action systémique.
- La nécessité fréquente d'associer au moins deux techniques afin de pallier l'absence de certaines molécules dans les galeries commercialisées.
- Une catégorisation clinique de type sensible, sensible dose dépendant, résistant, quasi-systématique, fondée sur les recommandations du fournisseur, et ce même en l'absence de seuils de sensibilité définis et valides pour un certain nombre de couples champignon/antifongique et de situations cliniques <sup>[32,33,102]</sup>.

Concernant les attitudes des cliniciens face à l'antifongigramme, plus de 80% des participants ressentent un sentiment d'incompétence totale ou partielle, que ce soit en ce

qui concerne les indications, le choix de la méthode d'antifongogramme, le choix des antifongiques à tester, la réalisation technique, la lecture, ou l'interprétation de l'antifongogramme. Enfin, 95% pour cent des répondants sont fortement demandeurs de recommandations consensuelles concernant les indications, la réalisation et l'interprétation de l'antifongogramme.

De cette enquête, on sent clairement une incompétence vis-à-vis de la pratique de l'antifongogramme, ce qui limite sans doute son utilisation dans les hôpitaux. De plus, une connaissance insuffisante des méthodes disponibles et de leur validité est mise en évidence. La diffusion de recommandations simples, plébiscitées par les biologistes serait sans doute le moyen à travers lequel ils pourront choisir la technique appropriée pour l'évaluation *in vitro* de la sensibilité aux antifongiques. Des évolutions techniques et un certain nombre de recommandations sont disponibles depuis la période de cette enquête, mais l'antifongogramme est un sujet qui retient toujours l'intérêt des biologistes et des cliniciens. Dans une autre étude épidémiologique multicentrique française conduite par le même collègue (colBVH), en octobre 2004, le but était de faciliter le choix pour les biologistes d'une méthode de routine d'antifongogramme pour les *Candida sp* <sup>[103]</sup>. La susceptibilité *in vitro* à l'amphotéricine B, à la 5-fluocytosine, au fluconazole, à l'itraconazole, au voriconazole et à la caspofungine a été déterminée sur 46 isolats de *Candida sp*. Les souches isolées comportaient 23 *C.albicans*, 12 *C.glabrata*, 5 *C.tropicalis*, 3 *C.parapsilosis*, un *C.krusei*, un *C.kefyr* et un *C.guilliermondii*. Les CMI ont été mesurées par la méthode M27, EUCAST, et deux méthodes commerciales : le Etest et ATB fungus<sup>2</sup>. Pour savoir si les quatre méthodes ont donné une distribution de CM semblables, le test de Friedman et le test des signes ont été employés. Les résultats de l'étude montrent qu'ils peuvent être considérés comme équivalents pour tester la sensibilité de *C.glabrata* vis-à-vis de l'amphotéricine B, de *C.albicans* vis-à-vis du fluconazole, de *C.parapsilosis* ou *C.tropicalis* vis-à-vis du voriconazole ou le fluconazole. Dans d'autres cas complexes, seulement trois méthodes ont donné une distribution équivalente des CMI. Elles concernent *C.albicans* et l'amphotéricine B (CLSI/EUCAST/ATB FUNGUS2), *C.parapsilosis* et amphotéricine B (CLSI EUCAST/E TEST), *C.albicans* et 5-flucytosine (CLSI/ ETEST/ ATB FUNGUS2).

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

Dans une autre étude menée par le ColBVH dans 95 hôpitaux en 2005 <sup>[104]</sup>, le but était de savoir quelles étaient les techniques utilisées par les laboratoires de biologie hospitalière et quels étaient les conclusions émanant de l'évaluation des résultats obtenus.

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

Quant aux méthodes utilisées par les laboratoires pour l'étude de la sensibilité aux antifongiques, 46% des laboratoires ont utilisé l'ATB FUNGUS bioMérieux®, 25% le FUNGITEST bioRad®, 16% le Etest, et 6% les disques Euro bio®. La comparaison entre les CMI obtenues par rapport aux CMI des deux souches de référence (*C.krusei* ATCC 6258 et *C.parapsilosis* ATCC 22019) déterminées par la microméthode du NCCLS a souligné une grande variabilité des CMI observée.

Aux termes de ces études, une nécessité de recommandations consensuelles sur le choix des techniques considérées comme valides en routine ainsi que sur leur interprétation est revendiquée.

## **IV.2 Voriconazole**

### **IV.2.1 Chimie :**

- **Structure :** Le voriconazole ou (2R,3S)-2-(2,4-difluorophényle)-3-(5-fluoro-4-pyrimidinyle)-1-(1H-1,2,4-triazole-1-yl)-2-butanol, de poids moléculaire de 349,3 <sup>[105]</sup> fait partie de la classe des triazolés, caractérisés par la présence de trois atomes d'azote dans leur cycle azoté pentagonal <sup>[106]</sup>. Ce dérivé fluoropyrimidine du fluconazole a été sélectionné parmi 2.000 autres dérivés <sup>[107]</sup>.

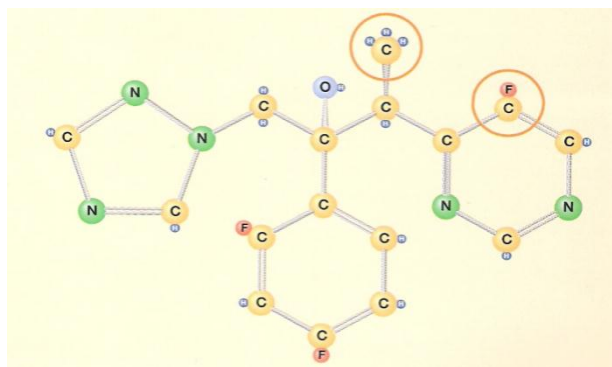


Figure 34 : Formule chimique du voriconazole

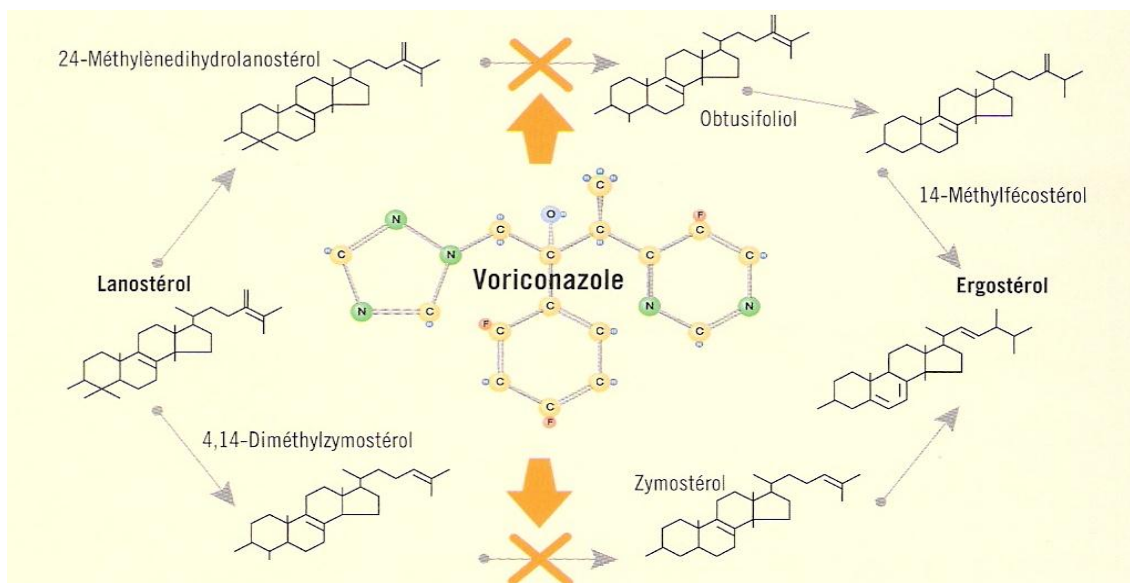
- **Relation structure/activité** : La formule originale du voriconazole dérive du fluconazole par addition d'un groupe méthyle en  $\alpha$  sur le squelette propyle et substitution d'un cycle triazolé par une 4-fluoropyrimidine. Ce qui se traduit par une amélioration du pouvoir antifongique [105] :

- ❗ L'addition du groupe méthyle augmente l'affinité pour la C14déméthylase, l'enzyme cible des azolés, d'*A.fimigatus* et fait passer sa  $CI_{50}$  de 4,8  $\mu M$  à 0,48  $\mu M$ .
- ❗ La substitution du triazole par un noyau pyrimidine amplifie encore la puissance d'activité, et la fluorination en 5 améliore l'efficacité *in vivo*.
- ❗ L'énantiomère 2R, 3S, retenu parce que le plus actif, avec cette double modification de la structure du fluconazole permet d'obtenir une  $CI_{50}$  de 0,053  $\mu M$ .

#### IV.2.2 Activités pharmacologiques :

- **Mode d'action** : Bien que le rôle exact de l'ergostérol dans la membrane cytoplasmique des champignons ne soit pas parfaitement connu, on lui attribue la même fonction que le cholestérol dans la membrane des eucaryotes supérieurs, c'est-à-dire un rôle de maintien de la fluidité membranaire. Certaines études biochimiques ont suggéré que l'ergostérol pourrait avoir un rôle comparable à celui d'une hormone, et qu'il ne serait pas substituable par un autre stérol. La déplétion en ergostérol se traduit alors par une augmentation de la perméabilité membranaire et une inhibition de la croissance cellulaire et de la reproduction. C'est de cette notion que découle le mécanisme d'action des azolés. Effectivement le voriconazole (comme autre azolé) agit en inhibant la C14-déméthylase codée par le gène *ERG11* qui effectue la transformation du lanostérol en ergostérol, principal stérol membranaire. Cette inhibition se fait par la liaison de l'atome d'azote libre du cycle triazolé à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme. On observe donc une accumulation des précurseurs dans

la chaîne de synthèse : Lanostérol et divers 14-méthylstérols dont la métabolisation par les enzymes situées en aval d'*ERG11p* dans la voie de biosynthèse produit des dérivés toxiques, incapables de remplacer l'ergostérol <sup>[108]</sup>. Il s'en suit une altération de la membrane dont la fonction devient perturbée <sup>[107]</sup>. Le voriconazole présente un autre mécanisme, il agit aussi par inhibition de la déméthylation du 24 méthylène dihydrolanostérol <sup>[109]</sup>. Ce deuxième mode d'action serait à l'origine de son activité sur les souches résistantes au fluconazole <sup>[110]</sup>.



**Figure 35 :** Biosynthèse de l'ergostérol et mode d'action du voriconazole

- **Activité fongicide :** Les modifications structurales introduites dans le fluconazole pour élaborer le voriconazole engendrent une affinité beaucoup plus élevée pour la C14 $\alpha$ -déméthylase d'*A.fumigatus*. Alors que les azolés sont considérés comme fongistatiques, le voriconazole présente une activité fongicide en particulier vis-à-vis de nombreuses espèces d'*Aspergillus*. Plusieurs hypothèses peuvent être considérées pour expliquer l'activité fongistatique du voriconazole sur les levures et le pouvoir fongicide sur *Aspergillus*. Le voriconazole inhibe cent fois plus la C 14-déméthylase d'*A.fumigatus* que celle de *C.albicans* (CI<sub>50</sub> respectives de 0,053 et 4,3  $\mu$ M). La déplétion en ergostérol, moins marqué chez *Candida*, lui permettrait de survivre, tandis que la carence quasi complète chez l'*Aspergillus* entraînerait la mort cellulaire. Les précurseurs méthylés qui s'accumulent seraient plus toxiques pour *A.fumagitus* que pour *C.albicans*. Enfin, l'existence d'un métabolisme facultatif

anaérobie pour *C.albicans*, inexistant chez *A.fumigatus*, lui permettrait de survivre à l'altération de la fonction mitochondriale [107].

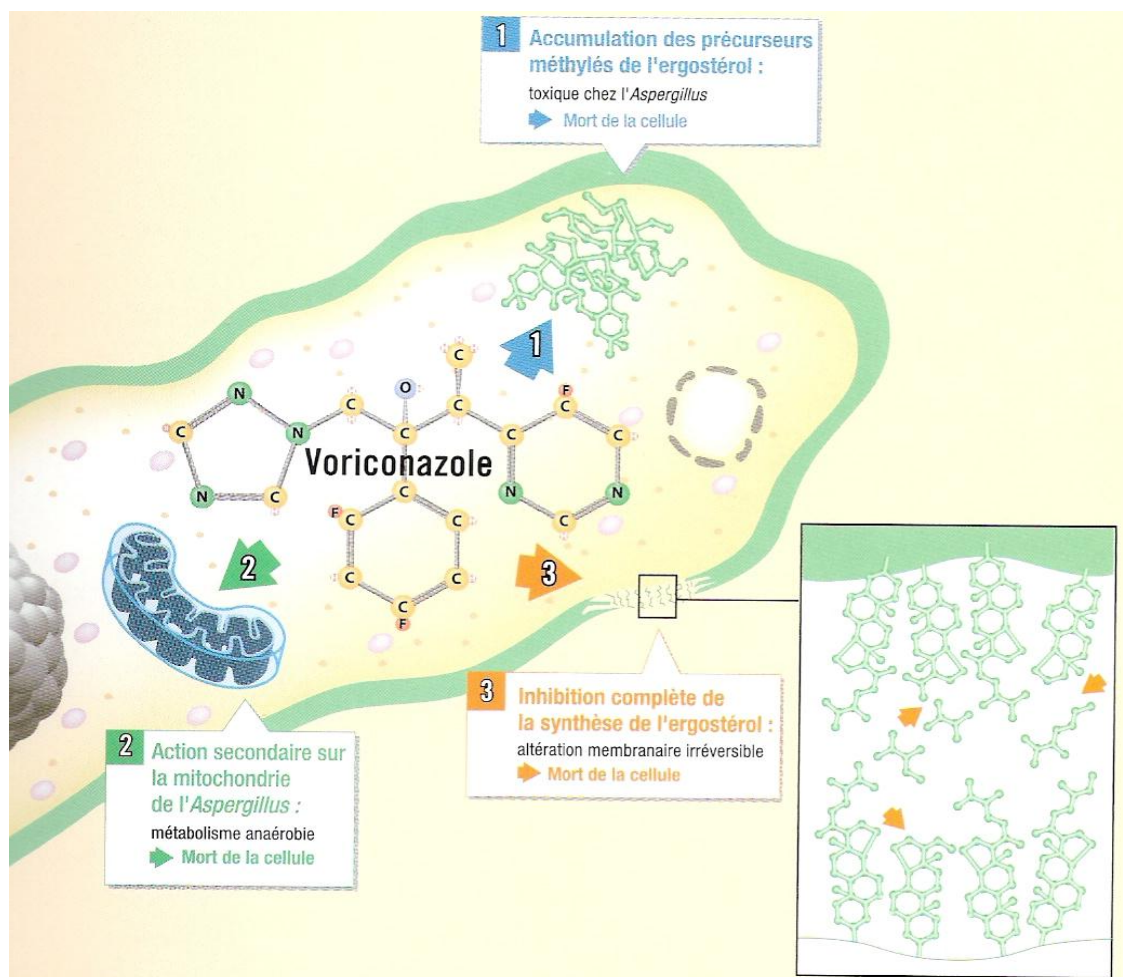


Figure 36 : Activité fongicide du voriconazole contre *Aspergillus*

- **Spectre d'action** : Le spectre d'action est large : tous les *Candida* sont sensibles, y compris les souches ayant acquis une résistance au fluconazole ou intrinsèquement partiellement résistantes comme *C.glabrata* ou totalement résistantes comme *C.krusei*. *C.dubliniensis* et *C.lusitanice* sont sensibles. Parmi les autres levures ou champignons levuriformes, *Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon asahii* et *Saccharomyces cerevisia* sont sensibles. *In vitro*, l'action sur les levures est de type fongistatique [112,113].

Parmi les champignons filamenteux, tous les *Aspergillus* sont sensibles dont *A.terreus* parfois résistant à l'amphotéricine B. Le type d'action est plutôt fongicide. *Pseudallescheria boydii* (forme sexuée de *Scedosporium apiospermum*) est sensible, l'espèce *Scedosporium prolificans*

est plus résistante. D'autres espèces de champignons peuvent être sensibles : *Fusarium sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Alternaria sp.*, *Bipolaris sp* [14].

Les zygomycètes responsables de mucormycoses sont résistants [114,115]. Parmi les agents dimorphiques responsables des mycoses endémiques, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis* et *Coccidioides immitis* sont sensibles, la molécule est moins active sur *Sporothrix schenckii* [105].

#### **IV.2.3 Posologies et administration :**

**- Formes galéniques et composition :** Le voriconazole se présente :

- Sous forme de comprimés pelliculés ronds de couleur blanche dosés à 50 mg et de comprimés allongés de couleur blanche dosés à 200 mg. Les comprimés sont présentés sous plaquettes thermoformées en PVC/alu en boîtes de 14, 28, et 56.
- Sous forme de solution pour perfusion présentée dans des ampoules de 200 mg sous emballage individuel. La solution finale de perfusion de voriconazole est de 2 à 5 mg/mL. Chaque boîte contient un flacon à usage unique en verre transparent de type 1 de 30 mL, fermé d'un bouchon en caoutchouc et d'un capuchon en aluminium scellé d'une bande plastique.

Concernant la forme 'comprimé' on retrouve les excipients suivants : lactose monohydraté, amidon prégélatinisé, croscarmellose de sodium, povidone, stéarate de magnésium.

Pour la réalisation du pelliculage ont été utilisées les substances suivantes : hypromellose, dioxyde de titane (E171), lactose monohydraté, triacétate de glycérol.

Quant à la poudre pour solution pour perfusion, le voriconazole est solubilisé grâce à une cyclodextrine : le sulfobutyl éther bêta-cyclodextrine de sodium (SBECD) [116].

**- Posologie :**

➤ **Adulte :**

Par voie intraveineuse, la dose de charge du voriconazole est de 2 x 6 mg/kg le premier jour, suivie par une dose d'entretien de 2 x 4 mg/kg. Par voie orale, pour le patient de plus de 40 kg, la dose de charge est de 2 x 400 mg le premier jour suivie par une dose d'entretien de 2 x 200 mg/j, tandis que pour le patient de moins de 40 kg, la dose de charge et de maintien sont réduites de moitié [116].

Chez l'adulte, en utilisant la voie intraveineuse, l'état d'équilibre est obtenu en 5 à 6 jours. Pour obtenir l'état d'équilibre en 24 h, la posologie recommandée pour la voie intraveineuse chez l'adulte et l'enfant est de 6 mg/kg/12h le premier jour suivie de 4 mg/kg/12h les jours suivants. La durée de perfusion est de 1 à 2 heures. Avec une posologie de 3 à 6 mg/kg/j les taux sériques sont de 3 à 6µg/ml <sup>[117,118]</sup>.

➤ ***Enfant :***

L'efficacité et l'innocuité du voriconazole chez les sujets de moins de 12 ans n'ont pas été établies. La monographie mentionne qu'un total de 22 patients âgés de 12 à 18 ans souffrant d'aspergillose invasive ont été étudiés (traités avec une dose de maintien de 4 mg/kg q12h) <sup>[116]</sup>. Le Pediatric Dosage Handbook <sup>[119]</sup> recommande une dose pédiatrique intraveineuse semblable à la dose adulte. Pour la dose orale également les doses pédiatriques sont semblables aux doses adultes. Cependant, dû à l'information limitée sur l'utilisation de voriconazole oral en pédiatrie, on mentionne que certains centres ont utilisé une dose de maintien de 3-5 mg/kg/dose chez les patients < 25 kg.

#### **IV.2.4 Pharmacodynamie :**

L'activité *in vitro* du voriconazole a fait le sujet de plusieurs études.

**1- Résultats de l'activité du voriconazole sur 6099 souches de champignons isolées de patients (synthèse de la littérature) :** Une exploration méticuleuse des entrées dans la base de données Medline de la National Library of Medicine a révélé 36 publications contenant des données originales sur l'activité fongistatique et fongicide du voriconazole et des composés de référence. Cette synthèse résume les données fongistatiques obtenues conformément aux directives du NCCLS pour les essais de sensibilité des levures et moisissures aux antifongiques <sup>[32,99]</sup>.

La sensibilité au voriconazole a été testée en 1997 et 1998 selon les standards du NCCLS sur 6099 isolats fongiques, dont 4416 étaient des levures et levuriformes et 1683 des moisissures, avec 3664 *Candida spp.*, 673 *C.neoformans*, 79 souches de champignons levuriformes, 479 *Aspergillus spp.*, 107 *Fusarium spp.*, 521 dimorphiques, 39 zyomycètes et 529 souches de champignons dématiés <sup>[120]</sup>.

**Tableau 27 :** Résumé par groupe des activités antifongiques *in vitro* du voriconazole et des composées de référence

champignons	Nbr d'isolats	Antifongiques	CMI <sub>90</sub> (µg/mL) <sup>g</sup>	CMF (µg/mL)
<i>Candida spp.</i>	3 664	Voriconazole	<0,03 – >16	NR
		Fluconazole	0,5 – >128	NR
		Amphotéricine B	0,12 – 2	NR
		Itraconazole	0,12 – >8	NR
		Kétoconazole	≤0,12 – 4	NR
		flucytosine	≤0,12 – 4	NR
<i>Cryptococcus neoformans</i>	673	Voriconazole	0,06 – 0,25	NR
		Fluconazole	8 – 16	NR
		Amphotéricine B	1	NR
		Itraconazole	0,5 – 1	NR
		Kétoconazole	0,25	NR
		flucytosine	8	NR
<i>Levuriformes</i>	79	Voriconazole	<0,03 – 4 <sup>g</sup>	NR
		Fluconazole	2 – 64 <sup>g</sup>	NR
		Amphotéricine B	0,5 – 2 <sup>g</sup>	NR
		Itraconazole	0,25 – 8 <sup>g</sup>	NR
		Kétoconazole	NR	NR
		flucytosine	NR	NR
<i>Aspergillus spp.</i>	479	Voriconazole	0,25 – 8	0,5 – 32
		Amphotéricine B	0,5 – 4	0,12 – 16
		Itraconazole	0,25 – 2	0,12 – 32
<i>Fusarium</i>	107	Voriconazole	2(10,5) <sup>g</sup>	2 – 16
		Amphotéricine B	1 (7,13) <sup>g</sup>	0,15 – 8
		Itraconazole	0,5 – 16 <sup>g</sup>	
		Flucytosine	>80 <sup>g</sup>	NR
<i>Champignons dimorphiques</i>	521	Voriconazole	0,25 – >16	<0,03 – 32
		Amphotéricine B	0,5 – 4	<0,03 – 4
		Itraconazole	0,06 – 4	<0,03 – 16
		Flucytosine	NR	
<i>Zygomycètes</i>	39	Voriconazole	16	8 – 16
		Amphotéricine B	0,25	0,12 – 2
		Itraconazole	0,5 – 2	0,5 - >16
<i>Dematiacées</i>	529	Voriconazole	0,05 – 7,4 <sup>g</sup>	<0,03 – 16
		Amphotéricine B	0,01 – 8,6 <sup>g</sup>	0,25 – >16
		Itraconazole	0,03 – 14,87 <sup>g</sup>	0,06 – >16

<sup>g</sup> : moyenne géométrique. NR : non rapporté.

Les résultats de cette exploration sont représentés ci-dessous selon l'activité fongistatique ou fongicide du voriconazole contre les différents isolats.

❗ **Activité fongistatique :**

▶ Contre les levures et les levuriformes :

La voriconazole présente *in vitro*, contre la plupart des levures et levuriformes, une activité fongistatique égale ou supérieure à celle du fluconazole, de l'amphotéricine B et de l'itraconazole [113, 121-124] avec une moyenne des CMI < 2 µg/mL en rencontrant peu de résistance. Le voriconazole a présenté une excellente activité fongistatique *in vitro* contre *C.neoformans* [113, 121, 125-127].

▶ Contre les moniliacées :

Les isolats de la famille des moniliacées comprennent les espèces pathogènes cliniquement importantes *Aspergillus sp* et *Fusarium sp*. Pour quatre des six espèces d'*Aspergillus* évaluées, les CMI du voriconazole (< 0,03 à 2 µg/mL) étaient inférieures à celle de l'amphotéricine B et comparables à celles de l'itraconazole [113, 115, 128-133]. Une résistance croisée avec *Aspergillus ustus* a été observée [134]. Les CMI du voriconazole pour les deux seuls isolats d'*A.fumigatus* bien attestés comme résistants à l'itraconazole étaient < 2µg/mL. Il n'a pas été observé de résistance croisée avec cette espèce [133]. L'activité fongistatique du voriconazole contre *Fusarium sp* était inconstante. Bien que la plupart des études [133, 132, 130, 135] aient montré des CMI variant de 0,25 à 8 µg/mL contre *F.oxysporum* et *F.solani*, une étude a fait état de CMI variant de 4 à 16 µg/mL pour ces deux espèces [113]. Pour *Fusarium sp*, l'activité fongistatique du voriconazole n'était pas supérieure à celle de l'amphotéricine B. Le voriconazole pourrait toutefois avoir un rôle important dans le traitement des infections à *Fusarium* [131].

▶ Contre les champignons dimorphiques :

Le voriconazole a montré une excellente activité fongistatique contre la plupart des espèces de champignons dimorphiques testées avec une CMI<sub>90</sub> < 1,0 µg/mL. Les données *in vitro* suggèrent toutefois que le voriconazole a peu d'activité fongistatique contre *Sporothrix schenckii* avec une CMI<sub>90</sub> ≥ 8µg/mL [113, 132, 136, 137].

▶ Contre les zygomycètes :

Bien que l'activité *in vitro* du voriconazole et des composés de référence contre les espèces de la classe des zygomycètes n'ait été évaluée que sur un petit nombre d'isolats, seule

l'amphotéricine B avait une bonne activité fongistatique contre les représentants de ce groupe [113, 115, 132, 135]. Les CMI variaient de 2 à  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  pour le voriconazole et de 0,06 à 8  $\mu\text{g/mL}$  pour l'amphotéricine B. Pour l'itraconazole, l'activité apparaît plus dépendante de l'espèce [132, 134].

► Contre les dématiacées :

Le voriconazole a fait preuve d'une excellente activité *in vitro* contre la plupart des 50 espèces de dématiacées testées avec une CMI  $< 0,03$  à 1  $\mu\text{g/mL}$  [113, 115, 132, 134, 138, 139].

❗ **Activité fongicide :**

► Contre les moniliacées :

Sept études ont montré les activités fongicides du voriconazole contre les moisissures de la famille les moniliacées à celle de l'itraconazole et de l'amphotéricine B [115, 130-132, 134, 136, 140].

L'activité fongicide du voriconazole, de l'itraconazole et de l'amphotéricine B contre *A.flavus* et *A.fumigatus* était variable [141, 130, 132]. Les concentrations minimales fongicides des trois composés variaient de 0,12 à  $> 8$   $\mu\text{g/mL}$ . Pour *Aspergillus terreus*, les CMF du voriconazole et de l'amphotéricine B variaient de 1 à 16  $\mu\text{g/mL}$  [115, 131].

Une étude a exploré les activités fongicides des trois composés par des cinétiques fongicides pour 18 isolats d'*Aspergillus* sp et un isolat de chacune de huit espèces de *Candida*. Il s'agit de courbes de décroissance de la population fongique en fonction du temps, sous l'effet du traitement. Les investigateurs ont en conclu que bien l'amphotéricine B, le voriconazole et l'itraconazole aient une activité fongicide contre *A.fumigatus* et d'autres espèces d'*Aspergillus*, le voriconazole et l'itraconazole n'avaient qu'une activité fongistatique contre *C.albicans* et les *Candida non albicans* évaluées [142].

► Contre zygomycètes et *Fusarium* :

L'activité fongicide de l'amphotéricine B contre *Absidia corymbifera*, *Rhizopus arrhizus*, *Fusarium solani* et *F.oxysporum* étaient bonne, mais le voriconazole a montré une faible activité fongicide contre ces espèces [115, 132, 136]. L'activité fongicide de l'amphotéricine B étaient supérieure à celle de l'itraconazole contre les espèces de zygomycètes et de *Fusarium* évaluées.

► Contre les champignons dimorphiques :

Contrairement à sa faible activité fongicide contre les champignons dimorphiques, le voriconazole a montré une bonne activité fongistatique contre toutes les espèces de champignons dimorphiques à l'exception de *S.schenckii* [120].

► Contre les dématiacées :

L'activité fongicide du voriconazole contre les dématiacées était variable selon l'espèce et la souche testée [107].

**2- Résultats concernant les levures :** Une première étude effectuée à l'Institut Jules Bordet, en collaboration avec la section mycologique de l'Institut de Santé Publique, avait pour but de tester la sensibilité *in vitro* de 60 souches de *Candida*, dont 20 isolats de candidémie par la méthode de microdilution selon les recommandations NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Les valeurs de CMI<sub>90</sub> étaient de 0,03 µg/mL pour *C.albicans*, 1 µg/mL pour *C.glabrata* et 0,25 µg/mL pour différents type de *Candida* incluant *C calliculosa*, *C.krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* et *C.guilliermondii*. A noter que pour 2 souches hautement résistantes au fluconazole avec des CMI<sub>90</sub> > 64 µg/mL, le voriconazole a gardé une bonne activité, avec des CMI<sub>90</sub> de 0,5 µg/mL pour *C.glabrata* et 0,06 µg/mL pour *C.krusei* [107].

**Tableau 28 :** Activité *in vitro* du voriconazole et de l'itraconazole. 40 souches de *Candida* provenant de sites colonisés et 20 souches de candidémies chez les patients cancéreux.

	Nombre de souches		
	<i>Candida albicans</i> (26)	<i>Candida glabrata</i> (17)	<i>Candida species</i> (17)*
Itraconazole			
CMI <sub>50</sub> (1)	0,03	1,00	0,25
CMI <sub>90</sub>	0,06	2,00	1,00
Voriconazole			
CMI <sub>50</sub>	0,03	0,50	0,06
CMI <sub>90</sub>	0,03	1,00	0,25

CMI exprimées en µg/mL.  
 \**Candida species* : *C. colliculosa* (2), *C. krusei* (1), *C. parapsilosis* (4), *C. tropicalis* (1), *C. guilliermondii* (3), *C. melibiosica* (1), *Dekkera bruxellensis* (1), *Rhodotorula mucilaginosa* (1), *Saccharomyces cerevisiae* (3).  
 (1) CMI : concentration minimale inhibitrice (µg/mL).

Dans deux autres études, l'activité du voriconazole a été comparée à d'autres antifongiques sur de nombreuses souches de *Candida spp.* et *C.neoformans* provenant de prélèvements biologiques divers [113] ou de prélèvements sanguins de patients neutropéniques [122] selon les standards du NCCLS. Le voriconazole présente une excellente activité sur la plupart des *Candida spp.* impliquées en clinique humaine ainsi que sur *C.neoformans*. Aucune résistance au fluconazole n'a été mise en évidence parmi les 757 souches testées par Hoban et al. tandis qu'elle a été recherchée parmi les souches testées par Espinel-Ingroff : les CMI<sub>90</sub> obtenues avec le voriconazole sont en général plus basses que celles obtenues avec le fluconazole, en particulier chez *C.krusei* et *C.glabrata*. Le voriconazole testé *in vitro* et comparé à d'autres antifongiques est l'antifongique le plus efficace [121], la même observation est faite pour d'autres espèces de levures émergentes (60 souches) par Espinel-Ingroff.

**Tableau 29** : Sensibilité à six antifongiques de différentes souches de levures isolées chez des patients

Agent causal	Antifongique testé	Hoban 1999		Espinel – Ingroff 1998	
		Nombre	CMI <sub>90</sub> µg/mL	Nombre	CMI <sub>90</sub> µg/mL
<i>C.albicans</i>	<b>Voriconazole</b>	513	<b>0,0625</b>	32	<b>0,5</b>
	Itraconazole		0,125		0,5
	Kétoconazole		0,125		-
	Fluconazole		0,5		32
	5FC		1		-
	Amphotéricine B		1		2
<i>C.glabrata</i>	<b>Voriconazole</b>	56	<b>2</b>	14	<b>4</b>
	Itraconazole		4		2
	Kétoconazole		2		-
	Fluconazole		16		64
	5FC		4		-
	Amphotéricine B		1		2
<i>C.parapsilosis</i>	<b>Voriconazole</b>	78	<b>0,125</b>	18	<b>0,25</b>
	Itraconazole		0,5		0,25
	Kétoconazole		0,5		-
	Fluconazole		1		2
	5FC		0,25		-
	Amphotéricine B		1		1
<i>C.krusei</i>	<b>Voriconazole</b>		-	12	<b>0,5</b>
	Itraconazole	-	-		1
	Kétoconazole		-		-
	Fluconazole		-		16
	5FC		-		-
	Amphotéricine B	-	-		1
<i>C.lusitaniae</i>	<b>Voriconazole</b>		-	17	<b>0,06</b>
	Itraconazole	-	-		2
	Kétoconazole		-		-

<i>C.tropicalis</i>	Fluconazole	-	-	2
	5FC	-	-	-
	Amphotéricine B	-	-	2
	<b>Voriconazole</b>	62	<b>0,25</b>	16
	Itraconazole	-	0,5	0,5
	Kétoconazole	-	0,5	-
<i>C.neoformans</i>	Fluconazole	-	2	32
	5FC	-	1	-
	Amphotéricine B	-	1	1
	<b>Voriconazole</b>	38	<b>0,25</b>	12
	Itraconazole	-	0,5	1
	Kétoconazole	-	0,25	-
	Fluconazole	-	8	16
5FC	-	8	-	
Amphotéricine B	-	1	1	

**3- Résultats concernant les filamenteux :** Une puissante activité antifongique du voriconazole exprimée vis-à-vis de trois espèces d'*Aspergillus* très impliquées en clinique humaine a été démontrée sur plusieurs souches isolées de différents prélèvements biologiques [129]. L'activité *in vitro* a été déterminée par une variante d'une méthode proposée par le NCCLS. Les CMI obtenues avec *A.fumigatus* s'échelonnent de < 0,03 à 0,5 µg/mL et la CMI<sub>90</sub> est de 0,25 µg/mL. Toutes les CMI déterminées avec le voriconazole sont inférieures à celles de l'amphotéricine B, et inférieures à celles de l'itraconazole pour *A.fumigatus* et *A.niger*.

**Tableau 30 :** Sensibilité à trois antifongiques de différentes souches d'*Aspergillus* isolées chez des patients

Agent causal	Nombre d'isolats	Antifongique testé	CMI (valeurs extrêmes) en µg/mL	CMI90 en µg/mL	en
<i>A.fumigatus</i>	21	Voriconazole	0,03 – 0,5	0,25	
		Itraconazole	-	0,5	
		Amphotéricine B	0,5 – 2	2	
<i>A.flavus</i>	10	Voriconazole	0,25 – 0,5	0,5	
		Itraconazole	0,125 – 0,25	0,25	
		Amphotéricine B	1 – 4	4	
<i>A.niger</i>	10	Voriconazole	0,25 – 1	0,5	
		Itraconazole	0,5 – 2	1	
		Amphotéricine B	0,5 – 1	1	

Une autre étude pour déterminer l'activité du voriconazole sur les champignons filamenteux opportunistes a été conduite sur plusieurs souches isolées de patients porteurs d'une infection fongique sévère en suivant des méthodes en cours d'évaluation par le NCCLS [113]. Pour

l'itraconazole, la CMI est définie comme étant la concentration minimale qui inhibe environ 50% de la croissance, pour l'amphotéricine B et le voriconazole, la CMI retenue est la concentration minimale 100% inhibitrice. Le voriconazole démontre *in vitro* une activité identique ou supérieure à celle de l'amphotéricine B et de l'itraconazole pour la plupart des espèces testées.

**Tableau 31 :** Sensibilité à trois antifongiques de différentes souches d'opportunistes filamenteux isolées chez des patients

Agent causal	Nombre d'isolats	Antifongique testé	CMI (valeurs extrêmes) en µg/mL	CMI (moyenne géométrique en µg/mL)
<i>A.fumigatus</i>	12	Voriconazole	0,5 – 1	0,57
		Itraconazole	0,06 – 0,12	0,1
		Amphotéricine B	1 – 2	1,07
<i>A.flavus</i>	11	Voriconazole	0,06 – 0,5	0,29
		Itraconazole	0,12 – >16	0,24
		Amphotéricine B	1	1
<i>Fusarium oxysporum</i>	6	Voriconazole	4	4
		Itraconazole	1 – >16	8
		Amphotéricine B	2	2
<i>Fusarium solani</i>	6	Voriconazole	8 – 16	10,5
		Itraconazole	1 – >16	8
		Amphotéricine B	1 – 2	1,31
<i>P.boydii</i>	6	Voriconazole	0,25 – 0,5	0,33
		Itraconazole	0,5 – 1	0,76
		Amphotéricine B	1 – 4	2,6

L'activité fongistatique et fongicide du voriconazole a été comparée *in vitro* à celles de l'itraconazole et de l'amphotéricine B, sur 110 souches de champignons filamenteux appartenant à 11 espèces, dont certaines émergentes <sup>[132]</sup>. La méthode utilisée est une adaptation de la technique standard M27 du NCCLS <sup>[143]</sup>. Les CMI de l'amphotéricine B ont été définies comme les concentrations minimales pour inhiber 100% de la croissance, celles du voriconazole et de l'itraconazole comme les concentrations minimales pour inhiber 80% de la croissance. Les CML (concentrations minimales létales) correspondent aux concentrations minimales qui tuent 95% de l'inoculum. Le voriconazole est plus actif que l'amphotéricine B ou l'itraconazole sur *S.apiopermum*. Les CMI pour *Fusarium solani* sont variables mais beaucoup plus basses qu'avec l'itraconazole. Le voriconazole exprime une activité fongicide sur 6 des 11 espèces testées, en particulier sur *A.fumigatus* et *A.flavus*.

**Tableau 32 :** Sensibilité à trois antifongiques de quatre champignons filamenteux isolés chez des patients

Agent causal	Nombre d'isolats	Antifongique testé	CMI (valeurs extrêmes en µg/mL)	CMI <sub>90</sub> en µg/mL	CML <sub>90</sub> en µg/mL
<i>A.flavus</i>	10	Voriconazole	0,25 – 1	0,5	1
		Itraconazole	0,12 – 0,25	0,25	0,5
		Amphotéricine B	0,5 – 1	1	1
<i>A.fumigatus</i>	10	Voriconazole	0,25 – 0,5	0,5	0,5
		Itraconazole	0,25 – 0,5	0,5	2
		Amphotéricine B	0,5 – 1	0,5	4
<i>Fusarium solani</i>	10	Voriconazole	1 – 4	4	16
		Itraconazole	>16	>16	>16
		Amphotéricine B	1 – 2	2	2
<i>Scedosporium apiospermum</i>	10	Voriconazole	0,06 – 0,025	0,5	>16
		Itraconazole	0,25 – 4	4	>16
		Amphotéricine B	1 – >16	8	>16

L'efficacité du voriconazole sur *Scedosporium spp.* a été étudiée et comparée à celle obtenue avec l'amphotéricine B et l'itraconazole selon une technique en grande partie en accord avec les standards M38-P du NCCLS [32]. Le voriconazole possède une bonne activité antifongique vis-à-vis de 33 souches de *S.prolificans* et des 11 souches de *S.apiospermum* isolées de prélèvements biologiques divers. Les CMI de l'amphotéricine B et de l'itraconazole sont élevées et signent leur inefficacité sur les deux espèces testées [144].

**Tableau 33 :** Sensibilité à trois antifongiques de différentes souches de champignons filamenteux isolées chez des patients

Agent causal	Nombre d'isolats	Antifongique testé	CMI (valeurs extrêmes en µg/mL)	CMI <sub>90</sub> en µg/mL
<i>S.prolificans</i>	33	Voriconazole	0,06 – 4	4
		Amphotéricine B	0,125 – >16	16
		Itraconazole	8 – >16	>16
<i>S.apiospermum</i>	11	Voriconazole	0,01 – 0,25	0,25
		Amphotéricine B	2 – >16	>16
		Itraconazole	0,03 – >16	>16

En conclusion, et à partir des données de cette synthèse des publications ayant pour sujet l'activité du voriconazole, on peut conclure que la fluoropyrimidination du fluconazole aboutissant au voriconazole majore l'activité *in vitro* vis-à-vis de tous les types de *Candida*, des Cryptocoques et autres levures comme en attestent les valeurs basses de concentrations minimales inhibitrices, en comparaison avec les autres antifongiques tels que l'amphotéricine B, le fluconazole, l'itraconazole et la 5-fluorocytosine. La comparaison montre que le

voriconazole possède des CMI plus basses que celle des autres antifongiques, confirmant ainsi son activité supérieure. Chose qui prouve que le voriconazole pourrait avoir un rôle important dans le traitement des infections fongiques qui se caractérisent par un taux de mortalité très élevé malgré l'amphotéricine B et d'autres antifongiques établis. Le voriconazole est également actif *in vitro* vis-à-vis de l'*Aspergillus*, *Fusarium* et *Scedosporium* avec des CMI<sub>90</sub> basses et des concentrations minimales fongicides (CMF) ne dépassant pas le double des CMI, ce qui laisse suggérer une activité fongicide contre ces moisissures. Le voriconazole est également actif *in vitro* contre les champignons dimorphiques tels que *Coccidioides* et *Histoplasma* et contre les moisissures noires telles qu'*Exophiala* et *Curvularia*. Dans ce large spectre d'activité *in vitro*, on a pu dégager deux exceptions à signaler : le peu d'activité *in vitro* contre *Sporothrix shenkii* et l'absence d'activité *in vitro* contre les zygomycètes (*Mucor*, *Absidia*, *Cunnigamella*, *Rhizopus*).

#### **IV.2.5 Pharmacologie du voriconazole :**

##### **1. Pharmacocinétique :**

- **Absorption :** Le voriconazole est disponible par voie intraveineuse et par voie orale. L'absorption orale est rapide avec des concentrations maximales obtenues en moins de 2h [116]. La biodisponibilité est très élevée, avoisinant les 96%. Cependant, la prise concomitante de nutriments diminue la biodisponibilité de 24% et implique une prise de voriconazole une heure avant ou une heure après les repas [14, 107, 116].

La demi-vie est de 6 à 9h ce qui permet de donner le voriconazole en deux doses journalières. Après une dose de charge donnée le premier jour, des concentrations plasmatiques stables sont obtenues endéans les 24h [145]. L'administration intraveineuse ou orale du voriconazole se traduit par une pharmacocinétique non linéaire. L'aire sous la courbe (ASC) et la concentration plasmatique maximale augmentent de manière disproportionnée par rapport à la dose administrée. Ainsi, si on double la dose, l'aire sous la courbe et la concentration plasmatique maximale (Tmax) sont quadruplées (au lieu d'être doublées) en raison de la saturation des capacités de métabolisation du voriconazole. La décroissance des concentrations plasmatiques suit une courbe biphasique témoignant d'une distribution rapide aux tissus suivie d'une élimination lente par métabolisation hépatique [146].

- **Distribution** : Le volume de distribution du voriconazole est de 4,6 L/kg, ce qui suggère une distribution importante dans les tissus. Le taux de liaison aux protéines est de 58 %. La concentration dans la salive est d'environ 65%, tout à fait cohérente avec le taux de liaison aux protéines plasmatiques <sup>[110,116]</sup>. La diffusion dans le liquide céphalorachidien (LCR) est d'environ 50% des taux sériques simultanés <sup>[112]</sup>. Au cours d'un programme compassionnel, les échantillons de liquide céphalorachidien de 8 patients ont montré des concentrations détectables de voriconazole chez tous ces patients. Il était également détecté dans diverses nécropsies : poumons, cerveau, foie, cœur, rein et rate <sup>[147]</sup>.

- **Métabolisme** : Le voriconazole est métabolisé par le cytochrome P450 et notamment par les isoenzymes CYP2C9, CYP2C19 et CYP3A4 <sup>[148,149]</sup>. Des études *in vitro* sur des microsomes hépatiques humains montrent que l'affinité du voriconazole pour le CYP3A4 est 100 fois moindre que pour les CYP2C9 et le CYP2C19. Les isoenzymes CYP2C9 et CYP2C19 semblent les plus concernées aux concentrations cliniques adéquates de 17µM (6µg/mL). Toutefois, c'est le CYP2C19 qui semble être l'isoenzyme métaboliseur principal. Le voriconazole inhibe de façon compétitive les isoenzymes CYP2C9, CYP2C19 et CYP3A4.

La voie métabolique principale implique la N-oxydation de la fluoropyrimidine pour former le N-oxyde-voriconazole. L'hydroxylation, la dihydroxylation et la méthylhydroxylation de la fluoropyrimidine sont d'autres voies métaboliques possibles. La combinaison de ces réactions biochimiques conduit à de nombreux métabolites oxydés. Plus de 8 métabolites ont été identifiés, aucun ne possède d'activité antifongique. Le principal métabolite est le N-oxyde voriconazole qui peut, de plus, perdre le cycle fluoropyrimidine. Les métabolites primaires sont conjugués ou défluorinés.

Comparé au voriconazole, le N-oxyde-voriconazole inhibe les enzymes cytochromes P-450 dépendantes de façon identique ou moindre. Le métabolite principal N-oxyde a une activité antifongique minime 100 fois inférieure à celle du voriconazole (détermination par des tests *in vitro*) et ne contribue pas à l'efficacité globale du voriconazole. Il ne présente pas non plus d'affinité pour de nombreux récepteurs physiologiques ou des sites de liaison, et n'entraîne pas d'allongement de l'intervalle QTc de l'ECG (détermination *in vitro* sur fibres de Purkinje isolées de chien). Ce métabolite contribue vraisemblablement aux caractéristiques d'efficacité et de tolérance du voriconazole <sup>[147]</sup>.

En raison du métabolisme hépatique de la molécule l'existence d'une insuffisance hépatique modérée (score de Child-Pugh à 7-9) est une indication pour diminuer la posologie de moitié sans modifier la dose de charge du premier jour. Il n'y a pas d'information concernant l'utilisation du voriconazole en cas d'insuffisance hépatique sévère <sup>[14]</sup>.

- **Elimination** : L'élimination du voriconazole se fait principalement par voie hépatique. Seulement 1% de la dose administrée est éliminée par voie urinaire, le voriconazole ne convient pas pour traiter les infections urinaires basses. On ne détecte pas de voriconazole sous forme inchangée dans les fèces. Le solvant dextransique de la forme à usage intraveineuse est un polysaccharide totalement éliminé par voie rénale avec une clairance très rapide. Pour cette raison, la voie intraveineuse est théoriquement déconseillée en cas de clairance à la créatinine inférieure à 50 ml/min <sup>[14,111]</sup>.

Après administration intraveineuse répétées de voriconazole marqué au carbone 14, environ 80% de la radioactivité est retrouvée dans l'urine, la majorité sous forme de métabolites, et environ 20% dans les fèces. En cas d'administrations orales répétées, environ 83% de la radioactivité est excrétée dans les urines et environ 17% dans les fèces. La plus grande partie de la radioactivité orale est excrétée dans les premières 96 heures suivant l'administration (94,7% si voie intraveineuse, 94,4% si voie orale).

Huit métabolites radioactifs sont identifiés dans les urines, deux seulement dans les fèces. Le N-oxyde représente 72% des métabolites radiomarqués circulant dans le plasma 1 heure après l'administration de la dernière dose. Environ 21% de la quantité de voriconazole radiomarqué se retrouve dans l'urine sous forme de N-oxyde, les autres métabolites les plus importants, représentant chacun 15% de la dose sont des glucoronoconjugués <sup>[147]</sup>.

La demi-vie d'élimination terminale du voriconazole dépend de la dose administrée et est d'environ 6 heures pour une dose de 200 mg (voie orale). Ceci suggère qu'une administration biquotidienne est nécessaire <sup>[111]</sup>.

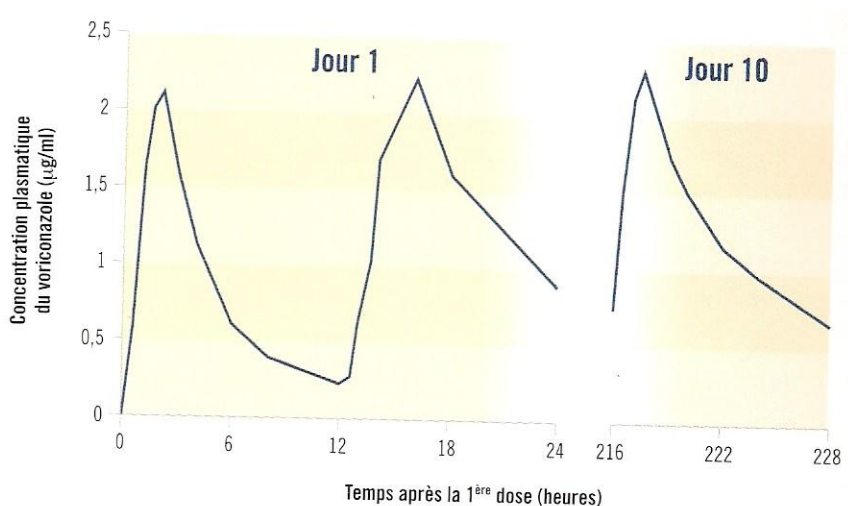
- **Pharmacocinétique du SBECD** (sulfobutyl éther bêta-cyclodextrine de sodium): L'excipient utilisé pour solubiliser le voriconazole pour l'administration IV, le SBECD, est pharmacologiquement inerte et ne modifie pas la pharmacocinétique du voriconazole. La demi vie du SBECD est de 1,6 heure et le volume de distribution obtenu à l'état d'équilibre est d'environ 0,2 L/kg, similaire à celui des fluides extracellulaires chez l'homme. La

clairance rénale est compatible avec la filtration glomérulaire, elle est rapide et le SBECD ne s'accumule pas chez le sujet sain ayant une fonction rénale normale lorsqu'il reçoit des doses répétées sur 10 jours. La clairance rénale du SBECD est reliée linéairement à celle de la créatinine <sup>[147]</sup>.

## **2. Critères de la pharmacocinétique du voriconazole :**

- **Une pharmacocinétique non linéaire :** Le voriconazole possède un profil pharmacocinétique non linéaire dû à une saturation de son métabolisme. L'exposition augmente de façon plus que proportionnelle à la dose, que l'administration soit orale ou intraveineuse. Il est estimé qu'en moyenne, une augmentation de la posologie orale de 200 mg deux fois par jour à 300 mg deux fois par jour fait passer la concentration plasmatique de 1,66 µg/mL à 4,19 µg/mL avec un coefficient multiplicateur de 2,5 alors que la dose a été multipliée par 1,5. Par voie intraveineuse, l'augmentation de la posologie de 3 mg/kg par jour à 4 mg deux fois par jour fait passer la concentration plasmatique de 1,82 µg/mL à 4,20 µg/mL avec un coefficient multiplicateur de 2,3 alors que la dose a été multipliée par 1,3 <sup>[147]</sup>. La non linéarité du profil pharmacocinétique fait que la demi vie ne permet pas de prévoir l'accumulation ou l'élimination du voriconazole.

- **Intérêt de la dose de charge :** Chez le sujet sain, les taux plasmatique à l'état d'équilibre ne sont pas atteints avant 6 jours lors de l'administration per os de 200 mg de voriconazole deux fois par jour. L'administration des doses de charge, le premier jour, recommandées de 6 mg/kg deux fois par jour par voie intraveineuse ou 400 mg/kg deux fois par jour par voie orale, permet d'obtenir des concentrations plasmatiques proches de l'état d'équilibre dans les première 24 heures suivant la prise. Après une dose d'attaque de 400 mg per os deux fois par jour et une posologie de 200 mg par voir orale les jours suivants, la concentration plasmatique du voriconazole atteint son état d'équilibre en 11 jours. L'exposition au voriconazole chez le sujet sain ne se modifie pas au cours de 30 jours d'administration dès que l'état d'équilibre est atteint <sup>[147]</sup>.



**Figure 38 :** concentrations plasmatiques de voriconazole à J1 et à l'état d'équilibre, J10

**- Relais de la voie intraveineuse par la forme orale :** Une série de simulations a été réalisée sur une population large et hétérogène, avec des poids allant de 51 à 97 kg, pour caractériser l'aspect pharmacocinétique du relais de la forme intraveineuse par la forme orale. On observe une cohérence des valeurs d'ASC lorsque le traitement d'entretien est réalisé par administration per os de 200 mg deux fois par jour ou par voie intraveineuse de 3 mg/kg deux fois par jour, et par administration orale de 300 mg deux fois par jour ou par voie intraveineuse de 4 mg/kg deux fois par jours, mais des différences apparaissent dans le groupe qui reçoit la plus forte posologie pour les poids extrêmes <sup>[147]</sup>.

**- Variabilité individuelle :** La variabilité du profil pharmacocinétique du voriconazole est importante.

► **Selon le type de patients :**

La variabilité inter-individuelle du profil pharmacocinétique du voriconazole est importante. Les coefficients de variation des moyennes des taux plasmatiques obtenus à l'état d'équilibre en administrant le voriconazole per os à la dose de 200 mg deux fois par jour ou en IV à la dose de 3 mg/kg deux fois par jour chez les sujets inclus dans les études de phase I cliniques sont de 94 et 100% respectivement. Chez les patients inclus dans les études cliniques, ce coefficient est de 88%. Par contre la variation intra-individuelle est faibles <sup>[147]</sup>.

### **a. Génotype du CYP2C19 :**

Des études *in vivo* montrent que le CYP2C19 joue un rôle significatif dans le métabolisme du voriconazole. Cette enzyme se caractérise par son polymorphisme génétique qui divise la population en métaboliseurs lents ou rapides, ces derniers étant homozygotes ou hétérozygotes <sup>[148]</sup>.

L'activité du CYP2C19 a un déterminisme génétique important : environ 20% des sujets asiatiques dont les japonais ont une activité enzymatique CYP2C19 de faible niveau et les patients homozygotes peuvent avoir des taux sériques 4 fois plus élevés que les patients métabolisant plus fortement le voriconazole <sup>[14,149]</sup>. On estime que 3 à 5% de la population caucasienne et noire sont des MP tandis que dans la population asiatique, la proportion des MP est de l'ordre de 12% <sup>[107,150]</sup>.

Il existe un polymorphisme génétique du CYP2C19 avec 3 génotypes identifiés:

- ✚ ME : métaboliseur extensif : responsable de concentrations plasmatiques normales;
- ✚ MEH : métaboliseur extensif hétérozygote : responsable de concentrations plasmatiques doubles de la normale;
- ✚ MP : métaboliseur pauvre : responsable de concentrations plasmatiques quadruples.

Ce polymorphisme génétique pourrait expliquer la variation dans les concentrations plasmatiques d'une personne à l'autre et également la toxicité hépatique qui semble être liée à des concentrations plasmatiques excessives <sup>[107]</sup>.

Les études menées chez des sujets sains issus des populations caucasiennes et japonaises ont montré que les métaboliseurs lents ont une moyenne une exposition au voriconazole quatre fois supérieure à celle de leurs équivalents homozygotes métaboliseurs rapide après administration de 200 mg deux fois par jour per os. Les métaboliseurs rapide hétérozygotes ont une exposition au voriconazole en moyenne deux fois plus élevées que leurs équivalents homozygotes. L'exposition au N-oxyde-voriconazole est inférieure de 30% chez les métaboliseurs lents comparés aux métaboliseurs rapides. Mais on constate aussi une variabilité importante dans chaque groupe de génotype <sup>[116,147]</sup>.

### **b. Sexe et âge :**

Dans une étude à administrations répétées par voie orale selon le protocole suivant : 6 mg/kg par voie intraveineuse (perfusion d'une heure), suivi 7 jours après de deux administrations de

400 mg, par voie orale, à 12 heures d'intervalle, puis 200 mg deux fois par jour pendant 5,5 jours, la  $C_{max}$  et l'ASC de femmes jeunes et saines étaient respectivement 83 et 113% supérieures aux valeurs observées chez des hommes jeunes et sains.

**Tableau 34 :** Données pharmacocinétiques en fonction du sexe et de l'âge (moyenne arithmétique pour  $T_{max}$ , géométrique pour  $C_{max}$  et ASC)

Paramètres cinétiques	Sexe masculin		Sexe féminin	
	Jeunes	Agés	Jeunes	Agées
$C_{max}$ µg/mL	2,16	3,47	3,96	3,27
ASC µg.h/mL	13,59	25,24	28,88	21,89
$T_{max}$ délai 'obtention de la $C_{max}$	1,58	1,38	2,00	1,41

Dans la même étude, chez des sujets âgés sains  $\geq 65$  ans, aucune différence significative de la  $C_{max}$  et de l'ASC n'a été observée entre les femmes et les hommes. La  $C_{max}$  et l'ASC des hommes âgés étaient respectivement 61 et 86% supérieures aux valeurs enregistrées chez des hommes jeunes (18 à 45 ans). Aucune différence significative de  $C_{max}$  et de l'ASC n'a été enregistrée chez les sujets féminins sains, que ces femmes soient âgées ( $\geq 65$  ans) ou jeunes (18 à 45 ans) [116,147].

**c. Race :**

Les analyses du profil pharmacocinétique effectuées sur les sujets sains n'ont montré aucune influence de la race après ajustement sur le génotype CYP2C19 et le poids [147].

**d. Poids :**

Dans les essais cliniques, la posologie du voriconazole per os a été diminuée de moitié pour les sujets de moins de 40 kg (28 patients sur 1214) et l'exposition au voriconazole obtenue chez ces patients était comprise dans la fourchette observée chez les patients de plus de 40 kg [147].

**► Selon le profil des patients :**

**a. Insuffisance rénale :**

Dans une étude utilisant une dose orale unique de 200 mg chez des sujets ayant une fonction rénale normale et une insuffisance rénale légère (clairance de la créatinine de 41 à 60 mL/min) à sévère (clairance de la créatinine  $< 20$  mL/min), la pharmacocinétique du voriconazole n'a pas été significativement modifiée par l'insuffisance rénale. La liaison aux protéines plasmatiques du voriconazole était semblable chez les sujets présentant, à des degrés

divers, une insuffisance rénale. Chez les patients présentant un dysfonctionnement rénal modéré à sévère (créatinémie > 2,5 mg/dL), il se produit une accumulation du véhicule intraveineux, le SBECD <sup>[147]</sup>.

**b. Insuffisance hépatique :**

Après administration d'une dose orale unique de 200 mg de voriconazole à des patients atteints d'une cirrhose hépatique légère à modérée (selon le score de Child-Pugh A et B), l'ASC était 233% supérieure à celle observée chez des sujets dont la fonction hépatique était normale. La liaison protéique du voriconazole n'était pas modifiée par l'insuffisance hépatique.

Dans une étude à administration orale répétées, l'ASC est similaire chez des sujets présentant une cirrhose hépatique modérée (selon le score de Child-Pugh B) recevant 100 mg deux fois par jour en dose d'entretien et chez des sujets ayant une fonction hépatique normale et recevant 200 mg deux fois par jour. Aucune donnée pharmacocinétique n'est disponible pour les patients présentant une cirrhose hépatique sévère (selon le score de Child-Pugh C) <sup>[147]</sup>.

**c. Enfants :**

Une analyse pharmacocinétique de population a été réalisée à partir des données provenant de 35 sujets immunodéprimés âgés de 2 ans à moins de 12 ans, inclus dans des études à doses uniques ou multiples administrées en intraveineuse. 24 de ces sujets ont reçu des doses multiples de voriconazole. Les concentrations plasmatiques moyennes à l'état d'équilibre chez les enfants recevant une dose d'entretien de 4 mg/kg toutes les 12 heures ont été similaires à celles observées chez des adultes recevant 3 mg/kg toutes les 12 heures, avec des médianes de 1186 ng/mL pour les enfants et de 1155 ng/mL pour l'adulte, reflétant une clairance plus rapide chez d'enfant <sup>[151]</sup>. Une dose d'entretien de 4 mg/kg toutes les 12 heures est donc recommandée pour les enfants de 2 ans à moins de 12 ans <sup>[147]</sup>.

**- Rapport entre paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques :** Des études sur l'homme montrent que la concentration plasmatique obtenue à l'équilibre (> 2µg/mL) après administration orale ou intraveineuse du voriconazole dépasse largement les CMI vis-à-vis de *Candida spp.* (0,001-0,39 µg/mL), de *Cryptococcus neoformans* (0,24 µg/mL), d'*Aspergillus* (0,35-0,58 µg/mL) et de la plupart des champignons émergents <sup>[117]</sup>.

Dans 10 essais cliniques, la médiane des concentrations plasmatiques moyennes et maximales chez les sujets pris individuellement était respectivement de 2425 ng/mL (fourchette interquartile: 1193 à 4380 ng/mL) et de 3742 ng/mL (fourchette interquartile : 2027 à 6302 ng/mL). Aucune relation positive n'a été observée entre les concentrations plasmatiques moyennes, maximales ou minimales du voriconazole et son efficacité dans les essais cliniques [147].

Les analyses pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des données issues des essais cliniques ont permis d'établir une relation positive entre les concentrations plasmatiques de voriconazole et les anomalies des tests de la fonction hépatique ainsi que les troubles visuels [154].

### **3. Interactions médicamenteuses** [14, 111, 116, 152, 153] :

Les interactions médicamenteuses sont fréquentes avec la famille des azolés. Le voriconazole n'y échappe pas. Dans cette partie on regroupera les trois variantes des interactions médicamenteuses du voriconazole :

- 2 Les effets des autres médicaments sur le voriconazole;
- 2 Les effets du voriconazole sur les autres médicaments, et enfin;
- 2 Les interactions réciproques.

Sauf spécification contraire, toutes les études d'interaction ont été menées chez des sujets sains de sexe masculin après administrations multiples orales de 200 mg de voriconazole deux fois par jour jusqu'à l'obtention de l'état d'équilibre des concentrations plasmatiques. Ces résultats sont applicables aux autres populations et aux autres voies d'administration.

**- Effets d'autres médicaments sur le voriconazole :** Le voriconazole est métabolisé par les isoenzymes CYP2C19, CYP2C9 et CYP3A4 du cytochrome P-450. Les inhibiteurs ou inducteurs de ces isoenzymes peuvent respectivement accroître ou réduire les concentrations plasmatiques du voriconazole.

Les inducteurs des cytochromes P450 accélèrent le catabolisme de l'antifongique et réduisent les taux sériques. C'est le cas de la rifampicine, des barbituriques à longue demi-vie et de la carbamazépine qui provoquent une diminution significativement des taux sanguins du voriconazole. D'où leur contre indication en cas d'administration concomitante avec le voriconazole. De l'autre côté, les inhibiteurs quant à eux ralentissent le catabolisme de

l'antifongique et augmentent les taux sériques. C'est le cas des inhibiteurs de la pompe à protons et de quelques antibiotiques (macrolides). Cependant, il n'a pas été montré d'interférence avec la cimétidine, les macrolides et la ranitidine.

Effets d'autres médicaments sur le voriconazole.		
Médicament	Effets de l'interaction	Contre indication
Inducteur du CYP450 <b>Rifampicine</b>	Accélération du catabolisme Diminution des taux sériques Réduction de la $C_{max}$ de 93% et de l' $ASC_t$ de 96%	Oui
Puissants inducteurs du CYP450 <b>Carbamazépine et phénobarbital</b>	Accélération du catabolisme Réduction significative des concentrations plasmatiques du voriconazole	Oui
Inhibiteur non spécifique du CYP450, augmente de pH gastrique <b>Cimétidine</b>	Ralentissement du catabolisme Augmentation des taux sériques Amplification de l'effet Augmentation de la $C_{max}$ de 18% et de l' $ASC_t$ de 23%	Non
Augmente le pH gastrique <b>Ranitidine</b>	Pas d'effet significatif sur la $C_{max}$ et l' $ASC_t$	Non
Inhibiteur du CYP3A4 <b>Erythromycine</b>	Pas d'effet significatif sur la $C_{max}$ et l' $ASC_t$	Non
<b>Azithromycine</b>		

- **Effets du voriconazole sur d'autres médicaments :** Etant de qu'inhibiteur de l'isoenzyme 3A4 du cytochrome P450, le potentiel de toxicité cardiaque et d'arythmie a fait l'objet d'une surveillance rigoureuse, concernant notamment, le possible allongement du segment QT, observé avec d'autres dérivés azolés. L'influence du voriconazole sur le segment QT semble minimale et aucun allongement de QT supérieur à 60 msec n'a été observé. Cependant, la co-administration du voriconazole avec d'autres médicaments connus pour provoquer un allongement de QT est contre indiquée. Il s'agit du cisapride, du pimozide de la quinidine. Le voriconazole augmente la concentration plasmatique de sirolimus de plus de 500%, taux très toxique, ce qui contre indique l'administration concomitante des deux médicaments. Les drogues métabolisées par les cytochromes qui sont la cible du voriconazole voient leur demi-vie augmenter : alcaloïdes de l'ergot de seigle, terféndine, astémizole, quinidine et cisapride. Le risque de toxicité qui en résulte contre-indique l'association. La ciclosporine et les antivitaminés K sont également potentialisées. L'effet d'autres molécules peut aussi être amplifié comme déjà démontré avec d'autres dérivés azolés : statines, benzodiazépines,

inhibiteurs calciques, sulfonylurées, et alcaloïdes de la pervenche. Il n'a pas été montré d'interférence avec la cimétidine, la digoxine, l'indinavir, les macrolides, le mycophénolate, la prednisone et la ranitidine.

Effets du voriconazole sur la cinétique de certains médicaments		
Médicament	Effet de l'interaction	Recommandation : contre indication, surveillance et ajustement de la dose
<b>Substrats du CYP3A4</b> Pimozide, quinidine, sirolimus	$\dot{U}C_{max}$ du médicament	Utilisation concomitante contre-indiquée (prolongation intervalle QT) Utilisation concomitante contre-indiquée
Alcaloïdes de l'ergot de seigle	$\dot{U}C_{max}$ du médicament	Utilisation concomitante contre-indiquée
<b>Substrat du CYP3A4</b> Ciclosporine, tacrolimus	$\dot{U}C_{max}$ du médicament	Réduire de moitié la dose de ciclosporine et surveiller les taux plasmatiques. Diviser par trois la dose de tacrolimus et surveiller les taux plasmatiques.
<b>Substrat du 2C9 et/ou 3A4</b> Warfarin, statines, benzodiazépines, sulfonylurés, alcaloïdes de la pervenche, méthadone	$\dot{U}C_{max}$ du médicament $\dot{U}$ effet du médicament	Réduction à envisager de la dose des statines et des benzodiazépines. Surveiller la toxicité des statines et des alcaloïdes de la pervenche. Surveiller la glycémie et le taux de prothrombines

**- Interactions réciproques :** La rifabutine, inducteur du CYP450, entraîne une diminution de la  $C_{max}$  et de l'ASC<sub>t</sub> du voriconazole, en outre, voit ses taux sériques augmenter. Le voriconazole augmente de plus de 100% la  $C_{max}$  de la rifabutine pouvant conduire à la toxicité. Les deux molécules ne doivent pas être prescrites simultanément. Il en est de même pour la phénytoïne, puissant inducteur enzymatique substrat du CYP2C9, qui diminue la  $C_{max}$  et l'ASC<sub>t</sub> du voriconazole de 49 et 69% respectivement. De l'autre côté, le voriconazole augmente la  $C_{max}$  et l'ASC<sub>t</sub> de la phénytoïne de 67 et 81% respectivement. L'administration des deux médicaments est donc à éviter sauf si le bénéfice attendu est supérieur au risque encouru, dans ce cas une surveillance étroite des taux plasmatiques de la phénytoïne est recommandée. Des ajustements de la dose du voriconazole sont recommandés en cas d'administration concomitante avec ces deux molécules (phénytoïne et rifabutine).

Médicament	Effet de l'interaction	Recommandations	
		Ajustement de la dose	Surveillance
<b>Phénytoïne</b>	$\dot{U} C_{\max}$ phénytoïne $\emptyset C_{\max}$ voriconazole	Voie IV : Passer de 4 à 5 mg/kg Voie orale : Passer de 200 à 400 mg (adulte) ou de 100 à 200 mg (enfant de 2 ans à moins de 12 ans et adulte < 40 kg)	Formule sanguine Effets secondaires de la rifabutine
<b>Rifabutine</b>	$\dot{U} C_{\max}$ rifabutine $\emptyset C_{\max}$ voriconazole	Voie IV : Passer de 4 à 5 mg/kg Voie orale : Passer de 200 à 350 mg (adulte) ou de 100 à 200 mg (adulte < 40 kg)	Taux plasmatiques de phénytoïne Administration contre indiquée

L'oméprazole, substrat du CYP2C19 et du CYP3A4 inhibiteur de CYP2C19, augmente la  $C_{\max}$  et l'ASC<sub>t</sub> du voriconazole de 15 et 41% respectivement. Le voriconazole a augmenté la  $C_{\max}$  et l'ASC<sub>t</sub> de l'oméprazole de 116 à 280% respectivement. Le métabolisme des autres inhibiteurs de la pompe à protons substrats du VYP2C19, pourrait également être inhibé par le voriconazole.

Des études *in vitro* suggèrent que le voriconazole pourrait inhiber le métabolisme des inhibiteurs de la protéase du VIH inhibiteurs du CYP3A4 comme le saquinavir, l'amprenavir et le nelfinavir. Des études *in vitro* ont également montré que le métabolisme du voriconazole pourrait être inhibé par les inhibiteurs de la protéase du VIH.

Il en est de même pour les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (NNRTI), des études *in vitro* ont montré que le métabolisme du voriconazole pouvait être inhibé par la delavirdine ou l'efavirenz, substrats du CYP3A4 indicateurs ou inhibiteurs du CYP450. Bien que ce point n'ait pas été étudié, il se pourrait que le métabolisme du voriconazole soit modifié par l'efavirenz et la névirapine. Le voriconazole pourrait aussi inhiber le métabolisme des inhibiteurs non nucléotidiques de la transcriptase réverse.

En raison de l'absence d'études *in vivo*, chez l'homme, étudiant l'administration du voriconazole avec ces deux classes médicamenteuses (inhibiteurs de la protéase du VIH et inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse), les patients doivent être étroitement surveillés en cas d'administration simultanée afin de détecter tout signe de toxicité médicamenteuse et/ou de perte d'efficacité.

Interactions réciproques : Effets sur la cinétique du voriconazole et du médicament administré en concomitance		
Médicament	Effet de l'interaction	Recommandation
Oméprazole	$\dot{U}C_{\max}$ oméprazole $\dot{U}C_{\max}$ voriconazole (Non significative)	Réduire de moitié la dose d'oméprazole
Inhibiteur de la protéase et Inhibiteur de la transcriptase inverse (non nucléosidique)	Métabolisme voriconazole inhibé ou induit Métabolisme médicament inhibé	Surveiller la toxicité de la molécule et/ou baisse d'activité
Efavirenz	$\emptyset C_{\max}$ voriconazole $\dot{U}C_{\max}$ efavirenz	Administration concomitante contre indiquée

#### IV.2.6 Efficacité clinique :

Le voriconazole a fait l'objet de plusieurs essais cliniques.

- **Candidose œsophagienne** : La première preuve d'efficacité est venue de l'étude de la candidose œsophagienne qui est une infection semi-invasive, dont l'endoscopie permet une évaluation clinique, microbiologique et éventuellement histologique. Dans une étude randomisée en double aveugle, incluant 391 patients immunocompromis, essentiellement séropositif pour le VIH, avec une candidose œsophagienne. Le voriconazole oral à 200 mg deux fois par jour a donné des résultats favorables équivalents à ceux du fluconazole per os à 200 mg une fois par jour, tant sur le plan clinique que œsophagoscopique. En effet, le taux de succès du voriconazole était équivalent à celui du fluconazole, 98,3% versus 95,1% respectivement. Une confirmation dans cette étude, c'est le rôle prédominant du *C.albicans* dans l'étiologie des candidoses œsophagiennes <sup>[152,154]</sup>.

Auteurs Année	Type d'étude	Population	Traitement	Résultats	Effets indésirables Commentaire
Ally R et al. 2001 [176]	Multicentrique Randomisée Double-aveugle	391 patients entre 18-75 ans immunodéprimés atteints de Candidose œsophagienne	voriconazole 200mg po bid + placebo durée moyenne de traitement: 14 jours ou fluconazole 400mg die + placebo x 1 dose puis fluconazole 200mg die + placebo durée moyenne de traitement: 15 jours	analyse "per protocole" (n=256) oesophagoscopie guérie ou améliorée: voriconazole 98,3% fluconazole 95,1 %	voriconazole considéré non inférieur au fluconazole $\dot{U}$ enzymes hépatiques avec vorico.

- **Candidose œsophagienne résistante au fluconazole :** Dans une étude ouverte, le voriconazole a été utilisé dans des cas limités de candidose oropharyngée réfractaire au fluconazole chez des patients sidéens (12 patients). Toutes ces candidoses superficielles étaient dues à *C.albicans* sauf une seule due à *C.glabrata*. Les CMI au fluconazole étaient > 12,5 µg/mL et pour le voriconazole < 0,39 µg/ mL. Le taux de réponse au voriconazole après une semaine de traitement s'est élevé à 91%. 7 patients ont été guéris en 1 à 2 semaines, 3 ont été améliorés et 2 ont été en échec <sup>[155]</sup>.

- **Candidoses invasives :** En ce qui concerne les candidoses invasives, une étude a montré que le voriconazole utilisé en traitement de rattrapage a un taux de réponse de 57,5%. Cette série comprenait un nombre limité d'infections à *Candida* non *albicans* genre *C.krusei* et *C.glabrata* <sup>[154,156]</sup>.

Dans une autres étude ouverte de traitement de sauvetage chez 52 patients atteints de candidoses invasives réfractaires aux traitements antérieurs, le voriconazole avec une posologie moyenne de 400 mg par jour pour une durée moyenne de 50 jours a permis d'obtenir une évolution favorable dans 56 % des cas, y compris pour *Candida glabrata* (70 %) et *Candida krusei* (67 %) <sup>[157]</sup>.

Une autre étude incluait 55 patients atteints d'infections systémiques réfractaires graves à *Candida* (incluant candidémie, candidose disséminée et autres candidoses invasives) pour lesquelles un traitement antifongique antérieur, en particulier par le fluconazole, s'était révélé inefficace. Des données limitées de sensibilité étayent les données d'efficacité clinique. Une issue favorable a été observée chez 24 patients (15 réponses complètes, 9 réponses partielles). Chez les espèces non *albicans* résistantes au fluconazole, une réponse positive a été obtenue dans 3/3 des cas d'infections à *C.krusei* (réponses complètes) et dans 6/8 des cas d'infections à *C.glabrata* (5 réponses complètes, 1 réponse partielle) <sup>[116]</sup>.

Une autre étude plus récente, menée en 2005 <sup>[158]</sup>, est représentée dans le tableau. Les patients étaient non neutropéniques et atteints de candidémies. Le voriconazole a été comparé à un régime thérapeutique comprenant l'amphotéricine B et le fluconazole. A l'issu de cette étude, le voriconazole a montré une efficacité égale ou inférieure à celle de l'amphotéricine B+fluconazole.

Auteurs Année	Type d'étude	Population	Traitement	Mesures	Résultats
Kullberg et al. 2005 <sup>[186]</sup>	Randomisée Multicentrique Étude de non infériorité	370 patients non neutropénique ≥ 12 ans	voriconazole 6 mg/kg en IV q12h x 2 doses, puis 3 mg/kg en IV q12h x ≥ 3 jours, puis 200 mg po bid ou amphotéricine B 0,7-1,0 mg/kg en IV die x ≥ 3 jours mais maximum 7 jours, puis fluconazole 400 mg/jour	EM/CG à 12 semaines (objectif primaire)	V: 41 % <sup>NI</sup> AB: 41 %
				EM/CG à la dernière visite (objectif secondaire)	V: 65,5 % <sup>I</sup> AB: 71,3%

EM/CG: éradication mycologique/cliniquement guéri; <sup>I</sup>: inférieur; <sup>NI</sup>: non inférieur ;V :voriconazole ;  
AB : amphotéricine B

- **Aspergillose invasive** : L'efficacité et la tolérance du voriconazole ont été évaluées dans l'aspergillose invasive dans une étude non comparative, multicentrique et en ouvert, portant sur 116 patients évaluables immun déficients atteints d'aspergillose invasive en traitement primaire (60 patients), ou en traitement de rattrapage (56 patients) après échec ou toxicité d'un traitement antifongique antérieur <sup>[159]</sup>. Le voriconazole était administré en IV à raison de 6 mg/kg/j deux fois par jour en J<sub>1</sub>, puis à 3 mg/kg/j deux fois par jour les jours suivants. Le relais en per os a été effectué entre J<sub>7</sub> et J<sub>8</sub> à 200 mg deux fois par jour. Le taux de succès en traitement primaire a été de 59% et en traitement de rattrapage de 38%. Le taux global de succès a été de 48% (succès total ou partiel), plus élevé dans les cas d'aspergilloses probables (58%) que dans les prouvée (38%).

**Tableau 35** : Site (ou type), probabilité d'aspergillose invasive et réponse au traitement

Site/type	Aspergillose			Réponse au traitement				
	Nbr	Prouvée	Probable	Succès total	Succès partiel	Stabilisation	Echec	Total
<b>Pulmonaire</b>	81	20	61	15	35	16	18	84
<b>Trachéobronchique</b>	3	3	0					
<b>Cérébrale</b>	19	14	5	0	3	5	11	19
<b>Disséminée</b>	6	5	1	1	2	0	3	6
<b>Sinus</b>	5	4	1	0	0	2	3	5
<b>Ostéomyélite</b>	1	1	0	0	0	1	1	2
<b>Hépatosplénique</b>	1	1	0					
<b>Total</b>	116	48	68	16	40	24	36	116
<b>Pourcentage</b>	100	41	59	14	34	21	31	100
<b>Traitement antérieur</b>								
<b>Primaire</b>				10	25	11	14	
<b>Sauvage</b>				6	15	13	22	

Cette étude a été suivie d'une autre étude randomisée comparant le voriconazole avec l'amphotéricine B dans le traitement primaire de l'aspergillose invasive (essentiellement pulmonaire 80%) chez 392 malades <sup>[160]</sup>. Les patients recevaient en première intention soit le voriconazole à 6 mg/kg en IV pour les 2 premières doses, suivi de 4 mg/kg IV ou l'amphotéricine B conventionnelle de 1 à 1,5 mg/kg/jour en perfusion. D'autres médicaments commercialisés pouvaient remplacer le traitement initial en présence de toxicité, d'intolérance ou de non-réponse. La réponse a été mesurée à la 12<sup>ème</sup> semaine de traitement et en fin de traitement. La majorité des patients avaient eu une greffe de moelle allogénique ou une chimiothérapie pour leucémie aiguë ou une autre tumeur hématologique. Sur 391 patients inclus, 379 ont reçu un des traitements du protocole, 277 étaient évaluable en intention de traiter modifiée après vérification des critères d'inclusion, 144 traités par le voriconazole et 133 par l'amphotéricine B.

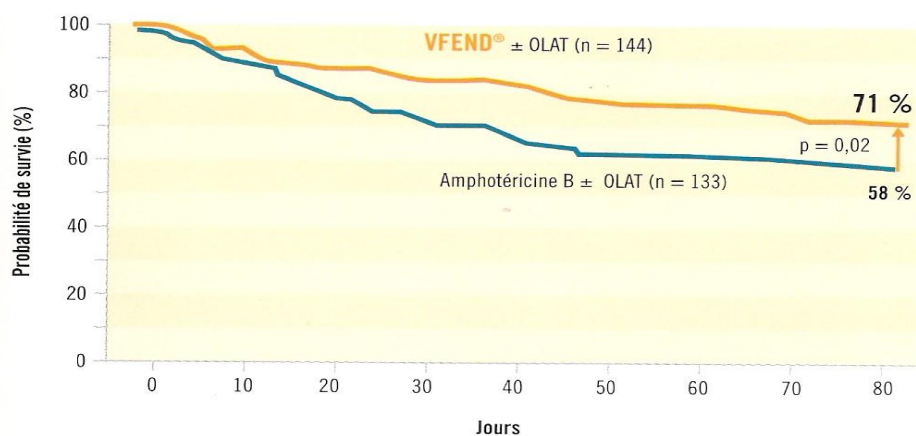
La durée médiane du traitement initial randomisé a été plus longue avec le voriconazole qu'avec l'amphotéricine B, et le taux de patients avec relais par un autre antifongique est nettement supérieur dans le groupe de l'amphotéricine B 80% versus 36% dans le groupe du voriconazole.

**Tableau 36 :** Relais par OLAT (Other Licensed Antifungal Therapy)

Relais	Voriconazole		Amphotéricine B	
	Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
<b>Relais</b>	52	36,1	107	80,5
<b>Amphotéricine B</b>	20	13,9	-	-
<b>Amphotéricine B lipidique</b>	14	9,7	47	35,5
<b>Itraconazole</b>	17	11,8	38	28,6
<b>Association</b>	1	0,7	22	16,5

Le taux de succès du voriconazole à 3 mois du début de traitement était de 52,8%, alors que celui de l'amphotéricine B était de 31,6%. Cette supériorité du voriconazole de plus de 20%, s'est confirmée parmi les différents sous-groupes analysés, que ce soit pour les patients ayant bénéficié d'une greffe de moelle (allogénique ou autologue) ou pour les patients neutropéniques, et cela quelque soit le site de l'aspergillose invasive (pulmonaire ou extrapulmonaire) et indépendamment du degré de certitude du diagnostic de l'aspergillose invasive ; prouvée ou probable. À la fin de la thérapie, le taux de réponse fut de 53,5% pour le groupe voriconazole versus 21,8% pour le groupe amphotéricine B avec une supériorité de plus de 30% du voriconazole.

Un autre élément marquant de cette étude est la diminution de la mortalité de 12 % dans le bras voriconazole par rapport à l'amphotéricine B (30% versus 42% respectivement). En effet, la survie globale à la 12<sup>ème</sup> semaine a été significativement supérieure dans le groupe voriconazole avec un taux de 70,8% versus 57,9% dans le groupe de l'amphotéricine B.



**Figure 39 :** Comparaison du taux de survie à la 12<sup>ème</sup> semaine entre le voriconazole et l'amphotéricine B

Quant aux effets indésirables, le taux des effets sévères potentiellement attribuables au traitement sont significativement plus faibles dans le groupe voriconazole: 13,4% versus 24,3% dans le groupe amphotéricine B. A l'issue de cette étude, le voriconazole constitue le traitement de premier choix dans le traitement de l'aspergillose invasive.

Auteurs Année	Type d'étude	Population	Posologie et durée	Mesures	Résultats
Herbrecht et coll. 2002 [188]	Randomisée Ouvverte Multicentrique	277 patients immunodéprimés ≥ 12 ans	voriconazole 6 mg/kg en IV q12h x 2 doses, puis 4 mg/kg en IV q12h x ≥ 7 jours, puis 200 mg po bid ou amphotéricine B 1-1,5 mg/kg en IV die x ≥ 2 semaines, puis autre traitement homologué contre l'aspergillose invasive	RTP des symptômes à 12 semaines	V: 52,8 %* AB: 31,6%
				Survie à 12 semaines	V: 70,8 %* AB: 57,9%

\*: différence statistiquement significative ; RTP: résolution totale ou partielle ; V : voriconazole ; AB : amphotéricine B

Une nouvelle étude est venue préciser plus encore le rôle du voriconazole dans l'aspergillose invasive. Il s'agit d'une étude rétrospective qui a répertorié 87 cas d'aspergillose invasive due à *A.terreus* [161]. Ce type d'*Aspergillus* est nettement moins fréquent qu'*A.fumigatus* ou *A.flavus*, mais provoque des aspergilloses réfractaires à l'amphotéricine B. Dans cette étude, le voriconazole a démontré une réduction de mortalité de 20% par rapport à l'amphotéricine B (50% versus 72% respectivement).

**- Infections osseuses aspergillaires :** Dans une série de 19 infections osseuses aspergillaires traitées pour une durée médiane de 80,5 jours par le voriconazole, 10 patients (52,6%) ont eu une réponse favorable : 3 réponses complètes et 7 réponses partielles [162].

**- Aspergillose du système nerveux central :** Dans étude est focalisée sur les aspergilloses du système nerveux central [163]. 86 cas ont été analysés rétrospectivement et le taux de succès du voriconazole était de 34% ce qui est remarquable pour une infection dont la mortalité avoisine les 100%. Ceci illustre la bonne pénétration du voriconazole dans le tissu cérébral et permet de le placer en premier choix dans ce type d'infection.

- **Autres infections** : Pour des infections mycotiques plus rares généralement associées à une haute mortalité (de 50 à 85%), le voriconazole dans des études ouvertes a montré une efficacité satisfaisante. Le taux de réponse en cas de fusariose était de 45,5% et en cas de scedosporiose, 63% pour le *S.apiospermum* et de 29% pour le *S.prolificans* <sup>[156]</sup>.

Des infections cryptococciques surtout méningées en échec thérapeutique ont répondu au voriconazole dans 39% des cas (7/18) <sup>[156]</sup>.

Quelques observations anecdotiques ont montré une efficacité dans les mycoses exotiques. Le voriconazole n'est pas recommandé dans les mucormycoses <sup>[14]</sup>.

- **Scedosporium** : Dans 36 cas d'infection à *Scedosporium*, peu sensible ou résistant à l'amphotéricine B et où le voriconazole a été utilisé en traitement de sauvetage, 63% des patients avec une infection à *S.apiospermum* (forme sexuée: *Pseudallescheria boydii*) et 29% avec une infection à *S.prolificans*, le plus résistant des deux, ont eu une évolution favorable. Des résultats analogues ont été publiés en pédiatrie et des guérisons de scédosporioses disséminées et d'atteintes cérébrales ont été rapportées <sup>[156, 164, 165]</sup>.

- **Fusariose** : Neuf patients sur 21 (43%) atteints d'infections à *Fusarium* réfractaires ou intolérantes à un traitement classique ont répondu au voriconazole <sup>[165]</sup>. Un cas de kératite dû à ce champignon a répondu au traitement systémique et local associé à la chirurgie <sup>[166]</sup>.

- **Traitement empirique des neutropéniques fébriles** : Une étude internationale randomisée et multicentrique a comparé le voriconazole à l'amphotéricine B liposomique dans le traitement empirique chez les patients fébriles neutropéniques. Huit cent trente sept (837) patients ont participé à l'étude, 415 patients ont reçu le voriconazole et 422 l'amphotéricine B liposomique <sup>[167]</sup>. Le succès global de l'étude fut 23,7% pour le groupe voriconazole versus 30,1% pour le groupe amphotéricine B liposomique <sup>[168]</sup>. À la suite de cette étude, le voriconazole n'a pas reçu l'indication officielle de la FDA pour l'utilisation en traitement empirique aux États-Unis <sup>[168, 169]</sup>.

Auteurs Année	Type d'étude	Population	Posologie et durée	Mesures	Résultats
Walsh et coll. 2002 [196]	Ouverte Randomisée Multicentrique Étude de non infériorité	837 patients entre 12-82 ans ayant subi une chimiothérapie ou transplantation	voriconazole 6 mg/kg IV q12h x 2 doses, puis 3 mg/kg IV q12h x ≥ 3 jours, puis 200 mg PO bid ou amphotéricine B liposomique 3 mg/kg IV die	Objectif primaire en 5 éléments <sup>§</sup>	V: 26 % <sup>1</sup> ABL: 31%

ABL: amphotéricine B liposomique; V : voriconazole; §: pas d'infection fongique perthérapeutique; <sup>1</sup>: inférieur.

**- Infections fongiques invasives de l'enfant :** Cette étude menée au cours d'un programme compassionnel avait pour but d'évaluer l'efficacité et la tolérance du voriconazole chez l'enfant atteint d'une mycose invasive. Au total, 69 patients ont été inclus dans l'étude dont 58 avaient une infection fongique prouvée ou probable à un agent pathogène ne disposant d'aucune thérapeutique disponible efficace ou ayant subi un échec thérapeutique à d'autres antifongiques systémiques ou ne l'ayant pas supporté. Ces patients ont été traités par le voriconazole en per os ou en IV. Le taux global de succès a été de 45%. Concernant la tolérance, des effets secondaires ont été observés chez 23 patients et ont consisté principalement à des éruptions cutanées, des troubles de la vision, des réactions de photosensibilité et une élévation des transaminases ou de la bilirubinémie. Chez 3 patients, il a été nécessaire d'arrêter la thérapie. Chez un quatrième, le traitement a été temporairement suspendu à cause de l'élévation des transaminases hépatiques. Chez 18 patients, les effets secondaires ont été transitoires [164].

**Tableau 37 :** Efficacité du voriconazole selon le type d'infection fongique invasive chez l'enfant

Pathogène/Type d'infection	Réponse au traitement				
	Nombre	Succès total+partiel	Stabilisation	Intolérance	Echec
<b>Aspergillose</b>	42	18	3	4	17
<b>Pulmonaire</b>	12	4	2	1	5
<b>SNC</b>	6	3	1		2
<b>Disséminée</b>	7	6			1
<b>Autres</b>	17	5		3	8
<b>Scédosporiose</b>	8	5	1		2
<b>Pulmonaire</b>	2	1	1		
<b>SNC</b>	5	3			2
<b>Disséminée</b>	1	1			
<b>Fusariose</b>	2				2
<b>Autres</b>	2	2			
<b>filamenteux</b>	4	1			3
<b>Levures</b>					
<b>Total</b>	58	26 (45%)	4 (7%)	4 (7%)	<b>a) 43%</b>

#### IV.2.7 Tolérance du voriconazole :

##### 1. Effets indésirables :

##### a) Classification par système et par fréquence :

Le profil de tolérance du voriconazole est fondé sur une banque de données globales de tolérance incluant plus de 2 000 sujets (dont 1 493 patients inclus dans des essais cliniques). Il s'agit d'une population hétérogène de volontaires sains et de patients présentant des infections fongiques sur des terrains d'immunodéficience divers, ces derniers recevant souvent d'autres thérapeutiques de façon concomitante. Chez 561 patients, la durée de traitement a dépassé 12 semaines, 136 ont reçu du voriconazole pendant 6 mois <sup>[116,147]</sup>.

Comme la plupart des études ont été réalisées en ouvert, les tableaux ci-dessous reprennent tous les événements indésirables ayant un lien de causalité possible par classe de système et par fréquence :

Très fréquents > 1/10

Fréquents > 1/100 et < 1/10

Peu fréquents > 1/1000 et < 1/100

Rares < 1/1000

❗ **Effets secondaires peu fréquents à rares <sup>[116]</sup> :**

Système	Effets indésirables	
	Peu fréquents	Rares
<b>Organisme en général</b>	Réaction allergique, réaction de type anaphylactique, œdème de Quinke, péritonite	
<b>Cardiovasculaire</b>	Arythmie auriculaire, bradycardie, syncope, tachycardie, arythmie ventriculaire, fibrillation, ventriculaire	Tachycardie supraventriculaire, bloc auriculo-ventriculaire, bloc de branche, arythmie nodale
<b>Digestif</b>	Cholécystite, lithiase biliaires, constipation, duodénite, dyspepsie, dilatation du foie, gingivite, glossite, hépatite, insuffisance hépatique, pancréatite, œdème à la langue	Colite pseudomembraneuse, coma hépatique
<b>Endocrinien</b>	Insuffisance cortico-surrénalienne	
<b>Génito-urinaire</b>	Néphrite	Nécrose tubulaire rénale
<b>Métabolique et nutritionnel</b>	Augmentation de l'urée sanguine, albuminurie, hypercholestérolémie	Hyperthyroïdie, hypothyroïdie
<b>Musculo-squelettique</b>	Arthrite	
<b>Nerveux</b>	Ataxie, œdème cérébral, diplopie, hypoesthésie, nystagmus, vertiges	Syndrome de Guillain-Barré, crise oculogyre, hypertonie, syndrome extrapyramidal
<b>Peaux et annexes cutanées</b>	Erythème pigmenté fixe, eczéma, psoriasis, syndrome de Stevens-Johnson, urticaire	Lupus érythémateux discoïde, érythème polymorphe, érythrodermie bulleuse avec épidermolyse
<b>Sanguin et lymphatique</b>	Lymphadénopathie, agranulocytose, éosinophilie, coagulation intravasculaire disséminée, myélosuppression	Lymphangite
<b>Sensoriels</b>	Blépharite, névrite optique, œdème papillaire, sclérite, dysgueusie	Hémorragie rétinienne, opacité cornéenne, atrophie optique

**⚠ Effets secondaires fréquents à très fréquents <sup>[116]</sup>:**

Système	Effets indésirables	
	Très fréquents	Fréquents
<b>Organisme en général</b>	Fièvre, céphalée, douleurs abdominales	Frissons, asthénie, dorsalgie, douleurs thoraciques, réaction ou inflammation au site d'injection, œdème facial, syndrome grippal
<b>Cardiovasculaire</b>		Hypotension, thrombophlébite, phlébite
<b>Digestif</b>	Nausées, vomissements, diarrhée	Elévation anormale des tests de la fonction hépatique (y compris ASAT, ALAT, PA, GGT, LDH, bilirubine), ictère, chéilite, ictère choléstatique, gastro-entérite
<b>Génito-urinaire</b>		Insuffisance rénale aiguë, hématurie
<b>Métabolique et nutritionnel</b>	Œdème périphérique	hypokaliémie, augmentation de la créatinine, hypoglycémie
<b>Nerveux</b>		Etourdissement, hallucination, confusion, dépression, anxiété, tremblement, agitation, paresthésie
<b>Peaux et annexes cutanées</b>	Eruption	Prurit, érythème maculopapuleux, réaction cutanée de photosensibilité, alopecie, dermatite exfoliative
<b>Respiratoire</b>		Syndrome de détresse respiratoire, œdème pulmonaire, sinusite
<b>Sanguin et lymphatique</b>		Thrombocytopénie, anémie (y compris macrocytaire, microcytaire, isochrome, mégaloblastique, aplasique), leucopénie, pancytopenie, purpura
<b>Sensoriels</b>	Troubles de la vision y compris perception visuelle altérée ou renforcée, vision trouble, modification de la vision des couleurs et photophobie	

**b) Effets indésirables sérieux :**

Le voriconazole est en général bien supporté. Trois effets secondaires sont à connaître : les éruptions cutanées d'hypersensibilité, les perturbations visuelles et l'élévation des enzymes hépatiques.

**⚠ Troubles visuels :**

Les effets secondaires les plus fréquents sont les manifestations visuelles jusqu'alors inconnues avec cette famille d'antifongiques. Elles surviennent chez environ 30% des patients

et sont bénignes. Il s'agit de brillance exagérée des objets, de photophobie, de vision trouble et d'images colorées dans le champ visuel. Ces manifestations surviennent environ 30 minutes après administration du produit et durent approximativement 30 minutes. Elles peuvent disparaître en quelques jours malgré la poursuite du traitement ou durer jusqu'à l'arrêt du voriconazole. Il n'y a pas de séquelles visuelles. Le mécanisme reste mal compris et concerne l'activité rétinienne et non cérébrale. Des hallucinations visuelles d'un mécanisme peut-être différent ont été rapportées à hauteur de 5 % dans une étude <sup>[107, 116, 164, 156]</sup>.

### **⚠ Réactions dermatologiques :**

Le deuxième effet secondaire en fréquence est cutané sous forme de photosensibilisation, en particulier pour les traitements prolongés ambulatoires en zone ensoleillée. Un rash cutané survient dans 6 à 25% des cas et consiste en des éruptions érythémateuses ou maculopapuleuses. À titre exceptionnel, un syndrome de Stevens-Johnson, une dermatite psoriasique et une nécrose épidermique toxique ont été décrits. Dans l'ensemble, les manifestations d'intolérance sont rares et bénignes <sup>[107, 152, 156]</sup>.

### **⚠ Hépatotoxicité :**

L'élévation des enzymes hépatiques est la troisième manifestation d'intolérance. Elle peut concerner les transaminases ALAT et ASAT ou les phosphatases alcalines. Le risque toxique semble plus important pour les taux sériques les plus élevés. L'anomalie biologique est habituellement asymptomatique mais des hépatites toxiques graves ont été rapportées. La surveillance des tests hépatiques est donc nécessaire au cours du traitement.

Plus rarement ont été signalés : céphalées, troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhée, douleurs abdominales). Dans l'ensemble, il est rare de devoir interrompre un traitement par le voriconazole pour toxicité ou intolérance <sup>[107, 152, 156]</sup>.

En comparaison avec l'amphotéricine B ou sa formulation liposomique, le voriconazole a montré une toxicité hépatique équivalente. L'élévation des phosphatases alcalines survenait dans 3%, des transaminases dans 7 à 8,9% et la bilirubine dans 9,6% <sup>[107]</sup>.

## **2. Contre indications [170] :**

### **a) Contre indications absolues :**

#### **Contre indication**

**Terfénadine, quinidine, phénobarbital, rifampicine, cisapride, astémizole, carbamazépine, alcaloïdes de l'ergot de seigle, pimozide, sirolimus.**

### **b) Contre indications relatives (précautions à considérer) :**

- ▶ Intolérance au galactose (les comprimés contiennent du lactose)
- ▶ Histoire d'hypersensibilité à d'autres antifongiques
- ▶ Cirrhose hépatique sévère
- ▶ Les patients devraient éviter la lumière directe du soleil pendant la thérapie
- ▶ Grossesse
- ▶ Pour le voriconazole injectable : Insuffisance rénale modérée à sévère (Clcr < 50 mL/min), utiliser la formulation orale
- ▶ Éviter de conduire la nuit (vision altérée)
- ▶ Administration concomitante de médicament allongeant le segment QT

### **c) Données disponibles dans la grossesse :**

Voriconazole a un poids moléculaire de 349,3 Da <sup>[116]</sup>, donc passage transplacentaire passif possible. Selon la monographie, le voriconazole serait tératogène chez le rat (fissures palatines, hydronéphrose et hydrouretère à des doses de 10 mg/kg (0,3 fois la dose de maintien recommandée chez l'humain sur une base de mg/m<sup>2</sup>), et embryotoxique chez le lapin à des doses de 100 mg/kg (6 fois la dose de maintien recommandée). Les concentrations plasmatiques d'estradiol chez la rate enceinte étaient diminuées en présence de voriconazole, et un allongement de la durée gestationnelle et une dystocie entraînaient une mortalité périnatale augmentée à dose de 10 mg/kg. Chez les lapins une mortalité embryonnaire augmentée, une diminution du poids foetal et une augmentation de l'incidence des malformations squelettiques ont été rapportées. À cause des effets tératogènes chez les rats à des doses inférieures aux doses correspondantes chez l'humain, et vu que l'utilisation des autres agents de la classe des antifongiques azolés (kétoconazole, fluconazole et itraconazole) n'est pas recommandée dans la grossesse (effets embryotoxiques et tératogènes chez les animaux, malformations possibles chez l'humain), le voriconazole devrait être évité durant la grossesse, à moins que les bénéfices surpassent les risques pour le fœtus, et un moyen de

contraception efficace devrait être utilisé chez les femmes en âge de procréer, recevant du voriconazole (catégorie D de la FDA) <sup>[171]</sup>.

**d) Données disponibles dans l'allaitement :**

Aucune donnée n'est disponible sur l'excrétion du voriconazole dans le lait maternel.

**IV.2.8 Données pharmacoéconomiques :**

Une étude pharmacoéconomique Canadienne a comparé les coûts du voriconazole et de l'amphotéricine B dans le traitement de l'aspergillose invasive <sup>[172]</sup>. L'arbre décisionnel utilisé pour cette évaluation repose sur les résultats de l'étude de Herbrecht <sup>[170]</sup>. Les auteurs concluent que l'utilisation du voriconazole comme thérapie de première ligne représente une stratégie potentielle d'économies au Canada.

**IV.3 RESISTANCE :**

**IV.3.1 Résistances aux antifongiques:**

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

**1. Définition:**

La résistance antifongique peut être définie comme la diminution de la sensibilité à un antifongique, mesurée *in vitro* par des méthodes appropriées et standardisées. La sensibilité d'un champignon est estimée le plus souvent par la mesure de la CMI vis-à-vis d'un antifongique donnée. Cette CMI correspond à une concentration d'antifongique inhibant la croissance de la grande majorité d'un groupe d'isolats de la même espèce. La CMI<sub>50</sub> et la CMI<sub>90</sub> correspondent à l'inhibition respectivement de 50% et 90% d'un groupe d'isolats de même ou différentes espèces à une concentration d'antifongique donnée. Cependant, une CMI ne peut être considérée comme une valeur absolue prédictive de succès ou d'échec thérapeutique. En effet, la mesure *in vitro* d'une CMI est tributaire de nombreux éléments (température, pH...). La définition des résistances par des valeurs seuils (breakpoints) requiert un consensus et une collaboration effective pour une standardisation, ce que réalise le NCCLS <sup>[173]</sup>.

## 2. Types de résistances :

- **Résistance innée** : La résistance à un antifongique peut être innée, c'est le cas de *C.krusei* au fluconazole. Une résistance innée peut se manifester par une apparition des CMI bimodale. C'est le cas de la résistance à la 5fluocytosine de *C.albicans* où sont rencontrés des isolats ayant une CMI haute et d'autres une CMI basse [25].

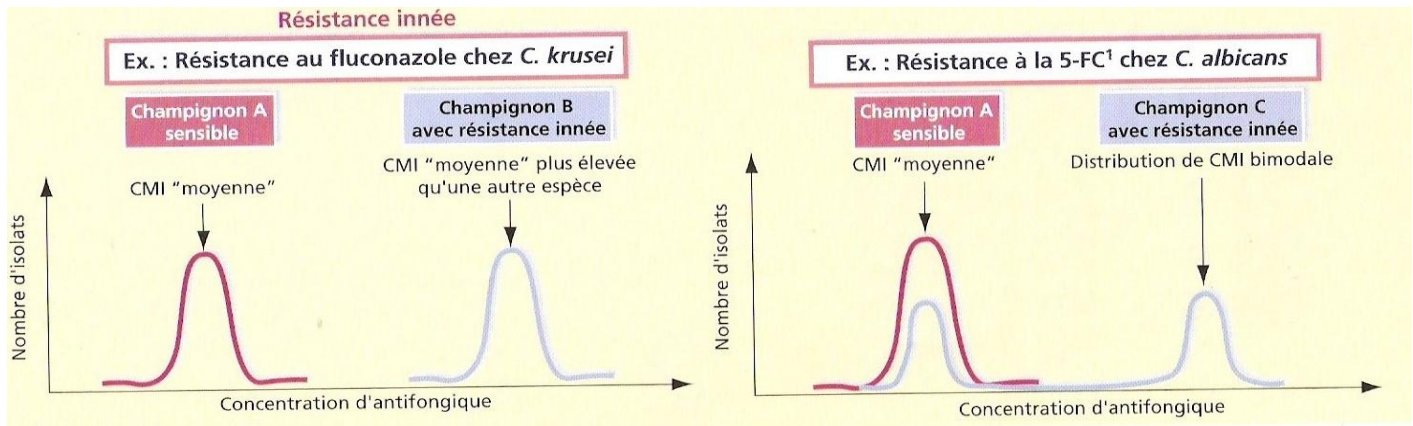


Figure 40 : Résistance innée chez *C.krusei* au fluconazole et *C.albicans* à la 5fluocytosine

- **Résistance acquise** : La résistance acquise se rencontre après exposition de certaines souches aux antifongiques. On assiste à une modification de CMI pour une même espèce ainsi qu'à une répartition des CMI dans un plus large spectre de concentration d'antifongique. C'est le cas de la résistance de *C.albicans* au fluconazole [25].

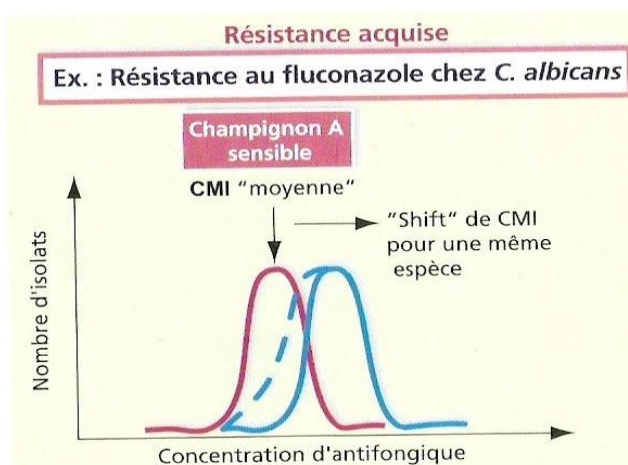


Figure 41 : Résistance acquise chez *C.albicans* au fluconazole

- **Multirésistance médiée par les pompes à efflux** : C'est une résistance acquise par efflux transmembranaires a été découverte auparavant [174]. Les pompes à efflux peuvent donner lieu à des phénotypes de résistance croisée aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes. Le

mécanisme de ce type de résistance est corrélé à la surexpression des pompes à efflux qui sont des transporteurs membranaires entraînant une excrétion de molécules toxiques. En effet, les pompes d'efflux peuvent être classées selon la source d'énergie nécessaire à leurs changements de conformation lors du transport, fournie soit par dissipation d'un gradient de protons, proton motive force (PMF) ou d'ions Na<sup>+</sup>, soit par hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP) [175].

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

### **3. Causes des résistances aux antifongiques:**

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

- **Au champignon responsable :** son genre et espèce, sa virulence, son niveau de résistance intrinsèque ou acquise ;
- **A l'antifongique utilisé :** son choix, les posologies prescrites, ses propriétés pharmacocinétiques et ses interactions médicamenteuses potentielles ;
- **A l'hôte :** son statut immunitaire, le site et la sévérité de l'infection, la pathologie sous jacente et la présence ou non d'un cathéter [25,96].

#### **IV.3.2 Mécanismes de résistance aux antifongiques azolés :**

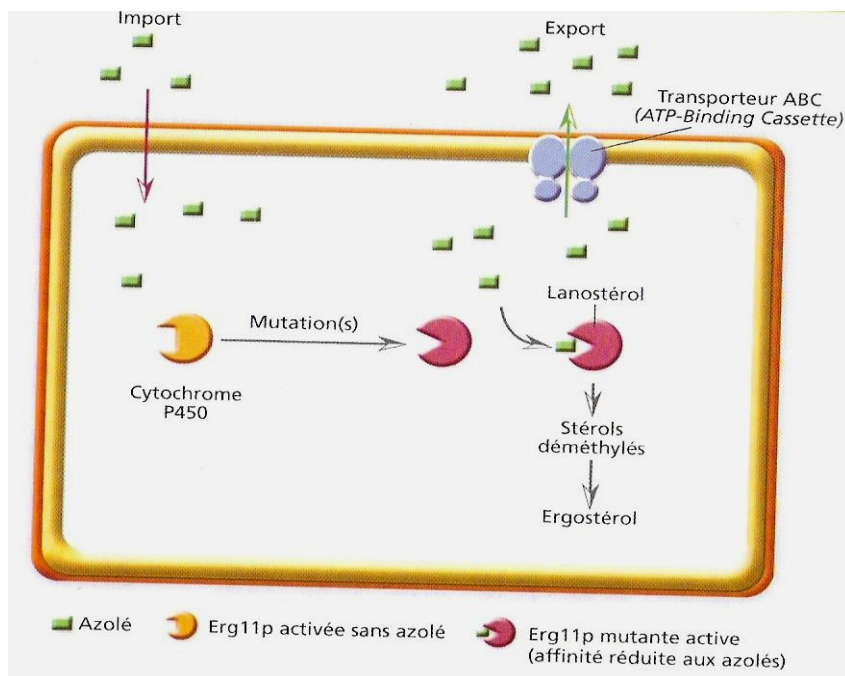
Bien que depuis quelques années la fréquence de la résistance aux antifongiques azolés n'augmente plus en raison de l'amélioration des thérapies antifongiques, le début des années 1990 s'est accompagné d'une augmentation considérable du nombre d'isolats cliniques résistants. De même, si le profil des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

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

Les mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance aux azolés ont été largement étudiés et peuvent être repartis en quatre catégories [176] :

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

Ainsi, une mutation ponctuelle du gène ERG 11, se traduisant par une modification de la séquence en acides aminés de la lanostérol 14  $\alpha$  déméthylase, suffit à empêcher la liaison entre l'antifongique et l'enzyme. De nombreuses mutations ont été identifiées, notamment chez *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans* [177] et *C. tropicalis* [178].



**Figure 42 :** Résistance aux azolés par altération de la cible

### 2. Multiplication du nombre de copies de la 14 $\alpha$ déméthylase :

Dans cette situation, les azolés ne sont pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14 $\alpha$ déméthylé. Ainsi, la surexpression du gène ERG11, par duplication chromosomique ou modification du promoteur, comme l'augmentation de la demi-vie des ARNm, peut aboutir à la résistance [179].

### 3. Blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol:

Il s'agit d'un mécanisme moins fréquemment observé chez les isolats cliniques résistants aux antifongiques azolé. Il est connu que l'effet fongistatique des azolés repose sur la conversion

en stéroïdes toxiques des intermédiaires 14 $\alpha$ méthylés synthétisés suite au blocage de la lanostérol 14 $\alpha$ déméthylase. Ainsi, une mutation d'un gène responsable de la synthèse de ces intermédiaires toxiques aura pour conséquence une résistance aux azolés. C'est notamment le cas pour *C. albicans*, chez qui la mutation du gène ERG3 aboutit à une résistance aux azolés [180].

#### **4. Surexpression des pompes d'efflux :**

La résistance aux azolés a été observée chez des souches cliniques de *C. albicans* qui est due à l'efflux du fluconazole de la cellule par l'expression constitutive élevée des deux types de transporteurs d'efflux : ATP-ABC codés par les gènes *Candida* drug response (CDR) qui utilisent l'adénosine triphosphate (ATP) comme source d'énergie, et les MFS à laquelle appartient multidrug resistance 1 (MDR1) qui utilise un gradient de protons à travers la membrane comme une force motrice pour le transport [181]. En effet, un défaut d'accumulation d'azolés à l'intérieur de la cellule fongique a été identifié comme un mécanisme d'importance des résistances aux azolés chez des patients positifs au VIH souffrant de candidose oropharyngée. Un isolat de *Candida* peut devenir résistant aux azolés par une augmentation d'efflux liée à une surexpression de transporteurs multidrogués de deux classes les transporteurs ATP-Binding-Cassette (ABC) et la famille des Major Facilitators (MF). La surexpression des gènes codant pour ces transporteurs est impliquée dans ce phénomène. Pour la famille MF, qui ont la capacité de transporter non seulement des azolés, c'est la protéine CaMDR1 et la surexpression du gène CaMDR1 qui confèrent une résistance de *Candida spp* aux azolés. Mais le rôle prédominant de la surexpression des gènes codant des transporteurs à efflux concerne les transporteurs ABC (CDR1 et CDR2) chez *C. albicans*. La surexpression de ces transporteurs provoque une baisse de concentration intracellulaire d'azolés, la cellule continuant de synthétiser de l'ergostérol et de croître malgré une concentration élevée d'azolés [25].

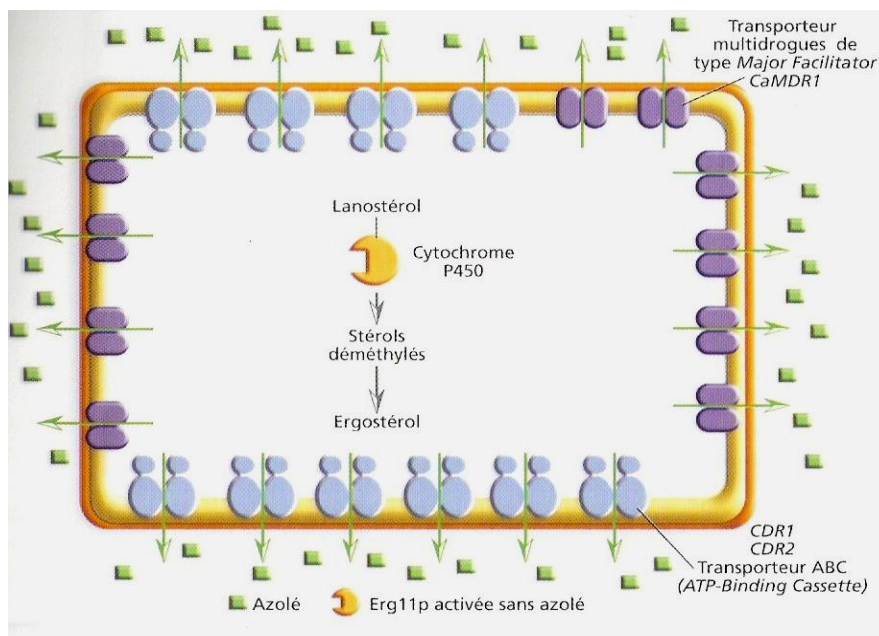


Figure 43 : Résistance aux azolés chez *C.albicans* par augmentation d'efflux

#### IV.4 Données épidémiologiques :

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

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

Depuis quelques années, il a été rapporté que la proportion de souches de *Candida* non *albicans* intrinsèquement résistantes aux dérivés triazolés a augmenté de façon importante dans certains centres d'oncohématologie dans les services de réanimation. C'est tout particulièrement le cas pour *C.glabrata* et pour *C.krusei* [182].

##### 1. Résistance aux azolés chez les patients VIH<sup>+</sup> :

L'acquisition de résistance par *C.albicans* est bien décrite chez les patients victimes d'une infection à VIH, et elle survient habituellement dans des circonstances bien particulières : Il s'agit des patients dont le nombre de lymphocytes CD<sub>4</sub> est généralement inférieur à 50

mm<sup>3</sup> qui sont exposés à de faibles doses de fluconazole (50 à 100 mg/j) pour le traitement d'une candidose oropharyngée ou œsophagienne. La résistance clinique peut parfois être vaincue par une posologie plus élevée, de 400 à 800 mg/j [182]. Quoique dans 9% [183] à 13% [184] des cas, une résistance clinique apparaît.

Bien que la prophylaxie secondaire par le fluconazole a été abandonnée dans les années 90 pour éviter l'émergence d'espèces naturellement résistantes au fluconazole comme *C.glabrata* et *C.krusei* [185], ceci n'évite pas l'apparition de souches de *C.albicans* avec des CMI augmentées au fluconazole chez des sujets VIH<sup>+</sup> ayant subi des traitements au coup par coup de leurs candidoses oropharyngées.

La crainte de résistances au fluconazole dues à la pression de sélection d'un traitement antérieur est cantonnée à ce type de malades, à l'exclusion des autres, notamment non neutropéniques est élevée [20]. Ces terrains présentent beaucoup de particularités favorisant l'apparition de résistances :

- L'immunodépression qui favorise l'hétérogénéité génétique de *Candida*, ce qui accélère le développement de mutants résistants ;
- L'importance de l'inoculum et la variété des espèces colonisant la bouche [183], ainsi que le traitement au long cours et à faibles doses [20,186] augmentent le taux d'exposition des *Candida* aux antifongiques;
- Enfin, la variété des mécanismes possibles de résistance aux azolés diminue le nombre de mutations nécessaires à l'émergence d'une résistance.

Diverses études vont dans ce sens: certains auteurs ont montré de grandes variations phénotypiques, une grande hétérogénéité génétique [187] et une activation de divers mécanismes de résistance [4,188] chez les souches isolées des malades atteints du sida, alors que ces phénomènes sont exceptionnellement retrouvés chez les *Candida* isolés de sujets sains [189]. 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 [190], la prévalence de *C.albicans* est restée stable après deux ans, aussi bien chez les VIH<sup>+</sup> (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 <sup>[191,96]</sup>. Enfin, aucune augmentation des CMI n'a été constatée dans une étude randomisée multicentrique comparant l'amphotéricine B au fluconazole dans les candidémies chez les malades non neutropéniques <sup>[1]</sup>.

Sur une période s'étendant de décembre 1994 à juin 1996, l'acquisition de la résistance aux azolés de *C.albicans* au cours de candidoses oropharyngées a été étudiée chez trois patients VIH<sup>+</sup> au sein du centre hospitalier de Versailles <sup>[20]</sup>. Les objectifs étaient d'une part d'établir si lors des candidoses qui échappaient cliniquement au traitement d'abord par le fluconazole puis par l'itraconazole, les souches isolées étaient résistantes *in vitro* à ces azolés. Pour cela les CMI étaient mesurées par le E test®. D'autre part de vérifier si une seule souche devenait résistante progressivement *in vitro* ou si la souche résistante était acquise ultérieurement. Pour cela une analyse génotypique des souches a été mise en place.

Sur les trois patients, le premier patient a présenté une vraie résistance clinique. L'échec thérapeutique ne pouvait pas être attribué à une mauvaise compliance du traitement ou à des posologies insuffisantes ou à une durée de traitement insuffisante, comme cela a été reporté dans certains cas <sup>[184]</sup>. Une augmentation des CMI du fluconazole et de l'itraconazole des souches appartenant au même pulsotype est observée chez ce patient au fur et à mesure que des traitements par le fluconazole sont reçus. La même augmentation est constatée pour les souches appartenant à chacun des deux pulsotypes du deuxième patient, toxicomane, pour qui les posologies et les durées de traitement n'ont pas toujours été respectées.

A la lumière de cette étude deux importantes notions ont été dégagées, la première c'est que la présence de souches de *C.albicans* résistantes au traitement dans les candidoses oropharyngées est retrouvée chez les patients ayant subi de nombreuses cures par les azolés à petites doses, et chez lesquels le nombre de CD<sub>4</sub> est faible (premier patient). La seconde c'est que les souches ayant une CMI élevée parmi la population d'origine sont celles qui développeraient une résistance aux azolés (deuxième patient) <sup>[192]</sup>.

En conclusion, selon le modèle de la résistance bactérienne aux antibiotiques, les faibles doses d'azolés seraient responsables de l'apparition des résistances. Tandis que les fortes doses d'azolés administrées durant une période de temps suffisante pourraient éviter

l'apparition des résistances. L'association de deux antifongiques ayant deux mécanismes d'action différents dans le traitement de la candidose oropharyngée chez le sujet VIH<sup>+</sup> pourrait éviter l'apparition de résistances.

Dans une autre étude cas/contrôle, l'observation de patients infectés par le VIH, a permis d'établir que la survenue d'une résistance au fluconazole était liée de façon significative à la durée du traitement par cet antifongique, au nombre de médicaments antirétroviraux utilisés et au statut immunitaire des patients. Globalement, la prévalence de la résistance aux azolés est de 1 à 3% chez les patients sous traitement HAART [193].

## **2. Résistance au fluconazole :**

Chez les sujets ayant reçu une allogreffe de moelle, soumis à un traitement prophylactique par 400 mg de fluconazole, on observe que 53% des patients ont eu au moins un prélèvement positif à *Candida non albicans*, essentiellement à *C.glabrata* 99% et *C.krusei* 100% résistants au fluconazole [194].

**Tableau 38 :** Prophylaxie par le fluconazole chez les patients ayant reçu une allogreffe de moelle : incidence sur la résistance au fluconazole de diverses espèces de *Candida*

<b>Espèces</b>	<b>n</b>	<b>Résistance aux fluconazole</b>
<i>C.albicans</i>	885	5,3%
<i>C.glabrata</i>	398	99%
<i>C.krusei</i>	80	100%
<i>C.lusitaniae</i>	20	30%
<i>C.tropicalis</i>	10	30%
<i>C.guilliermondii</i>	9	100%
<i>C.lipolytica</i>	2	100%

## **3. Résistance croisée aux azolés chez *Candida glabrata* :**

*C.glabrata* est actuellement la deuxième cause la plus fréquente de candidémies aux États-Unis, et cette infection est associée à une mortalité importante [194,195]. Une résistance microbienne au fluconazole apparaît rapidement, selon les données recueillies de 1993 à 2002 par le programme international de surveillance antifongique ARTEMIS (Global Antifungal Surveillance Program), 8,2% des isolats de *C.glabrata* avaient une CMI > 64 pg/ml pour le fluconazole et seulement 60% étaient réellement sensibles, selon des critères décrits dans des publications antérieures sur les limites d'interprétation des analyses [196,197]. L'utilisation de fluconazole semble être un des facteurs influençant l'incidence des infections à *C.glabrata* dans certaines régions géographiques [16]. Le

potentiel de résistance cliniquement significative, est devenu évident avec les récentes observations mettant en évidence l'apparition d'une candidémie à *C.glabrata* chez les patients sous fluconazole [198] et voriconazole [199], ainsi que l'apparition d'une résistance croisée dans les isolats prélevés dans la cavité buccale et la circulation sanguine [200].

Une étude a permis de déterminer la portée des résistances croisées aux nouvelles molécules azolées d'isolats de *C.glabrata* observée dans le cadre d'infection chez des receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques traités par les dérivés azolés. Sept cas de candidose invasive due à *C.glabrata* se sont produits chez des patients traités par dérivés azolés entre janvier 2000 et décembre 2004 au centre de recherche sur le cancer Fred Hutchinson. Plusieurs isolats de la série ont présenté des CMI relativement élevées vis-à-vis des dérivés azolés anciens (fluconazole) et récents (voriconazole) approuvés pour le traitement des candidémies. Cette observation a des implications thérapeutiques importantes, puisqu'elle suggère que *C.glabrata* peut présenter une résistance cliniquement significative à différents médicaments azolés [201]. Des séries de cas de ce qui semble être une résistance microbienne cliniquement significative sont décrites [202,198].

Deux études récentes ont examiné en détails le développement *in vitro* de la résistance croisée aux dérivés azolés. Une de ces études a évalué des isolats de *C.glabrata* recueillis dans des échantillons cliniques au cours d'une enquête hospitalière de 3 ans en Italie. Dans cette étude, qui incluait des isolats présentant des phénotypes résistants au fluconazole ou sensibles et dose-dépendants, on a observé une résistance croisée au voriconazole [203]. Dans une autre étude, les investigateurs ont observé l'acquisition rapide et stable d'une résistance croisée aux dérivés azolés dans des isolats de *C.glabrata* exposés au fluconazole par culture sériée au laboratoire [204].

Dans une autre étude exceptionnelle et intéressante portant sur une observation chez une patiente présentant une candidose invasive et une candidémie due à *C.glabrata*. La patiente a développé une résistance exceptionnelle à tous les antifongiques triazolés actuellement disponibles, après un traitement par le fluconazole. Ce cas a incité la détermination de la fréquence des résistances croisées parmi les isolats sanguins de *Candida* recueillis au cours d'une période de 12 mois dans le centre hospitalier [27].

La patiente présentait une infection intra-abdominale et sanguine due à *C.glabrata*. L'isolat de *C.glabrata*, initialement sensible *in vitro* au fluconazole, voriconazole et posaconazole, a développé une résistance croisée à tous les antifongiques triazolés actuellement disponibles, après un traitement par fluconazole, sans exposition antérieure connue aux triazolés à large spectre. Ce cas est similaire à une autre observation rapportée récemment, concernant un patient souffrant d'endocardite sur prothèse valvaire due à *C.parapsilosis* [205]. Malgré l'infection par un micro-organisme initialement sensible au fluconazole et au voriconazole, le patient de cette publication a développé une candidémie récidivante due à une souche apparemment identique de *C.parapsilosis* qui était résistante au fluconazole et au voriconazole. Ce patient avait reçu un traitement prolongé par fluconazole mais n'avait jamais été traité par voriconazole.

La rapidité avec laquelle l'isolat de *C.glabrata* de la patiente a développé une résistance aux triazolés actuellement disponibles est corroborée par le travail *in vitro* de Borst et coll., qui ont démontré que les isolats de *C.glabrata* obtenus avant l'introduction du fluconazole développaient une résistance stable au fluconazole, à l'itraconazole et au voriconazole après seulement 4 jours d'exposition au fluconazole. Ces auteurs ont conclu que l'acquisition rapide d'une résistance aux dérivés azolés chez *C.glabrata* pouvait survenir en l'absence de toute exposition antérieure à ces médicaments, et qu'elle était associée à l'expression accrue de gènes de transporteurs ABC [204]. Une autre étude sur les mécanismes de résistance des isolats de *C.glabrata* provenant de receveurs de greffe de cellules souches hématopoïétiques ayant reçu un traitement par fluconazole à titre prophylactique a montré que les CMI doubleraient, en moyenne, tous les 31 jours [205].

Ce qui est encore plus surprenant dans cette observation, c'est le fait que 24% des isolats sanguins de *Candida* évaluables pendant cette période avaient des CMI du fluconazole *in vitro* > 16 µg/ml, ce qui indique au moins une diminution de la sensibilité, et 11% étaient résistants, avec des CMI > 64 µg/ml. A l'exception de *C.krusei*, les isolats de *Candida* ayant des CMI du fluconazole < 64 µg/ml sont susceptibles d'être résistants *in vitro* au voriconazole. Ces résultats corroborent ceux de Pfaller et coll, qui ont montré que sur 12 796 isolats cliniques de *Candida*, la présence de CMI du fluconazole > 64 µg/ml permettait de prévoir une résistance au voriconazole, définie comme une CMI > 2 µg/ml

[199]. Une autre étude réalisée par Pfaller et coll. a démontré que la résistance au fluconazole n'était pas fréquente parmi les 3 932 isolats cliniques de *Candida* analysés (2,9%) mais qu'environ la moitié des isolats résistants au fluconazole avait des CMI du voriconazole et du posaconazole  $> 2 \mu\text{g/ml}$  [196].

Alors que la résistance au fluconazole et la résistance au voriconazole étaient relativement peu fréquentes dans les études citées ci-dessus, avec environ 3% des isolats ayant des CMI du fluconazole  $< 64 \mu\text{g/ml}$  et moins de 2% des isolats ayant des CMI du voriconazole  $> 2 \mu\text{g/ml}$  [196], la résistance à ces médicaments a été plus fréquente dans cette étude. Au moins 9 des 125 isolats sanguins (c'est-à-dire environ 7%) avaient des CMI du voriconazole  $> 2 \mu\text{g/ml}$ , ce qui souligne les différences géographiques de résistance aux dérivés azolés rencontrés dans le pays et dans le monde [206,112]. La plupart des isolats résistants de l'étude étaient des *C.glabrata* mais de nombreux isolats de *C.albicans*, *C.tropicalis* et *C.parapsilosis* avaient une sensibilité moindre ou une résistance aux deux médicaments. En revanche, il est intéressant de noter que les quelques isolats de *C.krusei* de l'étude étaient sensibles au voriconazole, une donnée mise en évidence par d'autres auteurs [196].

A la lumière des résultats de cette étude, il est indispensable d'effectuer d'autres études évaluant la relation entre résistance et évolution clinique afin de déterminer une approche thérapeutique efficace pour les patients souffrant de candidoses invasives.

L'analyse de cette littérature démontre donc que les isolats colonisant de *C.glabrata* peuvent acquérir une diminution de sensibilité à plusieurs dérivés azolés, y compris le voriconazole. Ce qui corrobore avec ce qui a été décrit dans nos résultats, puisque le voriconazole a été significativement actif contre toutes les espèces de *Candida* à l'exception de *C.glabrata* qui s'est révélée nettement moins sensible et plus résistante au voriconazole que toutes les autres espèces de *Candida*. De ce fait, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes moléculaires permettant aux isolats d'acquérir une résistance séquentielle à différents dérivés azolés. De plus, une prudence s'impose lorsqu'on envisage de traiter une candidémie à *C.glabrata* par le voriconazole dans une situation susceptible de générer une résistance au fluconazole. Les directives actuelles suggèrent que les cliniciens envisagent

l'utilisation d'antifongiques autres que le fluconazole pour le traitement des candidoses invasives, chez les patients ayant déjà été exposés aux dérivés azolés et dont l'état est instable ou qui sont infectés par des espèces connues pour être moins sensibles au fluconazole [207].

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

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

Le statut immunitaire et le type d'immunodépression sont les deux facteurs prédominants. La persistance d'une neutropénie profonde ou d'une thérapie immunosuppressive joue un rôle important, l'immunodépression paraît favoriser l'hétérogénéité génétique de *Candida* qui accélère le développement de mutants résistants. La présence de matériel étranger est un facteur aboutissant à la pérennisation de l'infection sous traitement antifongique par une mauvaise diffusion de l'antifongique l'importance de l'inoculum fongique. Enfin, la compliance du patient vis-à-vis de son traitement reste un facteur important et difficile à contrôler [182].

Les progrès thérapeutiques et la mise à disposition des dérivés de l'imidazole, moins toxiques que l'amphotéricine B, ont permis le développement du concept de traitement empirique précoce ou présomptif. Les traitements empiriques, qui sont susceptibles d'améliorer le pronostic, reposent sur l'identification de l'exposition à une succession de facteurs de risques que le clinicien doit s'entraîner à reconnaître. Leur prescription incontrôlée a toutefois été incriminée dans le développement et/ou la diffusion de souches résistantes, et leur utilisation doit être restreinte à certains groupes de patients clairement identifiés [208].

#### **IV.4.3 Evolution de l'épidémiologie des résistances :**

##### **1. Intérêt de la surveillance :**

Depuis ces dernières années, on note une évolution de l'épidémiologie des résistances aux différents antifongiques, spécialement aux azolés. La surveillance de la résistance aux antifongiques s'est aujourd'hui généralisée [18,20]. Plusieurs études sont réalisées continuellement dans le but d'évaluer la sensibilité des agents fongiques aux

antifongiques, qu'ils soient anciennement mis sur le marché ou en vue de commercialisation. Dans le premier cas, l'étude fournit des données sur l'apparition et le profil de résistance des espèces. Alors que dans le deuxième, elle évalue l'activité du nouvel antifongique par rapport aux autres molécules disponibles sur le marché.

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

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

- **Etude SENTRY** : L'étude SENTRY qui a porté sur 3 années (1997-1999) dans 74 sites (USA, Canada, Amérique latine et Europe) avait pour but d'étudier la sensibilité de *Candida* vis-à-vis du fluconazole, du voriconazole et du ravuconazole. La répartition de la sensibilité *in vitro* dans ces différents pays, toutes espèces confondues, oscille entre 98% pour l'Amérique latine et 90% pour les USA et l'Europe. Le fluconazole est actif dans les 4 aires géographiques. 90 à 98% des souches de *Candida sp.* sont sensibles avec une CMI  $\leq 8\mu\text{g/mL}$ . Quant au voriconazole et ravuconazole, leur efficacité est remarquée dans les 4 aires géographiques avec une sensibilité de 98 à 99% et une CMI entre 0,12 à 0,25  $\mu\text{g/mL}$  pour le voriconazole et entre 0,12 à 0,5  $\mu\text{g/mL}$  pour le ravuconazole [112].

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

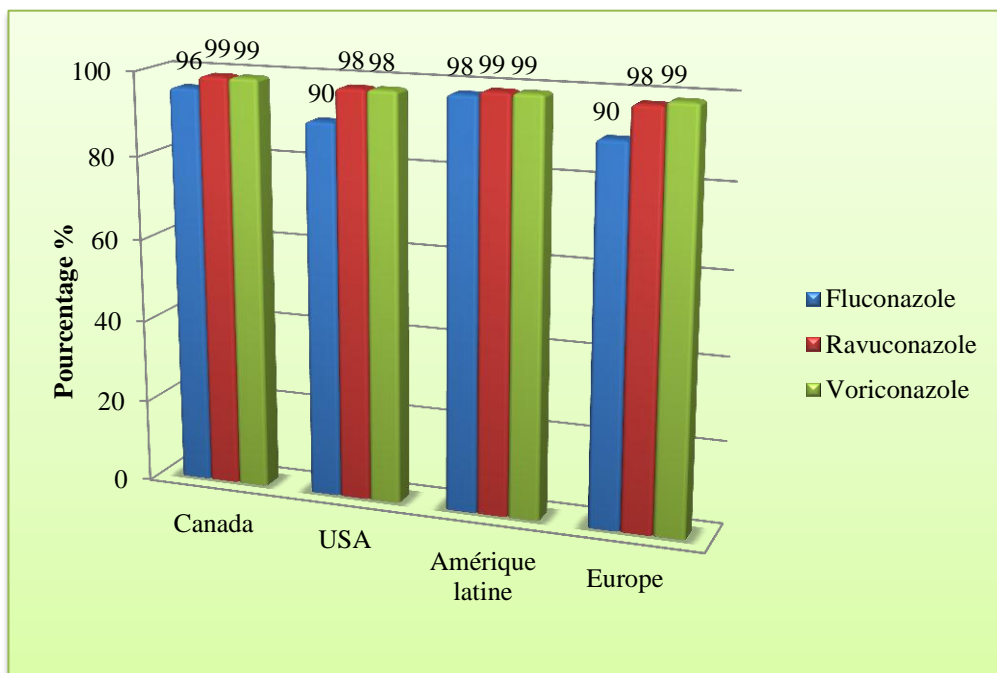


Figure 44 : Sensibilité de *Candida* au fluconazole, du voriconazole et du ravuconazole sur 3 années (1997-1999), SENTRY

Par rapport à notre étude, on note une sensibilité diminuée du voriconazole sur les souches de *Candida* isolées. Le voriconazole présente une sensibilité de 80% dans notre étude contre plus de 98% dans l'étude de ce programme international.

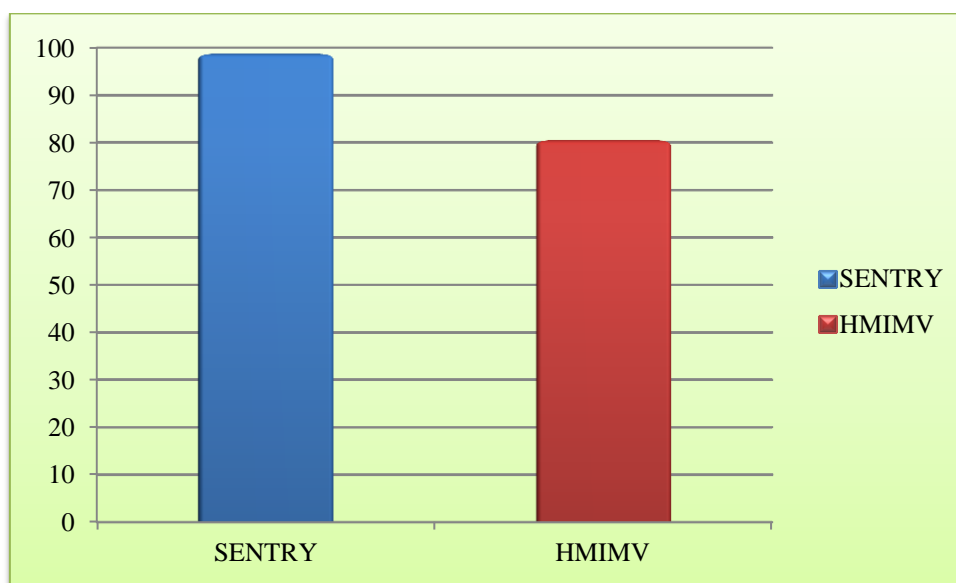
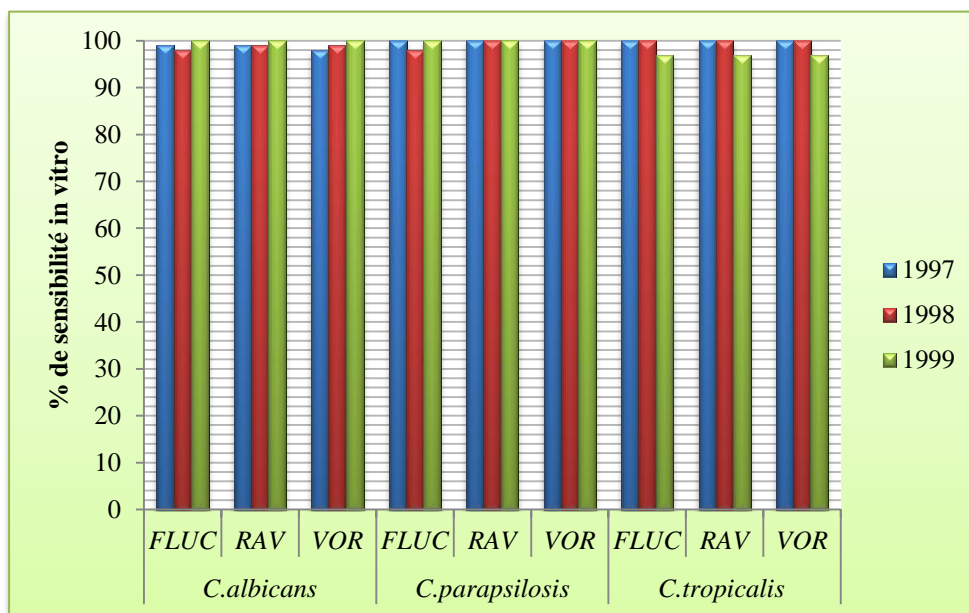


Figure 45 : Comparaison de la sensibilité au voriconazole de *Candida* entre l'étude de l'HMIMV et le programme SENTRY

Les isolats de *C.albicans*, *C.parapsilosis* et *C.tropicalis* sont hautement sensibles aux trois azolés avec une sensibilité allant de 97 à 100%. Cependant, concernant l'évolution de cette résistance au cours des trois années, il a été constaté que dans les années 1997 et 1998, quelques isolats de *C.albicans* étaient résistants au fluconazole. Ces mêmes isolats l'étaient aussi aux voriconazole et au ravuconazole. Ce qui reflète une possibilité de résistance croisée vis-à-vis des triazolés. Par contre, au cours de l'année 1999, une augmentation de la sensibilité vis-à-vis de l'itraconazole [209].



**Figure 46 :** Sensibilité des isolats de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, au voriconazole, au fluconazole et au ravuconazole sur 3 années (1997-1999), SENTRY

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

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

du fait de la résistance innée de *C.krusei* à cet agent [209].

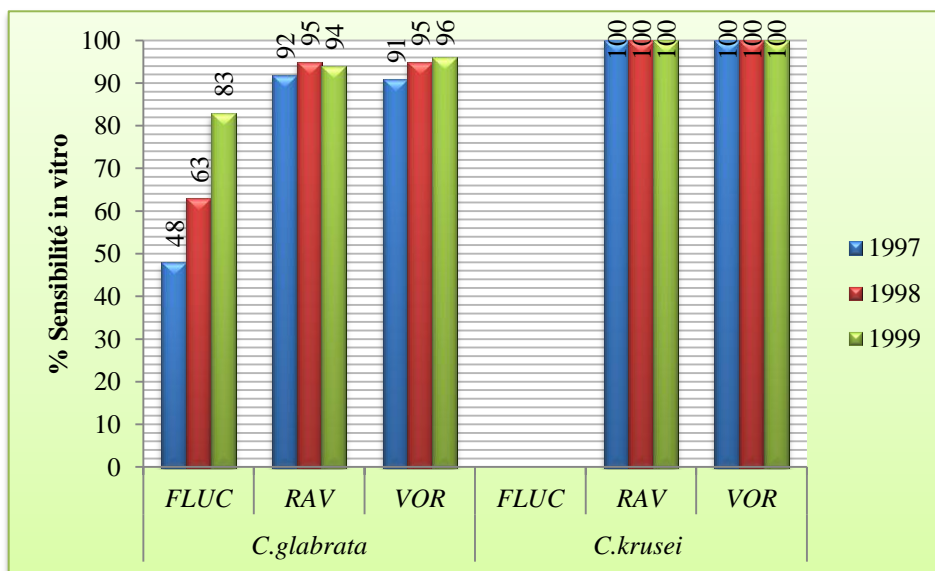


Figure 47 : Sensibilité des isolats *Candida glabrata*, *Candida krusei* au voriconazole, au fluconazole et au ravuconazole sur 3 années (1997-1999), SENTRY

Par rapport à notre étude, le taux de sensibilité retrouvé est inférieur ou égale à celui de ce programme. *Candida glabrata* de notre étude est nettement moins sensible avec 60% contre 94% pour le programme SENTRY.

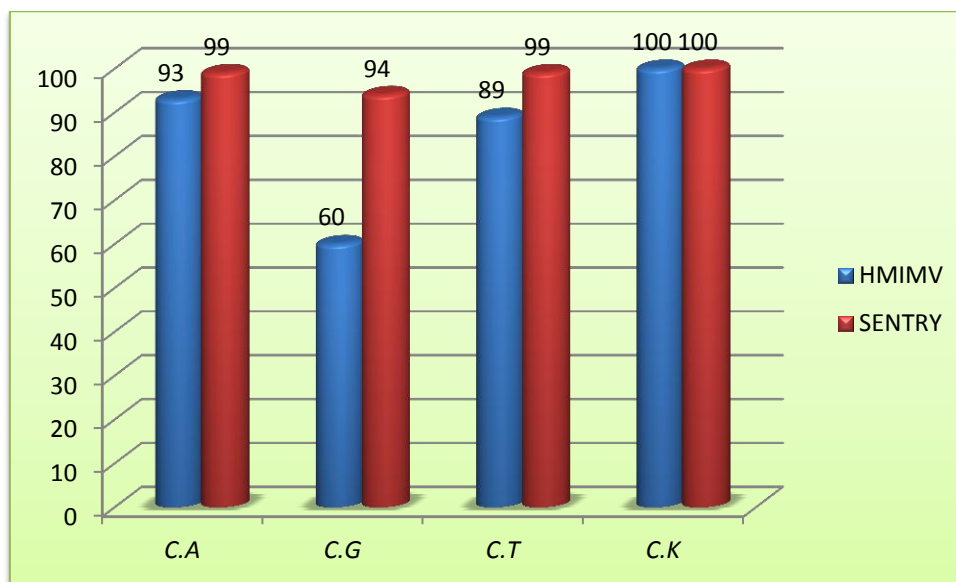


Figure 48 : Comparaison de la sensibilité au voriconazole vis-à-vis de *Candida* entre l'étude de l'HMIMV et le programme SENTRY

- **Etude ARTEMIS :** Le programme de surveillance ARTEMIS est connu comme étant un système mondial de surveillance des antifongiques le plus complet et le plus ancien [61, 198, 197, 210, 211]. Dans l'une de ses études récente publiée en 2005, les auteurs ont utilisé les résultats de ce programme pour évaluer les tendances globales de la sensibilité des levures au fluconazole et au voriconazole pendant une période de 6,5 ans dans 39 pays entre juin 1997 et décembre 2003. Au total, 134 715 isolats de *Candida sp.* ont été recueillis dans 127 centres médicaux répartis en Asie, Amérique latine, Europe, Moyen orient et en Amérique du nord. La sensibilité des souches a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé M-44 selon la technique préconisée par le CLSI [212].

Les valeurs seuils d'interprétation sont de :

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

✿ **Activité du voriconazole et du fluconazole:**

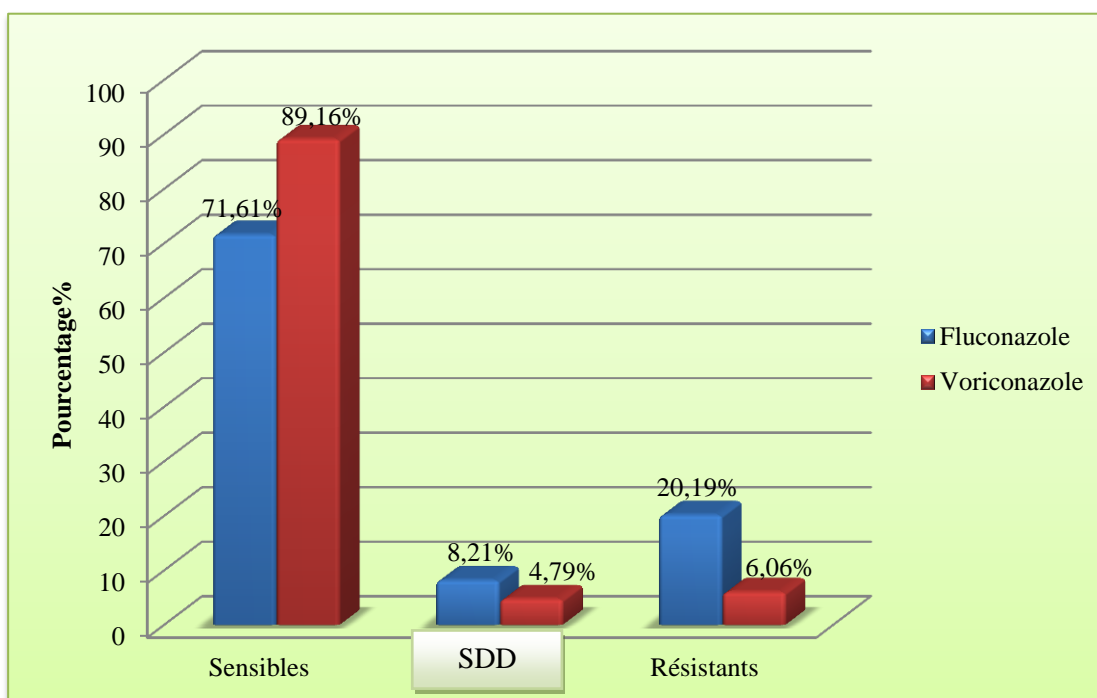
A l'issu des résultats de cette étude, le voriconazole, a montré qu'il est significativement plus actif que le fluconazole contre pratiquement toutes les espèces, hormis *C.tropicalis* avec 89,1% de sensibilité pour le fluconazole contre 87,1% pour le voriconazole. Globalement, 89,16% des souches sensibles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

Parmi les espèces présentant une sensibilité diminuée au fluconazole, plus de 80% étaient sensibles au voriconazole. De plus, parmi les souches de *C.glabrata* résistantes aux fluconazole, 30% ont été sensibles au voriconazole. Cependant, toutes les souches résistantes au voriconazole l'étaient aussi au fluconazole [197]. Bien que le voriconazole fût plus actif que le fluconazole contre *C.rugosa*, *C.lipolytica*, *C.zeylanoides*, ces espèces se sont révélées nettement moins sensibles et plus résistantes au voriconazole que toutes les autres espèces *Candida*. Ces données confirment et complètent les observations antérieures, spécialement concernant les espèces de *Candida* moins courantes [16, 196, 213, 214]. Bien que les résultats de l'étude soulignent l'existence de résistances croisée entre le fluconazole et le

voriconazole, ceci est variable selon l'espèce et ne doit pas être supposé en l'absence d'identification et de résultats de l'antifongogramme.

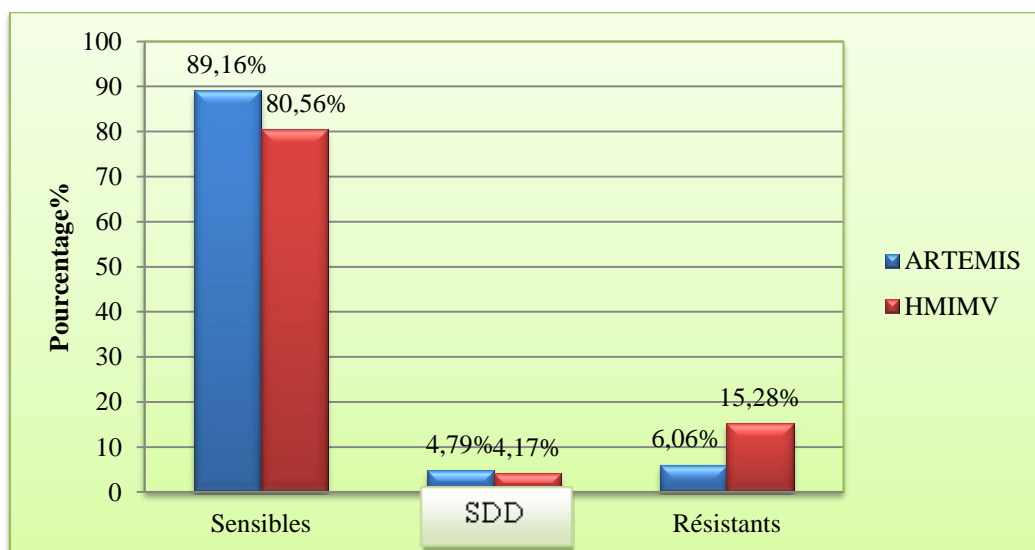
**Tableau 39 :** Sensibilité *in vitro* au fluconazole et au voriconazole des levures du genre *Candida*

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



**Figure 49 :** Comparaison entre l'activité du voriconazole et du fluconazole vis-à-vis des espèces de *Candida* isolées.

En comparaison des résultats de notre étude effectuée à l'HMIMV, le voriconazole présente une bonne activité contre les espèces de *Candida* mais avec uniquement 80,56% de souches sensibles contre 89,16% dans la présente étude (ce qui fait une différence de  $\approx 9\%$ ). Le taux de sensibilité dose dépendante quant à lui, s'est avéré proche entre les deux études (4,17% contre 6,06%). Cependant, le taux de résistance au voriconazole est distinctement supérieur avec un pourcentage de 15,28% dans notre étude contre 6,06% pour cette étude (ce qui fait une différence de  $\approx 9\%$ ). Il n'est pas de notre propos de parler d'augmentation de la résistance au voriconazole, surtout qu'il s'agit d'une comparaison avec des données à l'échelle mondiale et que des variations géographiques existent. De plus, s'agissant d'une première étude de son genre à l'HMIMV et au Maroc, l'absence d'études semblables de ce genre nous empêche de confirmer ce taux important de résistance. Toutefois cette constatation difficilement interprétable doit permettre la poursuite et la mise en place d'autres études pour confirmer cette tendance.



**Figure 50 :** Sensibilité du voriconazole vis-à-vis de *Candida* comparée entre l'étude de l'HMIMV et le programme ARTEMIS

#### **a) Sensibilité au fluconazole :**

Concernant la sensibilité de *Candida sp.* au fluconazole, l'étude a montré que celui-ci a été plus actif sur *C.albicans* (97,8%), *C.parapsilosis* (93,2%), *C.lusitaniae* (93,3%), *C.dubliniensis* (96,8%), *C.pelliculosa* (94,7%). Une sensibilité diminuée a été, par contre, observée pour *C.glabrata* (66,7%), *C.krusei* (9,4%), *C.guilliermondii* (9,8%), *C.rugosa*

(39,3%), *C.famata* (79,8%), *C.inconspicua* (25,7%), *C.norvengis* (50,0%), *C.lipolytica* (54,7%), *C.zeylanoides* (54,1%). Ces résultats confirment les données précédemment publiées concernant les espèces les plus courantes (*C.albicans*, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, et *C.krusei*) et accroissent fortement les connaissances sur la présence ou l'absence d'activité du fluconazole sur les espèces moins fréquemment isolées (*C.rugosa*, *C.inconspicua*, *C.norvegensis*) [213-218].

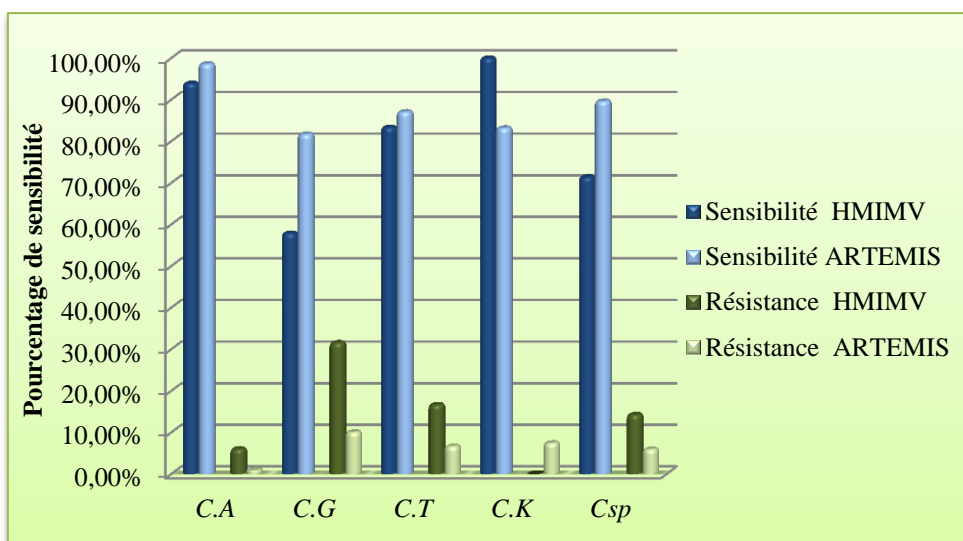
**b) Sensibilité au voriconazole :**

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

Par rapport à notre étude de l'HMIMV, cette étude montre des taux de sensibilité supérieurs aux différentes espèces de *Candida*. Les résultats des deux études étaient proches pour *C.albicans* et *C.tropicalis*, alors que la grande différence était nette pour *C.glabrata*. Effectivement, pour *C.albicans*, le taux de sensibilité était proche à celui de la présente étude avec un pourcentage de 93,9% (contre 98,6%) avec une différence de 4,6%. C'est le cas aussi de *C.tropicalis* avec une différence de 3,8% (83,33% contre 87,1%). *C.glabrata* a montré, quant à elle, une différence marquée de plus de 23% avec un pourcentage de sensibilité de 57,89% contre 81,7%. La seule et unique souche de *C.krusei* était sensible au voriconazole.

**Tableau 40 :** Comparaison de l'activité du voriconazole contre les différentes espèces de *Candida* entre l'étude de l'HMIMV et d'ARTEMIS

Espèces	Sensibilité en pourcentage		Resistance en pourcentage	
	Etude HMIMV	Etude ARTEMIS	Etude HMIMV	Etude ARTEMIS
<i>C.albicans</i>	93,94%	98,6%	6,06%	1,0%
<i>C.glabrata</i>	57,89%	81,7%	31,58%	10,1%
<i>C.tropicalis</i>	83,33%	87,1%	16,67%	6,7%
<i>C.krusei</i>	100%	83,2%	0%	7,5%
<i>Candida sp.</i>	71,43%	89,66%	14,29%	5,97%



**Figure 51:** Comparaison entre l'étude de l'HMIMV et d'ARTEMIS concernant l'activité au voriconazole des différentes espèces de *Candida*

✿ **Evolution de la résistance :**

**a) Au fluconazole :**

L'évolution de la résistance des *Candida sp.* au fluconazole sur la période a montré qu'aucune augmentation ou diminution notable par rapport au temps des degrés de résistance au fluconazole de *C.albicans* et de *C.glabrata* n'a été observée. Alors que le degré de résistance des isolats de *C.tropicalis* avait diminué entre 1997-1998, des augmentations ont été constatées en 2002 et en 2003. Un léger accroissement des résistances a été observé au cours du temps pour *C.parapsilosis* et *C.kefyr*, alors qu'une forte augmentation de résistance a été constatée pour les souches de *C.rugosa*. Bien que *C.famata* soit apparu relativement résistante au fluconazole en 1997 et 1998, cela doit être imputé au faible nombre de souches étudiées. Au cours des cinq années suivantes, le nombre d'isolats de *C.famata* ayant progressivement augmenté jusqu'à dépasser 50 par an, le niveau de résistance s'est stabilisé entre 10 et 12%. Malgré l'augmentation du pourcentage globale d'isolats de *C.kusei* résistantes au fluconazole, cette observation n'est pas significative car cette espèce doit être considérée cliniquement résistante à cet antifongique. Le CLSI recommande de ne pas tester la sensibilité de cette espèce au fluconazole [33,62].

**b) Au voriconazole :**

Concernant l'évolution de la résistance au voriconazole des souches de *Candida sp.* depuis

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

✿ **Variations géographiques de la sensibilité au fluconazole et au voriconazole :**

Pour les espèces de *Candida* les plus courantes, *C.albicans* et *C.glabrata*, la sensibilité *in vitro* au fluconazole et au voriconazole a été stratifiée par zone géographique et par pays d'origine pour la période 2001-2003. Le but étant de nuancer l'existence des variations géographiques de la sensibilité à ces deux antifongiques.

**Tableau 41 :** Variations géographiques des sensibilités *in vitro* au fluconazole et au voriconazole de *C.albicans* et de *C.glabrata*

Région/pays	Sensibilité						
	Antifongique	<i>C.albicans</i>			<i>C.glabrata</i>		
		Nbr	S%	R%	Nbr	S%	R%
Amérique latine Argentine	Fluconazole	1 595	97,6	1,4	335	74	14,9
	Voriconazole	1 458	99,5	0	318	84,9	4,4
Brésil	Fluconazole	1 401	99,6	0,1	410	94,9	3,9
	Voriconazole	1 288	91,2	0	405	96,8	1
Colombie	Fluconazole	1 315	94,9	6,1	99	75,8	17,2
	Voriconazole	1 263	91,6	4	90	80	7,8
Equateur	Fluconazole	1 169	96,4	4,9	33	60,6	27,3
	Voriconazole	1 093	91,6	0,7	33	66,7	12,1
Mexique	Fluconazole	186	96,4	1,1	15	86,7	13,3
	Voriconazole	179	98,4	1,7	15	73,3	6,7
Venezuela	Fluconazole	550	94,4	2,7	48	29,2	60,4
	Voriconazole	525	96,6	2,5	49	32,7	38,8
Amérique du nord Canda	Fluconazole	297	100	0	117	90,6	5,1
	Voriconazole	297	100	0	117	95,7	1,7
Etats unis	Fluconazole	2 638	94,8	4,4	1 159	75,9	19,3
	Voriconazole	2 644	97	2,2	1 161	82,1	9,7

*C.albicans*, et à l'exception des isolats prélevés en Inde, s'est montrée hautement sensible au fluconazole et au voriconazole. Aucune différence significative entre les profils de sensibilité après stratification par type de prélèvement ou site hospitalier. En contrepartie, *C.glabrata* a

montré une sensibilité variable selon le pays, la zone géographique, le type de prélèvement et la structure hospitalière. Les taux globaux de résistance des isolats de *C.glabrata* au fluconazole ont atteint 10,6% en Asie-Pacifique, 13,2% en Amérique latine, 16,5% en Europe et 18% en Amérique du nord. Ces résultats sont nettement plus élevés dans chaque zone géographique que ceux précédemment rapportés pour les isolats de *C.glabrata* provenant d'échantillons sanguins et de sites normalement stériles testés par la méthode de microdilution en milieu liquide de 1992 à 2000 [16].

Les isolats provenant d'échantillons sanguins et de sites normalement stériles se sont révélés les plus sensibles au fluconazole. Les taux de résistance les plus élevés ont été constatés pour les isolats de *C.glabrata* provenant d'unités de soins intensifs chirurgicaux (21,3%), de services de gynécologie-obstétrique (21,5%), d'hématologie et d'oncologie (22,6%) et d'unités de soins intensif néonataux (35%).

Le voriconazole a montré une activité supérieure ou égale à celle du fluconazole contre les isolats de *C.glabrata* collectés dans l'ensemble des pays et des zones géographiques. Les taux globaux de résistances des isolats de *C.glabrata* au voriconazole ont atteint 4,1% en Asie et dans le Pacifique, 5,4% en Amérique latine, 5,6% en Europe et 9% en Amérique du nord.

Les précédentes observations des auteurs sur la mesure des CMI par la méthode de dilution en milieu liquide avaient mis en évidence des taux de résistance compris entre 2,2% et 5,4% pour les tests effectués en 2001 et 2002 sur les isolats de *C.glabrata* provenant d'échantillons sanguins et de sites normalement stériles [197].

Comme cela a été observé pour *C.albicans*, la sensibilité de *C.glabrata* au voriconazole a montré une légère variation après stratification en fonction du type de prélèvement. Les isolats provenant d'échantillons sanguins et de sites normalement stériles se sont avérés les plus sensibles au voriconazole (81%). Les taux de résistance au voriconazole en fonction des sites hospitaliers ont varié de 2,5% dans les unités de soins intensifs néonataux à 8,2% dans les services d'hématologie et d'oncologie. Une légère variation a été observée pour la sensibilité au voriconazole de *C.glabrata* après stratification par prélèvement. Les isolats provenant des sites périphériques se sont avérés plus sensibles au voriconazole avec un pourcentage de 57,89% contre 55,56% pour les hémocultures. Le taux de résistance, quant à lui, était plus élevé pour les hémocultures avec 33,33% contre 31,58% pour les sites périphériques. En

contrepartie, toutes les souches de *C.albicans* isolées des hémocultures (uniquement trois souches) ont été sensibles au voriconazole. Pour les souches isolées des sites périphériques, la sensibilité était de 93,94%.

Dans notre étude, il est éminent que les souches provenant des sites périphériques ont montré une sensibilité supérieure par rapport à celle provenant des hémocultures avec des pourcentages de 83,33% et 66,67% respectivement. Les souches des hémocultures se sont avérées plus résistantes avec un pourcentage de résistance de 25% contre 13,33% pour les sites périphériques. Cela peut être imputé au faible nombre de souches d'hémocultures étudiées.

#### **- Autres études :**

Dans une étude dans CHU Timone Marseille, les auteurs ont analysé la tendance sur 20 mois (de février 1997 à septembre 1998) de la sensibilité de *C.albicans* aux antifongiques. Au total, 23 095 prélèvements provenant de 2 464 malades hospitalisés dans des services à haut risque sont parvenus au laboratoire de mycologie.

L'analyse des données montre que 8 076 souches ont été isolées. 64,3% étaient représentées par *C.albicans*, 14,5% par *C.glabrata*. Le profil de sensibilité aux antifongiques pour *C.albicans* montre une diminution significative de la résistance au fluconazole, qui passe de 8,6% au début de l'étude à 0,7% à sa fin. Les résultats sont similaires pour l'itraconazole avec une résistance variant de 7,1% au début à 0,7% à la fin. Le pourcentage moyen des résistances est plus élevé dans les souches provenant de malades VIH+. Pour la flucytosine, aucune variation n'est observée (4,7%-2,6%). Toutes les souches se sont avérées sensibles à l'amphotéricine B et au kétoconazole [219].

Une autre étude, réalisée sur une période d'un mois en octobre 2004, a été proposée à 209 biologistes répartis dans 193 hôpitaux en France [1]. Cette étude était effectuée dans le cadre de l'enquête annuelle de surveillance des résistances des hôpitaux français non universitaires affiliés au collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH). Chaque centre devait recenser de façon prospective les épisodes de septicémies, incluant les candidémies. Les tests de sensibilité aux antifongiques ont été réalisés par les biologistes selon leur méthodologie habituelle et ont été réévalués par technique E-test® (AB Biodisk) sur milieu RPMI (AB Biodisk®).

La répartition des espèces au cours de ces 46 épisodes de candidémies est la suivante : 23 *C.albicans* (50 %), 13 *C.glabrata* (28,3 %), cinq *C.tropicalis* (10,9 %), trois *C.parapsilosis* (6,5 %), un *C.krusei* (2,2 %) et un *C.kefyr* (2,2 %).

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

Toujours en France, une autre étude prospective observationnelle a été conduite de janvier à décembre 2004 dans sept centres hospitaliers universitaires et dix centres hospitaliers non universitaires, membres du Groupe d'Epidémiologie et de Recherche en Infectiologie Clinique du Centre-Ouest (GERICCO) [220]. Tous les patients présentant une candidémie ont été inclus. L'étude de la sensibilité aux antifongiques des souches de *Candida* était réalisée soit par les méthodes de référence du Clinical and Laboratory Standards Institute, anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI) [221] ou de l'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [222], soit par bandelette E-test. Un antifongogramme a été réalisé pour 142 des 193 souches (79 souches de *C.albicans*, 27 souches de *C.glabrata*, 18 souches de *C.parapsilosis*).

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

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

Le voriconazole restait le plus souvent actif sur les souches de *C.glabrata* de sensibilité dose-dépendante au fluconazole, avec sept souches sur huit qui étaient sensibles. Toutefois, il existait un certain degré de résistance croisée entre ces deux molécules, les trois souches résistantes au fluconazole étant aussi résistantes au voriconazole. Cette résistance croisée

entre les différents azolés vis-à-vis de *C.glabrata* a fréquemment été rapportée, et de nombreux auteurs recommandent la plus grande prudence avant d'envisager de traiter une infection invasive à *C.glabrata* par un antifongique de cette famille, notamment lorsqu'il existe une pré exposition au fluconazole [8, 27, 201].

À l'égard de ce qui a été restitué dans la littérature sur l'épidémiologie des résistances, notre étude rapporte un taux de résistance au voriconazole plus important notamment pour les souches provenant des hémocultures. *C.glabrata* est l'espèce la plus isolée des hémocultures et celle présentant la moindre sensibilité au voriconazole parmi toutes les souches de *Candida* isolées. Les résultats de notre étude devront être confirmés par d'autres études complémentaires et comparatives, surtout qu'il s'agit d'une première de son genre à l'HMIMV (Maroc). L'absence d'études semblables de ce genre nous empêche de confirmer ces tendances épidémiologiques. Cette étude devra cependant être à l'origine d'autres études de surveillance épidémiologiques des résistances, et refléter la volonté de notre établissement de s'inscrire dans une démarche d'amélioration de la connaissance de l'épidémiologie des résistances aux antifongiques pour une meilleure prise en charge des patients.

# *Conclusion*

## **V. Conclusion :**

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

Une famille d'antifongiques cantonnée en quatre classes ;

Un spectre antifongique étroit ;

Une toxicité élevée ;

Une absence de forme orale.

Faire face à cette menace nécessite l'utilisation plus large des antifongiques existants et incite l'industrie pharmaceutique à rechercher de nouvelles molécules afin de mettre à disposition des professionnels de santé l'antifongique idéal. Celui-ci devrait avoir un spectre d'activité large et être plus au moins fongicide, ne pas présenter d'interférences négatives et être doué de propriétés pharmacocinétiques favorables et d'une faible toxicité. Il devrait, en outre, être disponible tant par voie orale que par voie intraveineuse. Enfin, il devrait avoir démontré son efficacité dans des essais randomisés portant sur des populations à risque. Le voriconazole est un produit récemment introduit sur le marché. Depuis sa commercialisation en 2003, ce médicament constitue une avancée dans le traitement de première intention des infections fongiques invasives.

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

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

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

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

L'amélioration de la prise en charge des patients nécessite de connaître l'évolution épidémiologique des agents pathogènes et de leur résistance aux différents antifongiques. Chose qui souligne l'importance de la surveillance et l'intérêt majeur de la réaliser d'une manière constante. De la sorte, notre étude devrait refléter la volonté de notre établissement de s'inscrire dans une démarche d'amélioration de la connaissance de l'épidémiologie des résistances aux antifongiques. Les résultats de notre étude devront être confirmés par d'autres études complémentaires et comparatives, surtout qu'il s'agit d'une première de son genre à l'HMIMV (Maroc).

# *Résumés*

## RESUME

**Titre de la thèse :** Etude de la sensibilité *in vitro* au voriconazole de 72 souches de *Candida* isolées à l'Hôpital Militaire d'Instruction Mohammed V

**Auteur de la thèse:** Houda ALEM

**Directeur de thèse :** Pr B.E. LMIMOUNI

**Mots clés :** Genre *Candida* – Antifongigramme – voriconazole – Sensibilité *in vitro* – Surveillance

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

**Objectifs :** Etablir le profil de sensibilité phénotypique des souches de *Candida* au voriconazole dans les services de réanimation de l'HMIMV.

**Matériels et méthodes :** Notre étude prospective a inclus 72 souches de *Candida* issues de prélèvements divers (hémocultures et sites périphériques) provenant de patients hospitalisés dans les différents centres de Réanimation. La culture et l'identification des souches de *Candida* étaient faites sur milieu d'isolement Candiselect® et la sensibilité *in vitro* au voriconazole était réalisée par diffusion en milieu gélosé des disques.

**Résultats :** Parmi les prélèvements effectués, 17% étaient des hémocultures et 83% des sites périphériques. *Candida non albicans* représentait 54% alors que *C.albicans* ne représentait que 46%. La répartition des espèces non *albicans* était : *C.glabrata* (26%), *C.tropicalis* (17%) et *C.krusei* (1%). Les hémocultures à *Candida glabrata* représentaient les 3/4, alors que celles à *C.albicans* ne représentaient que le 1/4. Le voriconazole avait une bonne activité sur toutes les espèces de *Candida* : plus de 80% étaient sensibles et 15% résistantes. Il était plus actif sur *C.albicans* avec une sensibilité de 94% et *C.tropicalis* avec 83%. Pour *C.krusei*, la seule souche isolée était sensible. Une sensibilité diminuée était observée pour *Candida glabrata* avec 56%.

**Discussion :** Contrairement à la littérature, la distribution des espèces dans notre étude montre une prédominance de *Candida non albicans* sur *C.albicans*. *C.glabrata* est l'espèce la plus isolée après *C.albicans*. Elle est isolée en première ligne des hémocultures, ce qui diffère des données des Etats-Unis où elle représente la deuxième cause de candidémie. Le voriconazole est actif sur toutes les espèces de *Candida* sauf *C.glabrata*, dont l'activité reste diminuée surtout dans les candidémies. Néanmoins, ce médicament reste une meilleure alternative que le fluconazole en traitement de première intention des candidémies.

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

## ملخص:

**العنوان:** دراسة حساسية الفوريكونازول (Voriconazole) ل72 سلالة مبيضية (*Candida*) معزولة بالمستشفى العسكري بالرباط .

**الطالبة:** هدى عالم

**المؤطر:** البروفيسور بدر الدين لميموني.

**الكلمات الأساسية:** دراسة الحساسية, مضادات الفطريات, المراقبة, المبيضات, الفوريكونازول (Voriconazole).

**الأهداف:** تتجلى أهداف دراستنا في تقييم مؤهلات الحساسية لسلالة المبيضات للفوريكونازول مع تحديد معدلات المقاومة و وصف وبائياتها في وحدات العناية المركزة.

**المواد و الأساليب:** دراستنا الاستطلاعية التي استمرت شملت 72 سلالة مبيضية (*Candida*) استخرجت من مختلف العينات (دم و مواقع هامشية). المرضى الذين تم دمجهم في الدراسة هم المرضى المعالجين في مختلف مصالح الإنعاش. تم تحديد سلالات المبيضات عن طريق وضعها في وسط عزل (Candiselect®) و تمت دراسة الحساسية في المختبر للفوريكونازول (Voriconazole) و عن طريق نشر الأفراس في وسط أغار.

**النتائج:** من بين العينات المأخوذة, كانت 17% عينات دموية و 83% عينات من مواقع هامشية. شكلت *Candida non albicans* أكثر نسبة 54%, في حين شكلت *C.albicans* سوى 46%. لقد تم تحديد 4 أنواع مختلفة من المبيضات, كانت *C.albicans* الأكثر انتشارا ب 46% متبوعة ب *C.glabrata* ب 26% ثم ب *C.tropicalis* ب 17% ثم ب *C.krusei* ب 1%.

في ما يخص الاستتبات الدموية, شكلت *C.glabrata* ثلاثة أرباع بينما شكلت *C.albicans* سوى الربع. أبرزت نتائج الحساسية للفوريكونازول (Voriconazole) عن نشاط جيد لهذا الدواء على كافة أنواع المبيضات (*Candida*). 80% من الأنواع كانت حساسة و 4% متوسطة و 15% مقاومة. كان الفوريكونازول (Voriconazole) أكثر نشاطا على *C.albicans* و *C.tropicalis* حيث بلغت نسبة الحساسية على التوالي 94% و 83%. بالنسبة ل *Candida krusei* تم عزل سلالة واحدة فقط و كانت حساسة. لقد لوحظ انخفاض في حساسية *Candida glabrata* للفوريكونازول (Voriconazole) حيث كانت النسبة في حدود 56%. تراوحت نسبة المقاومة بين 32% ل *Candida glabrata* و 17% ل *Candida tropicalis* و 6% ل *Candida albicans*.

**المناقشة:** إن توزيع الأنواع, كما تدل باقي الدراسات, تبين غلبة *Candida non albicans* على *Candida albicans*. من كل العينات, *Candida glabrata* هي النوع الأكثر عزلة من بين كل المبيضات بعد *Candida albicans*. في حين تم عزلها عند أغلبية المرضى من الاستتباتات الدموية حيث أنها شكلت الرتبة الأولى, مما يختلف عن البيانات الأمريكية حيث تمثل *C.glabrata* السبب الثاني في تعفن الدم. أظهر الفوريكونازول (Voriconazole) نشاطا مهما على كافة أنواع المبيضات المعزولة, إلا أنه أظهر نشاطا عشوائيا ضد *Candida glabrata* خاصة تلك المعزولة من الدم. و مع ذلك يبقى هذا الدواء بديل أفضل من الفلوكونازول (Fluconazole) في علاج التعفنات المبيضية.

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

## SUMMARY

**Title:** A prospective study of sensitivity to voriconazole of 72 strains of *Candida* isolated at the Mohammed V's Military Instruction Hospital

**Author:** Houda ALEM

**Supervisor:** Prof. B.E. LMIMOUNI

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

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

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

**Materials and methods:** Our prospective study included 72 *Candida*'s strains from various samples (blood and peripheral sites) isolated from hospitalized in the intensive care units. Identification of *Candida*'s strains was done on the medium Candiselect® and *in vitro* susceptibility to voriconazole was performed by agar diffusion discs.

**Results:** Of the samples taken, 17% was represented by blood cultures and 83% was represented by peripheral sites. *Candida non albicans* accounted 54%, while *C.albicans* accounted for only 46%. 4 different *Candida*'s species were identified. *C.albicans* was the most frequent with 46% followed by *C.glabrata* with 26%, *C.tropicalis* with 17% and *C.krusei* with 1%. Blood cultures with *C.glabrata* accounted for three quarters, while those with *C.albicans* accounted for only one quarter. Voriconazole had a good activity against all species of *Candida*. Over 80% were susceptible, 4% intermediate and 15% resistant. Voriconazole was more active on *C.albicans* with a sensitivity of 94% and *C.tropicalis* with 83%. For *C.krusei*, the only strain isolated was sensitive. Decreased susceptibility was observed for *C.glabrata* with 58%. Resistance rates were 32% for *C.glabrata*, 17% for *C.tropicalis* and 6% for *C. albicans*.

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

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

## Références bibliographiques:

- [1] **Eloy O, Blanc V, Pina P, Gaudart A, Bressolle M-L, Plainvert C, Decousser J-W, Pangon B, Allouch P-Y, le Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (Co1BVH).** Épidémiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique Co1BVH. *Pathologie Biologie* **2006**; 54 : 523-530
- [2] **Lanternier F, Lortholary O.** Anidulafungine : une nouvelle option thérapeutique dans les candidoses systémiques. *Médecine et maladies infectieuses* **2010**; 40 : 440-448
- [3] **Paterson DL , Singh N.** *Aspergillus* infections in transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* **2005**; 18: 44-69.
- [4] **Wisplinghof H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clin Infect Dis* **2003**; 36:1103-10.
- [5] **Darty A, Thellier M, Traoré B, Alfa Cissé O, Danis M.** Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques: antifongigramme, point sur les résistances, données pharmacologiques. *Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS* **2001**; 20 : 389-93
- [6] **Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al.** A prospective observational study of candidemia: Epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* **2003**; 37:634–43.
- [7] **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Ng KP, Colombo A, et al.** Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: A global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* **2008**; 46: 842–9.
- [8] **Pfaller MA, Diekema DJ.** Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **2007**;20:133–63.

- [9] **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al.** *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* **2008**; 46:515–21.
- [10] **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.
- [11] **Costa-de-Oliveira S, Pina-Vaz C, Mendonca D, Goncalves Rodrigues A.** A first Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2008**; 27:365–74.
- [12] **Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie-White S, Wilcox S, et al.** Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: A case control study using data from population-based candidemia surveillance. *Infect Control Hosp Epidemiol* **2005**; 26:540–7.
- [13] **Anane S, Khalfallah F.** Diagnostic biologique des candidoses systémiques: difficultés et perspectives. *Pathologie Biologie* **2007** ; 55 : 262-272
- [14] **Dupont B.** Nouveaux antifongiques : voriconazole et caspofungine. *Archives de pédiatrie* **2003** ; 10 Suppl. : 592s-598s
- [15] **Dannaoui E.** Intérêt des tests de sensibilité *in vitro* dans la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives. In: conférence de consensus commune SFAR, SPILF. Paris: SRLF, *Elsevier Ed*; **2004**. p. 52-9.
- [16] **Pfaller MA, Diekema DJ.** International fungal surveillance participant group. 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.

- [17] **Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Kibbler CC, Faure O, et al.** Epidemiology of candidemia 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.
- [18] **Redding SW, Pfaller MA, Messer SA, et al.** Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *C.albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering from one or more episodes of infection. *J Clin Microbiol* **1997**; 35:1761-5.
- [19] **Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS., EspinelIngroff A., Ghannoum MA., et al.** Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of *in vitro-in vivo* correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infection. *Clin Infect Dis* **1997**; 24:235-47.
- [20] **Richet H, Roux P, Des Champs C, Esnault Y, Andremont A, French Candidemia Study Group.** Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol Infect* **2002**; 8:405-12.
- [21] **Barchiesi F, Azzeni D, De Prete MS, Sinicco A, Falconi di Francesco L, Pasticci MB et al.** Fluconazole susceptibility and strain variation of *Candida albicans* isolates from HIV infected patients with oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* **1998**; 41:541-8.
- [22] **Bosehman CR, Bodnar UR, Tornatore MA, Obias AA, Noskin GA, Englund et al.** Thirteen years evolution of azole resistance in yeast isolates and prevalence of resistance strains carried by cancer patients at a large medical center. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42:734-8.
- [23] **White A, Goetz MB.** Azole resistant *C.albicans*; report of two cases of resistance to fluconazole and review. *Clin Infect Dis.* **1994**; 19: 687-92

- [24] **Éloy O, Lemaire P, Roubache JF, Pina P, Favre A, Chenard C, Decousser JW, Greder Belan A, Ghnassia J-C.** Acquisition de la résistance aux azolés de *C.albicans* au cours de candidoses oropharyngées chez le sujet VIH<sup>+</sup>. *J. Mycol. Méd.* **1998** ; 8 : 78-82.
- [25] **Sanglard D.** Mécanismes de résistance. In : Infections fongiques : Résistances et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : *Optimed Ed* **2003** : 29-46
- [26] **Morin O.** Historiques des antifongiques et évolution de l'épidémiologie. In : Infections fongiques : résistances et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : *Optimed Ed* **2003** : 11-28
- [27] **Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG.** Résistance 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
- [28] **Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M.** Comparison of the antifungal susceptibility testing subcommittee of the European committee on antibiotic susceptibility testing proposed standard and the Etest® with the NCCLS broth microdilution method for voriconazole and caspofungin susceptibility testing of yeast species. *J Clin Microbiol* **2002**; 40:3841-4.
- [29] **Drouhet E, Barale T, Bastide J, Mallié M, Biava MF, Kures L, et al.** Standardisation de l'antibiogramme antifongique. Rapport du groupe d'études de la Société française de mycologie médicale. *Bull Soc Myc Med* **1981**; 10:131-4.
- [30] **Druetta A, Freydière A, Guinet R, Gille Y.** Evaluation of five commercial antifungal susceptibility testing systems. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1993**; 12:336-42.
- [31] **European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing.** EUCAST discussion document E.Dis 7.1 June 2002. Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect* **2003**; 9:1-8.

- [32] **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Approved standard M38-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **1998**, Wayne, PA.
- [33] **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast, 2nd ed. Approved standard M27-A2. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **2002**, Wayne, PA.
- [34] **Pfaller JB, Messer SA, Hollis RJ, Diekema DJ, Pfaller MA.** *In vitro* susceptibility testing of *Aspergillus spp.*: comparison of Etest® and reference microdilution method for determining voriconazole and itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* **2003**; 41:1126-9.
- [35] **Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ.** Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion and Etest® methods: report from the ARTEMIS global antifungal susceptibility program, 2001. *J Clin Microbiol* **2003**; 41:1440-6.
- [36] **Chabasse D, Guiguen C, Contet-Audonnet N.** Mycologie médicale. *Masson* **1999** : 122-125
- [37] **Grillot R, Lebeau B, Alderbert D, Faure O, Bille J, Woff M.** Corrélation *in vitro/in vivo*. Détermination de la sensibilité aux antifongiques au laboratoire. In: Infections fongiques: résistances et nouvelles modalités thérapeutiques, JIDIF : *Optimed Ed* **2003** : 47-71
- [38] **Ariane G.** Comparaison de méthode de deux antifongogramme : ATB FUNGUS3® et carte Vitek AST-YS01®. ICHV, laboratoire de bactériologie, Sion. *Travail de diplôme; 2008-2009*
- [39] **Eraso E, Ruesga M, Villar-Vidal M, Javier Carrillo-Muñoz A, Espinel-Ingroff A and Quindós G.** Comparative evaluation of ATB Fungus 2 and Sensititre YeastOne panels for testing *in vitro* *Candida* antifungal susceptibility. *Rev Iberoam Micol* **2008**; 25: 3-6

- [40] **Durussel C, Parreno D, Nougier L, Monnin V, Zambardi G, Bille J.** Comparative study of various methods, NCCL M27-A2, EUCAST and ATB Fungus 2 (bioMérieux) for the *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida sp.* *Clin Microbiol Infect* **2004**; 10 (Suppl. 3): 112-113.
- [41] **Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E.** *In vitro* susceptibilities to yeasts using the ATB FUNGUS 2 method, compared with Sensititre Yeast One and standard CLSI (NCCLS) M27-A2 methods. *J Antimicrob Chemother* **2007**; 60: 658-661.
- [42] **Sevtap A, Rex J.** Fungal drug resistance essays. In Antimicrobial Drug Resistance: Clinical and Epidemiological Aspects. Volume 2: Clinical and epidemiological aspects. *Springer* **2009**: 1171-1187
- [43] **Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing.** Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by brut h dilution of fermentative yeasts. EUCAST Discussion Document E.Dis 7.1. Munich, Germany: *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Jonc* **2002**.
- [44] **Cuenca-Estrel la M, Moore CB, Barchiesi F. Billet, Chryssanthou E, Denning DW et al.** Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* **2003**; 9(6):467-474.
- [45] **Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Menado E, Warnock DW, et al.** Comparative evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST broth microdilution procedures for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**:46(11):3644-3647.
- [46] **Lass-Florl C, Cuenca-Estrella M, Denning DW, Rodriguez-Tudela JL.** Antifungal susceptibility testing in *Aspergillus spp.* according to EUCAST methodology. *Med Mycol* **2006**; 44:S319-S325.

- [47] **Chryssanthou E, Cuenca-Estrella M.** Comparison of the EUCASTAFST broth dilution method with the CLSI reference broth dilution method (M38-A) for susceptibility testing of posaconazole and voriconazole against *Aspergillus spp.* *Clin Microbiol Infect* **2006**;12(9):90 I -904.
- [48] **Lass-Flörl C et al.** *In vitro* susceptibility testing in fungi: A 185 global perspective on a variety of methods. *Mycoses* **2010**; 53:1-11
- [49] **Cuenca-Estrella M et al.** Frequency of voriconazole resistance *in vitro* among spanish clinical isolates of *Candida* spp. according to breakpoints established by the antifungal subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2010**; 8:267-276.
- [50] **Johnson EM** *Antimicrob Chemother.* **2008**; 61: 113-118.
- [51] **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**.
- [52] **Verweij PE et al.** Drug resistance updates **2009**; 12: 141-147
- [53] **Yang HC, Mikami Y, Yazawa K, Taguchi IL, Nishimura K, Miyaji M, et al.** Colorimetric MTT assessment of antifungal activity of D0870 against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Mycoses* **1998**;41(11-12):477-480.
- [54] **Hawser SP, Norris H, Jessup CJ, Ghannout MA.** Comparison of a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-5-1(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) colorimetric method with the Standardized National Committee for Clinical Laboratory Standards method of testing clinical yeast isolates for susceptibility to antifungal agents. *J Clin Microbiol* **1998**;36:1450-1452.
- [55] **TREK Diagnostic Systems.** Notice du Sensititre Yeast One.
- [56] **Espinel-Ingroff A, Pfaller M, Messer SA, Knapp CC, Killian S, Norris HA, Ghannoun MA.** Multicentre comparison of the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Plate with the National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A Reference Method for Testing Clinical Isolates of Common and Emerging *Candida* spp., and other Yeasts and Yeast-like Organisms. *Journal of Clinical Microbiology* **1999**; 37: 591-595.

- [57] **Linás MD, Cassaing S.** Méthodes d'évaluation *in vitro* des antifongiques: étude comparative des différents tests. *Revue française des laboratoires* **2001**. N°332
- [58] **Sanofi Pasteur.** Protocole de la galerie Fungitest.
- [59] **Davey KG, Holmes AD, Johnson EM, Szekely A, and Warnock DW.** Comparative evaluation of Fungitest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology* **1998**, vol. 36 N°4: 926-930
- [60] **Barry AL, Pfaller MA, Rennie RP, Fuchs PC, Brown SD.** Precision and accuracy of fluconazole susceptibility testing by broth micro-dilution, Etest, and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**;46(6):1781-1784.
- [61] **Meis J, Petrou M, Bille J, Ellis D, Gibbs D.** A global evaluation of the susceptibility of *Candida* species to fluconazole by disk diffusion. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2000**; 36(4):215-223.
- [62] **National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002.** Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guidance M44-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004* Wayne, Pa
- [63] **Lee S-C, Ring C-P, Lee N, See L-C, Huang J-S, Tsai C-1, et al.** Fluconazole disk diffusion test with methylene blue- and glucose enriched Mueller Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* species. *J Clin Microbiol* **2001**; 39:1615-1617.
- [64] **Canton E et al.** Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev. Anti Infect Ther.* **2010**; 7:107-119.
- [65] **Brown S, Traczewski M.** Quality control limits for posaconazole disk susceptibility tests on Mueller-Hinton agar with glucose and methylene blue. *J Clin Microbiol* **2007**; 45(1):222-223.
- [66] **Sims CR, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Ostrosky-Zeichner L.** Correlation between microdilution, E-test and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of posaconazole against *Candida* spp. *J Clin Microbiol* **2006**; 44(6):2105-2108.
- [67] **Lozano-Chio M, Nelson PW, Paetznick VL, Rex JH.** Disk diffusion method for determining susceptibilities of *Candida* spp. to MK-099 I. *J Clin Microbiol* **1999**; 37(5):1625-1627.

- [68] **Girmenia C, Pizzarelli G, D'Antonio D, Cristini F, Martino P.** *In vitro* susceptibility testing: comparison of the E-test. Disk diffusion and Sensititre colorimetric methods in the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**;47(12):3985-3988.
- [69] **Arikan S, Paetznick V, Rex JH.** Comparative evaluation of disk diffusion with microdilution assay in susceptibility testing of caspofungin against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Anti Microb Agents Chemother* **2002**; 46(9):3084-3087.
- [70] **Arikan S, Yurdakul P, Hascelik G.** Comparison of two methods and three end points in determination of *in vitro* activity of micafungin against *Aspergillus spp.* *Antimicrob Agents Chemother* **2003**;47(8):2640-2643.
- [71] **Messer SA, Diekema DJ, Hollis RI, Boyken LB, Tendolkar S, Kroeger J, et al.** Evaluation of disk diffusion and Etest compared to broth microdilution for antifungal susceptibility testing of posaconazole against clinical isolates of filamentous fungi. *J Clin Microbiol* **2007**;45(4): I 322-1324.
- [72] **Lopez-Oviedo E, Aller AI, Martin C, Castro C, Ramircz M, Peman JNI, et al.** Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**;50(3):1108-1111.
- [73] **Espinel-Ingroff A, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Ellis D, Pfaller MA, Messer S, et al.** Multicenter evaluation of a new disk agar diffusion method for susceptibility testing of filamentous fungi against voriconazole, posaconazole, itraconazole, amphotericin B. and caspofungin. *J Clin Microbiol* **2007**; 45(6):1811-1820.
- [74] **Fernandez-Torres B, Carrillo-Munoz A, Inca I, Guarro J.** Effect of culture medium on the disk diffusion method for determining antifungal susceptibilities of dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother* **2006**;50(6):2222-2224.
- [75] **Venugopal PM, Venugopal TV.** Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines. *Int J Dermatol* **1994**; 33(10):730-732.

- [76] **Matar Mi, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH.** Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**;47(5):1647-1651.
- [77] **Rementeria A, Sanchez-Vargas LO, Villar Nt Casals JB, CarrilloMunoz Ai, Andres CR, et al.** Comparison of tablet and disk diffusion methods for fluconazole and voriconazole *in vitro* activity testing against clinical yeast isolates. *J Chemother* **2007**; 19(2):172-177.
- [78] **Espinel-Ingroff A, Canton E, Gibbs D, Wang A.** Correlation of Neo-Sensitabs tablet diffusion assay results on three different agar media with CLSI broth microdilution M27-A2 and disk diffusion 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):858-864.
- [79] **Bourouda N.** Place de l'antifongigramme dans la prise en charge des infections fongiques. **Thèse de Doctorat de Pharmacie. 2010**
- [80] **Rosco Diagnostica A/S.** NEO-SENSITABS Antifungal Agents: Product list **2009**
- [81] **Pfaller MA et al:** Evaluation of the Etest and disk diffusion methods for determining susceptibilities of 235 bloodstream isolates of *C.glabrata* to Fluconazole and Voriconazole. *J. Clin. Microbiol* **2003**: 41, 1875-80.
- [82] **Espinel-Ingroff A, Canton E.** Comparison of three antifungal susceptibility methods for testing *Candida spp.* /*Cryptococcus neoformans* with Caspofungin (CAS) and Amphothericin B (AMB). Abstract, presentation M1604, *45th ICAAC, 2005.*
- [83] **Pfaller MA et al.** Correlation of MIC with outcome for *Candida spp.* tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretative breakpoints. *J. Clin. Microbio* **2006**: 44, 819-26.
- [84] **Sims CR et al.** Correlation between microdilution, E-test and disk diffusion methods for antifungal susceptibility testing of Posaconazole against *Candida spp.* *J. Clin. Microbiol.* **2006**: 44, 2105-8

- [85] **Espinel-Ingroff A.** Comparison of 3 commercial assays and a modified disk diffusion assay with 2 broth microdilution Reference Assays for testing zygomycetes, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans* with Posaconazole and Amphotericin B. *J. Clin. Microbio.* **2006**; 44, 3616-22.
- [86] **Espinel Ingroff A et al.** Correlation of Neo-Sensitabs Tablet diffusion assay on 3 media, with CLSI broth microdilution M27-A2 and Disk Diffusion M44A methods for susceptibility testing of *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans* with Amphotericin B, Caspofungin, Fluconazole, Itraconazole and Voriconazole – In Press.
- [87] **Cuenca-Estrella M et al.** Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida spp.* of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques.
- [88] **Espinel-Ingroff A et al.** International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida spp.* to fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole. *J. Clin. Microbiol.* **2005**; 43, 3884-9.
- [89] **AB bioMérieux.** E test: Antimicrobial susceptibility testing for *in vitro* diagnostic use. *Copyright AB bioMérieux 2009.*
- [90] **Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH.** Comparison of E test and national committee for clinical laboratory standards north macrodilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemoter* **1995**; 39: 2520-2
- [91] **Pfaller MA, Messer SA, Mills K, Bolmstrom A.** *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3359-61
- [92] **Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstrom A.** improved detection of amphotericin B resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 339-42

- [<sup>93</sup>] **Szekely A, Johnson EM, Warnock DW.** Comparison of Etest and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J Clin Microbiol* **1999**; 37: 1480-3
- [<sup>94</sup>] **Barbara D, Alexanderand Michael A, Pfaller.** Contemporary Tools for the Diagnosis and Management of Invasive Mycoses. *Clinical Infectious Diseases* **2006**; 43:S15-27
- [<sup>95</sup>] **Zambardi G, Parreno D, Monnin V, Fothergill A, Hurt L, Bassel A, McCarthy D, Canard I, Slaughter J, ICAAC.** Poster M-1619, December **2005**
- [<sup>96</sup>] **Lortholary O.** Épidémiologie et émergence de souches résistantes: quel profil pour un antifongique idéal? *J Mycol Med* **2004** ; 14 : 221-225
- [<sup>97</sup>] **Walmsley S, King S, McGeer A, Ye Y, Richardson S.** Oropharyngeal candidiasis in patients with VIH: correlation of clinical outcome with *in vitro* resistance, serum azolé levels, and immunosuppression. *Clin Infect Dis* **2001**; 32 :1554-61
- [<sup>98</sup>] **Rex JH, Pfaller MA, Barry AL, Nelson PW, Webb CD.** Antifungal susceptibility testing of isolates from a randomized, multicenter trial of fluconazole versus amphotericin B as treatment of non neutropenic patients with candidemia. NIAID Mycoses Study Group and the Candidemia Study Group. *Antimicrob Agents Chemoter* **1999**; 39: 40-4
- [<sup>99</sup>] **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. *National Committee for Clinical Laboratory Standards* **1997**; Wayne, PA.
- [<sup>100</sup>] **Te Dorsthorst DT, Verweij PE, Meis JF, Punt NC, Mouton JW.** Comparison of fractional inhibitory concentration index with response surface modeling for characterization of *in vitro* interaction of antifimgals against itraconazole-susceptible and -resistant *Aspergillus fumigatus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46:702-7.
- [<sup>101</sup>] **Blanc V, Eloy O., Sanchez C R, Mallié M, Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (CoIBVH).** Pratique de l'antifongigramme dans 62 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* **2005** ; 15 : 197-210

- [102] **Rex JH, Pfaller MA, Walsh T, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al.** Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* **2001**; 14:643-8.
- [103] **Rieu P, Eloy O, Bertout S, Maillé M, Bain P, Blanc V.** Sensibilité comparée par CLSI, EUCAST, E-test et ATB® Fungus 2 des souches de *Candida sp.* isolées au cours d'une enquête épidémiologique sur les candidémies dans des hôpitaux non universitaires. *Journal de Mycologie Médicale* **2009** ; 19 : 94-103
- [104] **Eloy O, Blanc V, Mallié M, Decousser JW, Pina P, Allouch PY and le collège de bactériologie virologie hygiène (ColBVH).** Identification et sensibilité aux antifongiques de deux souches de *Candida* dans 95 hôpitaux français. *Journal de Mycologie Médicale* **2005** ; 15, Issue 3 :117-126
- [105] **Chandrasekar PH, Manavathu E.** Voriconazole: a second generation triazole. *Drugs of Today* **2001** ; 37 (2): 135-48
- [106] **Como JA., Dismukes WE.** Oral azoles drugs as systemic antifungal therapy. *N Eng J Med* **1994**; 27, 330 (4): 263-72
- [107] **Aoun M.** Voriconazole (Vfend®) : une nouvelle arme contre les mycoses invasives. *Rev Med Brux* **2004**; 25: 166-71
- [108] **Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, and Quindós G.** Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter* **2006**; 19:130-139.
- [109] **Hitchcock CA, Pye GW, Oliver GP, Troke PF.** UK-109, 496, a novel, wide-spectrum triazole derivative for the treatment of fungal infections: antifungal activity and selectivity *in vitro*. Thirty fifth interscience conferences on antimicrobial agents and chemotherapy, Washington (**1995**) Abstract F-75.
- [110] **Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M.** A new triazole, voriconazole (UK-109,496) blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41:2492-6.
- [111] **Ghannoum MA, Kuhn DM.** Voriconazole: better chances for patients with invasive mycoses. *Eur J Med Res* **2002**; 7: 242-56

- [112] **Pfaller MA, Diekma DJ, Jones RN. et al.** International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species; frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 3254-9
- [113] **Espinel-Ingroff A.** *In vitro* activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens. *J Clin Microbiol* **1998**; 36: 198-202.
- [114] **Manavathu EK, Cutright JL, Loebenberg D, Chandrasekar DH.** A comparative study of the *in vitro* susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus spp.* to amphotericin B, itraconazole, voriconazole, and posaconazole (SCH-56592). *J Antimicrob Chemother* **2000**; 46: 229-34.
- [115] **Espinel-Ingroff A.** *In vitro* fungicidal activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against opportunistic moniliaceous and dematiaceous fungi. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 954-958.
- [116] **Pfizer.** Monographie du produit Vfend®. **Kirkland, Québec; 17 août 2004.**
- [117] **Hoffman HL, Rathbun RC.** Review of the safety and efficacy of voriconazole. *Expert Opin Investig Drugs* **2002**; 11: 409-29.
- [118] **Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D.** Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous-to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother* **2002**; 46: 2546-53.
- [119] **Taketomo CK HJ, Kraus DM.** *Pediatric Dosage Handbook*; **2003**
- [120] **Espinel-Ingroff A, Boyle K, Sheehan D.** Activités antifongiques *in vitro* du voriconazole et des composés de référence, déterminées par les méthodes du NCCLS : synthèse de la littérature. *Mycopathologia* **2001** ; 150 : 101-115
- [121] **Hoban DJ, Zhanel GG, Karlowsky- JA.** *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Cryptococcus neoformans* isolates Rom blood cultures of neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43(6): 1463-1464.

- [122] **Pfaller MA, Messer SA, Gee S, Joly S, Pujol C, Sullivan Coleman DC, Soll DR.** *In vitro* susceptibilities of *Candida dubliniensis* isolates tested against the new triazole and echinocandin antifungal agents. *J Clin Microbiology* **1999**; 37(3): 870-872.
- [123] **Barry AL, Brown SD.** *In vitro* studies of two triazole antifungal agents (voriconazole UK-109,496 and fluconazole) against *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother* **1996**; 40 (8): 1948-1949.
- [124] **Nguyen MH, Yu CY.** Voriconazole against fluconazole susceptible and resistant *Candida* isolates: *in vitro* efficacy compares with that of itraconazole and ketoconazole. *J Antimicrob Chemother* **1998**; 42: 253-256.
- [125] **Pfaller MA, Zhang J, Messer SA, Brandt ME, Jajjeh RA, Jessup CJ, Tumberland M, Mbidde EK, Ghannoum MA.** *In vitro* activities of voriconazole, fluconazole, and itraconazole against 566 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from the United States and Africa. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43(1): 169-171.
- [126] **Mondon P, Petter R, Asnalfitano G, Luzzati R, Concia E, Polacheck L, Kwon-Chung KJ.** Heteroresistance to fluconazole and voriconazole in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* **1999**; 43(8): 1856-1861.
- [127] **Nguyen MH, Yu CY.** *In vitro* comparative efficacy of voriconazole and itraconazole against fluconazole susceptible and resistant *Cryptococcus neoformans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42(4): 471-472.
- [128] **Van't Hek LG, Verweij E, Weemaes CM, Van Dalen R, Yntema JB, Meis JFGM.** Successful treatment with voriconazole of invasive aspergillosis in chronic granulomatous disease. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**; 157: 1694-1696.
- [129] **Murphy M, Bernard EM, Ishimaru T, Armstrong D.** Activity of voriconazole (UK-109,496) against clinical isolates of *Aspergillus* species and its effectiveness in an experimental model of invasive pulmonary aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41(3): 696-698.
- [130] **Clancy CJ, Nguyen MH.** *In vitro* efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **1998**; 17: 573-575.

- [131] **Sutton AA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG.** *In vitro* amphotericin B resistance in clinical isolates of *Aspergillus terreus*, with a head-to-head comparison to voriconazole. *J Clin Microbiol* **1999**; 37(7): 2343-2345.
- [132] **Johnson EM, Szekely A, Warnock DW.** *In vitro* activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother* **1998**; 42: 741-745.
- [133] **Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH.** Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol* **1999**; 37 (12) : 3946-3951.
- [134] **Verweij PE, van den Bergh MFQ, Rath PM, dePauw BE, Voss A, Meis JFGM.** Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus* case report and review. *J Clin Microbiol* **1999**; 37(5): 1606-1609.
- [135] **McGinnis MR, Pasarell L, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR Jr, Rinaldi MG.** *In vitro* activity of voriconazole against selected fungi. *Med Mycol* **1998**; 36(4): 239-242.
- [136] **Li Ren-Kai, Ciblak MA, Nordoff N, Pasarell L, Warnock DW, McGinnis MR.** *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* and *Histoplasma capsulatum*. *Antimicrob Agents Chemother* **2000**; 44(6): 1734-1736.
- [137] **McGinnis MR, Pasarell L, Sutton DA, Fothergill AW, Cooper CR Jr, Rinaldi MG.** *In vitro* evaluation of voriconazole against some clinically important fungi. *Antimicrob Agents Chemother* **1997**; 41(8): 1832-1834.
- [138] **Meletiadis J, Meis JFG, Horre R, Verweij PE.** Short communication: *in vitro* antifungal activity of six drugs against 13 clinical isolates of *Ochroconis gallopava*. *Studies in Mycology*. **1999**; 43: 206- 208.
- [139] **McGinnis MR, Pasarell L.** *In vitro* testing of susceptibilities of filamentous Ascomycetes to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B, with consideration of phylogenetic implications. *J Clin Microbiol* **1998**; 36(8): 2353-2355.

- [140] **Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, Sutton DA, Rinaldi MG.** *In vitro* susceptibility data predict the microbiology response to amphotericin B: Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* **1998**; 177: 425-430.
- [141] **Sanglard D, Odds FC.** Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* **2002**; 2: 73-85.
- [142] **Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH.** Organism dependent fungicidal activities of amies. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42(11): 3018-3021.
- [143] **Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden et al.** Multicenter evaluation of standardized procedure for antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 139-43
- [144] **Carrillo AJ, Guarro J,** *In vitro* activities of four novel triazoles against *Scedosporium spp.* *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45: 2151-3.
- [145] **Patterson BE, Coates PE.** : UK-109,496, a novel, wide-spectrum triazole derivative for the treatment of fungal infections: pharmacokinetics in man. Program and abstracts of the 35th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC, *American Society for Microbiology*, **1995**: Abstr. F-78
- [146] **Tan KKC, Wood N, Weil A.:** Multiple-dose of pharmacokinetics voriconazole in chronic hepatic impairment. Program and abstracts of the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, American Society for *Microbiology*, **2001**: Abstr. A-16
- [147] **Pfizer Inc.** Dossier d'AMM.
- [148] **Goldstein JA, de Moraes SMF.** Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily. *Pharmacogenetics* **1994**; 4: 285-99.
- [149] **Kubota T, Chiba K., Ishizaki T.** Genotyping of S-mephenytoin 4-hydroxylation in an extended Japanese population. *Clin Pharmacol Ther* **1996**; 60 (6): 661-6.
- [150] **Marinac JS, Balian JD, Foxworth JW. et al.** Determination of CYP2C19 phenotype in black Americans with omeprazole: correlation with genotype. *Clin Pharmacol Ther* **1996**; 60 (2): 138-44.

- [151] **Walsh TJ, Arguedas A, Driscoll R. et al.** Pharmacokinetics of intravenous voriconazole in children after single and multiple doses of administrations. *41th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Chicago) 2001*. Abst A17.
- [152] **Ally R, Schürmann D, Kreisel G. et al:** A randomized, doubleblind, double-dummy, multicenter trial of voriconazole and fluconazole in the treatment of esophageal candidiasis in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* **2001** ; 33 : 1447-54
- [153] **Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, Fung HB.** Voriconazole. *Clin Ther* **2003**; 25(5):1321-81.
- [154] **Baildon R, Patterson T, Boucher HW, Tiernan R, Powers JH.** : NDA 21-266, Vfend® (voriconazole) tablets, and NDA 21-267, Vfend I.V. (voriconazole) for infusion, Pfizer Global Research and Development. Proposed for the treatment of invasive aspergillosis, serious *Candida* infections, infections caused by *Scedosporium spp.* and *Fusarium spp.*, rare and refractory infections and empirical treatment of febrile neutropenia. *US FDA* **2001**.
- [155] **Hegener P, Troke PF, Fätkenheuer G, Diehl V, Ruhnke M.** Treatment of fluconazole-resistant candidiasis with voriconazole in patients with AIDS. *AIDS* **1998** ; 12 : 2227-41
- [156] **Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ et al.** Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis* **2003** ; 36 : 1122-31
- [157] **Ostrosky-Zeichner L, Oude Lashof AML, Kullberg BJ, Rex JH.** Voriconazole for salvage treatment of invasive candidiasis: experience from open-label protocols. *40th Meeting IDSA, Chicago, 2002*.
- [158] **Kullberg BJ, Sobel JD, Ruhnke M, et coll.** Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trail. *Lancet* **2005**; 366(9495): 1435-42.
- [159] **Denning DW, Ribaud P, Milpied N et al.** Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of acute invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* **2002** ; 34 : 563-71
- [160] **Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF et al.** voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* **2002** ; 347 : 408-15

- [161] **Steinbach WJ, Benjamin Jr DK, Kontoyiannis DP et al.** Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus terreus* : multicenter retrospective analysis of 87 cases. Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Chicago, American Society for Microbiology, 2003*: Abstr. M-1753
- [162] **Lortholary O, Mouas-Dupuy H, Dupont B, Lutsar I, Fain O.** Voriconazole for bone aspergillosis a world wide experience of 19 cases. *43th ICAAC, Chicago, 2003*, abst: M929, p. 450-451.
- [163] **Troke PF, Schwartz S, Ruhnke M et al.** Voriconazole therapy in 86 patients with CNS *Aspergillus* (CNSA): a retrospective analysis. Program and abstracts of the 43rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Chicago, American Society for Microbiology, 2003*: Abstr. M-1755
- [164] **Walsh TJ, Lutsar I, Driscoll T, Dupont B, Roden M, Ghahramani P, et al.** Voriconazole in the treatment of aspergillosis, scedosporiosis and other invasive fungal infections in children. *Pediatr Infect Dis J 2002*; 21: 240-8.
- [165] **Johnson LB, Kauffman CA.** Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis 2003*; 36: 630-7.
- [166] **Reis A, Sundmacher R, Tintelnot K, Agostini H, Jensen HE, Althaus C.** Successful treatment of ocular invasive mould infection (fusariosis) with the new antifungal agent voriconazole. *Br J Ophthalmol 2000*; 84: 932-3.
- [167] **Walsh TJ, Pappas P, Winston DJ et coll.** Voriconazole compared with Liposomal Amphotericin B for Empirical Antifungal Therapy in Patients with Neutropenia and Persistent Fever. *N Engl J Med 2002*; 346(4):225-234.
- [168] **Powers JH, Dixon C, Goldberger MJ.** Voriconazole versus Liposomal Amphotericin B in Patients with Neutropenia. *N Engl J Med 2002*; 346:289-90.
- [169] **Carle S.** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel 2003*; Vol.36 No1: 25-41.
- [170] **Dupont C, Dehaut C.** Voriconazole VFEND<sup>md</sup> : évaluation complète. *Programme de gestion thérapeutique des médicaments 2005*.
- [171] **Moudgal VV SJ.** Antifungal drugs in pregnancy: a review. *Expert Opin Drug Saf 2003*; 2(5): 475-83.

- [172] **Rotstein C LM, Marciniak A, Ali F.** An economic evaluation of voriconazole versus amphotericin B for the treatment of invasive aspergillosis in Canada. *Can J Infect Dis Med Microbiol* **2004**; 15(5):277-84.
- [173] **Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R.** Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **2006**; 27:359-66.
- [174] **Levy SB.** Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**; 36:695-703.
- [175] **Borges-Walmsley MI, McKeegan KS, Walmsley AR.** Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem J* **2003**; 376:313-38.
- [176] **Sanglard D.** Clinical relevance of mechanisms of antifungal drug resistance in yeasts. *Enferm Infect Microbiol Clin* **2002**; 20:462- 9. Quiz 470, 479.
- [177] **Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J.** Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42:241-53.
- [178] **Vandeputte P, Larcher G, Berges T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP.** Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:4608-15.
- [179] **De Backer MD, Ilyina T, Ma XJ, Vandoninck S, Luyten WH, and Vanden Bossche H.** Genomic profiling of the response of *Candida albicans* to itraconazole treatment using a DNA microarray. *Antimicrob. Agents Chemother* **2001**; 45:1660-1670.
- [180] **Miyazaki Y, Geber A, Miyazaki H, Falconer D, Parkinson T, Hitchcock C, et al.** Cloning, sequencing, expression and allelic sequence diversity of ERG3 (C-5 sterol desaturase gene) in *Candida albicans*. *Gene* **1999**; 236:43-51.
- [181] **Park S, Kelly R, Kahn JN, Robles J, Hsu MJ, Register E, et al.** Specific substitutions in the echinocandin target Fks1 p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49: 3264-73.

- [182] **Eggimann P., Calandra T.** Infections fongiques sévères en réanimation. In : Pathologie infectieuse en réanimation. *Editions scientifiques et médicales Elsevier* **2002** ; Pages : 519-556
- [183] **Plettenburg A, Stoehr A, Hoffken G, Bergs C, Tschechne B, Ruhnke M, Heise W, Dieckmann S, Meigel W.** Fluconazole therapy of oral candidiasis in HIV infected patients: result of a multicentric study. *Infection* **1994**; 22: 118-23.
- [184] **Johnson EM, Warnock DW.** Azole drug resistance in yeasts. *J Antimicrob Chemother* **1995**; 36: 751-5.
- [185] **White TC.** Antifungal resistance in *Candida albicans*. *ASM News* **1997**; 63: 427-34.
- [186] **Gauzit R.** Epidémiologie des candidoses invasives en réanimation : dernières données. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS (Réanimation)* **2008**. Hors série 4 : 1-3
- [187] **Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoine MH, et al.** The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. *JAMA* **1995**; 274: 639-44.
- [188] **Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H et al.** Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* **2002**; 28: 108-21.
- [189] **Gauzit R.** Épidémiologie et facteurs de risque des candidoses systémiques en réanimation. *Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. Anesth Réanim* **2001** ; 20 : 394-9
- [190] **Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, Edmond MB, Wenzel RP.** National surveillance of nosocomial blood stream infection due to *C.albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **1998**; 31:327-32.
- [191] **Malani PN, Bradley SF, Little RS, Kauffman CA.** Trends in species causing fungaemia in a tertiary care medical centre over 12 years. *Mycoses* **2001**; 44:446-9.

- [192] **Maenza JR, Keruly JC, Moore RD, Chaisson RE, Merz WG, Gallant JE.** Risk factors for fluconazole-resistant candidiasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* **1996**; 173: 219-25.
- [193] **Lortholary O, Dupont B.** Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin Microbiol Rev* **1997**; 10: 477-504.
- [194] **Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD.** *Candida glabrata* : review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C.albicans*. *Clin Microbiol Rev* **1999**; 12:80-96.
- [195] **Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver P, Bielaczyc A, Kauffman CA.** *C.glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. *Clin. Infect Dis* **2005**; 41: 975-81.
- [196] **Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Rice C, Tendolkar S et al.** *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida spp.* and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* **2004**; 48:201-5.
- [197] **Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ.** Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *C.glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 3142-3146.
- [198] **Magill S, Shields C, Sears C, Choti M, Merz W.** Triazole cross-resistance among *Candida spp.*: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol* **2006**; 44: 529-35.
- [199] **Imhof A, Balajee SA, Fredricks DN, Englund JA, Marr KA.** Breakthrough fungal infections in stem cell transplant recipients receiving voriconazole. *Clin Infect Dis* **2004**; 39: 743-6.
- [200] **Burn AK, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, McCarthy DI. et al.** Comparison of antifungal susceptibilities to fluconazole and voriconazole of oral *Candida glabrata* isolates from head and neck radiation patients. *J Clin Microbiol* **2004**; 42: 5846-8.

- [201] **Panackala AA, Gribskova JL, Staab JF, Kirby KA, Rinaldi M, Marr A.** Signification clinique de la résistance croisée aux antifongiques azotés chez *C.glabrata*. *Journal de Mycologie Médicale* **2007** ; 17 : 516-S21
- [202] **Alexander BD, Schell WA, Miller JL, Long GD, Perfect JR.** *C.glabrata* fungemia in transplant patients receiving voriconazole after fluconazole. *Transplantation* **2005**; 80: 868-71.
- [203] **Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G.** Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *C.glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* **2005**; 49:668-79.
- [204] **Borst AM, Raimer T, Warnock DW, Morrison CJ, Arthington-Skaggs BA.** Rapid acquisition of stable azole resistance by *C.glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**; 49:783-7.
- [205] **Moudgal V, Little T, Boikov D, Vasquez JA.** Multiechinocandin and multiazoleresistant *C.parapsilosis* isolates serially obtained during therapy for prosthetic valve endocarditis. *J Antimicrob. Agents Chemother* **2005**; 49: 767-9.
- [206] **Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ.** Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location. *J Clin Microbiol* **2003**; 41:2176-9.
- [207] **Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ et al.** Guidelines for the treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* **2004**; 38: 161-89.
- [208] **Eggimann P, Pittet D.** Candidoses du sujet non neutropénique : de la colonisation à l'infection. *Ann Fr Anesth Réanim* **2001** ; 20 : 382-8
- [209] **Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, Sader HS, Fluit AC, Hollis RJ.** International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and *in vitro* susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program. *J Clin Microbiol* **2001**; 39(9):3254–9.

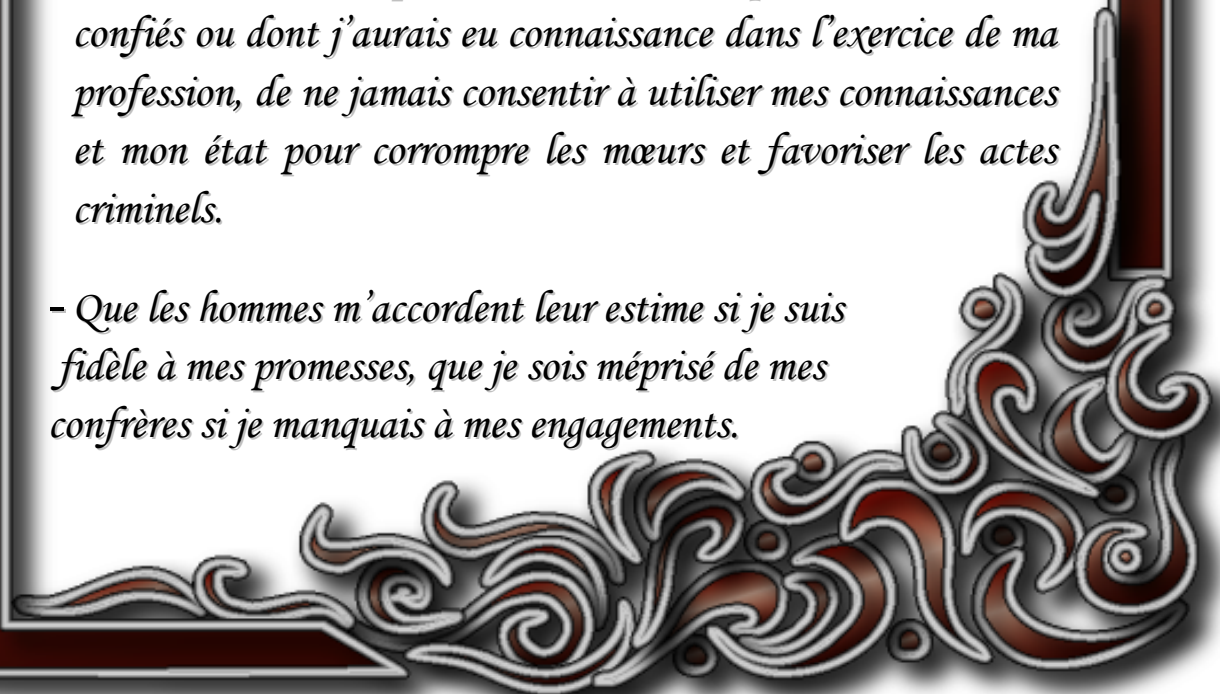
- [210] **Pfaller MA, Hazen KC, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, and DJ Diekema.** Comparison of results of fluconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol* **2004**; 42: 2163-2167
- [211] **Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, and DJ Diekema.** Comparison of results of voriconazole disk diffusion testing for *Candida* species with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol* **2004**; 43: 5208-5213
- [212] **Pfaller MA, Diekema DJ, Rinaldi MG, Barnes R, Hu B, Veselov AV, Tiraboschi N, Nagy E, Gibbs DL, Groupe International de Surveillance Antifongique.** Résultats de l'étude globale ARTEMIS de surveillance des antifongiques: analyse pendant 6,5 ans de la sensibilité au fluconazole et au voriconazole de *Candida* et d'autres espèces de levures par la méthode standardisée de diffusion en milieu gélosé. *Journal of Clinical Microbiology* **2005**; Vol 43, No 12: 5848-5859
- [213] **Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN and the International Fungal Surveillance Participant Group.** *In vitro* activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. *J. Clin. Microbiol* **2003**; 41: 28-83
- [214] **Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN.** *In vitro* susceptibility of rare *Candida* bloodstream isolates to voriconazole and three comparative antifungal agents. *Diagn. Microbiol. Infect.* **2004** Dis 48: 101-105
- [215] **Hejje RA, Sofair AN, Harisson LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Huie SE, Brandt ME and Warnock DW.** Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J.Clin.Microbiol* **2004**; 42: 1519-1527
- [216] **Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG and Yu VL.** The changing face of candidemia: emergence of non-*albicans* species and antifungal resistance. *Am. J.Med* **1995**. 100: 617-623

- <sup>[217]</sup> **Ostorsky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, Powderly WG, Hyslop N, Kauffman CA, Cleary J, Mangino JE and Lee J.** Antifungal susceptibility survey of 2000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother* **2003**; 47: 3149-3154
- <sup>[218]</sup> **Pfaller MA, and Diekema DJ.** Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol* **2004**; 42: 4419-4431
- <sup>[219]</sup> **Delarozière JC, Blancard A, Molinese C, San Marco JL. et Dumon H.** Analyse de tendance sur 20 mois de la sensibilité de *C.albicans* aux antifongiques. *J. Mycol. Med* **2000** ; 10 : 27-29
- <sup>[220]</sup> **Talarmin J-P, Boutoille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P, Ansart S, Chennebault J-M, Hutin P, Léautez-Nainville S, Gay-Andrieu F, Raffi F, le GERICCO.** Épidémiologie des candidémies : étude observationnelle prospective d'un an dans l'Ouest de la France. *Médecine et maladies infectieuses* **2009** ; 39 : 877–885
- <sup>[221]</sup> **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; *Approved Standard–3<sup>rd</sup> Edition*. **2008**, CLSI doc M27-A3.
- <sup>[222]</sup> **EUCAST definitive document EDef 7.1:** Method for the determination of broth dilution MIC of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* **2008**; 14: 398–405.

## *Serment de Galien*

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

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer ma profession avec conscience, dans l'intérêt de la santé public, sans jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humain.*
- *D'être fidèle dans l'exercice de la pharmacie à 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 -

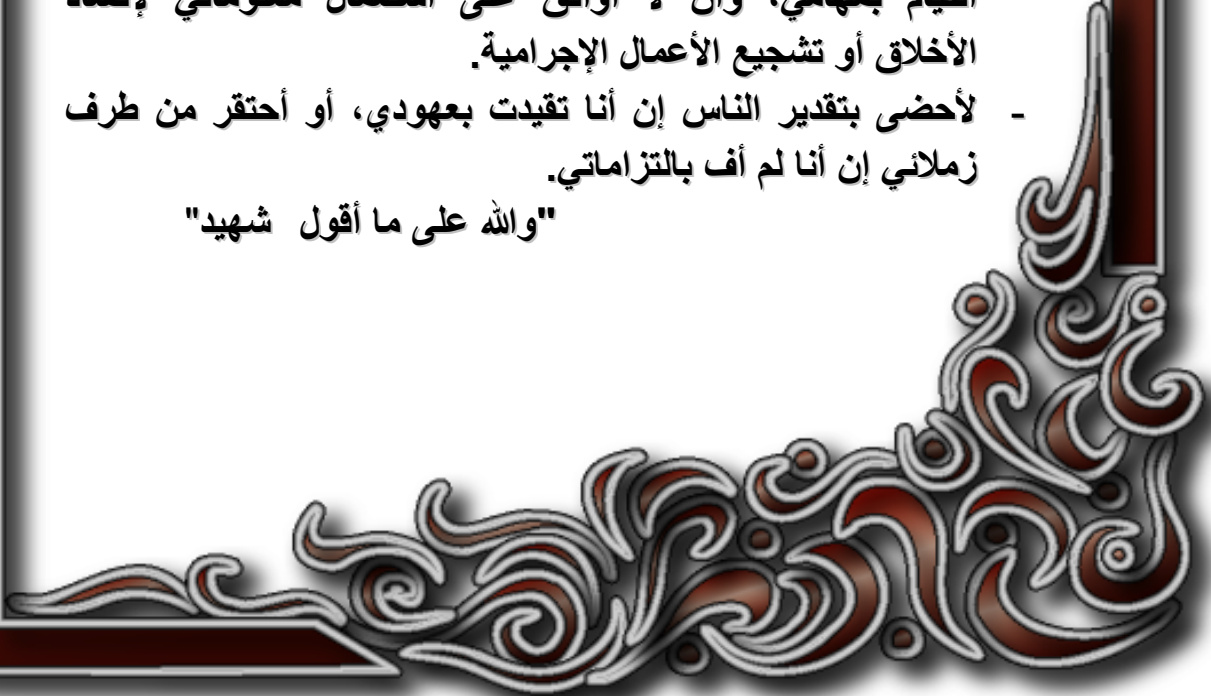
### قسم الصيدلي

بسم الله الرحمن الرحيم

وأحسب بالثمن العظيم

- أن أراقب الله في مهنتي
- أن أبجل أساتذتي الذين تعلمت على أيديهم مبادئ مهنتي وأعترف لهم بالجميل وأبقى دوما وفيا لتعاليمهم.
- أن أزاول مهنتي بوزع 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 وبأداب 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"



أطروحة رقم: 60

سنة : 2011

دراسة حساسية الفوغيكونازول لـ 72 سلالة مبيضية  
معزولة بالمستشفى العسكري بالرباط  
(شتنبر 2010 - ماي 2011)

## أطروحة

قدمت ونوقشت علانية يوم : .....

من طرفه

الآنسة : هدى عالم  
المزودة في : 04 نونبر 1986 بالرباط

## لنيل شهادة الدكتوراه في الصيدلة

الكلمات الأساسية: نوع المبيضات - دراسة الحساسية - فوغيكونازول - الحساسية في المختبر - مراقبة.

### تحت إشراف اللجنة المكونة من الأساتذة

السيدة: وفاء الملوكي  
رئيس  
أستاذة في علم الطفيليات  
السيد: بدر الدين الميموني  
مشرف  
أستاذ في علم الطفيليات  
السيد: شرقي حيمر  
أستاذ في الإنعاش والتخدير  
السيد: جمال لمصاوري  
أستاذ مبرز في الكيمياء العلاجية  
السيد: مصطفى بنميمون  
المدير الطبي لمختبرات فايزر (عضو مشرف)

أعضاء

}