

**THESE**  
pour le  
**DIPLÔME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

par

Freddy FIOLEAU

Présentée et soutenue publiquement le 18 Décembre 2003

**MISE AU POINT DU MAF-TEST POUR L'EVALUATION DE  
LA SENSIBILITE D'ASPERGILLUS AUX ANTIFONGIQUES.**

**Président** : **Monsieur J-Y. PETIT**  
Professeur de Pharmacologie et Pharmacocinétique

**Membre du jury** : **Monsieur P. LE PAPE**  
Professeur de Pharmacologie et Pharmacocinétique  
**Monsieur F. PAGNIEZ**  
Maître de conférences en Parasitologie  
**Monsieur C. BRIGAUDEAU**  
Docteur en Sciences  
**Monsieur E BAUDON**  
Pharmacien assistant

Je remercie très sincèrement :

*Monsieur J-Y. Petit, qui a eu la gentillesse d'accepter de présider le jury de cette thèse.*

*Monsieur P. LE PAPE, mon directeur de thèse, qui m'a dirigé et orienté tout au long de ce travail.*

*Monsieur F. PAGNIEZ, pour son écoute et ses précieux conseils.*

*Monsieur C. BRIGAUDEAU, pour l'attention qu'il a porté à ce travail.*

*Monsieur E. BAUDON, Pharmacien, pour les conseils qu'il m'a apporté tout durant mon stage de 6<sup>ème</sup> année.*

*A Cécile, qui a su me soutenir et m'encourager tout au long de nos études, tout mon amour.*

*A mes parents, qui ont toujours su être présents, toute mon affection.*

*A mes grands parents, oncles et tantes, affectueusement.*

*A ma belle-famille et à ma chère petite belle sœur, toute ma sympathie et mon attachement.*

*A toute l'équipe officinale, toute ma reconnaissance pour leur accueil.*

*A toute l'équipe du Laboratoire de Parasitologie, toute ma gratitude pour leur accueil pendant huit mois passés à leurs côtés.*

*A tous mes amis (Grand sek, Benji, Moucrit, JP, Guick, et tous les autres) en souvenir des bons moments et pour ceux à venir...*

# *Liste des Illustrations*

## Figures

Figure n° 1 : Appareil reproducteur des <i>Aspergillus</i> .....	6
Figure n° 2: Incidence de l'aspergillose invasive par pathologie hématologique.....	13
Figure n° 3 : Structure de l'amphotéricine B .....	23
Figure n° 4: Structure des nouvelles formulations d'Amphotéricine B .....	27
Figure n° 5 : Structure chimique de l'itraconazole .....	27
Figure n° 6: Structure du voriconazole .....	31
Figure n° 7 : Site d'action de la caspofungine .....	33
Figure n° 8: Origine de la fluorescence.....	41
Figure n° 9: Schéma de l'appareillage .....	42
Figure n° 10: Spectre d'émission de fluorescence de l'Alamar Blue® .....	42
Figure n° 11: Technique du E-Test®. Ellipse d'inhibition après 24 heures d'incubation .....	51
Figure n°12: Répartition des souches par service clinique .....	60
Figure n° 13: Intensité de fluorescence en fonction du temps d'incubation (Alamar blue déposé à t = 40 heures) .....	70
Figure n°14: Répartition des souches selon leur interprétation .....	71
Figure n°15: Répartition des souches selon leur interprétation .....	72

## Photos

Photo n° 1 : Fructification d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	6
Photo n° 2 : Filaments aspergillaires dans un crachat.....	19

## Tableaux

Tableau n° I: Caractères différentiels des espèces aspergillaires.....	20
Tableau n° II : Répartition des souches suivant l'espèce .....	59
Tableau n° III : Répartition des souches selon le prélèvement .....	59

Tableau n° IV: Résultat de la 1 <sup>ère</sup> série du NCCLS.....	61
Tableau n° V : Résultats de la 2 <sup>ème</sup> série du NCCLS.....	62
Tableau n° VI: Résultats du NCCLS CMI= Score 2 (NCCLS 50).....	64
Tableau n° VII: Résultats du NCCLS CMI= Score 0 (NCCLS 0).....	64
Tableau n° VIII : Résultats de l'E-Test pour l'amphotéricine B.....	65
Tableau n° IX : Résultats de l'E-Test pour l'itraconazole.....	65
Tableau n° X: Comparaison des CMI déterminées par le E-Test et le NCCLS : répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en log <sub>2</sub> .....	66
Tableau n° XI : Comparaison des CMI déterminées par le E-Test et le NCCLS : répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en log <sub>2</sub> .....	67
Tableau n° XII : Résultats de la première série du MAF-Test pour l'amphotéricine B.....	68
Tableau n° XIII: Influence de l'Alamar blue sur la détermination des CMI.....	69
Tableau n° XIV : Résultats de la seconde série du MAF-Test pour l'amphotéricine B.....	70
Tableau n° XV: Résultats du MAF-Test pour l'itraconazole.....	71
Tableau n° XVI: Valeurs de CMI (Souches de référence).....	72
Tableaux n° XVII: Essai de répétabilité réalisé sur la souche n° 33.....	73
Tableau n° XVIII : Evaluation de la répétabilité sur la souche n° 33.....	73
Tableau n° XIX : Essai de reproductibilité réalisé sur la souche n° 17.....	74
Tableau n°XX : Evaluation de la reproductibilité sur la souche n° 17.....	74
Tableau n° XXI : Comparaison des CMI déterminées par le NCCLS et le MAF-Test : répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en log <sub>2</sub> .....	75
Tableau n°XXII : Concordance d'interprétation entre le MAF-Test et le NCCLS.....	76
Tableau n°XXIII : Comparaison des CMI déterminées par le E-Test et le MAF-Test : répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en log <sub>2</sub> .....	76
Tableau n° XXIV : Concordance d'interprétation entre MAF-Test et l'E-Test.....	76

# Sommaire

INTRODUCTION .....	1
<b>I. ASPERGILLUS.....</b>	<b>5</b>
I.1. AGENT PATHOGÈNE .....	5
I.2. POUVOIR PATHOGÈNE ET FACTEURS FAVORISANTS .....	7
I.3. LES ASPERGILLOSES.....	7
I.3.1. <i>Aspergilloses broncho- pulmonaires et pleurales</i> .....	8
I.3.2. <i>Aspergilloses ORL et ophtalmologiques</i> .....	9
I.3.3. <i>L'Aspergillose invasive</i> .....	10
I.4. DIAGNOSTIC .....	18
I.4.1. <i>Diagnostic mycologique</i> .....	18
I.4.2. <i>Diagnostic immunologique</i> .....	21
<b>II. LES ANTIFONGIQUES.....</b>	<b>22</b>
II.1. AMPHOTÉRICINE B.....	22
II.1.2. <i>Structure</i> .....	23
II.1.2. <i>Mécanisme d'action</i> .....	23
II.1.3. <i>Spectre d'action</i> .....	24
II.1.4. <i>Pharmacocinétique</i> .....	24
II.1.5. <i>Indications et posologies</i> .....	25
II.1.6. <i>Toxicité</i> .....	26
II.1.7. <i>L'amphotéricine B liposomiale</i> .....	26
II.2. ITRACONAZOLE .....	27
II.2.1. <i>Structure</i> .....	27
II.2.2. <i>Mécanisme d'action</i> .....	28
II.2.3. <i>Spectre d'action</i> .....	28
II.2.4. <i>Résistance</i> .....	29
II.2.5. <i>Pharmacocinétique</i> .....	29
II.2.6. <i>Indications et posologies</i> .....	30
II.2.7. <i>Toxicité</i> .....	30
II.3. NOUVELLES MOLÉCULES.....	31
II.3.1. <i>Voriconazole et autres azolés</i> .....	31
II.3.2. <i>Caspofungine</i> .....	33
<b>III. LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES D'ANTIFONGIGRAMMES.....</b>	<b>35</b>
III.1. FACTEURS INFLUENÇANT LES TESTS DE SENSIBILITÉ AUX ANTIFONGIQUES .....	35
III.1.2. <i>Détermination du point final</i> .....	35
III.1.3. <i>Taille de l'inoculum</i> .....	36
III.1.4. <i>Réalisation de l'inoculum</i> .....	36
III.1.5. <i>Durée et température d'incubation</i> .....	36
III.1.6. <i>Le milieu</i> .....	36
III.2. LA MÉTHODE DE RÉFÉRENCE DU NCCLS .....	37
III.3. TESTS COMMERCIALISÉS .....	37
III.3.1. <i>Tests sur milieux liquides</i> .....	37
III.3.2. <i>Test sur milieu gélosé</i> .....	38
III.4. L'AMÉLIORATION DE LA LECTURE .....	39
III.4.1. <i>La colorimétrie</i> .....	39
III.4.2. <i>La fluorimétrie</i> .....	40
<b>I. LES SOUCHES ETUDIÉES .....</b>	<b>45</b>
I.1. SOUCHES DE RÉFÉRENCE .....	45
I.2. SOUCHES D'ORIGINE CLINIQUE .....	45
<b>II. MÉTHODES CONVENTIONNELLES .....</b>	<b>45</b>
II.1. MÉTHODE DE RÉFÉRENCE :DOCUMENT M38-P DU NCCLS .....	45
II.1.1. <i>Préparation du milieu de culture</i> .....	46
II.1.2. <i>Réalisation des plaques d'antifongiques</i> .....	46

II.1.3. Préparation de l'inoculum fongique.....	48
II.1.4. Ensemencement des plaques et incubation.....	49
II.1.5. Lecture des résultats.....	49
II.1.6. Interprétation des CMI.....	50
II.2. E-TEST®.....	50
II.2.1. Milieu.....	50
II.2.2. Inoculum.....	50
II.2.3. Ensemencement.....	51
II.2.4. Incubation.....	51
II.2.5. Lecture.....	51
<b>III. TEST DE FLUORIMETRIE : LE MAF-TEST .....</b>	<b>52</b>
III.1. PROTOCOLE.....	52
III.1.1. Préparation des plaques d'antifongiques.....	52
III.1.2. Réalisation de l'inoculum et ensemencement.....	53
III.1.3. Lecture des résultats.....	53
III.2. AGRÉMENT.....	54
III.3. RÉPÉTABILITÉ ET REPRODUCTIBILITÉ.....	54
III.3.1 Test de répétabilité.....	54
III.3.2 Test de reproductibilité.....	55
<b>IV. COMPARAISON DU MAF TEST PAR RAPPORT AU NCCLS ET À L'E-TEST .....</b>	<b>55</b>
IV.1. EXPRESSION DES RÉSULTATS.....	55
IV.1.1. Concordance en terme de CMI (CCMI).....	55
IV.1.2.1 Concordance en terme d'interprétation (CI) : .....	56
<b>I. LES SOUCHES .....</b>	<b>59</b>
<b>II. TECHNIQUE DE REFERENCE DU NCCLS.....</b>	<b>60</b>
II.1. AMPHOTÉRICINE B.....	61
II.2. ITRACONAZOLE.....	62
<b>III. E-TEST.....</b>	<b>63</b>
III.1. AMPHOTÉRICINE B.....	63
III.2. ITRACONAZOLE.....	63
III.3. COMPARAISON E-TEST / NCCLS.....	66
III.3.1 Amphotéricine B.....	66
III.3.2 Itraconazole.....	66
<b>IV. LE MAF TEST .....</b>	<b>67</b>
IV.1. MISE AU POINT DU TEST ET RÉSULTATS DES SOUCHES CLINIQUES.....	67
IV.1.1. Amphotéricine B.....	67
IV.1.2 Itraconazole.....	71
IV.2. AGRÉMENT DE LA MÉTHODE.....	72
IV.3. PRÉCISION DE LA MÉTHODE.....	73
IV.3.1. Essai de répétabilité.....	73
IV.3.2. Essai de reproductibilité.....	74
IV.4. COMPARAISON DU MAF TEST PAR RAPPORT À LA TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE DU NCCLS ET À L' E-TEST.....	75
IV.4.1. Concordance MAF Test/NCCLS.....	75
IV.4.2 Concordance MAF-Test / E-Test.....	76
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>77</b>
CONCLUSION.....	79

# **INTRODUCTION**

Au cours des vingt dernières années, la fréquence des affections fongiques n'a cessé d'augmenter. Parallèlement aux innovations médicales, les infections nosocomiales comme les mycoses systémiques progressent d'année en année. Le développement de techniques invasives comme les transplantations d'organes, les chimiothérapies intensives ainsi que le traitement de malades sévèrement immunodéprimés (grands brûlés, sidéens) ont contribué à cette situation préoccupante au sein des services à risque. Parmi les mycoses systémiques, les aspergilloses invasives, caractérisées par un taux de mortalité très important, représentent plus d'un tiers des infections(1).

Alors que l'amphotéricine B était la seule molécule antifongique dans les années 60, la famille des azolés a révolutionné la prise en charge du patient.

Face à ces nouvelles alternatives thérapeutiques et devant la montée des résistances, le choix du clinicien devient difficile. Ces considérations expliquent le développement de tests de sensibilités aux antifongiques pour un choix raisonné de la thérapie. Les techniques utilisées pour identifier la sensibilité des levures aux antifongiques ont été transférées au domaine des filamenteux (2). Toutefois, par manque de reproductibilité, le NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standards) a proposé, à l'instar du test sur les levures, une méthode de référence (M38-P) pour les filamenteux. Cette technique de référence lourde et fastidieuse ne permet son application en routine (3). Elle laisse donc place dans le laboratoire d'analyse à des techniques plus souples telles que l'E-Test ®. Cette méthode manque de reproductibilité et n'a pas été validée pour les filamenteux.

Devant ce manque de tests standardisés et adaptés à la routine, nous avons voulu mettre en place une technique fiable, de lecture facile et d'application rapide de sensibilité aux antifongiques : le MAF-Test utilisant un marqueur fluorescent de viabilité cellulaire, l'Alamar Blue®. Cette technique mise au point précédemment sur le genre *Candida* a donné des résultats encourageants. L'objet de notre étude est donc la mise au point du MAF-Test pour l'étude de la sensibilité d'*Aspergillus* aux antifongiques.

Après un rappel bibliographique concernant les aspergilloses, les antifongiques, les différents tests de sensibilité et le principe de la fluorimétrie, nous nous attacherons à la partie expérimentale, sa méthodologie et les résultats obtenus. Dans ce cadre, après une mise au

point du système de révélation pour le genre *Aspergillus*, une étude comparative des performances du MAF-Test et de l'E-Test ® est réalisée par rapport à la technique de référence du NCCLS. Cette étude concernera les antifongiques amphotéricine B et itraconazole. Enfin nous conclurons et nous envisagerons les perspectives issues de cette étude.

# **CHAPITRE I**

## **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**

# I. ASPERGILLUS

## I.1. Agent pathogène

Les Aspergillose sont dues à des champignons microscopiques du genre *Aspergillus*. Ces *Aspergillus* appartiennent au phylum des *Deutéromycotina*, embranchement qui englobe toutes les espèces fongiques se multipliant sur le mode asexué, et à la classe des Hyphomycètes regroupant tous les champignons à thalle septé dont les cellules conidiogènes sont libres.

Ce sont des champignons cosmopolites très répandus dans le milieu extérieur. On les retrouve aussi bien en milieu rural (silos à grain, foin, céréales et fruits moisissés, matières organiques en décomposition) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations (poussière, faux plafonds, conduits d'aération...)

*Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus pathogène, responsable d'environ 80 à 90% des aspergillose humaines. On trouve ensuite, par ordre décroissant de fréquence, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, et *A. nidulans*.

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* repose sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique des colonies. Sur les filaments végétatifs, prennent en effet naissance des filaments dressés, non cloisonnés. Ces derniers, nommés conidiophores, se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides (Figure n°1). La formation de spores s'effectue par bourgeonnement à l'apex des phialides d'une série de conidies qui restent accolées les unes aux autres en chaînes non ramifiées. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) comme pour *Aspergillus fumigatus* (Photo n°1), ou portées par des petits articles insérés sur la vésicule, les métules (têtes bisériées). L'ensemble constitué de la vésicule (plus ou moins métules), des phialides et des conidies correspond à la tête aspergillaire qui caractérise le genre *Aspergillus*.

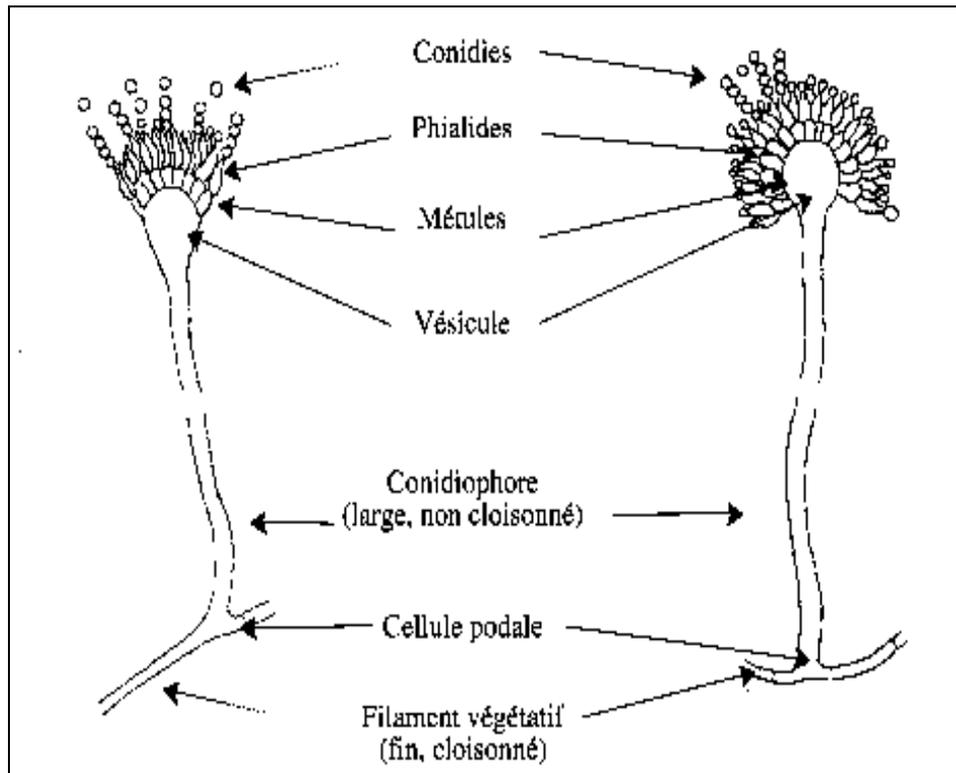


Figure n° 1 : Appareil reproducteur des *Aspergillus*

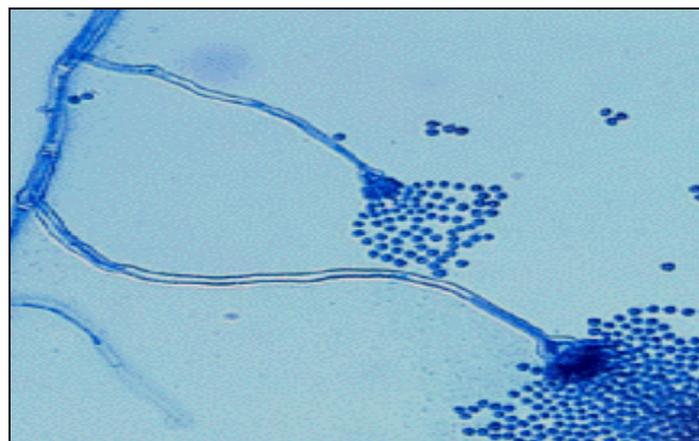


Photo n° 1 : Fructification d'*Aspergillus fumigatus*

## I.2. Pouvoir pathogène et facteurs favorisants

Les *Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes. Leur développement chez l'hôte nécessite l'existence de conditions favorables, locales (caverne tuberculeuse, cancer broncho-pulmonaire, broncho-pneumopathie obstructive, emphysème, mucoviscidose, brûlures étendues) ou générales : traitement immunosuppresseur (corticothérapies prolongées, antimitotiques), affections graves (SIDA, hémopathies malignes). En outre, des facteurs environnementaux (abondances des spores aspergillaires dans l'air inhalé lors de la manipulation du fumier, du foin moisi) ou liés au champignon (taille des spores aspergillaires, thermotolérance, facteurs de virulence) contribuent à la fréquence de la pathologie aspergillaire.

Ces *Aspergillus* sont ainsi à l'origine de diverses mycoses : des otomycoses, des kératites, des onyxis, des atteintes cutanées ou encore des mycoses profondes résultant d'une inoculation traumatique des spores. Toutefois, les *Aspergillus* sont principalement des pathogènes respiratoires, l'infestation s'effectuant par inhalation des conidies véhiculées par l'air. La voie d'entrée est donc essentiellement pulmonaire mais peut être dans quelques cas cutanée. La dissémination dans l'organisme s'effectue par voie hématogène ou lymphatique.

## I.3. Les Aspergilloses

Les mycoses causées par *Aspergillus* sont appelées aspergilloses. Il en existe plusieurs formes qui vont d'une maladie de type allergique à une infection généralisée gravissime, le plus souvent mortelle. La sévérité de l'aspergillose dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels le plus important est l'état du système immunitaire de la personne infectée.

### **I.3.1. Aspergillose broncho- pulmonaires et pleurales**

#### **I.3.1.1. Bronchite aspergillaire muco-membraneuse**

La multiplication du champignon s'effectue dans la lumière bronchique sans pénétration dans l'endothélium. On remarque une toux avec expectoration pseudo-membraneuse ainsi qu'une perturbation de la ventilation. Le diagnostic repose sur une opacification radiologique et sur la présence de filaments mycéliens dans les crachats.

#### **I.3.1.2. Aspergillose broncho-pulmonaire allergique**

Cette maladie allergique est assez commune chez les patients asthmatiques et touche également fréquemment les patients atteints de mucoviscidose. Les symptômes sont identiques à ceux d'un asthme classique avec des épisodes de malaise, toux, sifflements, dyspnée. Certains patients crachent des bouchons muqueux brunâtres.

La radiologie ainsi que la sérologie, l'analyse des crachats et des tests cutanés s'imposent pour le diagnostic de cette pathologie.

La thérapeutique comprend l'emploi de corticostéroïdes par aérosol ou voie orale (surtout pendant les crises) et d'antifongique. L'itraconazole est utile pour diminuer la dose de cortisone employée chez les patients qui nécessitent des concentrations élevées de stéroïdes.

#### **I.3.1.3. Alvéolite allergique intrinsèque (Poumon de fermier)**

Elle apparaît en revanche chez des sujets non atopiques mis en présence de spores. Après leur inhalation, il y a apparition en quelques heures d'une pneumopathie d'allure grippale durant 24-48 heures. En cas de répétition, on craint rapidement un passage à la chronicité voire par la suite à l'installation d'une insuffisance respiratoire.

#### **I.3.1.4. Aspergillome ou aspergillose intra-cavitaire**

Le champignon se développe dans une cavité préexistante dans le poumon, résultant d'une maladie antérieure telle que tuberculose ou sarcoïdose. Les spores présentes dans la cavité germent pour former une boule mycélienne à l'intérieur de celle-ci. Lors de sa croissance dans le poumon, le champignon sécrète des molécules toxiques et allergisantes qui aggravent l'état

du malade. Perte de poids, toux chronique et fatigue constituent les symptômes classiques du stade avancé de la mycose. Une hémoptysie se retrouve également chez 50 à 80% des patients affectés. La maladie peut passer inaperçue, notamment dans les phases précoces.

La radiologie montre une masse opaque de quelques centimètres en forme d'un croissant clair (image en grelot). Quand le champignon meurt, cette opacité devient plus diffuse (ressemblant à un kyste calcifié).

Le traitement est fonction de nombreux facteurs et en particulier de l'extension fongique dans le poumon et de la présence de crachats sanguinolents. L'itraconazole en administration intra-pariétale réduit généralement les symptômes mais ne détruit pas le champignon dans la cavité pulmonaire. L'élimination de la boule fongique nécessite une intervention chirurgicale en particulier si le patient présente une hémoptysie. Une autre approche thérapeutique possible est l'injection *in situ*, d'un autre antifongique (l'amphotéricine B) directement dans la cavité. Parfois, certains patients sans symptômes apparents guérissent spontanément.

#### I.3.1.5. Aspergilloses pleurales

Elles correspondent à une complication rare des affections pleurales mais peuvent également avoir une origine iatrogène à la suite d'une exérèse pulmonaire, un pyopneumothorax. En fonction de l'aération de la zone atteinte, on pourra retrouver soit une truffe aspergillaire (sans oxygène) soit un feutrage mycélien (pression faible) ou bien un "gâteau" mycélien avec têtes aspergillaires (pression forte).

### I.3.2. Aspergilloses ORL et ophtalmologiques

#### I.3.2.1. Sinusite aspergillaire

L'installation et le développement sont similaires à ceux décrits pour l'aspergillome. La symptomatologie est peu caractéristique, elle mime une sinusite chronique banale avec maux de tête chronique, malaise facial, vasoconstriction nasale et parfois épistaxis. Chez l'immunodéprimé, elle est très sérieuse et peut évoluer vers une aspergillose invasive.

Le diagnostic repose sur l'identification du champignon dans les liquides biologiques ou sur les biopsies provenant des sinus et sur l'examen tomodensitométrique.

Dans la plupart des cas, la thérapeutique de choix est l'utilisation d'amphotéricine B à fortes doses. La chirurgie est aussi très efficace, non seulement pour éliminer le champignon mais aussi pour se rendre compte de la localisation du foyer d'infection et de l'étendue des dommages tissulaires.

### I.3.2.2. Aspergillose de l'oreille : otite externe aspergillaire

Surinfection d'une otite externe banale après antibiothérapie ou corticothérapie, elle est souvent provoquée par *Aspergillus niger*. L'observation d'un prurit chronique associé à un écoulement et à des lésions érythémato-squameuses orientera le clinicien vers cette pathologie. Dans aucun cas le tympan n'est endommagé.

### I.3.2.3. Aspergilloses oculaires

Ces aspergilloses peu fréquentes peuvent se situer à différents niveaux. L'atteinte de l'orbite est très souvent secondaire à une atteinte sinusienne. L'affection de la cornée due en général à *Aspergillus fumigatus* résulte de l'administration de collyres contenant des antibiotiques ou des corticoïdes. Les voies lacrymales, la conjonctive et les paupières peuvent également être touchées à la suite d'un traumatisme (*A. niger*, *A. tamarii*). Une atteinte intra-oculaire peut être consécutive à une inoculation traumatique ou à une aspergillose invasive.

## I.3.3. L'Aspergillose invasive

### I.3.3.1. Introduction

Exposés en permanence à une atmosphère riche en spores aspergillaires (1 à 20 spores / m<sup>3</sup>), nos moyens de défense nous permettent de prévenir le développement des aspergilloses invasives. Celles-ci ne se rencontrent qu'exceptionnellement chez l'immunocompétent. Le développement des greffes d'organes et des chimiothérapies immunodépressives a entraîné une augmentation de leur incidence.

Elles sont définies par l'invasion aiguë des différentes structures anatomiques du parenchyme pulmonaire par des filaments mycéliens d'*Aspergillus*. De plus le champignon est capable de provoquer des lésions généralement d'aspect nécrotique, à l'intérieur desquelles il peut facilement proliférer. Dans la plupart des cas, ces affections sont attribuées à *A. fumigatus*.

### I.3.3.2. Physiopathologie

#### Le mécanisme :

Les moyens de défense de l'organisme contre le champignon sont de deux types. Le tapis mucociliaire, présent dans l'arbre bronchique, joue tout d'abord un rôle mécanique important dans l'élimination des spores inhalées. Une défense cellulaire est également mise en place par deux types de cellules intervenant à deux stades évolutifs du champignon :

- \* **Le macrophage alvéolaire** assure la destruction des spores et évite leur germination, et ce indépendamment des polynucléaires, de l'activation lymphocytaire et de l'immunité humorale.
- \* **Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes** quant à eux , assurent la résistance de l'organisme vis à vis de la forme mycélienne d'*Aspergillus* : produit de germination des spores. Les neutrophiles endommagent les filaments mycéliens aspergillaires en provoquant une altération de leur métabolisme et de leur structure (4).

Ainsi, les altérations de la fonction d'épuration bronchique et la perturbation des fonctions cellulaires intervenant dans la défense antifongique sont à l'origine des formes graves d'aspergillose pulmonaire invasive . L'immunité humorale intervient peu dans la défense anti-aspergillaire (5).

**La pathogénie :**

Suite à la colonisation de l'arbre trachéo-bronchique, l'*Aspergillus* pénètre la muqueuse de la bronche, détruisant l'épithélium bronchique et envahissant le cartilage. Les filaments mycéliens gagnent de proche en proche le parenchyme pulmonaire dont les alvéoles sont le siège d'une alvéolite fibrineuse. L'*Aspergillus* produit au cours de sa multiplication des facteurs de virulence au sein des tissus infectés, lui permettant de franchir les différentes barrières anatomiques et d'envahir les vaisseaux pulmonaires. Il est responsable de thromboses vasculaires et de la nécrose ischémique du parenchyme pulmonaire réalisant une véritable pneumopathie nécrosante. A partir des vaisseaux, tous les organes peuvent être atteints par dissémination aspergillaire : coeur, rein, foie, cerveau, os, tube digestif, peau, etc...

L'infection pulmonaire peut par ailleurs atteindre une localisation secondaire par voie hématogène d'une infection cutanée (cathéter veineux, plaie opératoire, etc ...) ou digestive.

## I.3.3.3. Facteurs favorisants

**Facteurs généraux :**

La diminution des facteurs de défense immunitaire est déterminante dans la survenue des formes invasives de l'aspergillose, celle-ci dépend de la maladie sous-jacente et de son mode de traitement.

\* **La granulopénie** profonde et prolongée inférieure à 500 cellules/mm<sup>3</sup>, souvent induite par la chimiothérapie, semble être le facteur le plus important . Elle explique la fréquence de l'aspergillose invasive chez les patients traités pour une hémopathie maligne ou les patients greffés.

\* **La chimiothérapie** : elle a, d'une part, un effet neutropéniant direct (toxicité médullaire), mais elle dégrade également le tapis bronchique muco-ciliaire.

\* **Les patients atteints de SIDA** lors de la période prolongée de granulopénie post thérapeutique ou du fait d'un déficit en macrophages (6).

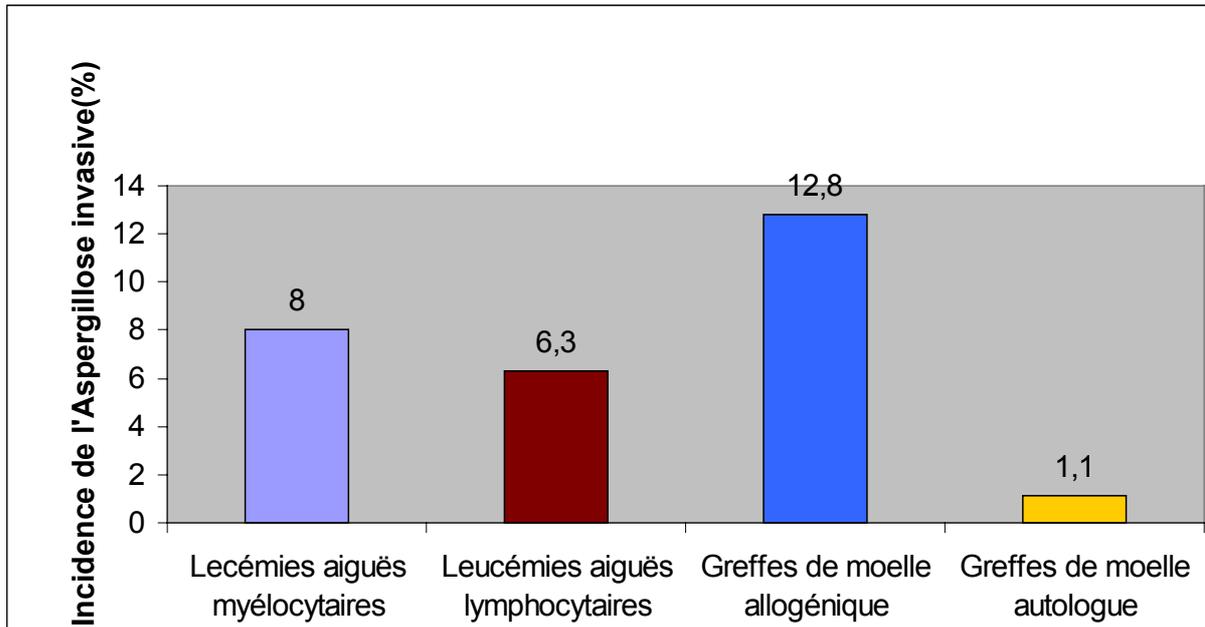


Figure n°2: Incidence de l'aspergillose invasive par pathologie hématologique

La forme invasive s'observe plus rarement chez les patients peu immunodéprimés, les facteurs de risque présumés sont alors l'alcoolisme, le diabète, l'insuffisance rénale, une maladie de système ou la corticothérapie prolongée.

Les infections virales seraient responsables d'une immunodépression transitoire, les virus le plus souvent incriminés sont le cytomégalovirus et le virus *influenzae* (7). Le virus semble agir à différents niveaux : il est capable d'altérer l'épithélium de l'arbre trachéo-bronchique, de diminuer la réponse chimiotactique des neutrophiles et des macrophages et d'entraver la fonction des lymphocytes T.

### **Les facteurs locaux :**

Le tabagisme, les séquelles de tuberculose, les antécédents de bronchopneumopathie chronique obstructive, de fibrose pulmonaire, la mucovicirose, les lésions tumorales bronchiques, peuvent être à l'origine de la colonisation de l'arbre respiratoire par *Aspergillus*.

**Facteurs environnementaux :**

La concentration élevée en spores aspergillaires de l'air ambiant, lors des travaux de rénovation ou de construction dans les hôpitaux peuvent entraîner l'apparition de véritables épidémies nosocomiales d'aspergilloses en particulier chez les patients sévèrement immunodéprimés (transplantation d'organes , hémopathie maligne, etc ...). Des moyens de filtration d'air sont ainsi mis au point et se sont révélés efficaces dans la prévention de l'aspergillose invasive dans les centres de greffe d'organes (8).

I.3.3.4. Tableau clinique

**L'aspergillose pulmonaire invasive**

L'Aspergillose pulmonaire invasive réalise un tableau de pneumopathie aiguë infectieuse souvent bilatérale, résistante aux antibiotiques, elle survient en moyenne vers le 15ème au 20ème jour de la granulopénie, chez des sujets porteurs d'hémopathie et traités par chimiothérapie agressive. La fièvre supérieure à 38,5° est quasi constante, mais peut manquer les premiers jours (9).

La persistance ou la recrudescence de la fièvre chez un malade leucopénique sous corticothérapie malgré une antibiothérapie à large spectre, doit faire suspecter une infection fongique. La toux est parfois accompagnée d'une expectoration difficile. La dyspnée est fréquente.

Les signes les plus caractéristiques sont représentés par :

**\*Les douleurs thoraciques localisées ou diffuses**, souvent de type pleural augmentées par la toux et l'inspiration profonde. Elles s'observent dans 66% des cas.

**\*Les hémoptysies parfois massives**, souvent plus tardives, elles apparaissent lors du processus d'excavation

L'examen clinique est pauvre révélant tout au plus des râles bronchiques, plus rarement des râles crépitants en foyer voire un syndrome pleural.

Initialement localisée au poumon, l'infection se propage rapidement conduisant dans 20 à 30% des cas à l'aspergillose polyviscérale.

### **Les localisations extrapulmonaires :**

Lorsqu'il y a une atteinte de deux organes non contigus ou plus, on parle d'aspergillose disséminée. Elle est le plus souvent due à une dissémination d'*Aspergillus* par voie hématogène à partir d'un point de départ broncho-pulmonaire. Mais la lésion primitive peut être également cutanée ou sinusienne et diffuse secondairement vers les poumons.

L'Aspergillose invasive peut disséminer dans différents organes :

\***L'atteinte cérébrale** : elle se présente sous forme d'abcès unique ou multiples. Il existe souvent des foyers d'infarctus ou de nécrose.

\***L'atteinte cardiaque** : On distingue trois formes :

-L'endocardite aspergillaire : elle survient habituellement après chirurgie cardiaque. Chez les immunodéprimés, le rôle des cathéters intraveineux semble être un facteur de risque majeur.

-Les abcès myocardiques : fréquents chez les greffés et les sidéens.

-Les péricardites : consécutives à une rupture d'un abcès myocardique, par contiguïté ou par voie hématogène.

\* **L'atteinte du tube digestif** : Elle comprend des ulcérations responsables d'hémorragie, de perforation ou d'occlusion.

\* **L'atteinte osseuse** : elle est souvent douloureuse, atteint principalement les parois des sinus maxillaires, les côtes et les vertèbres.

\* **Autres localisations** : sinusienne, cutanée, rénale, hépatique, vasculaire, splénique ou thyroïdienne ...

### I.3.3.5. Les examens radiologiques

#### **La radiographie thoracique**

Elle permet de localiser les foyers infectieux et met en évidence des lésions souvent multifocales et bilatérales de deux types :

- les formes diffuses : de mauvais pronostic, de diagnostic trop tardif ou dues à une contamination aérienne massive (souvent d'origine nosocomiale), à type de broncho-pneumonie, d'infiltrats plus ou moins excavés, correspondant à des infarctissements pulmonaires.
- les formes multinodulaires de diagnostic plus précoce et de meilleur pronostic.

#### **L'examen tomодensitométrique :**

Il permet de mettre en évidence un signe précoce évocateur d'aspergillose pulmonaire invasive, le "CT halosign". Il s'agit d'un halo péri-lésionnel de densité moins importante que celle du centre de la lésion, mais plus importante que celle du parenchyme pulmonaire (10).

L'examen TDM permet d'établir un bilan précis des lésions et de suivre l'évolution de l'aspergillose pulmonaire invasive

#### **Imagerie par résonance magnétique :**

L'imagerie par résonance magnétique nécessite un repérage préalable des lésions par la TDM. Elle représente un examen long et coûteux et sa place dans le diagnostic de l'aspergillose pulmonaire invasive reste actuellement discutable.

### I.3.3.6. Traitement

#### *Traitement médicamenteux*

L'aspergillose pulmonaire invasive est une affection grave dont le pronostic dépend de la précocité du diagnostic et de la rapidité de mise en route du traitement (11).

L'amphotéricine B désoxycholate (Fungizone®) à dose de 1.0 à 1.5 mg/kg/j demeure toujours le traitement de premier recours de l'aspergillose pulmonaire invasive. Si le patient présente une toxicité avec cet agent, une préparation phospholipidique (Ambisome®) à 5 mg/kg/j constitue un choix valable. Une fois la phase aiguë de l'infection passée et la neutropénie résolue, l'administration d'itraconazole (Sporanox®) à la dose de 400 mg/j peut compléter un traitement débuté par l'amphotéricine B.

De nouvelles molécules comme le Voriconazole (Vfend®) ou la Caspofungine (Cancidas®) viennent de faire leur apparition et représentent une réelle alternative thérapeutique.

En ce qui concerne les immunomodulateurs, leur rôle dans le traitement de l'aspergillose pulmonaire invasive reste incertain.

#### *Chirurgie*

Dans les formes localisées d'aspergillose pulmonaire invasive, l'intérêt d'une résection chirurgicale du foyer infecté avant la reprise de nouveaux traitements a été montré. Cette attitude peut permettre la réalisation de cures de chimiothérapie de consolidation, voire de greffe de moelle osseuse sans récurrence de l'infection fongique.

## I.4. Diagnostic

### I.4.1. Diagnostic mycologique

#### I.4.1.1. Les prélèvements

Les produits pathologiques sont recueillis dans des flacons secs et stériles. Il peut s'agir d'expectorations, ces dernières sont obtenues après lavage de la bouche par une solution iodée diluée. Fréquemment sujettes à contamination, elles doivent être renouvelées plusieurs jours de suite. La présence d'aspergillus dans les expectorations n'a de valeur que confronté au contexte radioclinique (12).

La fibroscopie bronchique, quant à elle, permet d'obtenir des prélèvements qui possèdent une meilleure valeur prédictive comme :

- l'aspiration des sécrétions bronchiques
- un brossage endobronchique
- un lavage broncho-alvéolaire
- une biopsie pulmonaire transbronchique

Dans les aspergilloses invasives, on prélèvera des échantillons sanguins et urinaires.

Le liquide pleural peut dans certains cas faire l'objet d' un examen.

#### I.4.1.2. L'examen direct

Cet examen s'effectue en microscopie optique entre lame et lamelle après avoir ajouté une goutte de lactophénol ou de NaCl 0.9% au prélèvement. On recherche la présence de filaments ou conidiophores septés et enchevêtrés associés ou non à des spores (Photo n°2). L' observation unique de spores ne signe en rien une aspergillose. En revanche, la découverte de têtes aspergillaires ( si le prélèvement provient d'une zone aérée) oriente fortement le diagnostic mais il ne suffit pas pour le confirmer.

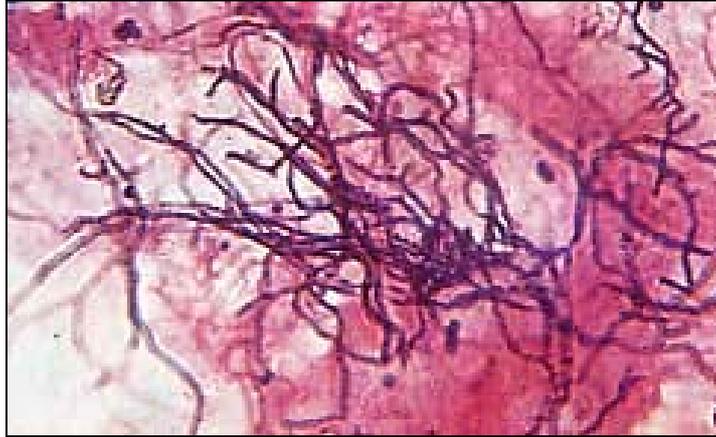


Photo n° 2 : Filaments aspergillaires dans un crachat

### I.4.1.3. La culture

Elle fait partie intégrante du diagnostic aspergillaire

#### *Milieu de culture*

*Aspergillus* pousse aisément en quelques jours en aérobiose. Le prélèvement doit être ensemencé rapidement sur milieu approprié type Sabouraud-chloramphénicol ou gentamycine. Le milieu de Czapeck sera utilisé pour les repiquages et les identifications d'espèces.

En 24-48 heures, une pousse peut être observée mais il faut garder les tubes 15 jours car certains prélèvements (peu riches en agent pathogène) comme ceux recueillis par LBA ou par aspiration bronchique peuvent mettre une dizaine de jours avant de donner une colonie.

#### *Identification de l'espèce*

Le diagnostic d'espèce sera porté sur un ensemble de critères macroscopiques et microscopiques.

#### **\*critères macroscopiques :**

- la vitesse de pousse
- l'aspect des colonies à maturité :
  - surface (duveteuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse)
  - relief des colonies (planes ou surélevées)
  - couleur au recto et au verso

**\*critères microscopiques**

- la taille du conidiophore, la présence ou non d'une pigmentation ou d'échinulation
- la taille et la forme de la vésicule
- l'aspect général de la tête aspergillaire : implantation des phialides sur la vésicule (en colonne, ronde, radiée)
- la présence ou non de métules
- la pigmentation, la taille et la surface des conidies
- l'existence ou non d'une reproduction sexuée (présence ou non de cléistothèces )

Tableau n° I: Caractères différentiels des espèces aspergillaires

<b>CARACTERES DIFFERENTIELS</b>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. terreus</i>
<b>Culture</b>	Poudreuse vert-bleuté foncé	Broussailleuse jaune verdâtre	Granuleuse noir	Poudreuse vert foncé	Veloutée marron à brun
<b>Conidiophore</b>	Lisse, court	Rugueux, long	Lisse et long	Lisse et court	Lisse et long
<b>Vésicule (ou tête aspergillaire)</b>	Simple renflement 20 à 30µm	Très sphérique Volumineuse : 35 à 45µm	Très sphérique Volumineuse : 50 à 75 µm	Hémisphérique Petite :8 à 12µm	Hémisphérique Petite :10 à 16µm
<b>Phialides et métules</b>	Une rangée de phialides serrée à disposition parallèle au conidiophore	Une rangée de phialides avec disposition radiaire ± une rangée de métules			Une rangée de phialides sur 1/2 ou 2/3 de la vésicule et une rangée de métules
<b>Conidies ou phialospores</b>	Très finement échinulées 2 à 3µm	Echinulées 3 à 6µm	Rondes et lisses 3,5 à 5µm	Echinulées 3,5 à 5µm	Lisses, rondes 1,5 à 2,5 µm
<b>Caractères particuliers</b>	Aspergillus les plus thermophiles :poussant bien à 37°C pouvant pousser jusqu'à 55°C	Agent essentiel des mycotoxicoses par l'intermédiaire de l'aflatoxine	Agent d'otomycoses (conduit auditif externe)	En culture : présence de cléistothèces de 300 à 500µm contenant des ascospores et surtout des Hüll-cells (cellules noisettes de 25µm) en amas entourant les cléistothèces	Très présents dans le sol.  Tropisme neuroméningé éventuel

## I.4.2. Diagnostic immunologique

Les aspergillus sont doués d'un potentiel immunogène important. Il est donc possible, quand l'hôte est immunocompétent, de diagnostiquer une aspergillose en détectant la présence d'anticorps dans le sérum du malade. Lors d'une immunodépression du patient, une recherche d'antigènes circulants sera plus appropriée.

### I.4.2.1. Recherche d'anticorps

La technique de confirmation demeure l'immunoélectrophorèse(IE). L'antigène employé est un antigène somatique et métabolique d'*Aspergillus fumigatus*. La formation d'au moins 3 arcs de précipitation ou l'ascension du nombre d'arcs signe la positivité de la réaction. L'IE doit être complétée par la révélation d'arcs supports d'activités enzymatiques (catalasique ou chymotrypsique). La présence d'un arc enzymatique doit faire suspecter une aspergillose. Cette technique reproductible et très spécifique manque toutefois de sensibilité.

L'électrosynérèse (ES), réalisée sur gel d'agarose ou sur membrane d'acétate de cellulose, s'avère plus sensible et beaucoup plus rapide que l'IE. Des problèmes de lecture sont quelquefois rencontrés quand les arcs de précipitation sont de faible intensité.

L'hémagglutination passive (HAI) est utilisée davantage dans le dépistage de l'Aspergillose. Cette technique rapide souffre d'un manque de spécificité et doit donc être associée à une réaction d'immunoprécipitation.

Une technique immuno-enzymatique type ELISA peut également détecter et doser les Ig E anti-Aspergillus présents dans les aspergilloses allergiques

Chez le sujet dont l'immunité humorale est fortement compromise (ex :aspergillose pulmonaire invasive), la capacité de produire des anticorps est presque nulle ou très retardée et la sérologie est peu prédictive. Toutefois, certaines études ont montré une certaine efficacité de la sérologie aspergillaire. Il est important de répéter les tests sérologiques une ou deux fois par semaine de façon systématique, pendant la période d'hospitalisation des patients à risque.

#### I.4.2.2. Recherche d'antigènes circulants

Chez l'immunodéprimé, la sérologie n'a pas réellement d'intérêt étant donné la pauvreté en anticorps dans le sérum de ces patients. Dans ce cas présent, il est plus opportun de rechercher la présence d'antigène circulant. La détection du polysaccharide pariétal (Galactomannane) est obtenue par agglutination de particules de latex sensibilisées avec un anticorps monoclonal antigalactomannane (kit Pastorex Aspergillus). Une étude dirigée par Maertens (2001) portant sur des patients greffés de moelle osseuse ou leucémique révèle une sensibilité de 90% et une spécificité de 98% (13). Toutefois ces résultats restent controversés.

D'autres méthodes sont à l'étude pour la détection de l'antigène aspergillaire comme ELISA ou la PCR.

Une antigénémie positive s'avère de très mauvais pronostic.

## II. LES ANTIFONGIQUES

Depuis ces vingt dernières années, les différentes classes d'antifongiques se sont développées et de nouvelles ont fait leur apparition sur le marché. Dans le traitement de l'aspergillose, l'amphotéricine B et l'itraconazole tiennent toujours une place importante mais certaines molécules innovantes comme le voriconazole ou la caspofungine représentent désormais de réelles alternatives thérapeutiques.

### II.1. Amphotéricine B

Depuis les années 60, cette molécule de la classe des polyènes reste une référence dans le traitement des mycoses profondes.

## II.1.2. Structure

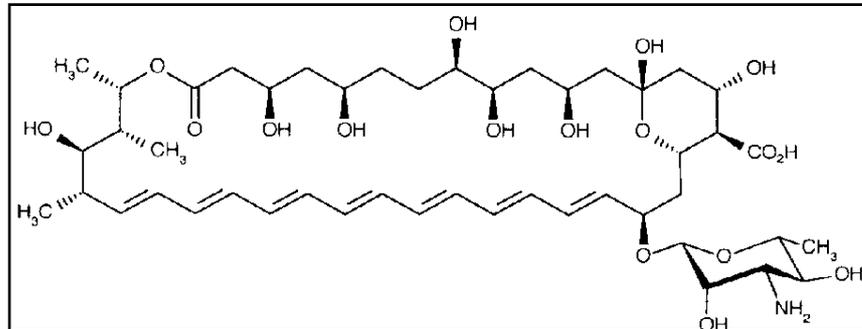


Figure n° 3 : Structure de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un macrolide cyclique polyène produit par fermentation de culture de *Streptomyces nodosus*. Elle possède une partie apolaire constituée par l'enchaînement de sept double liaisons conjuguées et une partie polaire formée par de nombreux groupements hydroxyles et un aminosucre : la mycosamine.

Insoluble et instable dans la majorité des solvants, elle se présente sous forme d'une poudre jaune photosensible. On peut obtenir une suspension micellaire d'amphotéricine B en la combinant à des sels biliaires (désoxycholate de sodium) dans un soluté glucosé.

## II.1.2. Mécanisme d'action

Son mécanisme d'action est d'ordre physico-chimique ; il entraîne donc très peu de sélection de souches résistantes. L'amphotéricine B interagit avec les stérols membranaires de manière à former des pores ou canaux par lesquels s'échappent des ions et des constituants essentiels de la cellule fongique. Cela induit une dépolarisation membranaire importante ainsi qu'une altération de la viabilité cellulaire.

Elle provoque en outre des inhibitions enzymatiques (ATPase) et une stimulation des oxydations cellulaires pouvant provoquer une dégradation de la cellule.

### II.1.3. Spectre d'action

Son spectre d'activité est large :

- levures pathogènes de l'homme (*Candida*, *Cryptococcus*...)
- champignons dimorphiques (*Histoplasma* ...)
- champignons filamenteux (*Aspergillus*)

Elle possède en revanche une activité variable vis à vis de :

- *Malassezia sp*
- *Trichosporon sp*
- *Fusarium sp*
- dématiés

La résistance à l'amphotéricine B est assez rare dans la mesure où le mécanisme d'action passe par un phénomène majoritairement physique. Des résistances primaires sont rencontrées avec certains filamenteux (*A. terreus*) ou levures (*C. lusitaniae*).

Les mécanismes de cette résistance ne sont pas exactement connus mais il pourrait s'agir d'une modification de la structure de la paroi fongique ou une déplétion en ergostérol de la membrane. On invoque également une diminution de la sensibilité cellulaire aux phénomènes d'oxydation (14).

Après de longs traitements avec l'amphotéricine B une moindre sensibilité peut apparaître avec certaines levures (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*)

En dépit de 45 ans d'utilisation le taux de résistance à cet agent reste relativement faible.

### II.1.4. Pharmacocinétique

De manière générale, l'amphotéricine B ne présente pas d'absorption par voie orale. Administrée par voie intraveineuse, elle se lie fortement aux protéines plasmatiques. De fortes concentrations tissulaires sont obtenues au niveau des poumons, du foie, de la rate et des reins. En revanche, sa distribution est assez faible au niveau du système nerveux central ainsi que dans les liquides biologiques.

Son élimination sérique est biphasique avec une demi-vie initiale de l'ordre de 24 heures et une demi-vie terminale d'élimination d'environ 15 jours suggérant une libération provenant d'un compartiment périphérique. L'amphotéricine B n'est éliminée que très lentement par les reins. On ne dispose pas de données détaillées concernant la métabolisation de cette substance. La bile constitue la voie essentielle d'élimination pour l'amphotéricine B (15).

### II.1.5. Indications et posologies

- Candidoses digestives

Gélules et suspensions buvables

Dose adulte 1.5 à 2 g/j pendant 15 à 20j

Dose enfant 50mg/kg/j pendant 15 à 20j

A prendre en dehors des repas

- Candidoses cutanéomuqueuses

Lotion

2 à 4 applications/j pendant 15j

- Mycoses profondes

Poudre pour usage parentéral

Perfusion lente IV (2 à 6 heures)

Dose : de 0.3mg/kg/j à 1.5mg/kg/j tous les 2 jours pour  
les infections sévères

Durée : 6 à 12 semaines

### **II.1.6. Toxicité**

L'Amphotéricine B présente un profil d'innocuité et de tolérance assez faible. En effet, l'incidence des réactions indésirables qui lui sont associées est relativement élevée et limite son utilisation.

On peut noter tout d'abord au cours des perfusions une intolérance générale à titre de fièvre, frisson, céphalée, nausées. Ces réactions peuvent être limitées par une prémédication : acide salicylique, antihistaminique, hydrocortisone ou en diminuant le débit de perfusion.

Mais l'effet néfaste majeur est la néphrotoxicité (34%) induite par l'acidose tubulaire. Elle se constitue de façon générale après quelques semaines de traitement. On observe une diminution de la filtration glomérulaire associée à une augmentation de l'urée et de la créatinine plasmatique et à une chute de la kaliémie. Cette atteinte, toutefois réversible, nécessite une surveillance quotidienne de la fonction rénale.

Une toxicité hématologique se traduisant par une anémie normochrome normocytaire est parfois rencontrée. Des thrombophlébites sont également possibles ; reliées au pH acide surtout si le médicament est administré par voie périphérique.

L'utilisation de cet antifongique sera donc contre-indiquée en cas d'insuffisance rénale. On diminuera autant que possible son association aux produits engendrant une néphrotoxicité (aminoside, ciclosporine) et aux médicaments induisant une hypokaliémie (digitalique, diurétique, anti-arythmique).

### **II.1.7. L'amphotéricine B liposomiale**

Afin de contrer les effets secondaires de l'amphotéricine B, de nouvelles formulations phospholipidiques et liposomiales ont été commercialisées. L'amphotéricine B y est solubilisée en milieu lipidique. La prépondérance de la forme monomérique sur la forme polymérique induit une tolérance systémique plus grande. Ces préparations montrent également une plus grande sélectivité pour les cellules fongiques. L'étude de Walsh a démontré une toxicité moindre au niveau des réactions induites par la perfusion. Le taux de néphrotoxicité comparative était aussi réduit de façon statistiquement significative (16-17).



Figure n° 4: Structure des nouvelles formulations d'Amphotéricine B

En revanche, le coût de ces formulations étant très élevé, il est nécessaire de contrôler leur utilisation au moyen de critères d'indications spécifiques.

## II.2. Itraconazole

L'itraconazole appartient à la famille des triazolés, classe d'antifongique qui a révolutionné la prise en charge thérapeutique des infections fongiques profondes.

### II.2.1. Structure

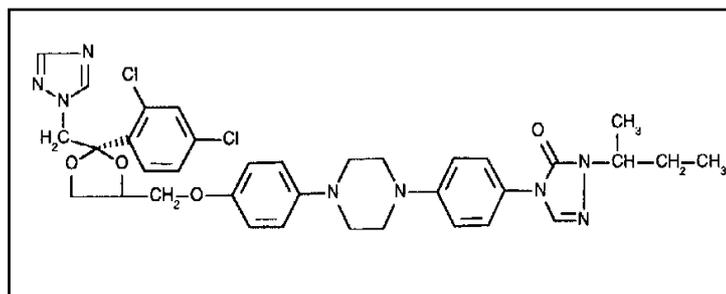


Figure n° 5 : Structure chimique de l'itraconazole

## II.2.2. Mécanisme d'action

L'itraconazole modifie la structure et la composition de la paroi fongique par inhibition préférentielle des enzymes du cytochrome P450. En effet, il provoque l'inhibition de la 14- $\alpha$ -déméthylase, enzyme impliquée dans la synthèse de l'ergostérol. La déplétion en ergostérol ainsi que l'accumulation de son précurseur enzymatique (le lanostérol) entraîne une désorganisation de la membrane qui perd alors sa perméabilité et sa fluidité.

En outre, cet antifongique interagit avec les acides gras de la membrane fongique provoquant une fuite de protéines, d'acides aminés et de potassium. On retrouve également une inhibition des enzymes oxydatives (catalases) de la chaîne respiratoire conduisant à une accumulation de peroxydes toxiques pour la cellule. D'autres phénomènes comme l'inhibition de la production de mycélium ou la diminution de l'adhésion fongique peuvent concourir également à l'effet fongistatique observé lors de l'administration de ce composé (18).

## II.2.3. Spectre d'action

L'itraconazole possède comme l'Amphotéricine B un spectre d'activité antifongique très large. Les espèces suivantes sont sensibles à son action :

- Champignons lévuriformes      *Candida sp*, *Cryptococcus neoformans*,  
*Malassezia sp*
- Champignons filamenteux      *Aspergillus*, Mucorales, Dermatophytes
- Champignons dimorphiques      *Histoplasma*, *Blastomyces dermatidis*...

En ce qui concerne *Candida*, son spectre inclut le *C. albicans*, le *C. tropicalis* et le *C. parapsilosis*. Il est peu actif contre le *C. glabrata* et totalement inactif contre le *C. krusei*.

*In vivo*, son activité est fongistatique mais peut se révéler fongicide à doses élevées *in vitro*.

#### **II.2.4. Résistance**

De nombreuses études ont démontré qu'il existait trois grands mécanismes expliquant la survenue de résistance dans la classe des azolés :

##### **\*modification de la lanostérol déméthylase**

Elle survient à la suite de mutations qui peuvent engendrer une altération de l'affinité des azolés pour l'enzyme. En effet, une surexpression du gène codant pour cette protéine enzymatique peut intervenir pour palier le déficit en ergostérol.

##### **\*modification de la $\Delta 15-6$ désaturase**

Des mutations apparaissant au niveau du gène ERG3 apportent à la cellule un mécanisme échappatoire à l'effet inhibiteur enzymatique des azolés.

##### **\*mécanisme d'efflux**

Ces systèmes d'efflux sont présents naturellement dans la cellule et permettent à la fois l'entrée et la sortie de certaines molécules. Une surexpression des gènes codant pour ce type de transporteurs confère à la cellule la capacité d'évacuer l'antifongique hors du secteur cellulaire.

#### **II.2.5. Pharmacocinétique**

L'itraconazole est efficace grâce à son métabolite actif : l'OH-itraconazole. Les capsules d'itraconazole présentent une faible biodisponibilité (55%) et il est important de les administrer avec une boisson acide. Il est conseillé de les prendre avec de la nourriture ou immédiatement après un repas. La formulation liquide est préférée, elle présente une biodisponibilité de 88% et doit se prendre à jeun.

Il est très lié aux protéines plasmatiques, sa distribution est excellente dans la plupart des tissus (sauf œil et LCR)

Sa métabolisation est hépatique et son élimination se fait essentiellement par voie biliaire. Il possède une demi-vie d'élimination d'environ 24 heures (19).

### **II.2.6. Indications et posologies**

On retrouve l'itraconazole dans les indications suivantes :

- Aspergillose aiguë invasive en relais de l'amphotéricine B
- Aspergillose broncho-pulmonaire et pulmonaire
- Mycoses exotiques : histoplasmosse, sporotrichose, chromomycose..
- Candidoses digestives résistantes au fluconazole ou chez le patient infecté par le VIH
- Cryptococcose : alternative au traitement classique

Forme galénique : gélule à 100 mg et suspension buvable à 100 mg/ml

Posologie : 100 à 400 mg /jour

### **II.2.7. Toxicité**

Les effets indésirables rencontrés avec l'itraconazole sont assez rares pour des traitements de courte durée. Cependant, cet antifongique peut tout de même provoquer des troubles digestifs variés (nausées, dyspepsie, douleurs abdominales), des réactions allergiques cutanées ainsi que des céphalées. Au cours de traitement plus long, son administration peut entraîner l'élévation du taux de transaminases hépatiques et parfois même une cytolyse hépatique ( la FDA US a recensé 24 cas d'hépatotoxicité imputables à l'itraconazole ).

Du fait de son action sur les enzymes microsomiales hépatiques, l'itraconazole se trouve impliquer dans de nombreuses interactions médicamenteuses. Son taux peut être

abaissé significativement lors de l'administration concomitante de Rifampicine, carbamazépine, phénytoïne. Au contraire, l'administration de ce triazolé peut potentialiser l'effet de nombreux médicaments à tropisme hépatique comme la ciclosporine, les anti-vitamine K, les sulfamides hypoglycémiant. La prise d'anti-acides diminuera l'action de l'antifongique par diminution de sa biodisponibilité.

## II.3. Nouvelles molécules

Ces dernières années, on a vu apparaître de nouvelles molécules avec des potentialités antifongiques importantes. Les principaux composés innovant pour le traitement des aspergilloses sont les suivants :

### II.3.1. Voriconazole et autres azolés

Le voriconazole (Vfend®) représente le premier composé d'une nouvelle génération de dérivés azolés ayant une activité élevée contre les souches d'*Aspergillus*.

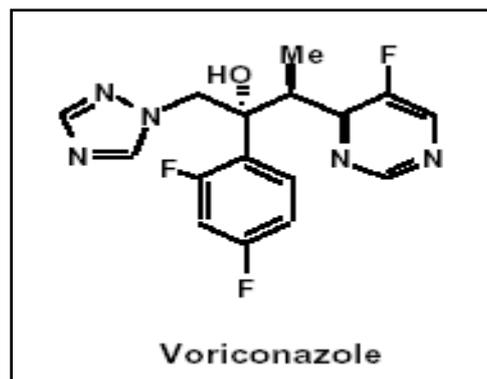


Figure n° 6: Structure du voriconazole

Il est intrinsèquement plus actif que le fluconazole contre les souches de *Candida* (CMI 4 à 16 fois plus faible). Il serait même actif vis à vis de *C. glabrata*, *C. krusei*. Fongicide sur *Aspergillus sp*, *Scedosporium sp*, *Fusarium sp* ; il est cependant peu actif sur les Mucorales.

Cet antifongique est disponible sous forme orale et injectable. Il présente une excellente biodisponibilité (96%). Tout comme les autres triazolés, il interagit avec les enzymes hépatiques induisant donc de nombreuses interactions. Les effets secondaires sont identiques à ceux de sa classe chimique avec toutefois une particularité : des troubles visuels signalés chez 8 à 24 % des patients testés à titre de vision brouillée, changement de coloration, sensibilité accrue à la lumière et des hallucinations.

Le Voriconazole a fait l'objet d'une étude visant à démontrer son effet sur l'aspergillose invasive. Cette étude comparative menée par Herbrecht et Denning en 2002, comparait ce composé à l'amphotéricine B conventionnelle (20). Réalisée sur 392 patients, les chercheurs ont mesuré une réponse au bout de 12 semaines. A la fin de la thérapie, le taux de réponse fut de 53% pour le groupe voriconazole versus 22% pour le groupe amphotéricine B. Dans cette étude, le voriconazole était donc associé à un taux de survie plus élevé chez ces patients atteints d'Aspergillose invasive.

Il a reçu l'AMM pour le traitement des mycoses invasives à *Aspergillus*, *Candida* (résistant au fluconazole), *Scedosporium* et *Fusarium*.

Posologie : Dose de charge 12mg/kg/j ou 800mg/j

Dose d'entretien 8mg/kg/j ou 400mg/j

Outre le Voriconazole, deux autres dérivés azolés, le posaconazole et le ravuconazole sont à des stades avancés d'expérimentations cliniques. Par rapport au fluconazole, ces composés signent une plus grande efficacité sur les souches de *C. albicans* et non *albicans* et sus *Aspergillus*.

#### \*Posaconazole

Ce médicament ressemble chimiquement à l'itraconazole. Sa biodisponibilité est majorée s'il est administré avec un repas riche en lipides. Sa demi-vie augmente avec la dose suggérant un mécanisme d'élimination saturable. Des études ont démontré une efficacité similaire à celle du fluconazole dans le traitement des candidoses oropharyngées ainsi qu'une potentialité dans le traitement de l'aspergillose chez les patients infectés par le VIH.

## \*Ravuconazole

Plus proche du fluconazole, cette molécule est en cours de développement pour une formulation orale. Le Ravuconazole présente l'avantage de causer moins d'induction au niveau du cytochrome 3A4 que les autres azolés limitant ainsi les effets secondaires et facilitant son utilisation chez les polymédicamentés.

### II.3.2. Caspofungine

Substance issue d'un produit de fermentation de *Glarea lozoyensis*, la caspofungine est le premier représentant d'une nouvelle classe d'antifongiques : les échinocandines. Ce sont des inhibiteurs de la synthèse du  $\beta$ -(1,3)D-glucane, composé essentiel de la paroi cellulaire de nombreux champignons pathogènes. Il n'existe pas chez les mammifères donc sa dégradation n'induit pas de toxicité. Contrairement à l'Amphotéricine B, la caspofungine joue sur la paroi cellulaire et non sur la membrane. En atteignant l'intégrité de la paroi, elle provoque une perméabilisation qui engendre une lyse de la cellule fongique (figure n°7).

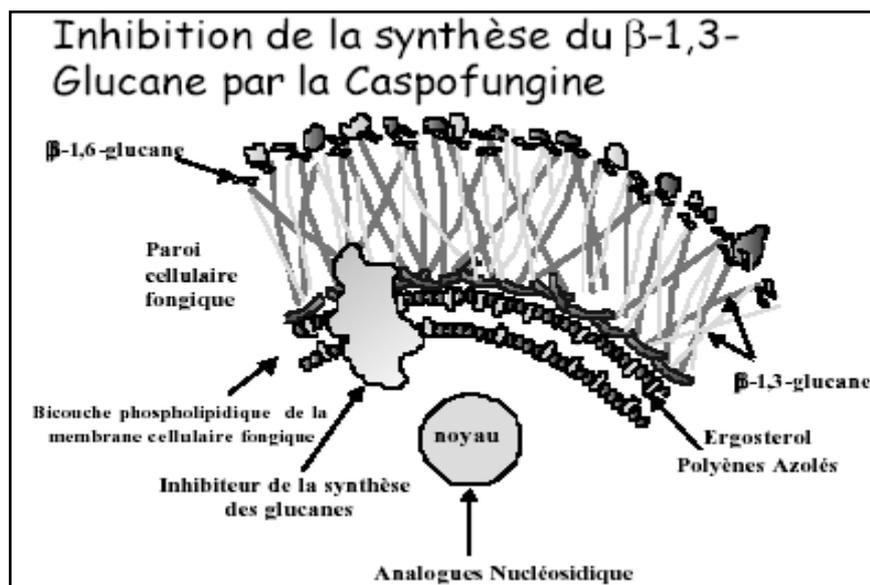


Figure n° 7 : Site d'action de la caspofungine

Elle possède une activité fongicide contre une grande variété de pathogènes :

- *Candida* : *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*.
- *Aspergillus* : *A. fumigatus* , *A. flavus*, *A. nidulans* , *A. niger*, *A. terreus*.

Cette molécule semble peu métabolisée par les enzymes du cytochrome P450 et n'interfère pas avec les autres antifongiques (itraconazole et amphotéricine B). Les effets secondaires les plus fréquents sont d'origine gastro-intestinale (nausées, vomissements). Des cas de thrombophlébites au cours de perfusion ainsi que des élévations des enzymes hépatiques ont été signalés. Les interactions médicamenteuses concernent le Tacrolimus, la ciclosporine et la rifampicine.

La caspofungine a été testée lors d'un seul essai, prospectif et non comparatif, comportant 69 patients atteints d'une aspergillose prouvée ou probable. Ces derniers étaient réfractaires ou intolérants aux traitements traditionnels. Administrée en perfusion intraveineuse, elle a eu un effet au moins partiellement favorable chez 40% des malades qui ont survécu avec peu de rechutes dans l'année qui a suivi le traitement.

Les données d'évaluation clinique (bénéfices/risques) de la caspofungine sont assez limitées mais on peut admettre que dans le cas précis des malades en échec après traitements de référence et dont le pronostic vital est engagé à cours terme, la caspofungine constitue un recours justifié (21-22).

Posologie : dose de charge unique de 70mg  
puis 50mg/j à partir du deuxième jour  
traitement poursuivi pendant au moins 7 jours après la résolution des  
symptômes et des signes

## **III. LES DIFFERENTES TECHNIQUES D'ANTIFONGIGRAMMES**

L'utilisation croissante des antifongiques et la montée des résistances qui en découle ont nécessité la mise en place de tests de sensibilité aux antifongiques déterminant la concentration minimale inhibitrice. Cette CMI correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance fongique.

Afin de palier aux disparités interlaboratoires observées régulièrement, la mise au point de méthodes standardisées et reproductibles était donc nécessaire. Ainsi, après avoir effectué des études multicentriques pour standardiser les différents paramètres, le NCCLS a donc proposé une méthode de référence en milieu liquide. Cette technique standardisée mais peu applicable en routine laisse place, au laboratoire de mycologie, à des méthodes plus souples et moins contraignantes comme l'E-Test® ou l'ATB-Fungus®.

Cependant, des progrès restent encore à effectuer notamment au niveau de la lecture de ces tests qui est souvent peu objective. Ainsi, de nouveaux procédés utilisant des marqueurs colorés ou des lectures par spectrophotométrie viennent élargir la panoplie de ces tests.

### **III.1. Facteurs influençant les tests de sensibilité aux antifongiques**

#### **III.1.2. Détermination du point final**

Cette détermination est source de très grandes variations interlaboratoires notamment pour les azolés qui présentent un important effet de traîne. Quant à l'Amphotéricine B, elle ne pose pas de problème, l'inhibition de croissance apparaissant assez nettement.

### III.1.3. Taille de l'inoculum

Pour les filamenteux, un inoculum plus important que pour les levures est nécessaire afin d'obtenir des résultats concordants. Il sera situé entre  $0.4 \times 10^4$  et  $5 \times 10^4$  UFC /ml. Sa préparation doit être rigoureuse car une concentration s'écartant des limites se traduira par une CMI faussée.

### III.1.4. Réalisation de l'inoculum

Plusieurs études multicentriques ont conclu à l'intérêt du spectrophotomètre pour la quantification de l'inoculum fongique. En raison des différences de taille et de propriétés de diffraction de la lumière des différents types de spores produits par les filamenteux, plusieurs plages de densité optique sont prévues en fonction des genres.

### III.1.5. Durée et température d'incubation

Une bonne corrélation interlaboratoire est obtenue en incubant les souches à 35°C. Pour le temps d'incubation chez les filamenteux, il varie avec le genre testé : 24 heures pour *Rhizopus sp*, 72 heures pour *Pseudallescheria boydii*, mais 48 heures pour la plupart des champignons dont *Fusarium sp*, *Aspergillus sp* et *Sporothrix schenkii*. Ces durées correspondent au temps nécessaire pour observer une pousse correcte du champignon dans le témoin positif.

### III.1.6. Le milieu

Celui-ci ne doit en aucun cas interférer avec l'antifongique testé ou avec la souche fongique dont on essaye de déterminer la sensibilité. Des conditions assez précises de pH sont recommandées pour ne pas affecter l'action du composé. Ainsi, un pH acide provoque une augmentation des CMI de l'amphotéricine B, du fluconazole et du kétoconazole tandis qu'un pH basique augmente celles de la 5-Fluorocytosine.

Le milieu RPMI 1640 tamponné à pH 7 communément employé présente de bons résultats avec tous les types de champignons testés (23).

## **III.2. La méthode de référence du NCCLS**

Il s'agit d'une méthode par dilution en milieu liquide. Les différents antifongiques testés sont dissous dans un solvant approprié puis on réalise une gamme de dix concentrations d'une progression géométrique de raison 2.

Ensuite, l'inoculum fongique est préparé à partir des spores ou conidies puis transféré dans les tubes contenant les différentes dilutions. Après incubation, la pousse est observé dans chacun des tubes à l'œil nu et des scores sont attribués en fonction de le trouble observé. A l'aide de ces scores, les CMI des souches testées sont alors déterminées.

Il existe en adaptation de cette technique une microméthode de microdilution utilisant une plaque 96 puits. Cette technique utilisée dans notre étude offre la possibilité de tester sur une même plaque 8 souches différentes et d'inclure un témoin positif et un témoin négatif.

Malgré cette modification, cela reste une technique lourde et fastidieuse inexploitable en routine au laboratoire.

Cependant, cette méthode bien standardisée représente une référence dans le domaine des antifongigrammes ainsi toutes les nouvelles molécules ou nouveaux procédés de détermination de CMI sont évalués grâce à cette technique.

Pour les levures, il existe le document M27-A qui a été approuvé en 1997 après 15 années de recherche. Concernant les filamenteux, une proposition de méthode standard intitulée M38-P servira de référence pour notre étude sur *Aspergillus*. Depuis la finalisation de nos travaux, une version "approuvée" intitulée M38-A a été publiée.

## **III.3. Tests commercialisés**

### **III.3.1. Tests sur milieux liquides**

Des tests commerciaux comme Candifast® (International microbio), Fungitest® (Biorad) ou ATB-Fungus® (Api-Biomérieux) ont été validées pour les levures. Ce sont des kits renfermant des réactifs pour tester un nombre restreint de concentrations d'antifongiques,

sélectionnées comme valeurs critiques. Ces méthodes, reproductibles et adaptées au laboratoire, ne déterminent pas réellement de CMI mais apportent seulement une réponse en terme de sensibilité. De plus, elles n'ont pas montré de fortes corrélations avec la méthode de référence. Elles ne sont plus utilisables dans la mesure où le résultat doit être aujourd'hui obligatoirement exprimé en CMI. Une nouvelle version de l'ATB-Fungus devrait d'ailleurs être commercialisé courant 2004 pour palier cet inconvénient.

### **III.3.2. Test sur milieu gélosé**

#### **III.3.2.1. L'E-Test®: méthode de diffusion/dilution**

Cette technique, largement employée en bactériologie pour les essais de sensibilité aux agents antimicrobiens, a été adaptée à un certain nombre d'antifongiques. Utilisée en routine pour la détermination des CMI des levures et des filamenteux, l'E-Test® se présente sous la forme d'une bandelette imprégnée d'un gradient exponentiel d'antifongique sur une des faces. Cette dernière, mise en contact avec une gélose préensemencée, libère le composé actif dans le milieu de culture.

Après une période d'incubation suffisante pour le développement fongique, il se forme une ellipse d'inhibition autour de la bandelette. L'autre face comporte une échelle graduée de concentrations. La CMI correspond à l'intersection entre l'ellipse d'inhibition et la bandelette.

Deux facteurs peuvent se conjuguer pour rendre difficile l'interprétation de l'E-Test : la croissance non homogène de l'étalement fongique et la présence fréquente d'une marge réduite ou d'un effet de traîne. Dans certains cas, notamment pour les azolés, la lecture est rendue difficile par la présence de micro ou macrocolonies dans la zone d'inhibition, d'une double ellipse ou d'un changement de morphologies des colonies au point d'intersection.

Lors de plusieurs études concernant les filamenteux, l'E-Test® a démontré une bonne corrélation avec la technique de référence pour l'amphotéricine B et l'itraconazole (Pfaller et al, 2000 et Szekely et al, 1999).

Toutefois, cette technique n'est pour le moment validée que pour les levures du genre *Candida* et pour *Cryptococcus neoformans*.

Le coût de revient de cette méthode s'avérant assez élevée, elle est donc réservée aux situations cliniques particulières.

### III.3.2.2 Autres méthodes sur gélose

Il existe des méthodes de détermination tel que l'antifongigramme Pasteur®. qui utilise des disques qui, tout comme la bandelette de l'E-Test®, délivrent une certaine quantité d'antifongique diffusant dans le milieu. On observe la formation d'un cercle d'inhibition centré par le disque, cercle dont on mesure le diamètre afin d'obtenir la CMI. Toutefois cette méthode n'est exploitable que pour la 5-fluorocytosine en raison de problème de diffusion des composés.

Un autre système, le Néo-Sensitabs® utilisant le même procédé, n'a pas démontré de bonnes corrélations avec la méthode de référence sur *Candida* (24).

Aucune publication ne révèle une application possible de ces méthodes chez les filamenteux.

## III.4. L'amélioration de la lecture

### III.4.1. La colorimétrie

En milieu liquide, la détermination du point final s'avère le plus souvent difficile et reste très subjective. Des innovations ont donc été proposées intégrant à la microméthode en milieu liquide un marqueur coloré. Ces tests colorimétriques sont basés sur la mesure de l'activité métabolique de la cellule et non sur la simple mise en évidence de filaments mycéliens comme les tests traditionnels.

Le MTT, bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium est un indicateur colorimétrique de potentiel rédox. De couleur jaune à l'état oxydé, il se transforme sous l'action des déshydrogénases mitochondriales, en un dérivé formazan insoluble bleu. L'intensité de couleur observée au sein du milieu sera donc proportionnelle au taux de cellules viables dans le puits. Inconvénient majeur de ce composé, il libère un dérivé formazan insoluble qu'il faut dissoudre (en lysant les cellules) avant la lecture au spectrophotomètre. Cette étape d'extraction peut être délicate et surtout elle constitue une

perte de temps en routine. Un autre sel de tétrazolium, le XTT, (2,3 bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5((phénylamino)carbonyl))-2h-tétrazolium hydroxyde), ne présente pas ce désagrément.

Ces méthodes incluant le MTT ou le XTT se sont révélées utiles pour *Candida*, *Cryptococcus neoformans* (Hawser,1998) et pour les moisissures comme *Aspergillus* ou *Fusarium*. Les CMI obtenues sont comparables à celles de la technique de référence. Pour Meletiadis (2001), la méthode XTT basée sur une lecture spectrophotométrique démontre un très haut niveau de sensibilité et de précision et peut constituer une méthode alternative pour les tests de sensibilité sur les champignons filamenteux (25).

Il existe également un autre marqueur colorimétrique employé dans les tests de sensibilité : l'Alamar blue ®. Tout comme les sels de tétrazolium, son changement de teinte dépend de l'activité enzymatique du champignon. Une lecture au spectrophotomètre affine la détermination du point de rupture. Certains composés présentent des produits fluorescents après réduction par les cellules viables. C'est cette propriété que nous allons développer à présent.

Le composé Alamar réduit est doué d'une activité fluorescente et peut donc prétendre à une lecture au fluorimètre ; méthode qui sera mise à profit au sein de notre étude.

### **III.4.2. La fluorimétrie**

#### **III.4.2.1 Principe de la spectrofluorimétrie (26)**

La spectrométrie de fluorescence étudie l'émission de lumière par des molécules en solution, excitées par un faisceau lumineux.

A température ambiante, la plupart des molécules se trouvent dans le niveau de vibration le plus bas du niveau électronique fondamental  $S_0$ .

Une source lumineuse de longueur d'onde choisie va éclairer la cellule de mesure. Chaque molécule peut alors absorber un photon. Un électron passe alors sur un niveau

électronique supérieur à n'importe quel niveau de vibration. Cette transition de  $S_0$  à  $S_1$  permet à l'électron de se retrouver à l'état excité.

Par collision avec d'autres molécules environnantes, la molécule excitée perd son énergie et revient à un niveau de vibration plus bas  $V_0$ .

Grâce à une durée de vie de l'état excité très faible, l'électron peut revenir à un niveau quelconque de vibration de l'état fondamental  $S_0$ . La différence d'énergie est émise sous forme d'un photon et permet l'émission de lumière fluorescente de longueur d'onde différente de celle d'excitation (fig.n°10 ).

Un spectrofluorimètre est ainsi constitué d'une source lumineuse de forte intensité émettant dans l'UV. Le monochromateur d'excitation encadré par une fente à chaque extrémité va éclairer le compartiment échantillon. L'intensité de fluorescence est alors lue perpendiculairement au trajet du rayonnement, après passage par le monochromateur d'émission.

Le détecteur utilisé est un photomultiplicateur qui convertit la lumière émise en courant électrique. Un système de lecture va alors transformer la réponse obtenue en tension. Après amplification, elle sera envoyée dans un système d'acquisition des données (fig. n°11 ).

La spectrofluorimétrie possède certains avantages par rapport à la spectrophotométrie (37).

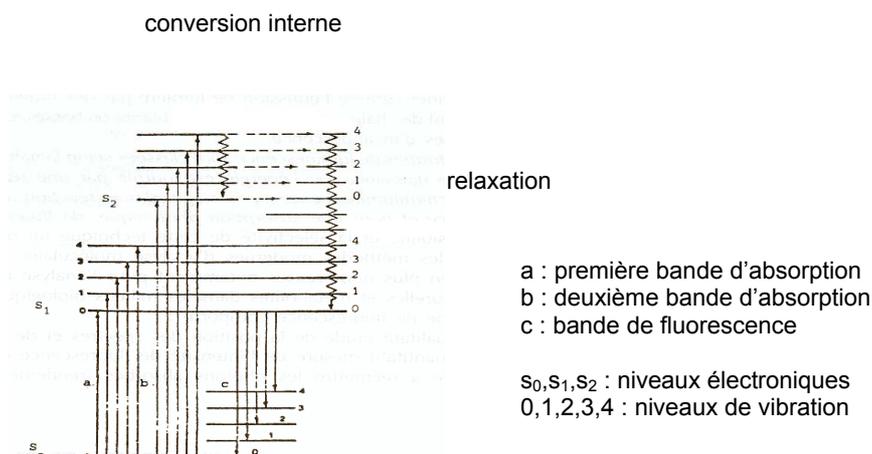


Figure n° 8: Origine de la fluorescence

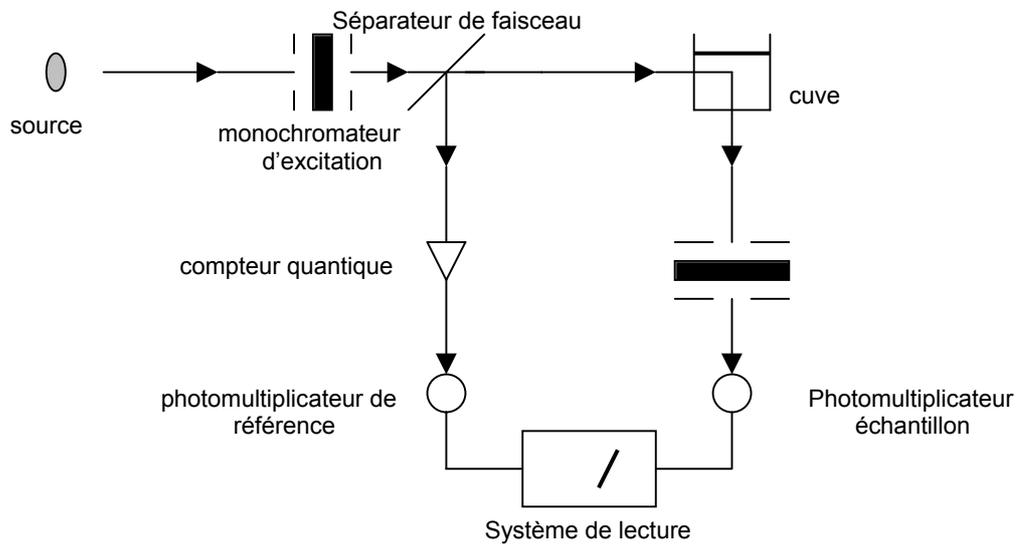


Figure n° 9: Schéma de l'appareillage

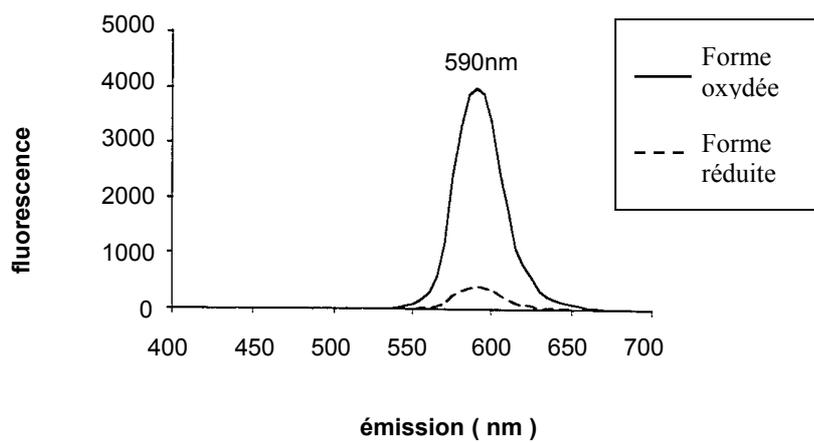


Figure n° 10: Spectre d'émission de fluorescence de l'Alamar Blue®

En effet, en fluorimétrie, deux longueurs d'ondes doivent être sélectionnées pour l'analyse d'un échantillon : celle d'excitation et celle d'émission. Ceci permet de distinguer des composés présentant une bande d'absorption identique mais des émissions différentes. Cette méthode d'analyse se trouve ainsi plus spécifique que la spectrophotométrie.

Elle est également plus sensible puisqu'elle permet de mesurer une intensité correspondant à une concentration de  $10^{-12}$  mol/L, alors qu'en spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible, la différence d'intensité mesurée entre celle incidente et celle transmise, correspond au mieux à une concentration de  $10^{-8}$  mol/L.

La spectrofluorimétrie s'avère être une méthode très sensible et spécifique possédant de nombreuses applications. Elle permet l'identification de substances fluorescentes et la détermination de spectre d'absorption d'une molécule donnée. De part sa grande sensibilité, l'analyse de substance à concentration très faible est possible.

Des molécules présentant une fluorescence naturelle peuvent être étudiées, mais également certaines substances non fluorescentes après transformation en dérivé fluorescent, ce qui permet d'élargir le domaine d'application de la spectrofluorimétrie.

#### III.4.2.2. L'Alamar Blue®

Ce composé trouve plusieurs applications dans le domaine de la recherche. Son potentiel fluorimétrique est mis à profit pour tester des nouvelles molécules antitumorales et pour l'évaluation de substances à visée antileishmanienne (27-28).

L'Alamar Blue®, substance bleue foncée à l'état oxydé, intervient au niveau de la chaîne respiratoire ou elle est réduite en un composé rose fortement fluorescent. On peut donc le détecter soit par colorimétrie soit par fluorimétrie en exploitant ses deux propriétés. Sa détection en fluorimétrie s'effectue à une longueur d'onde d'excitation de 550nm et une longueur d'onde d'émission de 590nm.

Contrairement au MTT, l'Alamar Blue® soluble dans l'eau, ne demande ni extraction ni solubilisation avant lecture. Son innocuité pour les cellules et sa stabilité dans le temps permettent d'effectuer facilement des études de cinétique. Le temps d'incubation est variable, dépendant du type cellulaire étudié.

Dans cette étude, nous avons exploité la propriété fluorescente de ce composé afin de mettre au point un nouveau test de sensibilité aux antifongiques applicable aux filamenteux.

# **CHAPITRE II**

## **MATERIELS ET METHODES**

# **I. LES SOUCHES ETUDIEES**

## **I.1. Souches de référence**

Les souches de références utilisées pour la détermination des CMI sont :

- *Candida parapsilosis* ATCC 22019
- *Candida krusei* ATCC 6258

Ces souches sont recommandées par le NCCLS pour l'étude de la sensibilité des antifongiques. A ce jour, il n'existe pas de souche de référence pour les filamenteux.

## **I.2. Souches d'origine clinique**

Pour cette étude, toutes les souches d'*Aspergillus* recueillies entre septembre 2001 et mai 2002 au laboratoire de Mycologie du CHU de Nantes et ayant fait l'objet d'un test de sensibilité vont être sélectionnées. Elles seront isolées, identifiées puis conservées à température ambiante sur milieu PDA avant les différents tests.

# **II. METHODES CONVENTIONNELLES**

## **II.1. Méthode de référence :document M38-P du NCCLS**

Nous suivrons tout au long de l'expérience les recommandations du document M38-P qui décrit en détail la technique de microdilution adaptée aux filamenteux.

### **II.1.1. Préparation du milieu de culture**

Le milieu RPMI 1640 (Sigma, St Quentin Fallavier, France) apparaît, selon plusieurs publications, le milieu le plus adapté pour tester l'Amphotéricine B et l'Itraconazole. Nous utilisons donc un milieu RPMI 1640 liquide contenant de la L-Glutamine mais sans bicarbonate. Ce milieu est tamponné à l'aide MOPS (acide 3 N-morpholino propane sulfonique)(Sigma) à une concentration finale de 0,165 M. Puis, on ajuste le pH entre 6,9 et 7,1 à l'aide de soude 10 M.

La dernière opération consiste à stérilisé le milieu grâce à un système de filtration Stéricup® (Millipore,France) utilisant un filtre de 0,22 µm. Une fois constitué, celui-ci est conservé entre 2°C et 4 °C.

### **II.1.2. Réalisation des plaques d'antifongiques**

L'itraconazole ( laboratoire Jansen, France) et l'Amphotéricine B (Sigma) sont des composés peu solubles dans l'eau donc ceux-ci sont dissous dans du DMSO ( diméthylsulfoxyde)(Sigma). Dans un premier temps, des solutions mères à 1600µg/ml sont réalisées par dissolution des poudres industrielles dans ce solvant.

La microméthode de référence préconise l'utilisation de 10 concentrations allant de 16 µg/ml à 0.0313 µg/ml. En suivant le protocole de dilution du NCCLS les différentes concentrations désirées seront obtenues de la manière suivante.

#### *\*Préparation des concentrations intermédiaires 100x*

Cette première série de dilutions est effectuée dans le DMSO

tubes	solution source (µg/ml)	dilution dans le DMSO au	Concentrations intermédiaires 100x (µg/ml)
tube 1	solution mère 1600		1600
tube 2	solution mère 1600	1/2	800
tube 3	solution mère 1600	1/4	400
tube 4	solution mère 1600	1/8	200
tube 5	tube 4 (200µg/ml)	1/2	100
tube 6	tube 4 (200µg/ml)	1/4	50
tube 7	tube 4 (200µg/ml)	1/8	25
tube 8	tube 7 (25µg/ml)	1/2	12,5
tube 9	tube 7 (25µg/ml)	1/4	6,25
tube 10	tube 7 (25µg/ml)	1/8	3,13

\* Préparation des concentrations finales d'antifongiques 2x

Cette série de dilutions a lieu en revanche dans du RPMI. On effectue à partir des concentrations intermédiaires obtenues une dilution au 1/50<sup>ème</sup> dans ce milieu afin d'obtenir la série de concentrations suivantes en µg/ml :

32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
----	----	---	---	---	---	-----	------	-------	------

Cette gamme sera distribuée à raison de 100µl par puits dans une microplaque de titration fond en U (Nunc). Après adjonction de l'inoculum fongique, l'antifongique sera donc dilué au ½. La gamme finale de concentrations obtenue sera donc la suivante :

16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
----	---	---	---	---	-----	------	-------	------	------

Deux puits seront réservés pour les témoins positifs et négatifs.

Les plaques d'antifongiques réalisées sont alors conservées à -70°C et peuvent être utilisées pendant une période de six mois.

### II.1.3. Préparation de l'inoculum fongique

Les souches d'*Aspergillus* isolées sont ensemencées en tube sur milieu PDA (gélose pomme de terre glucosée) pendant 7 jours à une température de 37°C selon les recommandations du NCCLS.

La culture est arrosée par environ 1 ml de solution saline 0,85%. Afin de recueillir un nombre suffisant de conidies et de filaments, le contenu du tube est agité à l'aide d'une pipette Pasteur. La réalisation d'une suspension homogène est difficile à obtenir. Il est donc conseillé d'ajouter à la solution de NaCl une goutte de Tween 80, tensioactif favorisant la dispersion des conidies dans le liquide.

Ensuite, la suspension est transférée dans un tube stérile décantée de manière à laisser sédimenter les fragments mycéliens. Le surnageant est prélevé et est soumis au vortex quelques secondes afin d'homogénéiser la suspension de conidies. La turbidimétrie est lue par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 530 nm. Elle est ajustée à 0.09-0.11 (80-82% de transmission) avec le NaCl 0,85% à 0.09-0.11 (80-82% de transmission) afin d'obtenir l'inoculum  $2 \times (0.4 \text{ à } 5 \times 10^4 \text{ UFC/ml})$  Pour des raisons pratiques, nous avons standardisé une

mesure en Mc Farland après avoir démontré la corrélation entre les deux unités de mesure. Une turbidimétrie comprise entre 0.25 et 0.3 Mc Farland est donc retenue.

La suspension obtenue est diluée dans le milieu RPMI au 1/50<sup>ème</sup> puis distribuée dans les puits de la plaque le jour du test. Pour permettre un certain contrôle de l'inoculum, une quantification est effectuée en parallèle sur gélose de Sabouraud : 10µl d'une dilution au 1/1000 de l'inoculum 2x dans du RPMI y sont déposés puis, après 24 heures d'incubation, les colonies sont dénombrées.

#### **II.1.4. Ensemencement des plaques et incubation**

Après sa réalisation, l'inoculum doit être ensemencé dans les 15 minutes ou dans les 2 heures s'il est conservé au réfrigérateur. 100 µl de cette suspension sont introduits dans les onze puits contenant les dix concentrations de l'antifongique ainsi que le témoin de pousse (ou témoin positif). La concentration fongique est alors de 0,2 à 2,5x10<sup>4</sup> CFU/ml.

Le témoin négatif comporte uniquement 200 µl de RPMI.

Les plaques ainsi réalisées sont incubées à 35°C pour une durée de 48 heures.

#### **II.1.5. Lecture des résultats**

La lecture des plaques est effectuée à l'aide d'un miroir incliné. Pour chaque puits, il faut estimer la pousse fongique à l'œil nu. Pour cela, on compare les différents puits tests contenant l'antifongique avec le témoin positif et on leur attribue des scores allant de 0 à 4 en respectant le tableau suivant.

Score 0 : absence de culture, milieu optiquement clair (100% d'inhibition de croissance)

Score 1 : léger trouble (environ 75% d'inhibition soit une croissance d'environ 25% du témoin positif)

Score 2 : forte réduction d'opacité (environ 50% d'inhibition du témoin)

Score 3 : légère réduction d'opacité (environ 25% d'inhibition du témoin)

Score 4 : pas de réduction d'opacité (0% d'inhibition, croissance comparable au témoin positif)

Concernant l'amphotéricine B, la concentration minimale inhibitrice est considérée comme la concentration la plus faible révélant un score de 0. Pour l'itraconazole, celle-ci est définie comme la plus faible dilution donnant un score de 2. Cependant, des études récentes ont montré l'intérêt pour les azolés et notamment l'itraconazole de prendre un score de 0. Dans notre expérience, ces deux valeurs seront recherchées.

Pour valider les résultats obtenus, le témoin négatif ne devra présenter aucune trace de pousse fongique.

### **II.1.6. Interprétation des CMI**

Aucun critère d'interprétation n'a été validé pour les filamenteux. Toutefois, en ce qui concerne l'itraconazole, la concentration critique, c'est à dire la concentration au dessus de laquelle la souche est considérée résistante est fixée à 4µg/ml, concentration généralement employée au niveau du laboratoire de mycologie a été retenue dans notre étude.

## **II.2. E-Test®**

L'E-Test® (AB Biodisk, Suède) est une méthode de détermination de CMI basée sur une combinaison de tests de dilution et de diffusion. Technique utilisée en routine au laboratoire, elle s'avère plutôt fiable et rapide mais pose parfois des soucis de lecture.

La bandelette E-Test imprégnée du gradient d'antifongique doit être conservée à -20°C jusqu'à utilisation.

### **II.2.1. Milieu**

Le milieu de culture utilisé pour tester l'amphotéricine B et l'itraconazole sera une gélose RPMI enrichie de 2% de glucose et tamponnée par du MOPS (0.165M).

## II.2.2. Inoculum

La réalisation de l'inoculum fongique est relativement semblable à celle du NCCLS. Une densité égale à 0,5 Mc Farland sera permettre d'ajuster la concentration en conidies.

## II.2.3. Ensemencement

L'ensemencement est effectué à l'aide d'un écouvillon stérile. Celui-ci, plongé dans la suspension puis essoré sur les parois du tube, est alors frotté sur la surface de la gélose en tournant la boîte trois fois de 90° pour permettre une bonne répartition de l'inoculum. Les boîtes sont ensuite mises à sécher durant une quinzaine de minutes.

Les bandelettes sorties au préalable sont alors déposées à l'aide d'une pince à épiler à la surface de la gélose.

## II.2.4. Incubation

Les milieux sont ensuite mis à incuber pendant 48 heures à une température de 35°C.

## II.2.5. Lecture

Après la période d'incubation, la CMI est déterminée de façon visuelle en observant la pousse fongique sur la gélose. Cette concentration correspond à l'intersection des deux ellipses d'inhibition.

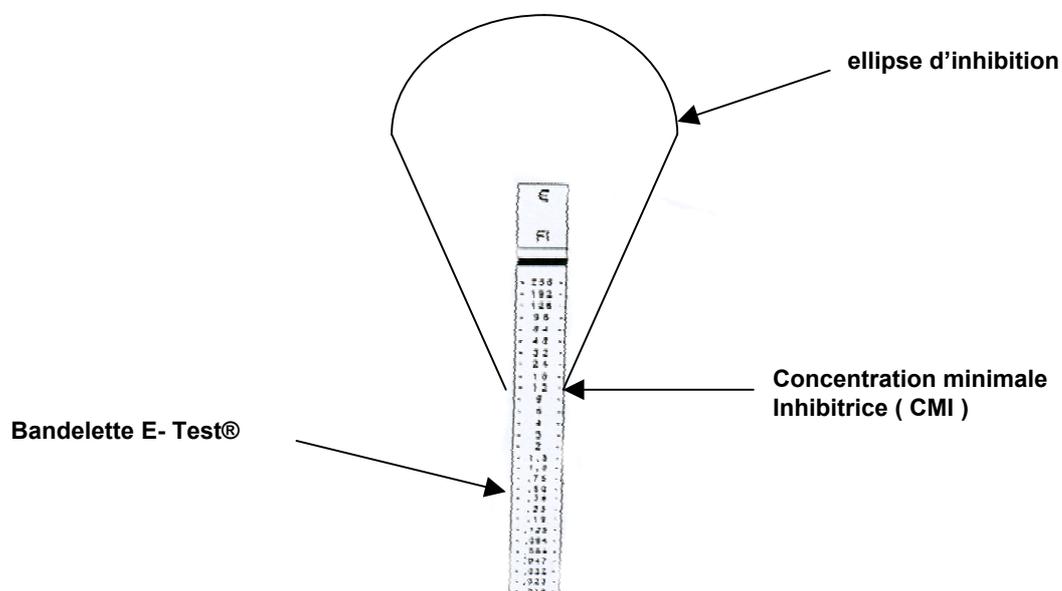


Figure n° 11: Technique du E-Test®. Ellipse d'inhibition après 24 heures d'incubation

## III. TEST DE FLUORIMETRIE : LE MAF-TEST

### III.1. Protocole

Cette méthode d'antifongigramme précédemment testée sur des souches de *Candida*, a donné des résultats encourageants incitant le laboratoire à poursuivre son évaluation sur des souches de filamenteux. La technique utilisée sur les *Aspergillus* a été mise au point par extrapolation de la méthode sur *Candida*.

Il s'agit d'une méthode en milieu liquide reprenant le principe de la technique du NCCLS et alliant un mode de lecture moins subjectif basé sur la mesure de fluorescence d'un composé présent dans le milieu de culture.

#### III.1.1. Préparation des plaques d'antifongiques

Dans cette technique, seulement trois concentrations d'antifongique seront testées sur chaque souche. Il convient donc de choisir des concentrations critiques stratégiques afin de déterminer au mieux la sensibilité des souches testées. Pour les filamenteux, il n'existe pas encore de critères d'interprétation pour les CMI mais les concentrations suivantes couramment employées, ont été retenues :

Itraconazole Sensible < 4µg /ml

Résistant > ou égale à 4µg/ml

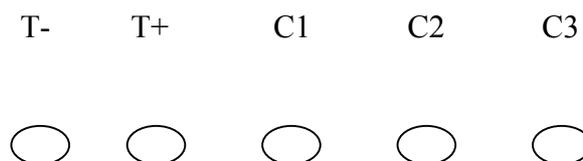
Amphotéricine B Sensible < ou égale à 1µg/ml  
Résistant > 1µg/ml

Trois concentrations de l'antifongiques sont donc choisies et préparées à partir des solutions mères de la même manière que pour la technique du NCCLS. Ainsi, les différentes concentrations critiques 2x sont réalisées par dilution dans le milieu de culture RPMI 1640. 100 µl sont alors distribués dans les cupules de la microplaque.

Pour une souche donnée testée sur un antifongique, cinq puits seront donc utilisés sur la plaque : trois puits pour les concentrations d'antifongique (100µl d'ATF), un puits témoin positif de contrôle de pousse (100µl de RPMI), un puits témoin négatif contrôlant la stérilité du milieu (200 µL de RPMI) faisant office de blanc

Après dépôt des solutions d'antifongiques, 10 µl du fluorochrome sont ajoutés dans chaque cupule.

Les plaques ainsi préparées sont congelées à -70°C et peuvent être utilisées dans les 6 mois.



### III.1.2. Réalisation de l'inoculum et ensemencement

Ces étapes reprennent le protocole décrit au niveau de la microméthode du NCCLS.

### III.1.3. Lecture des résultats

La lecture des plaques est réalisée par spectrofluorimétrie (fluorolite 1000 Dynatech) après excitation à 550 nm et émission à 590 nm. L'appareil mesure la fluorescence émise par le composé Alamar blue réduit dans les différents puits.

Aux valeurs mesurées pour les puits avec antifongique (fluo fx où x est la concentration de l'antifongique f) et le puits témoin positif est retranchée la valeur de fluorescence du blanc. D'après ces résultats, le pourcentage d'inhibition sera alors défini de la manière suivante :

$$\text{Fluo ATF}_x = \text{fluo fx} - \text{fluo blanc}$$

$$\text{Fluo TP} = \text{fluo témoin positif} - \text{fluo du blanc}$$

$$\% \text{ inhibition} = ((\text{Fluo TP} - \text{Fluo ATF}_x) / \text{Fluo TP}) \times 100$$

Ces pourcentages d'inhibition calculés pour les différentes concentrations permettront de déterminer la concentration minimale inhibitrice de l'antifongique testé. Cette CMI est définie comme la plus faible concentration provoquant 80 % d'inhibition pour l'itraconazole et 90 % d'inhibition pour l'amphotéricine B.

## III.2. Agrément

Les valeurs de CMI obtenues pour les souches de référence avec le MAF test doivent être comparées à celles recommandées par la méthode du NCCLS. Une concordance en terme de CMI mais également en terme d'interprétation (R ou S) permettra de valider les résultats.

## III.3. Répétabilité et reproductibilité

Ces deux paramètres sont étudiés afin de déterminer la précision d'une méthode d'analyse.

### III.3.1 Test de répétabilité

Il est réalisé au cours d'une même série d'analyse, dans les mêmes conditions expérimentales, par un même individu avec les mêmes appareils et réactifs. Pour ce faire, deux souches d'origine clinique incluses dans le test sont testées à six reprises au sein d'une même plaque.

Les résultats obtenus permettront de calculer le pourcentage P de valeurs situées à plus ou moins deux dilutions d'écart par rapport à la moyenne des CMI.

La répétabilité est également mesurée en calculant le coefficient de variation à partir de l'écart-type des CMI.

$$CV = (E \times 100) / m \quad E = \sqrt{[\sum (xi - m)^2 / (n - 1)]}$$

m : moyenne des 6 CMI

n : nombre d'essais

### III.3.2 Test de reproductibilité

Cet essai quant à lui renseignera sur la précision de la méthode quand cette dernière est effectuée dans des conditions différentes. Les deux souches citées auparavant seront testées lors de six séries différentes entraînant des modifications certaines de paramètres expérimentaux (changement de lots des réactifs, inoculum différents...).

## IV. COMPARAISON DU MAF TEST PAR RAPPORT AU NCCLS ET A L'E-TEST

### IV.1. Expression des résultats

#### IV.1.1. Concordance en terme de CMI (CCMI)

Les CMI obtenues par les deux tests sont comparées et les différences exprimées en  $\log_2$  de dilution d'écart. Le pourcentage de concordance CCMI se calcule de la façon suivante :

$$\text{CCMI}(\%) = \frac{\text{nombre de cas où la différence n'excède pas plus de 2 dilutions d'écart}}{\text{nombre total de réponses}} \times 100$$

#### IV.1.2.1 Concordance en terme d'interprétation (CI) :

Pour un antifongique donné la concordance (%) d'une technique par rapport à la méthode de référence du NCCLS se définit comme le rapport entre le nombre de réponses identiques en terme d'interprétation (R, S) et le nombre total de réponses :

$$\text{CI}(\%) = \frac{\text{nombre de réponses identiques au NCCLS}}{\text{nombre total de réponses}} \times 100$$

Son degré de significativité est évalué par le test de Friedman et de Dunett .

Pour cela, un ordre est attribué à chaque réponse, afin de tenir compte du degré de discordance éventuel entre deux résultats.

-Résistant : 1

-Sensible : 2

Une comparaison globale des trois techniques via le test de Friedman est tout d'abord réalisée.

Pour l'étude de chaque antifongique, on obtiendra le tableau suivant :

Variable	Somme des rangs	Moyenne des rangs
NCCLS	w	w/n
E test	x	x/n
MAF test	y	y/n

(n = nombre de souches testées)

Si la probabilité (p) obtenue à l'issue de ce test est inférieure à 5%, les trois méthodes sont concordantes et la différence est alors non significative.

Si la probabilité (p) obtenue est supérieure à 5%, il existe une discordance entre les méthodes. Aussi, afin de déterminer lesquelles diffèrent entre elles, il faut effectuer une comparaison multiple des moyennes des rangs.

Chaque méthode est comparée à la méthode de référence grâce au test de Dunnett. Pour cela, une valeur seuil appelée « plus petite valeur significative » (PPDS) est calculée :

$$PPDS = d_{\infty} \sqrt{(k(k+1)/6n)}$$

K= nombre de traitements - celui de référence

n= nombre de souches

$d_{\infty}$  ( 5%, k=3, bilatéral ) = 2.37 , d'après la table de Dunett

$d_{\infty}$  ( 5%, k=2, bilatéral ) = 2.21 , d'après la table de Dunett

Si  $| \text{moyenne du rang} - \text{moyenne du NCCLS} | > PPDS$ , la différence entre le test étudié et le NCCLS est significative (DS).

Si  $| \text{moyenne du rang} - \text{moyenne du NCCLS} | < PPDS$ , la différence entre le test étudié et le NCCLS est non significative (DNS).

# **CHAPITRE III**

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. LES SOUCHES

Lors de notre étude, 48 souches d'*Aspergillus* ont été recueillies. Dans ce panel, différentes espèces du genre *Aspergillus* sont représentées mais *Aspergillus fumigatus* est largement majoritaire. Espèce la plus fréquemment rencontrée dans les prélèvements, *A. fumigatus* est responsable de plus de 90% des aspergilloses invasives.

Tableau n° II : Répartition des souches suivant l'espèce

Espèces	Nombre
<i>Aspergillus fumigatus</i>	45
<i>Aspergillus terreus</i>	1
<i>Aspergillus nidulans</i>	1
<i>Aspergillus flavus</i>	1

Ces souches proviennent de prélèvements variés mais la plupart est issue de l'appareil broncho-pulmonaire. Le crachat représente un prélèvement simple et peu invasif, il est donc très souvent employé. Ce type de prélèvement étant souvent le reflet d'une simple contamination, les techniques plus invasives telle que la fibroscopie lui sont préférées.

Tableau n° III : Répartition des souches selon le prélèvement

Prélèvements	Nombre	Pourcentage
Crachat	32	64.2
LBA	5	10.4
Piège	3	6,3
Aspi Bronch	3	6,3
Liq pleural	1	2.1

Sinus	1	2,1
Biopsie	1	2,1
Pus	1	2.1
Trachée	1	2,1

En ce qui concerne l'origine clinique des souches isolées, elles proviennent pour 84% de trois services : la pédiatrie, la pneumologie et l'unité de transplantation. Pour les deux premiers, c'est le reflet de l'altération du tractus respiratoire qui signe bien entendu le recrutement. En effet, les souches issues du service de pédiatrie concernent principalement des patients atteints de mucoviscidose très sensibles aux infections pulmonaires. Pour l'unité de transplantation, la baisse des défenses immunitaires explique la sensibilité des patients.

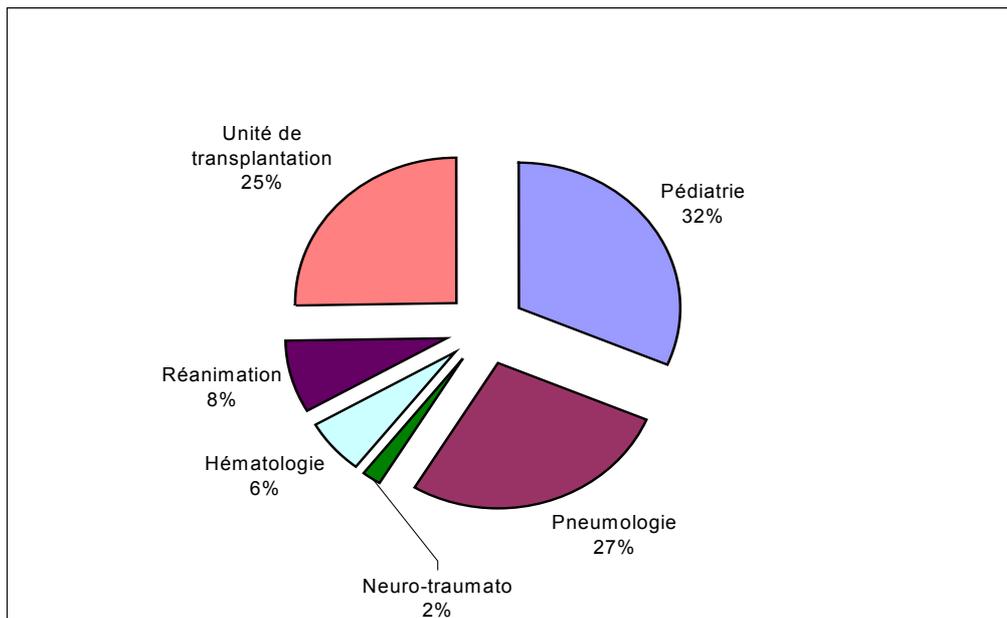


Figure n°12: Répartition des souches par service clinique

## II. TECHNIQUE DE REFERENCE DU NCCLS

48 souches d'origine clinique du genre *Aspergillus* technique ont été testées par la technique de référence sur deux antifongiques : l'amphotéricine B et l'itraconazole. Le premier sera testé à deux reprises afin de résoudre un problème apparu dans le protocole, tandis que l'itraconazole bénéficiera de deux modes de lecture.

## II.1. Amphotéricine B

Cette première série de résultats apparaît surprenant avec un taux de résistance des souches testées dépassant les 70 %. Des résultats similaires ont déjà été retrouvés lors de récentes études sur *Aspergillus* et sur *Candida* évaluant la sensibilité vis à vis de l'Amphotéricine B par le NCCLS (Thèse Franck Batguzere, 2001, Apport de la microméthode du NCCLS dans la détermination des CMI ...) (29).

Le protocole expérimental a donc été revu en détail afin d'expliquer ce phénomène récurrent. Le fait d'utiliser une poudre industrielle dont le degré de pureté n'est que de 80% pourrait être à l'origine de l'augmentation significative des CMI des souches testées vis à vis de l'Amphotéricine B.

En prenant en compte dans la préparation des solutions mères ce paramètre, les résultats obtenus correspondent à des valeurs plus acceptables se rapprochant des valeurs retrouvées dans la bibliographie. En effet, la moyenne des CMI est de 0,91 et le taux de résistance chute à seulement 2 %. Bien que les CMI ne soient descendues que d'une dilution, ceci suffit pour changer le résultat en terme d'interprétation. Les résultats obtenus avec ce protocole modifié (série 2) seront donc retenus pour la comparaison avec les autres tests.

Tableau n° IV: Résultat de la 1<sup>ère</sup> série du NCCLS

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
1	1	S
2	2	R
3	2	R
4	2	R
5	1	S
6	1	S
7	2	R
8	2	R
9	2	R
10	2	R
11	2	R
12	2	R
13	2	R
14	2	R

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
25	2	R
26	2	R
27	2	R
28	2	R
29	1	S
30	1	S
31	1	S
32	2	R
33	2	R
34	2	R
35	2	R
36	2	R
37	2	R
38	2	R

15	2	R
16	1	S
17	1	S
18	2	R
19	2	R
20	2	R
21	2	R
22	2	R
23	2	R
24	2	R

39	2	R
40	2	R
41	2	R
42	1	S
43	1	S
44	2	R
45	2	R
46	1	S
47	1	S
48	1	S

Tableau n° V : Résultats de la 2<sup>ème</sup> série du NCCLS

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
1	0,5	S
2	0,5	S
3	0,5	S
4	1	S
5	1	S
6	0,5	S
7	0,5	S
8	1	S
9	1	S
10	1	S
11	1	S
12	1	S
13	1	S
14	1	S
15	1	S
16	1	S
17	0,5	S
18	1	S
19	1	S
20	1	S
21	1	S
22	1	S
23	1	S
24	1	S

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
25	1	S
26	1	S
27	1	S
28	1	S
29	0,5	S
30	0,5	S
31	0,5	S
32	0,5	S
33	1	S
34	1	S
35	2	R
36	1	S
37	1	S
38	1	S
39	1	S
40	1	S
41	1	S
42	1	S
43	1	S
44	1	S
45	0,5	S
46	1	S
47	1	S
48	1	S

## II.2. Itraconazole

Selon le document M38-P, la CMI pour les azolés correspond à la dilution pour laquelle on attribue un score égal à 2 (inhibition partielle ou 50% d'inhibition). Des travaux plus récents suggèrent que la lecture du critère à 100% d'inhibition (score 0) détecte mieux la résistance d'*Aspergillus* à l'Itraconazole (Espinel-Ingroff, 2001) (30). De ce fait, ces deux modes de lecture ont été retenus pour cette étude.

Une seule souche voit sa CMI significativement augmentée passant de 1 à 16 µg/ml. Pour cette souche, un important effet de traîne était remarquable impliquant cette variation importante. Au total, 95% des souches sont situées dans l'intervalle + ou - 2 dilutions.

En terme d'interprétation, il existe de très faibles variations (1 souche sur 48) entre les deux méthodes. L'attribution du score 2 relatif à la méthode M38-P pour la détermination des CMI étant assez subjective et la différence entre les deux méthodes (NCCLS 50 et NCCLS 0) peu significative, il est donc plus aisé de recourir au score 0 facilement déterminé à l'œil nu. C'est donc ce dernier protocole qui sera retenu.

## **III. E-TEST**

Cette technique de routine évalue la sensibilité des 48 souches sur l'amphotéricine B et l'itraconazole.

### **III.1. Amphotéricine B**

L'ensemble des CMI déterminées par l'E-Test est assez faible avec une moyenne de 0.24µg/ml (Tableau n°VIII). Ces CMI très basses sont surprenantes, une hypothèse pouvant expliquer ce phénomène sera évoquée dans la discussion. Aucune souche n'a été trouvée résistante à l'Amphotéricine B par cette méthode.

### **III.2. Itraconazole**

Par cette technique de l'E-Test, 10 % des souches d'Aspergillus testées sont résistantes à l'itraconazole. Des problèmes de lecture sont parfois apparus avec cette méthode. L'apparition de deux ellipses d'inhibition gênaient l'interprétation de l'E-Test.

La réalisation d'un petit test en aveugle au sein du laboratoire de mycologie effectuée par les techniciennes confirme les soucis de reproductibilité de la lecture. En général, les

interprétations restent correctes mais des écarts assez importants au niveau des CMI ont pu être notés (2 à 3 dilutions au niveau l'échelle E-Test®).

Tableau n° VI: Résultats du NCCLS CMI= Score 2 (NCCLS 50)

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
1	0,06	S
2	0,06	S
3	0,06	S
4	0,25	S
5	0,125	S
6	1	S
7	0,125	S
8	0,25	S
9	0,125	S
10	0,25	S
11	0,25	S
12	0,25	S
13	0,25	S
14	0,125	S
15	0,125	S
16	0,06	S
17	0,06	S
18	0,125	S
19	0,125	S
20	0,25	S
21	0,125	S
22	0,25	S
23	0,25	S
24	0,25	S

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
25	0,25	S
26	0,125	S
27	0,25	S
28	0,25	S
29	0,25	S
30	0,25	S
31	0,25	S
32	0,125	S
33	0,125	S
34	0,125	S
35	0,125	S
36	4	R
37	0,25	S
38	0,25	S
39	0,03	S
40	0,125	S
41	0,125	S
42	0,25	S
43	0,25	S
44	0,06	S
45	0,25	S
46	>16	R
47	8	R
48	>16	R

Tableau n° VII: Résultats du NCCLS CMI= Score 0 (NCCLS 0)

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
1	0,5	S
2	0,25	S
3	0,25	S
4	0,5	S
5	0,25	S
6	16	R
7	0,5	S
8	0,5	S
9	0,5	S
10	0,5	S
11	1	S
12	0,5	S
13	0,5	S

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
25	0,5	S
26	0,25	S
27	0,5	S
28	1	S
29	1	S
30	1	S
31	0,5	S
32	0,5	S
33	0,25	S
34	0,5	S
35	0,25	S
36	16	R
37	0,5	S

14	0,25	S
15	0,25	S
16	0,125	S
17	0,25	S
18	0,5	S
19	0,25	S
20	0,5	S
21	0,5	S
22	0,5	S
23	0,5	S
24	0,5	S

38	0,5	S
39	0,125	S
40	0,25	S
41	0,5	S
42	0,5	S
43	0,5	S
44	0,25	S
45	0,5	S
46	>16	R
47	>16	R
48	>16	R

Tableau n° VIII : Résultats de l'E-Test pour l'amphotéricine B

Souches	CMI (µg/ml)	interprétation
1	0,125	S
2	0,064	S
3	0,094	S
4	0,38	S
5	0,094	S
6	0,125	S
7	0,094	S
8	0,064	S
9	0,25	S
10	0,125	S
11	0,125	S
12	0,125	S
13	0,023	S
14	0,064	S
15	0,094	S
16	0,032	S
17	0,75	S
18	0,094	S
19	0,064	S
20	0,094	S
21	0,047	S
22	0,064	S
23	0,064	S
24	0,25	S

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
25	0,19	S
26	0,75	S
27	0,125	S
28	0,75	S
29	0,032	S
30	1	S
31	0,023	S
32	0,023	S
33	1	S
34	0,047	S
35	0,38	S
36	1	S
37	0,38	S
38	0,75	S
39	0,094	S
40	0,094	S
41	0,094	S
42	0,032	S
43	0,047	S
44	0,75	S
45	0,094	S
46	0,125	S
47	0,047	S
48	0,25	S

Tableau n° IX : Résultats de l'E-Test pour l'itraconazole

Souches	CMI (µg/ml)	interprétation
1	0,25	S
2	0,38	S
3	0,25	S
4	0,125	S
5	0,09	S
6	0,5	S
7	0,032	S
8	0,38	S
9	0,5	S
10	0,25	S
11	0,38	S

souches	CMI (µg/ml)	interprétation
25	0,5	S
26	0,5	S
27	1	S
28	4	R
29	2	S
30	2	S
31	1	S
32	0,75	S
33	0,5	S
34	0,5	S
35	1	S

12	0,064	S
13	0,5	S
14	0,25	S
15	0,38	S
16	0,25	S
17	0,75	S
18	0,064	S
19	0,047	S
20	0,25	S
21	0,064	S
22	0,38	S
23	0,38	S
24	1	S

36	>32	R
37	2	S
38	0,75	S
39	0,5	S
40	0,5	S
41	0,5	S
42	0,5	S
43	0,5	S
44	0,25	S
45	0,75	S
46	>32	R
47	6	R
48	>32	R

## III.3 Comparaison E-Test / NCCLS

### III.3.1 Amphotéricine B

Concernant l'amphotéricine B, le degré de concordance entre les deux méthodes en terme de CMI est assez faible avec seulement 42 % des souches compris dans l'intervalle +ou- 2 dilutions (Tableau n°). Si l'on considère les résultats en terme d'interprétation, ces deniers sont satisfaisants compte tenu que le phénomène de résistance est un événement rare dans la population.

Dans la littérature, les informations divergent à propos de la concordance E-Test/NCCLS. Un étude récente réalisée par Mélétiadis et *al* en 2002 rapportent une très faible concordance à 48 heures avec une CCMI de 45 % entre l'E-Test et le NCCLS ce qui tend à confirmer nos résultats.

Par contre, des travaux menés par Espinel-Ingroff et *al* en 2001 soulignent de bons résultats avec l'amphotéricine B. Elle testait comparativement le NCCLS M38-P à l'E-Test sur de nombreuses espèces d'*Aspergillus* (30).. Les CMI de l'E-Test relevées après 24 heures et 48 heures d'incubation montrent la supériorité du délai 24 heures. : 97 % de concordance pour *Aspergillus fumigatus* à 24 heures contre seulement 63 % à 48 heures) ce qui remet en question les recommandations de l'E-Test.

Tableau n° X: Comparaison des CMI déterminées par le E-Test et le NCCLS : répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en  $\log_2$ .

Ecart de dilution	<-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	CCMI (%)
NCCLS	28	10	4	4	2	0	0	41,7%

### III.3.2 Itraconazole

Les données recueillies traduisent une corrélation intéressante entre l'E-Test et le NCCLS par rapport à l'itraconazole (Tableau n°). Comparé au NCCLS 50, l'E-Test obtient une CCMI proche de 80% et une concordance d'interprétation égale à 98%.

L'étude d'Espinel-Ingroff et *al* citée précédemment relève des résultats similaires (CCMI=74%) mais souligne une différence marquée entre 24 et 48 heures d'incubation pour les CMI d'*Aspergillus fumigatus*.

Le pourcentage d'agrément (CCMI) vis à vis du NCCLS 0 est supérieur (90%) mais l'interprétation est erronée pour 2 souches.

Après avoir testé tous les modes de lecture du point final, Mélétiadis trouve le meilleur niveau d'agrément E-Test / NCCLS pour une incubation de 48 heures et une CMI = CMI 0 (31).

Tableau n° XI : Comparaison des CMI déterminées par le E-Test et le NCCLS : répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en  $\log_2$ .

Ecart de dilution	<-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	CCMI (%)
NCCLS 50	0	2	5	6	9	15	11	79,2%
NCCLS 0	5	3	3	16	16	5	0	89,6%

## IV. LE MAF TEST

## IV.1. Mise au point du test et résultats des souches cliniques

### IV.1.1. Amphotéricine B

#### IV.1.1.1. Protocole classique

Cette première série du MAF Test réalisée sur l'amphotéricine B montre des résultats peu encourageants quant à la valeur des CMI retrouvées. Toutes les souches d'*Aspergillus* testées sont résistantes à cet antifongique avec des CMI dix fois plus importantes que celles déterminées par le NCCLS.

Lors de précédents essais réalisés sur *Candida albicans*, des CMI également très élevées avaient été relevées pour l'Amphotéricine B (Valais C. Thèse Pharm, 2002) (32).

Tableau n° XII : Résultats de la première série du MAF-Test pour l'amphotéricine B

souches	cmi	interprétation
1	16,5	R
2	16,41	R
3	16,65	R
4	17,07	R
5	17,11	R
6	17,05	R
7	16,63	R
8	16,68	R
9	16,54	R
10	16,51	R
11	16,74	R
12	16,18	R
13	15	R
14	16,77	R
15	>20	R
16	15,83	R
17	16,6	R
18	16,37	R
19	13,07	R
20	9,91	R
21	16,29	R
22	15,24	R
23	15,56	R
24	16,02	R

souches	cmi	interprétation
25	17,9	R
26	15,7	R
27	14,3	R
28	14,9	R
29	4,8	R
30	9,4	R
31	5,2	R
32	13,3	R
33	14,8	R
34	15,7	R
35	17,4	R
36	17,8	R
37	18,1	R
38	17,9	R
39	18,3	R
40	17,9	R
41	17,3	R
42	15,18	R
43	8,7	R
44	17,2	R
45	17,9	R
46	16,2	R
47	15,9	R
48	14,4	R

Entre la technique du NCCLS et le MAF-Test, il existe deux différences essentielles que sont le mode de lecture et la présence d'un composé fluorescent dans le milieu de culture. Afin d'élucider le problème rencontré dans le MAF Test, nous proposons de réaliser en parallèle sur une même plaque le NCCLS et un MAF-Test réalisé cette fois-ci sur dix dilutions.

Ce test réalisé sur trois souches apporte un résultat particulièrement intéressant. En effet, la présence de l'Alamar blue modifie la pousse de l'*Aspergillus* en présence de l'antifongique. Pour une même dilution, le score retrouvé dans la cupule avec ou sans Alamar blue est différent et la CMI se retrouve donc changée. Un décalage généralement égal à deux dilutions est observé pour chacune des souches testées (Tableau n°XIII).

Les souches dont les CMI ont été déterminées avec présence d'Alamar blue sont retrouvées plus résistantes qu'avec le NCCLS. Ce composé peut donc être à l'origine soit d'une potentialisation de la croissance du champignon soit d'une altération de l'activité de l'antifongique.

Tableau n° XIII: Influence de l'Alamar blue sur la détermination des CMI

	CMI NCCLS	CMI NCCLS avec Alamar blue
Souche n°1	0,5	2
Souche n°2	0,5	2
Souche n°3	0,5	2

Afin de déterminer le site d'action de l'Alamar blue (affaiblissement de l'antifongique ou dynamisation du champignon), le même test en parallèle est réalisé avec l'Itraconazole sur ces souches d'*Aspergillus*. Aucune modification de CMI n'a été décelée entre la méthode réalisée avec ou sans Alamar blue. Il pourrait donc s'agir d'une interaction entre l'Amphotéricine B et le composé fluorescent.

Les expériences réalisées par la suite indique que la réduction du temps de contact entre l'Alamar et l'amphotéricine B amène une réduction de cet effet « inhibiteur ». C'est la raison

pour laquelle nous avons tenté de trouver un temps d'incubation 'Alamar-Amphotéricine B' qui soit le plus faible possible tout en respectant un délai suffisant permettant aux enzymes du champignon de réduire efficacement ce composé. La mise en œuvre de tests de cinétique a permis de conclure à un temps compris entre 6 et 8 heures.

Un changement dans le protocole doit donc intervenir ; l'Alamar ne sera plus déposé dans les cupules pendant la phase initiale de préparation des plaques mais seulement après environ 40 heures de culture du champignon avec l'amphotéricine B.

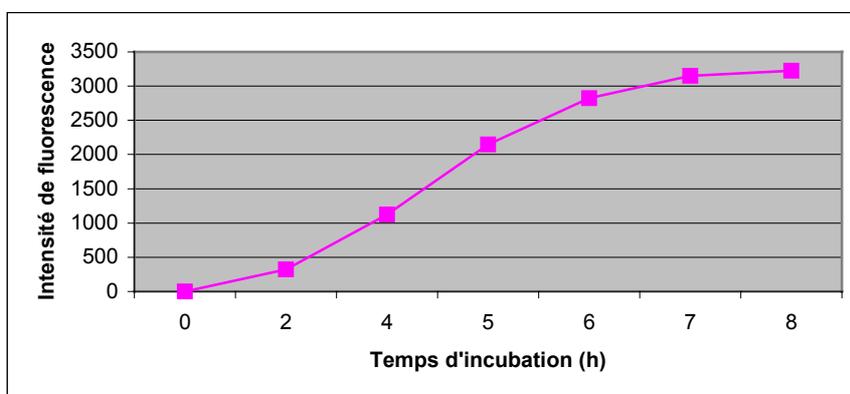


Figure n° 13: Intensité de fluorescence en fonction du temps d'incubation (Alamar blue déposé à t = 40 heures)

#### IV.1.1.3. Protocole modifié

Cette série offre des résultats tout à fait convenables. On retrouve des CMI plus proches de celles déterminées par les méthodes conventionnelles (Tableau n°) et un faible taux de résistance des souches testées (4 %)(Figure n°). C'est donc le résultat obtenu avec ce protocole qui est retenu pour la comparaison aux autres tests.

Tableau n° XIV : Résultats de la seconde série du MAF-Test pour l'amphotéricine B

souches	cmi	interprétation
1	0,86	S
2	0,85	S
3	0,86	S
4	0,88	S
5	0,93	S
6	0,86	S
7	0,85	S
8	0,88	S
9	0,88	S

souches	cmi	interprétation
25	0,81	S
26	0,84	S
27	0,83	S
28	0,82	S
29	0,8	S
30	0,83	S
31	0,81	S
32	0,82	S
33	0,84	S

10	0,87	S
11	0,87	S
12	0,85	S
13	0,82	S
14	0,87	S
15	0,84	S
16	0,85	S
17	0,84	S
18	0,83	S
19	0,82	S
20	0,79	S
21	0,83	S
22	0,81	S
23	0,88	S
24	0,85	S

34	0,84	S
35	0,85	S
36	4,54	R
37	0,89	S
38	0,9	S
39	0,85	S
40	0,85	S
41	0,84	S
42	0,78	S
43	0,84	S
44	0,84	S
45	0,82	S
46	0,9	S
47	6,72	R
48	0,8	S

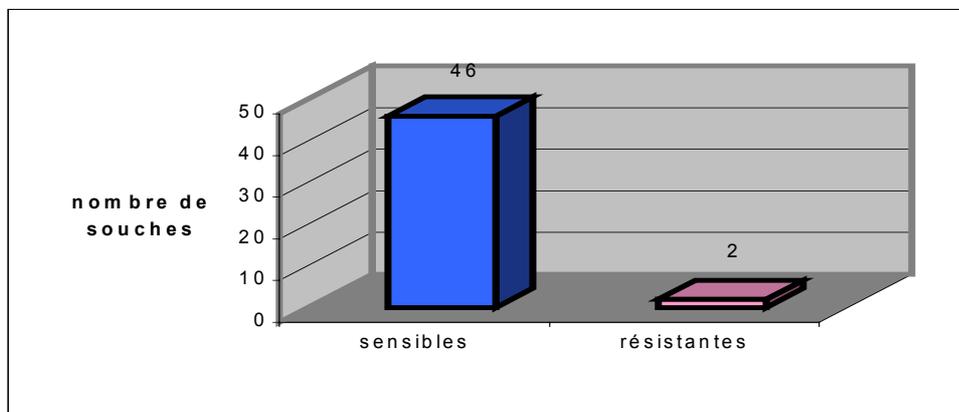


Figure n°XIV: Répartition des souches selon leur interprétation

### IV.1.2 Itraconazole

Seulement 11% des souches d'*Aspergillus* sont résistantes à l'itraconazole. Des résultats plutôt satisfaisants ont été obtenus pour cet antifongique sans remanier le protocole de base correspondant. On peut regretter le choix de la borne inférieur trop élevé qui ne permet pas de rendre une CMI exacte pour quelques souches très sensibles à cet antifongique.

Tableau n° XV: Résultats du MAF-Test pour l'itraconazole

souches	cmi	interprétation
1	0,7	S
2	0,7	S
3	0,44	S
4	0,71	S
5	0,71	S
6	>20	R
7	0,49	S
8	0,72	S
9	0,59	S

souches	cmi	interprétation
25	<0,1	S
26	<0,1	S
27	0,68	S
28	0,63	S
29	<0,1	S
30	0,23	S
31	0,63	S
32	0,59	S
33	0,56	S

10	0,75	S
11	0,47	S
12	0,68	S
13	0,65	S
14	0,59	S
15	0,69	S
16	<0,1	S
17	0,63	S
18	0,14	S
19	<0,1	S
20	0,38	S
21	0,3	S
22	<0,1	S
23	0,22	S
24	0,67	S

34	0,38	S
35	0,41	S
36	>20	R
37	0,66	S
38	0,67	S
39	<0,1	S
40	<0,1	S
41	<0,1	S
42	0,32	S
43	0,72	S
44	0,21	S
45	0,61	S
46	>20	R
47	>20	R
48	>20	R

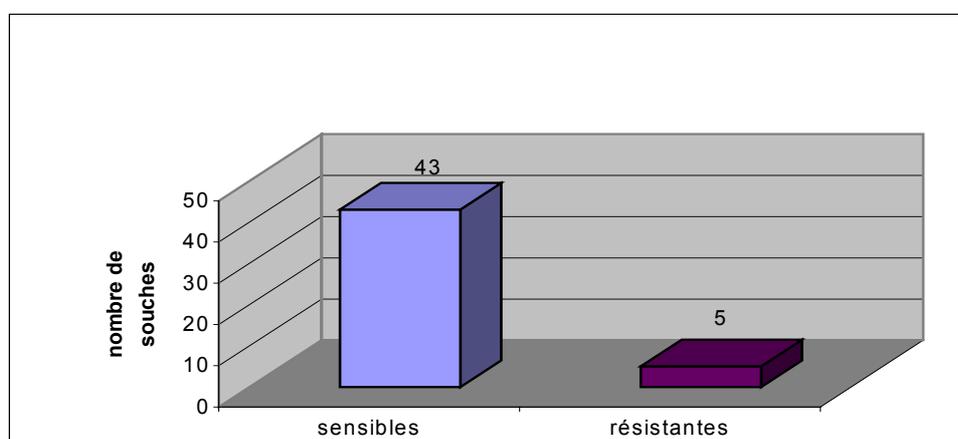


Figure n°15: Répartition des souches selon leur interprétation

## IV.2. Agrément de la méthode

Les CMI obtenues pour les deux souches de référence de *Candida* concernant l'amphotéricine B sont satisfaisantes car incluses dans la fourchette de valeurs indiquée par le NCCLS. En revanche, les résultats de l'itraconazole sortent légèrement de l'intervalle recommandé. Des discordances bien plus significatives ont déjà été signalées dans des études antérieures. Malgré cet écart en terme de CMI, l'interprétation (S ou R) des deux souches de référence vis à vis de l'itraconazole reste exacte et c'est avant tout le résultat recherché par le clinicien demandeur.

Tableaux n° XVI : Valeurs de CMI en µg/ml et interprétation pour les souches de référence

<b><i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019</b>	MAF Test CMI et interprétation		CMI et interprétation recommandées par le NCCLS	
Amphotéricine B	<b>0,78</b>	<b>I</b>	<b>0,25-1</b>	<b>I-R</b>
Itraconazole	<b>0,62</b>	<b>I</b>	<b>0,06-0,25</b>	<b>S-I</b>

<b><i>Candida krusei</i> ATCC 6258</b>	MAF Test CMI et interprétation		CMI et interprétation recommandées par le NCCLS	
Amphotéricine B	<b>0,84</b>	<b>R</b>	<b>0,5-2</b>	<b>I-R</b>
Itraconazole	<b>0,57</b>	<b>I</b>	<b>0,12-0,5</b>	<b>S-I</b>

## IV.3. Précision de la méthode

### IV.3.1. Essai de répétabilité

Afin d'effectuer ce test, la souche clinique n° 33 a été testée à six reprises lors d'une même série expérimentale. Cet essai de répétabilité donne de bons résultats avec un coefficient de variation inférieur à 10% pour les deux antifongiques testés et un pourcentage P égal à 100 (Tableau n° XVIII).

Tableaux n° XVII: Essai de répétabilité réalisé sur la souche n° 33 –CMI en µg/ml et interprétation

Séries	Amphotéricine B		Itraconazole	
	CMI	Interprétation	CMI	Interprétation
<b>1</b>	<b>0,87</b>	<b>S</b>	<b>0,62</b>	<b>S</b>
<b>2</b>	<b>0,85</b>	<b>S</b>	<b>0,62</b>	<b>S</b>
<b>3</b>	<b>0,80</b>	<b>S</b>	<b>0,58</b>	<b>S</b>
<b>4</b>	<b>0,86</b>	<b>S</b>	<b>0,64</b>	<b>S</b>
<b>5</b>	<b>0,80</b>	<b>S</b>	<b>0,59</b>	<b>S</b>
<b>6</b>	<b>0,81</b>	<b>S</b>	<b>0,49</b>	<b>S</b>

Tableau n° XVIII : Evaluation de la répétabilité sur la souche n° 33

<b>Antifongiques</b>	<b>P</b>	<b>CV</b>
Amphotéricine B	100	3,83
Itraconazole	100	9,1

P= pourcentage de valeurs situées à plus ou moins 2 dilutions d'écart par rapport à la moyenne des 6 CMI obtenues

CV= coefficient de variation .

### IV.3.2. Essai de reproductibilité

La souche n°17 a été testée lors de six séries différentes. L'Amphotéricine B conserve un coefficient de variation très faible. L'itraconazole souffre d'une reproductibilité moins satisfaisante avec un coefficient de variation proche des 30% tout en gardant un pourcentage P égal à 100.

Tableau n° XIX : Essai de reproductibilité réalisé sur la souche n° 17 –CMI en µg/ml et interprétation

<b>Séries</b>	<b>Amphotéricine B</b>		<b>Itraconazole</b>	
	<b>CMI</b>	<b>Interprétation</b>	<b>CMI</b>	<b>Interprétation</b>
<b>1</b>	<b>0,89</b>	<b>S</b>	<b>0,30</b>	<b>S</b>
<b>2</b>	<b>0,80</b>	<b>S</b>	<b>0,71</b>	<b>S</b>
<b>3</b>	<b>0,80</b>	<b>S</b>	<b>0,55</b>	<b>S</b>
<b>4</b>	<b>0,87</b>	<b>S</b>	<b>0,51</b>	<b>S</b>
<b>5</b>	<b>0,82</b>	<b>S</b>	<b>0,63</b>	<b>S</b>
<b>6</b>	<b>0,93</b>	<b>S</b>	<b>0,68</b>	<b>S</b>

Tableau n°XX : Evaluation de la reproductibilité sur la souche n° 17

<b>Antifongiques</b>	<b>P</b>	<b>CV</b>
----------------------	----------	-----------

Amphotéricine B	100	6,27
Itraconazole	100	26,56

P= pourcentage de valeurs situées à plus ou moins 2 dilutions d'écart par rapport à la moyenne des 6 CMI obtenues

CV= coefficient de variation .

De manière générale, la précision du MAF-Test est donc plutôt bonne mais, pour l'itraconazole, des variations importantes ont pu être observées à quelques reprises lors de notre étude. Des variations de taille de l'inoculum sont probablement à l'origine de ces disparités rencontrées entre deux séries. Il convient donc d'être vigilant au niveau de cette étape.

La précision des autres méthodes n'a pas été testée lors de cette étude mais récemment, certaines publications ont fait part d'une reproductibilité assez faible de l'E-Test (Mélétiadis et al, 2002).

## **IV.4. Comparaison du MAF Test par rapport à la technique de référence du NCCLS et à l'E-Test**

Les performances du MAF-Test sont mesurées en terme de concordances vis à vis de la technique de référence et de l'E-Test.

### **IV.4.1. Concordance MAF Test/NCCLS**

Vis-à-vis du NCCLS, une CCMI très élevée est obtenue pour l'amphotéricine B avec plus de 95% de concordance. Par contre, le MAF-Test signe une concordance moins satisfaisante avec l'itraconazole où il sous évalue la sensibilité des souches. En effet, pour 31 souches des 48, nous avons au moins eux dilutions d'écart. Lorsque les résultats du MAFTest sont comparés à la version remaniée du NCCLS, la CCMI augmente à 91,6% et cette fois-ci, les CMI de 31 souches ne dépassent pas un écart de 1 dilution (Tableau n°XXI)

En terme de concordance d'interprétation, elle est plus élevée pour l'itraconazole que pour l'amphotéricine B. Cette concordance s'élève à 100% pour l'itraconazole évalué par le NCCLS 0.

Tableau n° XXI: Comparaison des CMI déterminées par le NCCLS et le MAF-Test :  
répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en  $\log_2$

Ecart de dilution	<-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	<b>CCMI (%)</b>
Amphotéricine B			1	34	11		2	95,8
Itraconazole O	4	3	5	7	22	7	0	91,6
Itraconazole 50	0	2	4	3	8	18	13	70

Tableau n° XXII: Concordance d'interprétation entre le MAF-Test et le NCCLS

Antifongiques	<b>CI (%)</b>	<b>Concordance globale</b>
Amphotéricine B	<b>93,8</b>	<b>DNS</b>
Itraconazole NCCLS 50	<b>97,9</b>	<b>DNS</b>
NCCLS 0	<b>100</b>	<b>DNS</b>

DNS : différence non significative

#### IV.4.2 Concordance MAF-Test / E-Test

La corrélation observée entre les deux techniques pour l'amphotéricine B est très faible (Tableau n°XXIII). Les CMI déterminées par le MAF-Test sont bien supérieures à celles obtenues par l'E-Test, 79% des souches évaluées ont au moins deux dilutions d'écart. En revanche, concernant l'itraconazole, la concordance est acceptable avec une CCMI proche de 73%. Pour les deux antifongiques, la concordance globale reste très satisfaisante.

Tableau n° XXIII: Comparaison des CMI déterminées par le E-Test et le MAF-Test :  
répartition des souches selon le nombre de dilutions d'écarts exprimées en  $\log_2$ .

Ecart de dilution	<-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	<b>CCMI (%)</b>
-------------------	-----	----	----	---	----	----	-----	-----------------

Amphotéricine B	0	0	0	7	3	4	34	29.2
Itraconazole	8	0	3	12	12	8	5	72.9

Tableau n° XXIV: Concordance d'interprétation entre le MAF-Test et l'E-Test.

Antifongiques	CI (%)	Concordance globale
Amphotéricine B	95.8	DNS
Itraconazole	97,9	DNS

## V. DISCUSSION

L'étude de l'évaluation du MAF-Test montre que pour l'amphotéricine B, le pourcentage de concordance en terme de CMI avec la technique de référence est très élevé (95.8%), contrairement à celui de l'E-Test qui est faible (42%). Toutefois, les CMI très basses déterminées par l'E-Test laissent penser à un problème dans les manipulations. Un changement opéré dans la réalisation des boîtes RPMI nécessaires à l'E-Test peut être responsable de ce phénomène.

On ne retiendra donc pas la mauvaise concordance observée entre l'E-Test et les autres méthodes pour l'étude de l'amphotéricine B. La CMI excellente entre le MAF-Test et la technique de référence permet d'affirmer que ce test de fluorimétrie est fiable pour déterminer la sensibilité d'*Aspergillus* à l'amphotéricine B. Cependant, les problèmes d'interaction 'Alamar blue-amphotéricine B' rencontrés au cours de cette étude nécessitent des recherches approfondies. D'autre part, le milieu AM3 demande à être validé en ce qui concerne cet antifongique.

L'étude de la sensibilité d'*Aspergillus* à l'itraconazole nous apporte des résultats concluants. Les différentes concordances avec la technique de référence et l'E-Test sont satisfaisantes. Cependant, les soucis de reproductibilité observés quelquefois sont à surveiller.

Des progrès dans la réalisation de l'inoculum peuvent contribuer à améliorer cet aspect du test. En effet, selon To et al (1995), la taille de l'inoculum peut se révéler un facteur important quand les azolés sont testés en présence du fluorochrome. (33).

Le MAF-Test devra par la suite être étudié sur de nombreux autres genres de filamenteux comme *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii*. D'autres molécules comme le voriconazole ou la caspofungine, antifongiques d'avenir dans le domaine de l'aspergillose invasive qui n'ont pu faire partie de cette recherche feront prochainement l'objet d'études dans le laboratoire afin d'intégrer le MAF-Test *Aspergillus*.

Enfin, pour les tests de sensibilité en général, la relation entre la sensibilité *in vitro* et le résultat clinique n'a jamais été encore démontrée. Certaines études comme celle de Denning et al (1997) réalisée sur des modèles murins, ont fait d'importants progrès dans ce domaine concernant l'itraconazole (34). En revanche, peu de recherches ont été effectuées pour l'amphotéricineB. Cette corrélation *in vitro/ in vivo* reste à démontrer surtout dans les mycoses systémiques où les facteurs de l'hôte jouent un rôle primordial dans la réussite du traitement.

# **CONCLUSION**

Faisant suite à une étude concernant le genre *Candida*, ces travaux avaient pour but de mettre au point et de valider un nouveau protocole d'évaluation de la sensibilité du genre *Aspergillus* aux antifongiques de référence, l'amphotéricine B (FUNGIZONE ®) et l'itraconazole (SPORANOX ®). Ce test qui fait appel à la fluorimétrie permet d'exprimer les résultats non seulement par une réponse qualitative de type sensible ou résistant mais également par une CMI ce qui est aujourd'hui obligatoire pour les tests de sensibilité.

Les résultats indiquent que les concordances du MAF-Test *Aspergillus* vis à vis de la technique de référence du NCCLS sont très satisfaisantes pour les deux antifongiques testés. Elles sont également comparables à celles obtenues avec le test commercialisé le plus utilisé, l'E-Test, en ce qui concerne l'itraconazole.

Ce test en plaque est une méthode adaptée au travail de routine. L'objectivité de la lecture, la possible automatisation et la traçabilité sont autant d'atouts par rapport aux techniques existantes

## **BIBLIOGRAPHIE**

1-KONTOYIANNIS DP, BODEY GP. Invasive aspergillosis in 2002 : an update.*Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 Mar ;21(3) :161-72.

2-ESPINEL-INGROFF A. Utility of mould susceptibility testing. *Curr Opin Infect Dis.* 2003 Dec;16(6):527-32

3-National Committee of Clinical Laboratory Standards. 1998. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-P. National Committee of Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

4-LE CONTE P, BLANLOEIL Y , GERMAUD P, MORIN O , MOREAU P. Aspergillose invasive en réanimation. *Ann Fr Anesth Reanim* 1995 ; 14 : 198-208

5-KULLBERG BJ, OUDE LASHOF AM Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res.* 2002 May 31;7(5):183-91.

6-LORTHOLARY O , MEYOHAS MC , DUPONT B , CADRANEL J, SALMON CD, PEYRAMOND D, SIMONIN D. Invasive Aspergillosis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: report of 33 cases. French Cooperative Study Group on Aspergillosis in AIDS. *Am J Med* 1993 ; 95 : 177-87.

7-URBAN PH., CHEVROLET J.-CI , SCHIFFERLI J, SAUTEUR E , COX . Aspergillose pulmonaire invasive associée à une infection aiguë à virus influenza .*Rev Mal Resp* 1985 ; 2 : 255-57.

8-BOCQUET P, PATRIS S, DUMARTIN C, GOTTO S, RYKNER G, BRÜCKER G. Aspergillose invasive humaine .*Ann Med Interne* 1995 ; 146 : 79-83 .

9-CAILLOT D, DURAND C, CASASNOVAS O et al . Aspergillose pulmonaire invasive des patients neutropéniques : Analyse d'une série de 36 cas:apport du scanner thoracique et de l'itraconazole . *Ann Med Interne* 1995 ; 146 : 84-90 .

10-KUHLMAN JE , FISHEMAN EK , BRUCH PA , KARP JE , ZERHOUNI EA , SIEGEMAN SS . Invasive Pulmonary Aspergillosis in acute leukemia Contribution of CT to Early Diagnosis and aggressive Management .Chest 1987 ; 92 : 95-9 .

11-ELLIS M. Invasive fungal infections: evolving challenges for diagnosis and therapeutics. Mol Immunol. 2002 May;38(12-13):947-57.

12-DUPONT B . Méthodes diagnostiques de l'aspergillose invasives . *Ann Med Interne* 1995; 146 : 102-5 .

13-MAERTENS J, VAN ELDERE J, VERHAEGEN J, VERBEKEN E, VERSCHAKELEN J, BOOGAERTS M. Use of circulating galactomannan screening for early diagnosis of invasive aspergillosis in allogeneic stem cell transplant recipients.*J Infect Dis.*2002 Nov1;186(9):1297-306.

14-LAVARDE V. Antifongiques. Dans : Maladies infectieuses. Edition Doin. Tome I. Collection inter-med. 1999: 143-148.

15-GRILLOT R., LEBEAU B. Antifongiques systémiques. Dans : BRYSKIER A. Antibiotiques, agents antibactériens et antifongiques. Paris. 1999 : 1104-1130.

16-WALSH TJ, FINBERG RW, ARNDT C ET COLL.Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. *N Engl J Med* 1999 ;340 : 764-71

17-WINGARD JR, WHITE MH, ANAISSIE E. A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. *Clin Infect Dis* 2000 ;31 :1155-63.

18-LEPORT C. Thérapeutiques antifongiques azolés. Utilisation en clinique humaine. *Med. Mal. Infect.* 1995 ; 25, Spécial : 74-5.

19-PETITJEAN P., JACOLOT A., TOD M. Pharmacologie des antifongiques azolés systémiques. *Med. Mal. Infect.* 1995; 25: 14-26.

20-HERBRECHT R, DENNING DW, PATTERSON TF, BENNETT JE, GREENE RE, OESTMANN JW, KERN WV, MARR KA, RIBAUD P, LORTHOLARY O, SYLVESTER R, RUBIN RH, WINGARD JR, STARK P, DURAND C, CAILLOT D, THIEL E, CHANDRASEKAR PH, HODGES MR, SCHLAMM HT, TROKE PF, DE PAUW B. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med.* 2002 Aug 8;347(6):408-15.

21-LOMAESTRO BM. Caspofungin :An Echinocandin Antifungal for the traitement of invasive aspergillosis. *Formulary* 2001 ;36 :427-36

22-PACETTI SA , GELONE S. Caspofungin acetate for treatment of invasive fungal infections. *Ann Pharmacother.* 2003 Jan;37(1):90-8.

23-ESPINEL-INGROFF A, BARTLETT M, CHATURVEDI V, GHANNOUM M, HAZEN KC, PFALLERMA, RINALDI M, WALSH TJ. Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative evaluation. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Jun;45(6):1828-35. PMID: 11353633 [PubMed - indexed for MEDLINE]

24-SWINNE, D., C. RAES-WUYTACK, K. VAN LOOVEREN, P. DESMET. 1999. Comparative evaluation of Fungitest®, Neo-Sensitabs® and M27T NCCLS broth microdilution method for antifungal drug susceptibility testing of *Candida*, species and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses* 42:231-237.

25-HAWSER SP, JESSUP C, VITULLO J, GHANNOUM MA. Utility of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenyl-amino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide (XTT) and minimum effective concentration assays in the determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to the lipopeptide class compounds. *J Clin Microbiol.* 2001 Jul;39(7):2738-41.

26-TOD M., THUILLIER A. Spectrofluorimétrie moléculaire. Dans : Sciences mathématiques, physiques et chimiques. Tome II. Paris. 1994 : 247-258.

27-PAGNIEZ F. Mise au point d'un test fluorimétrique pour l'évaluation de substances à potentialité anti-leishmanienne. Th. D. Pharm. 1998.

28-LE PAPE P., PAGNIEZ F., ABDALA H. A new automatized fluorimetric assay for anti-*Leishmania* drug screening. *Acta Parasitologica*, 2002, 47 (1), 79-81.

29-BATGUZERE F. Apport de la microméthode du NCCLS dans la détermination des CMI. Th. Médecine. 2001.

30-ESPINEL-INGROFF A. Comparison of the E-test with the NCCL M38P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 2001 Apr;39(4):1360-7.

31-MELETIADIS J, MOUTON JW, MEIS JF, BOUMAN BA, DONNELLY PJ, VERWEIJ PE. Comparison of the E-Test and the Sensititre Colorimetric Methods with the NCCLS Proposed Standard for Antifungal Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species. *Journal of clin microbiology*, Aug 2002, p.2876-2885.

32-VALAIS C. Mise au point d'un test fluorimétrique sur le genre *Candida*. Th. D. Pharm. Nantes. 2002.

33-TO, W.K., A.W. FOTHERGILL, M.G. RINALDI. 1995. Comparative evaluation of microdilution broth methods for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J.Clin.Microbiol.* 33:915-917.

34-D.W.DENNING, S.A. RADFORD, K.L. OAKLEY, L. HALL, E.M. JOHNSON, D.W. WARNOCK. Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection.

Vu, Le Président du Jury

Vu, Le Directeur de Thèse

Vu, Le Directeur de l'UER

**Nom-Prénoms** : FIOLEAU Freddy Loïc Bruno

**Titre de la thèse** : Mise au point du MAF-Test pour l'évaluation de la sensibilité d'Aspergillus aux antifongiques

---

**Résumé de la Thèse** : Ces vingt dernières années, la fréquence des infections fongiques comme l'aspergillose invasive n'a cessé d'augmenter. Parallèlement, l'arsenal thérapeutique s'est étoffé et des résistances aux antifongiques se sont développées. Le recours aux antifongogrammes s'est donc révélé indispensable pour obtenir une thérapeutique adaptée. Devant l'insuffisance des tests actuels comme l'E-Test ou l'ATB-Fungus, nous avons mis au point un nouveau test de fluorimétrie, le MAF-Test, sur le genre Aspergillus. Dans cette étude, les performances de ce nouveau test sont comparées à celles obtenues par la technique de référence et l'E-Test. L'analyse des résultats montre l'intérêt du MAF-Test pour l'évaluation de la sensibilité d'Aspergillus aux antifongiques

---

**MOTS CLES** : ANTIFONGIQUES - ASPERGILLUS - NCCLS - E-TEST

---

## **JURY**

**PRESIDENT** : **Monsieur PETIT Jean-Yves**, Professeur de Pharmacologie  
Faculté de pharmacie de Nantes

**ASSESEURS** : **Monsieur LE PAPE Patrice**, Maître de Conférences, Service de Parasitologie e de Biologie Animale- Institut de Biologie-  
Chu Nantes  
**Monsieur PAGNIEZ Fabrice**  
Maître de conférences en Parasitologie  
**Monsieur BRIGAUDEAU Christophe**  
Docteur en Sciences  
**Monsieur BAUDON Emmanuel**  
Pharmacien assistant

---

Adresse de l'auteur : 18 Chemin de St Michel des champs- 44310 Saint Philbert de Grand-  
Lieu