



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEN

FACULTE DE MEDECINE DE TLEMCEN
Dr Benzerdjeb Benaouda

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

POUR OBTENIR DIPLOME D'ETAT EN PHARMACIE

THEME :

INTERET DE L'ANTIFONGIGRAMME DANS LE TRAITEMENT DES MYCOSES
SUPERFICIELLES ET PROFONDES

Présentée par :

M^r HADJI Abdelhamid

M^r BENABDERRAHMANE Abdelhalim

M^r HANAFAI Mohamed

Encadrée par :

Dr BENABADJI

ANNEE 2013

PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Résumé07

Introduction08

Partie théorique :

1. Epidémiologie

I.Définitions10

II.Historique10

III.Classification11

III.1.Classification selon la morphologie11

III.2. Classification selon le siège12

IV. Répartition géographique14

2. Epidémiologie analytique

I. Mycoses superficielles

I.1 Candidoses15

I.1.1. Définition.....15

I.1.2. Classification.....15

I.1.3. Morphologie des agents pathogènes.....15

I.1.4- Facteurs favorisants.....16

I.1.5- Mode de contamination.....16

I.1.6- Signes cliniques.....17

I.1.7- différentes types de candidoses17

I.2 - Les Dermatophytes.....18

I.2.1 – Définition.....18

I.2.2 – Classification.....18

I.2.3 - Morphologie de l'agent pathogène.....19

I.2.4- Répartition Géographique.....20

I.2.5- Mode de Contamination.....20

I.2.6- Facteurs favorisants.....20

I.2.7- Manifestations cliniques21

I.3- La Pityrospore.....22

I.3.1- Généralités22

PLAN DU MEMOIRE

I.3.2- Caractères généraux.....	23
I.3.3- Rôle pathogène.....	24
II. Mycoses profondes	
II.1 Cryptococcose.....	25
II.1.1 – Définition.....	25
II.1.2 – Classification.....	25
II.1.3 - Morphologie de l'agent pathogène.....	25
II.1.4 - Répartition géographique.....	25
II.1.5 - Signes cliniques.....	26
II.2 Les Histoplasmoses.....	27
II.2.1- Histoplasmosse américaine.....	27
II.2.1.1 - Définition	27
II.2.1.2 – Classification.....	28
II.2.1.3 – Morphologie.....	28
II.2.1.4 - Répartition géographique.....	28
II.2.1.5 - Mode de contamination.....	28
II.2.1.6 - Signes cliniques:	28
II.2.2 - Histoplasmosse africaine.....	29
II.2.2.1 - Définition	29
II.2.2.2 – Classification.....	29
II.2.2.3 - Morphologie de <i>Histoplasma diboisII</i>	29
II.2.2.4 - Répartition géographique.....	29
II.2.2.5 - Mode de contamination.....	29
II.2.2.6 - Manifestations cliniques.....	29
II.2.3 - Les Aspergilloses.....	30
II.2.3.1- Définition.....	30
II.2.3.2- Classification.....	30
II.2.3.3 - Morphologie de l'agent pathogène.....	30
II.2.3.4 - Répartition géographique.....	30
II.2.3.5 - Mode de contamination.....	30
II.2.3.6 - Facteurs favorisants.....	30
II.2.3.7- Manifestations cliniques	31
II.2.4 La Coccidioidomycose.....	32
II.2.4.1 – Définition.....	32
II.2.4.2 – Classification.....	32
II.2.4.3 – Morphologie.....	32
II.2.4.4- Répartition géographique.....	32
II.2.4.5 - Mode de contamination.....	32
II.2.4.6 - Facteurs favorisants.....	32
II.2.4.7 - Manifestations cliniques.....	33
II.2.5 - La Pneumocystose.....	33
II.2.5.1 – Définition.....	33
II.2.5.2 – Classification.....	33

PLAN DU MEMOIRE

II.2.5.3 – Morphologie.....	33
II.2.5.4- Répartition géographique.....	34
II.2.5.5 - Mode de contamination.....	34
II.2.5.6 - Manifestations cliniques.....	34
II.2.6 Les Dermatophytoses sous cutanées et profondes.....	35
II.2.7 - Candidoses généralisées.....	35
II.2.8 - Autres Mycoses.....	36

3. Traitement et prophylaxie

I. ANTIFONIQUE.....	38
II. ANTIFONGIQUES POYLENIQUES.....	38
II.1. Amphotericine B.....	38
II.2. Formulations lipidiques d'amphotericine B.....	41
III. ANALOGUES NUCLEOSIDIQUES.....	42
III.1. Flucytosine.....	42
IV. LES AZOLES.....	43
V. INDICATIONS ACTUELLES DES ANTIGONGIQUES.....	45
VI. MOLECULES EN COURS DE DEVELOPPEMENT.....	46
VII. MECANISMES DES RESISTANCES AUX ANTIFONGIQUES	
VII.1 Résistance de <i>C. albicans</i> aux azolés.....	48
VII.2 Résistance de <i>C. albicans</i> aux polyènes.....	48
VII.3 Résistance de <i>C. albicans</i> aux échinocandine.....	49
VIII. CONCLUSION.....	49

DEUXIEME PARTIE : PARTIE PRATIQUE

1. Diagnostic biologique

I.1. Introduction.....	51
I.2 . Recherche d'une fluorescence sous rayonnement ultra-violet ("lampe de Wood")	51

2. Diagnostic mycologique	
I.1 Prélèvements.....	53
I.2 Conditionnement et transport.....	54
I.3. Examen direct	54
I .3.1 Examen direct à « frais ».....	55
I .3.2. Examen direct après coloration.....	56
I.4. Cultures	56
I.4.1. Isolement	57
I.4.2. Identification.....	59
I.5. Antifongigramme	60
3. Antifongigramme pour les levures	
I. ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES	62
I.1. INTRODUCTION ET OBJET DU TEST	62
I.2. PRINCIPE	62
I.3. PRESENTATION.....	62
I.4. Matériel	63
I.5. PRECAUTIONS D'UTILISATION.....	63
I.6. CONDITIONS DE STOCKAGE	63
I.7. MODE OPERATOIRE	64
I.8. METHODOLOGIE É FICHE DE RESULTAT.....	69
4. Diagnostic immunologique.	
IV. Diagnostic immunologique	73
IV.1. Recherche des anticorps circulants	73
IV.2. Recherche des antigènes circulants	74

TROISIEME PARTIE : CONCLUSION

Conclusion	75
Liste de bibliographie.....	76

RESUME

La mycologie médicale est une discipline profondément bioclinique. Il occupe une place importante au sein des disciplines biologiques et étudie les champignons microscopiques et les pathologies communément appelées mycoses dues à ces derniers. Les champignons sont avant tout des organismes telluriques qui coévoluent étroitement avec les végétaux. Si aujourd'hui on admet que les champignons constituent un règne individualisé au sein du monde vivant, il n'en a pas toujours été ainsi. Leurs morphologies (thalle, spore), leur comportement (absence de motilité) et leur nutrition qui semble se faire par « des racines » les ont longtemps assimilés au règne végétal. En 1968 Wittaker proposa une vision globale du monde vivant en individualisant nettement le règne des champignons au sein d'un système taxinomique à 5 règnes.

INTRODUCTION

Pour le clinicien, les buts du diagnostic biologique des mycoses muqueuses et cutanéophanériennes sont : - confirmer la mycose, ou, au contraire, sur la base d'une réponse négative, réorienter le diagnostic ; - identifier l' (ou les) agent(s) fongique(s) incriminé(s) et adapter au mieux la thérapeutique ; - comprendre la pathogénie de la mycose et amoindrir (voire supprimer) les facteurs favorisant son développement.

Dans ce cadre, la démarche mise en œuvre par le laboratoire est influencée par :

- la symptomatologie clinique ; - les facteurs épidémiologiques inhérents au patient ;
- le « terrain » immunitaire sous-jacent.

Hormis : - quelques rares cryptococcoses cutanées primaires (par inoculation) ou secondaires (Par dissémination hématogène chez le sidéen) ; - quelques mycoses dermo-épidermiques également par dissémination hématogène de Champignons impliqués dans des mycoses tissulaires chez l'immunodéprimé ou par contamination aérienne de plaies, brûlures, ... par des *Candida*, des *Aspergillus*, des Mucorales ou par diverses Dématiacées ; - et d'exceptionnelles sporotrichoses autochtones, la pathologie muqueuse et cutanéophanérienne d'origine fongique développée en Europe se résume essentiellement :

- aux pityrospores (= malassezioses) : pityriasis versicolor, pityriasis capitis, folliculite à *Pityrosporum* ;

- aux candidoses buccales (chéilite et perlèche, stomatites aiguës ou chroniques) et digestives (de l'oesophagite à l'anite), génitales (vulvo-vaginite, balano-posthite, ...), cutanées (intertrigos des grands plis et des sillons interdigitaux, parfois interdigito-plantaires, ...) et unguéales (onyxis avec péri-onyxis) ;

- et aux dermatophytoses : onychomycoses dermatophytiques, en particulier des orteils, occasionnellement compliquées d'une colonisation secondaire par un Champignon filamenteux

opportuniste (*Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* sp, ...) ; dermatophytoses de la peau dite « glabre » (dermatophytose cutanée circinée, dermatophytose inguino-crurale, dermatophytose

interdigito-plantaire, ...) ; teignes du cuir chevelu (teignes tondantes microsporiques ou trichophytiques, teigne favique) ; folliculites suppurées (sycosis ou mentagre, kérion).

D'une manière générale, le diagnostic biologique d'une mycose muqueuse ou cutanéophanérienne repose sur :

- la révélation d'une éventuelle fluorescence sous rayonnement ultra-violet de certaines lésions fongiques de la peau ou du cuir chevelu ;

INTRODUCTION

- la mise en évidence du (ou des) Champignon(s) à l'état parasitaire par examen direct du produit biologique prélevé ;

- l'isolement et l'identification de ce(s) Champignon(s) par cultures.

L'évaluation de la sensibilité *in vitro* du Champignon à divers antifongiques (« antifongigramme ») est exceptionnellement justifiée et n'a que très peu d'intérêt en pratique courante.

Ni la recherche d'anticorps spécifiques, ni celle d'antigènes fongiques circulants ne sont justifiées dans le cadre du diagnostic des mycoses muqueuses et cutané-phanériennes.

La biologie moléculaire (détection de Champignons dans le matériel biologique, identification spécifique ...) reste encore actuellement du domaine de la recherche.

L'ordonnance prescrivant l'examen mycologique d'une mycose muqueuse ou cutanéophanérienne sera donc rédigée ainsi : « Examen mycologique d'une lésion de ... : prélèvement, examen direct et cultures (isolement et identification) ». L'éventuelle recherche d'une fluorescence sous lampe de Wood pourra être mentionnée si elle n'a pas été effectuée par le clinicien.

CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE

I - Définitions :

I.1 - Champignons :

- ✓ Organismes unicellulaires ou pluricellulaires dont les cellules possèdent un noyau (eucaryote).
- ✓ Se nourrissent par absorption et utilisent le carbone organique comme source de carbone (ce sont des hétérotrophes).
- ✓ Leur paroi cellulaire contient typiquement de la chitine.
- ✓ Ils peuvent se reproduire de façon sexuée et/ou asexuée.

I.2 - Mycoses :

Les champignons microscopiques sont donc à l'origine de mycoses.

Il en existe plus de 100 000 espèces et 3700 genres. Il y en a environ 150 espèces pathogènes ou potentiellement pathogènes pour l'homme. Certaines ne provoquent que des mycoses superficielles (de la peau, phanères, muqueuses), tandis que d'autres pénètrent plus profondément et peuvent être responsables de mycoses sous-cutanées ou de mycoses profondes viscérales.

Ces dernières posent actuellement le plus de problèmes dans les services de parasitologie-mycologie. En effet la mycologie y est très majoritaire (peu de cas de paludisme ou autre parasitose tropicales).

II - Historique :

Si aujourd'hui les champignons constituent un règne bien individualisé, il n'en a pas toujours été ainsi ; On les a longtemps assimilés au règne végétal de part leur morphologie (thalle, spores, etc.), de part leur absence de mobilité et leur nutrition (absorption).

Au 18ème siècle, le monde vivant était partagé en 2 règnes : le végétal et l'animal, le règne végétal regroupait les plantes et les algues, qui sont des espèces photosynthétiques, les bactéries et les champignons.

Le règne animal, quant à lui, était composé à la fois d'êtres unicellulaires, c'est-à-dire les Protozoaires et des Métazoaires.

CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE

En 1866, le naturaliste et philosophe allemand Haeckel proposa d'y ajouter un troisième règne, celui des Protistes, ce que Copeland transformera plus tard en Protoctistes pour y regrouper la plupart des unicellulaires c'est-à-dire des bactéries, les Protozoaires, les Myxomycètes et autres protistes fongoïdes en raison de leur similitude avec les Rhizopodes. Les champignons et les algues sont quant à eux restés encore longtemps associés au règne végétal.¹

C'est en 1969 que l'américain Wittaker propose un système taxinomique à 5 règles soit les monomères (bactéries), les protistes, les végétaux, les champignons et les animaux.

III - Classification :

III.1 - Classification selon la morphologie

III.1.1 - Les mycoses à levures :

Cryptococcose/Histoplasmose/Coccidioidomycose/blastomycose/Paracoccidiomycose /Sporotrichose...

III.1.2 - Les mycoses à filaments (mycoses à hyphes) :

Filaments hyalins : candidose, aspergillose, pénicilliose, mucormycose, scedosporiose.

Filaments pigmentés (champignons dématiés) : Phaeocephomycoses, chromomycose, alternariose.

III.1.3 - Les mycoses à filaments et à levures (ce sont les champignons dits dimorphiques) :

III.1.3.1 - Les mycoses à grains (mycétomes) :

Mycétomes « vrais » : Grains noirs (*Madurella mycetomatis*) et Grains blancs (*Pseudallesheria boydii*).

Pseudo mycétomes bactériens :

_ Petits grains (*Nocardia*) et Grains blancs (*Actinomadura*)

_ Grains rouges : *Actinomadura pelletieri*

_ Grains blancs : *Streptomyces somaliensis*

¹ D. Chabasse, Cl. Guiguen. N. Contet-Audonneau (1999)

CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE

III.1.3.2 - Les mycoses à sphérules :

Un champignon à part : le *Pneumocystis carinii* (++++).

III.2 - Classification selon le siège :

III.2.1 - Les mycoses cutanées superficielles : *Pitysporium ovale*, *Tinea cruris*, *pedis* ou *versicolor*, *Trichophyton rubrum*.

III.2.2 - Les mycoses sous cutanées et profondes :

-Les mycoses « autochtones » : *Sporotrichose*, *Phaeoconyphomycose*, Cryptococcose, Candidose, Zygomycoses, Scedosporioses.

-Les Mycoses « exotiques » : Mycétome, Chromomycose, Rhinosporidiose, Lobomycose, Histoplasmosse, Blastomycose, Coccidioidomycose, Paracoccidioidomycose, Protothécose. (voir tableau 1)

CHAPITRE 1 : EPIDEMIOLOGIE

INFECTIONS	MALADIES	AGENTS PATHOGENES
SUPERFICIELLES CUTANÉES	PITYRIASIS VERSICOLOR	<i>Malassezia furfur</i>
	DERMATOPHYTOSE	<i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i>
	CANDIDOSE (PEAU, ONGLES, MUQUEUSES)	<i>Candida albicans</i> , ...
SOUS-CUTANÉES	SPOROTRICHOSE CHROMOBLASTOMYCOSE MYCÉTOME	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>Fonsecaea pedrosoi</i> , ... <i>Pseudallescheria boydii</i> , <i>Madurella</i>
PROFONDES OU GÉNÉRALISÉES	HISTOPLASMOSE BLASTOMYCOSE COCCIDIOÏDOMYCOSE PARACOCCIDIOÏDOMYCOSE	PATHOGENES <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Coccidioides spp.</i> <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	CANDIDOSE CRYPTOCOCCOSE ASPERGILLOSE MUCORMYCOSE	OPPORTUNISTES <i>Candida albicans</i> , ... <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> , ... <i>Rhizopus</i> , <i>Lichtheimia</i> , <i>Rhizomucor</i> ,...
HYALOHYPHOMYCOSE	Ex. <i>Fusarium</i> , ...	
PHAEOHYPHOMYCOSE	Ex. <i>Alternaria</i> , <i>Exophiala</i> , ...	

Tableau 1 : classification des mycoses

IV - Répartition géographique :

Les mycoses sont cosmopolites, on les voit partout dans le monde, mais elles seront beaucoup retrouvées dans les régions chaudes et humides. Quelques mycoses "tropicales" ont des répartitions particulières comme l'*histoplasma* ou le *coccidioïdes* et d'autres sont cosmopolites, ce sont celles qui vont nous intéresser (candidoses, aspergilloses, dermatophytoses).

A l'heure actuelle, l'intense circulation des populations fait que l'on va pouvoir observer des mycoses dans des pays où elles n'existent pas de manière habituelle, ces mycoses peuvent modifier la flore fongique.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

I - Mycoses Superficielles:

I.1 - Candidoses:

I.1.1 – Définition :

Les infections localisées ou généralisées dues au genre *Candida* sont groupées sous le terme de candidoses.

I.1.2 - Classification:

Le genre *Candida* apparaît comme un groupe complexe hétérogène selon les auteurs un nombre variable de champignons levuriformes.

Candida albicans est le plus fréquent; mais il existe de nombreuses autres espèces.

I.1.3 - Morphologie des agents pathogènes:

Les *Candida* sont des levures: microorganismes unicellulaires dont la multiplication se fait par bourgeonnement, les levures peuvent émettre des filaments (figure 1)

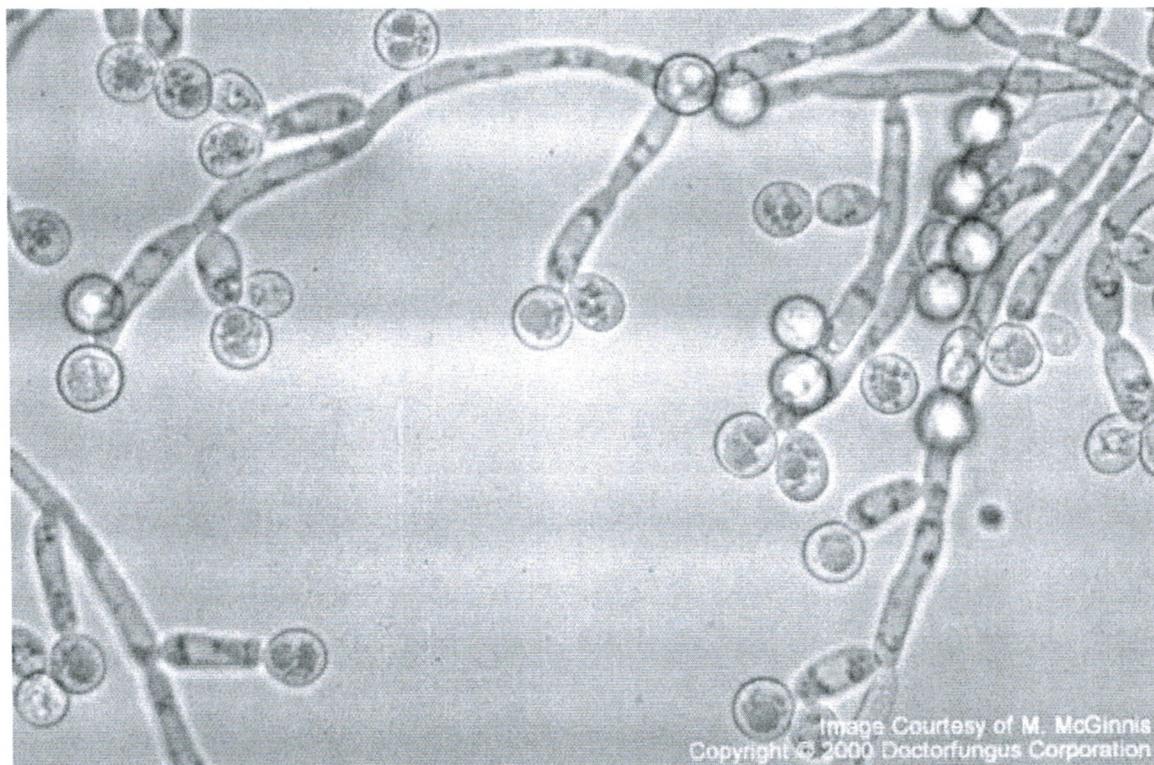


Figure 1 : levures de candida

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

I.1.4 - Facteurs favorisants:

I.1.4.1 - Facteurs locaux:

L'irritation toxique ou traumatique, la macération, les corps étrangers (cathéters) favorisent les candidoses cutanées.

L'humidité favorise l'apparition des manifestations cutanées de candidose notamment, candidose des plis.

I.1.4.2 - Facteurs généraux:

L'âge (prématuré, nouveau-né, vieillard)

I.1.4.3 - Facteurs pathologiques:

Il existe de nombreuses maladies qui entraînent l'apparition de candidoses Le SIDA favorise la survenue de candidose buccale.

Le diabète, la maladie de Hodgkin, le cancer notamment l'hémopathie maligne, l'anomalie fonctionnelle des monocytes et des macrophages peuvent influencer la présence de candidose.

I.1.4.4 - Facteurs liés aux médicaments:

L'emploi d'antibiotiques à large spectre change la flore microbienne endogène et favorise la colonisation de la bouche et du rectum.

Il a été démontré que les aminosides altèrent la fonction neutrophile et que l'amphotéricine B peut aussi inhiber la migration des neutrophiles.

Les corticoïdes, les immunodépresseurs, les cytostatiques sont aussi des facteurs qui sont importants.

I.1.5 - Mode de contamination:

Les Candidas pénètrent dans l'organisme par la muqueuse du tractus digestif;

Par contact (candidoses génitales);

Mais aussi occasionnellement par l'intermédiaire des cathéters.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

I.1.6 - Signes cliniques:

Les candidoses peuvent provoquer des affections de la peau et des muqueuses mais aussi viscérales et profondes.

I.1.7- différentes types de candidoses :

I.1.7.1 - Les Candidoses Cutanées:

I.1.7.1.1 - L'intertrigo:

Il en est la manifestation la plus fréquente. la lésion est prurigineuse, souvent suintante, parfois surinfectée.

I.1.7.1.2 - Candidose unguéale :

L'onxyxis et le périonyxis à candida réalisent un bourrelet périunguéal rouge inflammatoire et douloureux d'évolution chronique.

Les doigts sont beaucoup plus souvent atteints que les orteils. Cette candidose est plus fréquente chez la femme adulte.

I.1.7.1.3 - L'allergie à Candida:

Elle se manifeste sous forme d'eczéma, d'urticaire et de l'acné.

I.1.7.1.4 - Autres candidoses cutanées:

On distingue aussi la candidose génitofessière du nouveau-né, et le granulome candidosique qui est une mycose cutané-muqueuse, frappant les immunodéprimés.

I.1.7.2 - Candidoses des muqueuses:

I.1.7.2.1 - Candidoses buccale et péribuccale:

- Le Muguet, c'est enduit blanchâtre recouvrant la langue C'est une mycose qui peut être la cause d'une extension redoutable.

L'infection VIH est devenue un des principaux facteurs favorisants.

- La langue noire villose.
- La perlèche ou intertrigo des commissures labiales.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

I.1.7.2.2 - Candidose Oesophagienne:

Elle se manifeste par la dysphagie et la brûlure due au passage des aliments.

I.1.7.2.3 - Candidoses digestives:

Les Candidas peuvent siéger le long du tube digestif, les atteintes candidosiques atteignent électivement les deux extrémités du tube.

I.1.7.2.4 - Candidoses anales et périanthés:

Elles sont favorisées par le traitement par les antibiotiques.

I.1.7.2.5 - Candidoses génitales:

Elles sont favorisées par le diabète, la grossesse, la contraception orale, l'antibiothérapie.

La vulvovaginite se manifeste par des brûlures, un prurit tenace et une dyspareunie, la vulve est érythémateuse, les leucorrhées blanchâtres, caillebottées.

Chez l'homme: l'infection se traduit par une balanite ou une balano-posthite avec érythème et prurit.

I.2 - Les Dermatophytes:

I.2.1 - Définition:

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux à mycélium cloisonné et ramifié. Ce sont des parasites kératinophiles retrouvés aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (poils, peau, ongles, ou griffes).

I.2.2 – Classification:

Les dermatophytes appartiennent à la classe des Ascomycètes et à la famille d'Arthrodermataceae. La classification est basée sur les caractères botaniques et reconnaît trois genres :

- Le genre *Microsporum*.
- Le genre *Trichophyton*.
- Le genre *Epidermaphyton*.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

La reproduction sexuée est connue pour un certain nombre d'espèces.

I.2.3 - Morphologie de l'agent pathogène:

Les champignons sont caractérisés par des macroconidies de formes variables selon le genre avec ou sans microconidies parfois (voir figure 2 ; 3)

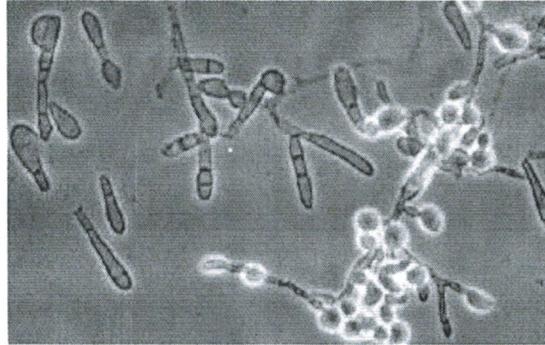


figure 2 : champignons des dermatophyte

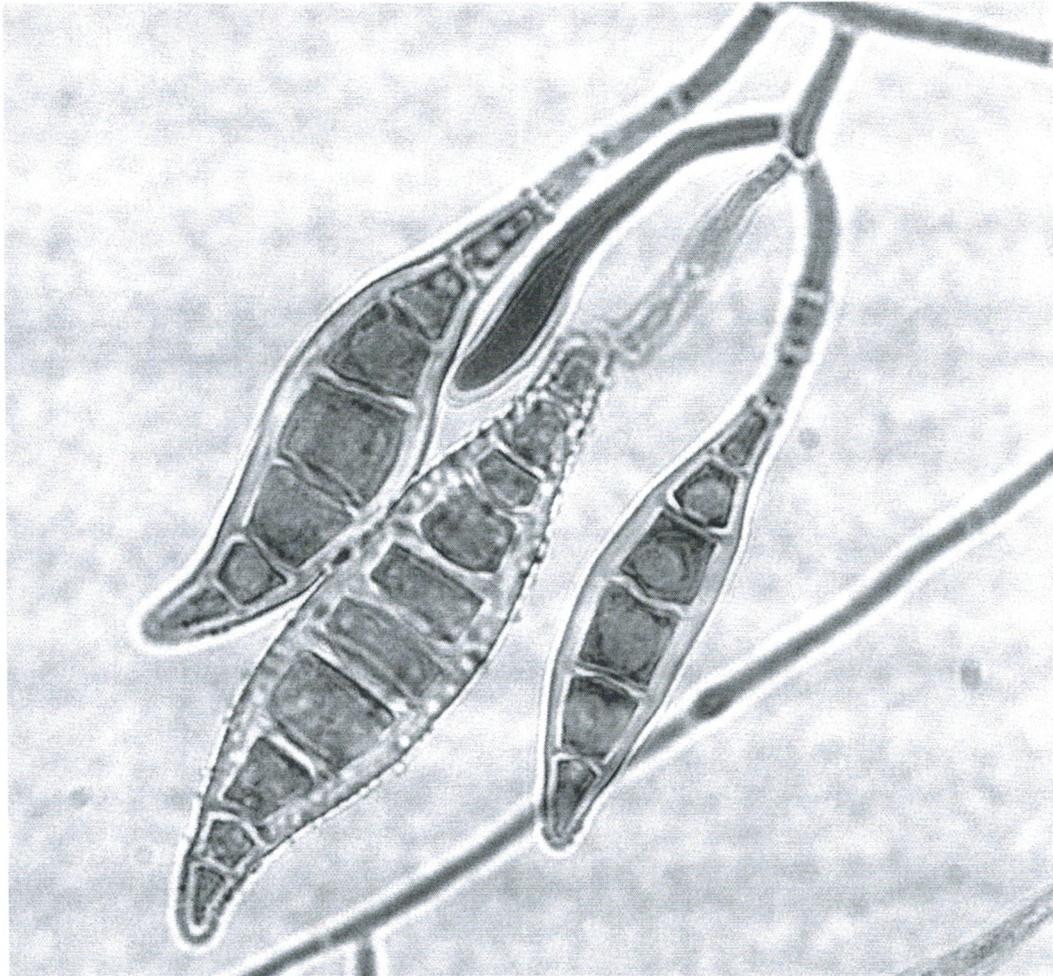


figure 3 : champignons des dermatophytes .

I.2.4 - Répartition Géographique:

Les mycoses sont fréquentes en région tropicale et subtropicale.

I.2.5 - Mode de Contamination :

Les filaments mycéliens nés d'une spore posée par hasard sur la peau pénètrent dans la kératine superficielle probablement à la faveur d'une excoriation.

I.2.6 - Facteurs favorisants :

Facteurs climatiques locaux ou généraux: chaleur, humidité.

Hygiène et mode de vie.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

Modification du terrain liée à une pathologie associée à une mycose ou à une immunodépression ou à une prise de médicaments (corticoïdes).

I.2.7 - Manifestations cliniques :

I.2.7.1 - Teignes :

I.2.7.1.1 - Teignes tondantes :

Elles réalisent une tonsure. On distingue

- ✓ Les teignes tondantes à grandes plaques:
Plusieurs espèces peuvent être responsables d'un tel aspect clinique. *Microsporum* fréquent en France depuis 1980. Les champignons attaquent le cuir chevelu formant une ou plusieurs plaques alopeciques.
- ✓ Les teignes tondantes à petites plaques :
Cette lésion est marquée par une squame minime entraînant la casse des cheveux au ras du cuir chevelu.

I.2.7.1.2 - Teignes Suppuratives :

C'est une atteinte du cuir chevelu." siégeant chez l'homme au niveau de la barbe.

I.2.7.1.3 - Teignes faviques :

Elle se caractérise par l'évolution: débutant chez le jeune âge. Les teignes font tomber les cheveux mais ne les cassent pas. Le cheveu est entouré à son émergence de godet formé de filaments mycéliens.

Ce filament pouvait pénétrer dans les ganglions, le tissu sous-cutané et même les viscères: c'est la maladie dermatophytique, de traitement difficile.

I.2.7.2 - Herpes Circinés :

C'est une lésion élémentaire sur la peau. Ces herpes circinés peuvent siéger en n'importe quel point de la peau dite glabre.

I.2.7.3 - Intertrigo des grands plis :

Dit eczéma Marginé de Hébra: au niveau des plis inguinaux, plus rarement les plis axillaires, le plis inter fessier, les plis sous-mammaires.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

I.2.7.4 - Intertrigo des petits plis :

. Espaces interdigitoplantaires et plantes appelés pied d'athlète avec prédominance dans les 3^e et 4^e espaces.

. Espaces interdigitaux des mains et des paumes: lésions finement squameuses pouvant toucher les 3^e et 4^e espaces.

I.2.7.5 - Onyxis dermatophytiques :

On individualise quatre types cliniques:

- Onyxis sous - unguéal distale.
- Onyxis sous - unguéal proximale.
- Leuconychies superficielles.
- Onchomycodystrophie totale.

I.2.7.6 - Manifestations allergiques au cours des dermatophyties :

Ce sont des lésions vierges de tout parasite, et sont fréquentes et très polymorphes.

I.3 - La Pityrospore :

I.3.1 - Généralités :

La pityrospore est une mycose superficielle généralement bénigne *Malassezia furfur*, l'agent responsable, est un champignon imparfait (figure 4)

Elle est la seule levure qui fasse partie de la flore cutanée normale de l'homme.

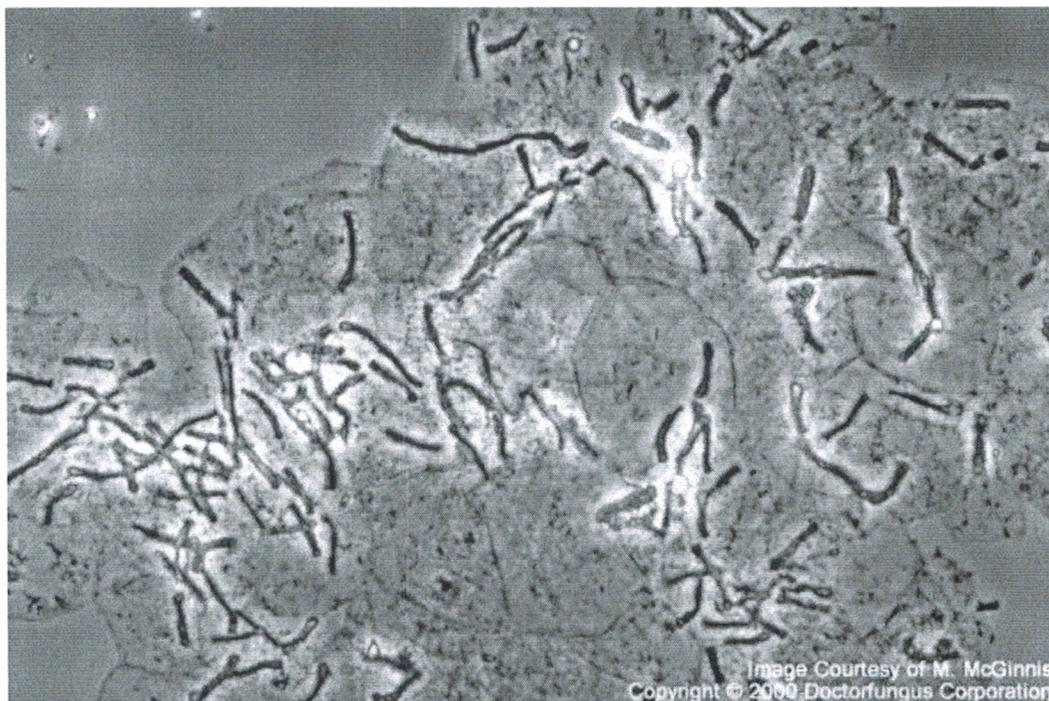


figure 4 : champignon de *Malassezia furfur* .

I.3.2 - Caractères généraux :

C'est un champignon saprophyte universellement répandu. 50% d'une population peuvent être porteurs de ce champignon au niveau des téguments selon certains auteurs.

Pityrosporose, affection superficielle tout à fait bénigne est la mycose la plus banale, la plus fréquente et elle présente des incidences esthétiques qui sont telles que le problème du diagnostic et du traitement se pose de manière souvent impérieuse.

Sur le plan morphologique *Malassezia furfur* à l'état parasitaire au niveau des squames, se caractérise par :

- ✓ Une forme de levure sphérique de 3 à 6 μm de diamètre rassemblé en grappes (figure 5)
- ✓ Une forme de filaments mycéliens, rectilignes incurvés.

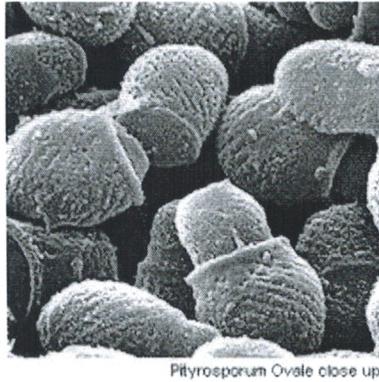


Figure 5 : levure de *Malassezia furfur*

I.3.3 - Rôle pathogène :

Les principales lésions cutanées sont représentées par :

Pityriasis versicolor: tâche chamois à brun squameuse, ou de tâche achromatique, hypopigmentées, siégeant principalement au niveau du tronc.

* Pityriasis capitis ou (état pelliculaire) du cuir chevelu, qui est sec, gras ou stéatoïde.

* Dénitite séborrhéïque : banale mais chronique du visage. Cette affection est souvent rencontrée chez les sujets séropositifs.

* La folliculite pityrosporique simulant l'acné, elle siège sur le dos et les épaules, fréquente chez les immunodéprimés.

Les mycoses systémiques sont de connaissance récente.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

II - MYCOSES PROFONDES :

II.1 - Cryptococcose :

II.1.1 – Définition :

La cryptococcose est une infection due à une levure encapsulée: cryptococcus néoformans.

II.1.2 – Classification :

Cryptococcus néoformans appartient à la famille des Rasidiomycètes et de la sous famille des Hémibasidiomycètes.

II.1.3 - Morphologie de l'agent pathogène :

Cryptococcus néoformans est une levure arrondie ou ovale de 4 à 6 µm (figure 6)

Il c'est une exosaprophyte, entourée d'une capsule mucilagineuse qui, invisible à l'état frais, apparaît en négatif sur les préparations à l'encre de chine.

Elle se reproduit par bourgeonnement

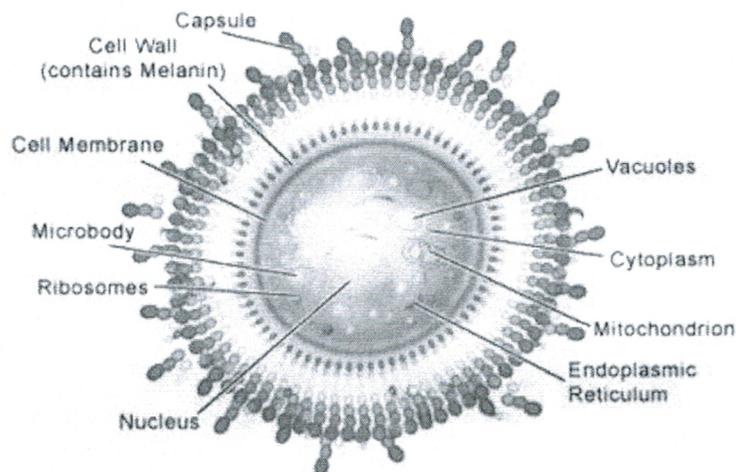


figure 6 : levure de Cryptococcus néoformans

II.1.4 - Répartition géographique :

C'est un champignon cosmopolite, mais plus fréquent en Afrique Centrale. La levure se développe dans les fientes desséchées de divers oiseaux : pigeons, canaris.

Elle est abondante dans le sol, sur les fruits et dans le lait.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

II.1.5 - Mode de contamination :

La porte d'entrée est pulmonaire dans la très grande majorité des cas.

La dissémination, par voie aérienne, sanguine sympathique est responsable d'une forme neuroméningée, et /ou septicémique.

II.1.6 - Signes cliniques :

II.1.6.1 - Atteinte neurologique :

C'est une méningo-encephalite subaigue ou chronique. Les manifestations sont en règle d'installation .autant plus rapide que le sujet est plus immunodéprimé (sida, patient sous corticothérapie à forte dose) bien que les observations de cryptococcose neuroméningée de découverte fortuite aient été rapportées sur ce terrain.

Les manifestations atypiques sont : fatigue, amaigrissement, perte de mémoire.

Le symptôme le plus fréquent est la présence de céphalées: frontales, temporales ou rétro-orbitaires résistantes aux antalgiques.

Les conclusions surviennent en général tardivement dans l'évolution de la maladie.

II.1.6.2 - Atteinte pulmonaire :

Elle est souvent asymptomatique et de découverte fortuite et s'accompagne chez le sujet séropositif de signes fonctionnels: dyspnée, toux avec expectoration minime parfois hémoptoïque, douleurs thoraciques, fièvres.

Les aspects radiologiques sont variables:

- Spacités intra-parenchymateuses uniques ou multiples.
- Pneumopathie interstitielle segmentaire oblitérale.
- Atteinte pleurale, ganglionnaire.

II.1.6.3 - Autres localisations :

L'atteinte cutanée témoignée de la dissémination de l'infection, atteintes osseuses (le champignon a une préférence pour les épiphyses, les os du crâne, et les vertèbres).

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

Dans la cryptococcose disséminée trois organes sont plus fréquemment touchés.

- l'œil (choriorétinites, endophtalmies conjonctivites).
- le cœur (myocardite, endocardite, péricardite.
- la prostate.

II.2 - Les Histoplasmoses :

Les histoplasmoses sont des mycoses profondes causées par des champignons vivant habituellement dans le sol.

Les histoplasmoses sont des champignons dimorphiques, sous la forme de levures à l'état parasitaire et sous forme filamenteuse (figure 7) à l'état saprophytique.

On connaît actuellement deux formes d'histoplasmoses humaines qui diffèrent par leurs aires de répartition géographique mais dont les agents pathogènes sont semblables en culture:

- L'histoplasmose américaine ou classique due à *histoplasma capsulatum*. Variété *capsulatum*.
- l'histoplasmose dite africaine due à *histoplasma capsulatum*. Variété *duboisii*.

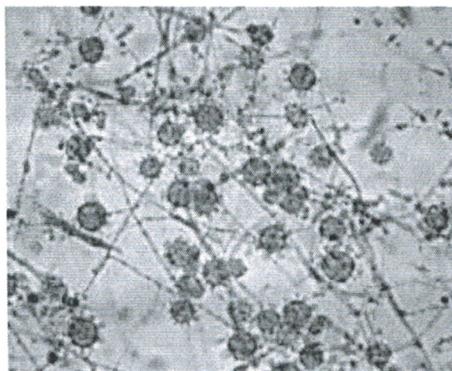


figure 7 : champignon de l histoplasmose .

II.2.1 - Histoplasmose américaine :

II.2.1.1 – Définition :

L'histoplasmose à *histoplasma capsulatum* est une mycose à porte d'entrée pulmonaire, caractérisée par le développement de petites levures dans le cytoplasme des cellules du système réticulo-endothéliale.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

II.2.1.2 – Classification :

Histoplasma capsulatum fait partie de la famille des ascomycètes et de la sous famille de Encascomycètes.

II.2.1.3 – Morphologie :

La forme levure mesure 1 à 3 µm, levure bourgeonnante, limitée par une paroi réfringente, bien colorée par le PAS et l'argent.

A l'état saprophytique, il se présente sous forme mycélienne: filaments septés de 1 à 2 microns de large, présentant de petites spores et de grosses chlamydo-spores de 6 à 15 µm échinulées ou tuberculées, caractéristique du genre histoplasma.

II.2.1.4 - Répartition géographique :

C'est une mycose considérée comme cosmopolite: Afrique, Asie, USA.

II.2.1.5 - Mode de contamination :

La contamination se fait par inhalation de spores présentes dans le sol.

La contamination par voie digestive ou cutanée est très exceptionnelle, voire inexistante.

II.2.1.6 - Signes cliniques: 3 formes:

II.2.1.6.1 - Primo-infection pulmonaire :

Après une incubation de 5 à 18 jours, l'infection débute par des symptômes, facilement confondus avec une grippe ou pouvant passer inaperçus dans 65 à 75% des cas.

II.2.1.6.2 - Forme secondaire disséminée :

Elle se traduit en général par: fièvre modérée, splénomégalie, hépatomégalie, polyadénopathie, troubles digestifs et perforations intestinales.

Les histoplasmoses ont une certaine affinité pour les glandes surrénales.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

B.2.1.6.3 - Forme chronique pulmonaire ou tertiaire :

Cette forme peut être cavitaire, modulaire ou pseudotumorale; elle résulte soit du prolongement d'une histoplasmosse primaire soit d'une réinfection. L'affection emprunte le tableau clinique de la tuberculose évolutive.

II.2.2 - Histoplasmosse africaine :

II.2.2.1 – Définition :

C'est une mycose profonde caractérisée par le développement de levures beaucoup plus grandes que celles de *histoplasma capsulatum*. Ces levures ont une prédominance cutanée, osseuse, et ganglionnaire.

II.2.2.2 – Classification :

Histoplasma capsulatum variété *diboisii* fait partie de la classe des Ascomycètes.

II.2.2.3 - Morphologie de *Histoplasma diboisii* :

A l'état parasitaire, le champignon se présente sous forme de grandes levures bourgeonnantes de 7 à 15 μm , bordées par une épaisse membrane réfringente.

A l'état saprophytique *Histoplasma diboisii* présente le même aspect en culture sur milieu Sabouraud +C+A en cœur - cerveau.

II.2.2.4 - Répartition géographique :

C'est une mycose strictement africaine: Afrique de l'Ouest, Centrale et Equatoriale.

II.2.2.5 - Mode de contamination :

Le mode de contamination est mal connu.

II.2.2.6 - Manifestations cliniques :

Le poumon est rarement touché.

On distingue 3 principales localisations: cutanée, osseuse, ou ganglionnaire. Les signes cutanés prédominent au niveau du visage sous la forme de capsules ou modules bruns.

L'atteinte osseuse est pseudo-tuberculeuse avec ostéolyse, géodes et abcès froid.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

Il existe des formes disséminées avec ulcérations digestives et atteintes polyviscérales.

II.2.3 - Les Aspergilloses :

II.2.3.1- Définition :

Les aspergilloses sont des mycoses provoquées par des champignons imparfaits appartenant au genre *Aspergillus*, caractérisé par une multiplication asexuée au moyen de conidies produites par des organes de morphologie tout à fait caractéristique « les têtes aspergillaires ».

II.2.3.2 - Classification :

Il s'agit de champignon imparfait appartenant à la classe des Hyphomycètes.

II.2.3.3 - Morphologie de l'agent pathogène :

Ce sont des champignons filamenteux avec des filaments en septa de 2 à 4 μm de diamètre environ (figure 8)

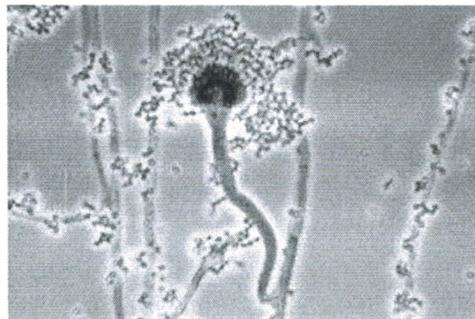


figure 8 : filaments d *Aspergillus*

II.2.3.4 - Répartition géographique :

Les aspergilloses sont des mycoses cosmopolites

II.2.3.5 - Mode de contamination :

L'homme se contamine par inhalation de spores.

B.2.3.6 - Facteurs favorisants :

Facteurs généraux:

Nombre de spores infestantes inhalées.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

Diminution des facteurs de défense immunitaire.

Chimio et corticothérapie immunosuppressives.

Facteurs locaux: il peut s'agir :

D'une cavité résiduelle faisant le lit de l'aspergillose.

D'une origine iatrogène. Exemple lors des cathéters ou protège vasculaire

II.2.3.7 - Manifestations cliniques :

L'aspergillose survient plutôt à un stade avancé du déficit immunitaire et les formes cliniques chez les patients atteints de SIDA sont variées.

II.2.3.7.1 - L'aspergillose pulmonaire :

La localisation habituelle de l'aspergillose au cours du SIDA est le poumon.

Typiquement, il s'agit d'une pneumopathie aiguë fébrile, résistante aux antibiotiques. L'existence d'une toux avec ou sans expectoration, de douleurs thoraciques l'hémoptysies ou d'hypoxie fait évoquer le diagnostic.

L'aspergillose bronchique obstructive est une forme clinique particulière. Les patients expectorent spontanément des bouchons muqueux remplis d'Aspergillus. Les manifestations cliniques sont: dyspnée, fièvre, hémoptysie et parfois douleurs thoraciques.

L'aspergillome correspond à une touffe de filaments dans un kyste ou une cavité pulmonaire, le plus souvent dans le lobe supérieur.

II.2.3.7.2 - Aspergillose cérébrale :

L'aspergillose cérébrale est particulièrement grave et signe la dissémination.

II.2.3.7.3 - L'aspergillose invasive du conduit auditif :

Elle est liée à une colonisation du conduit auditif externe par Aspergillus. Les patients présentent une baisse de l'acuité auditive, un prurit, des douleurs, une fièvre.

Une otorrhée verdâtre ou noirâtre peut s'écouler, contenant des filaments mycéliens.

II.2.3.7.4 - L'aspergillose immuno-allergique :

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

Il existe asthmes bronchiques avec test de provocation positif aux antigènes aspergillaires.

II.2.4 - La Coccidioïdomycose :

II.2.4.1 – Définition :

La coccidioïdomycose ou fièvre des vallées est due à *Coccidioides immitis*, espèce dimorphique.

II.2.4.2 – Classification :

C'est un champignon imparfait appartenant à la classe des Septomycètes.

II.2.4.3 – Morphologie :

Le champignon existe sous deux formes: formes parasitaire et saprophytique.

II.2.4.3.1 - Forme saprophyte :

Elle est formée de filaments mycéliens, fins, septés ramifiés. Certains filaments se segmentent en arthrospores qui se dissocient.

II.2.4.3.2 - Forme parasitaire :

Elle se présente sous forme d'une cellule sphérique mesurant environ 10 à 80 μm de diamètre à paroi épaisse multinuclée appelée sporange ou sphérule.

A maturité, elle est remplie de sporangiospores uninuclées arrondies de 1 à 4 μm de diamètre.

II.2.4.4 - Répartition géographique :

La coccidioïdomycose est une mycose endémique des régions désertiques et semi - désertiques des Etats - unis, et de l'Amérique du sud.

II.2.4.5 - Mode de contamination :

L'infection chez l'homme et l'animal résulte de l'inhalation d'arthrospores portés par le vent et provenant du sol.

II.2.4.6 - Facteurs favorisants :

Facteurs climatiques: faible pluviométrie, température élevée en été, présence de Cactus, certains rongeurs favorisent la multiplication de la forme saprophytique.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

Le vent favorise la dispersion des spores.

Facteurs professionnels: agriculteurs.

II.2.4.7 - Manifestations cliniques :

La primo infection pulmonaire symptomatique se manifeste par de la fièvre, de la toux, une douleur thoracique.

L'évolution peut conduire à la coccidioïdomycose pulmonaire chronique et engendre de la toux et une expectoration.

La dissémination peut subvenir si le malade est atteint de SIDA ou à d'autres immunodépressions. Cette dissémination peut être suspectée par la présence de fièvre, la sensation de malaise, et une vitesse de sédimentation élevée chez des malades atteints de primo infection pulmonaire.

Les localisations peuvent être la peau, les os, le tissu sous cutané, les méninges; les articulations.

II.2.5 - La Pneumocystose :

II.2.5.1 – Définition :

La pneumocystose est une pneumonie due à *Pneumocystis carinii*, d'habitat naturel le poumon. Cette espèce pathogène est classée parmi les champignons dont, la recrudescence observée depuis ces 20 dernières années, est liée à l'infection par le VIH.

II.2.5.2 – Classification :

Actuellement classée parmi les champignons.

II.2.5.3 – Morphologie :

Les micros - organismes sont souvent rassemblés au niveau des alvéoles pulmonaires dans des amas de substance acidophile. Habituellement on décrit 3 stades de développement:

- Les trophozoïtes pléomorphiques (1 à 4 μm) forme trophique.
- Le kyste mesurant 5 à 8 μm qui a une paroi cellulaire épaisse et qui contient jusqu'à huit corps intrakystiques (figure 9).

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

- Le prékyste est un stade intermédiaire.

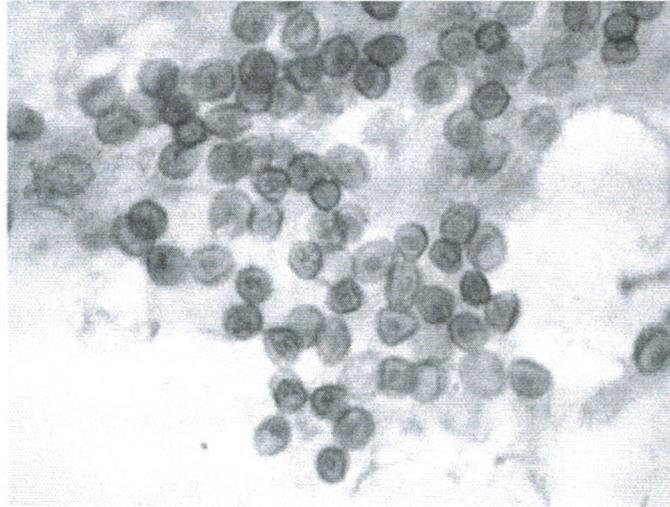


figure 9 : kystes de *Pneumocystis carinii*.

II.2.5.4 - Répartition géographique :

La pneumocystose à *Pneumocystis carinii* est une affection cosmopolite de l'homme et de nombreux animaux (rongeurs, chien, chat, porc).

II.2.5.5 - Mode de contamination :

L'acquisition par inhalation a été prouvée chez l'animal, chez l'homme.

La contamination se fait probablement par voie respiratoire.

II.2.5.6 - Manifestations cliniques :

La pneumocystose se manifeste dans la plus grande majorité des cas chez des malades en état d'immunodépression particulièrement chez les sidéens. Cependant des cas de pneumocystose ont été rapportés chez des personnes immunocompétentes.

Chez ces sujets immunodéprimés quelle que soit la cause de l'immunodépression, l'infection pneumocystique se développe au niveau des alvéoles pulmonaires quoique des localisations extrapulmonaires aient pu être décrites.

- formes typiques :

Elle est marquée par la triade: fièvre, toux, dyspnée d'aggravation progressive évoluant depuis 3 semaines à 1 mois.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

- formes débutantes :

Les signes cliniques peuvent être plus discrets et évoluer sur plusieurs semaines, voire quelques mois et rendre le diagnostic difficile.

- formes vues tardivement :

Elles se présentent avec d'emblée une insuffisance respiratoire aiguë de « poumons blancs » nécessitant une prise en charge en réanimation.

- formes atypiques :

Elles s'expliqueraient par la distribution inégale de la pentamidine et une dissémination de *Pneumocystis carinii* qui pourrait être non plus alvéolaire mais interstitielle et/ou vasculaire.

- au cours des autres immunodépressions :

La symptomatologie est la même tant sur le plan clinique que radiologique.

II.2.6 - Les Dermatophytoses sous cutanées et profondes :

Trois formes sont bien individualisées:

- le granulome trichophytique de Majocchi
- le mycétome à dermatophyte et
- la maladie dermatophytique.

II.2.7 - Candidoses généralisées :

Ce terme regroupe les candidoses systémiques avec hémoculture positive et/ou les candidoses viscérales par lesquelles l'infection s'est révélée le plus souvent par voie hématogène. Les levures systémiques s'observent avec une moindre fréquence chez les héroïnomanes et les patients infectés par le VIH à un stade avancé du SIDA, et plus rarement encore chez les diabétiques ou des patients ayant une maladie auto-immune. Néanmoins, quelque soit le terrain, plus les facteurs favorisants sont nombreux, plus le risque est élevé.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

II.2.8 - Autres Mycoses :

II.2.8.1 - Paracoccidiomycose :

Infection à *Paracoccidioides brasiliensis*.

La paracoccidiomycose est endémique en Amérique latine, du Mexique à l'Argentine en passant par le Brésil. Elle est rarement décrite chez l'immunodéprimé.

Les cas signalés viennent du Brésil et ont été rapportés chez des patients infectés par le VIH.

Les formes disséminées sont habituelles. Quelques patients présentaient une atteinte cutanée, sous forme de papule du visage. Le diagnostic est porté sur les biopsies de la peau ou des ganglions.

II.2.8.2 - Infection à *Blastomyces dermatitidis* :

La blastomycose est endémique aux Etats- Unis, en particulier dans les vallées de l'Ohio et du Mississippi et dans le sud-est du pays. Elle est également retrouvée dans quelques régions d'Afrique.

Elle est rarement décrite chez le sujet immunodéprimé. Plus d'une vingtaine de cas ont été rapportés au cours de l'infection par le VIH, le plus souvent des patients dont le taux de lymphocytes TCD4 était inférieur à 200/ mm³.

Deux types de présentations cliniques sont principalement décrits:

- les localisations pleuro pulmonaire isolées (50%).
- les formes disséminées.

Dans les formes disséminées certaines particules présentent une atteinte cutanée ou cérébrale.

Le diagnostic repose sur la culture mycologique à partir des prélèvements respiratoires ou cutanés.

CHAPITRE 2: EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

II.2.8.3 - Infection à *Sporothrix schenckii* :

La sporotrichose est caractérisée par des lésions cutanées, modulaires et du tissu sous cutané avec diffusion lymphatique locale.

Quelques cas ont été rapportés au cours de l'infection par le VIH chez les patients ayant moins de 200 CD4/mm³.

Le diagnostic est porté sur la positivité des cultures en particulier des prélèvements cutanés.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

I - Antifongique :

C'est seulement depuis cette dernière décennie que la thérapeutique antifongique s'est réellement développée. Cette inertie trouvait sa justification dans la relative rareté des mycoses systémiques à l'exclusion de certaines mycoses tropicales à répartition géographique bien limitée, et le fait que l'on disposait depuis 1960 d'un antifongique systémique, l'amphotéricine B, toxique mais très efficace.

L'incidence croissante des septicémies à levures et des aspergilloses invasives liée à l'utilisation de thérapeutiques médicales et chirurgicales plus efficaces mais aussi plus agressives, et la rapide émergence du SIDA ont conduit au développement des antifongiques azolés de deuxième et troisième génération moins toxiques et administrables par voie orale. Depuis, des classes totalement nouvelles d'antifongiques ont encore été découvertes et il est remarquable de constater que de nouvelles molécules commencent à être disponibles au moment où le besoin est le plus évident.

En fait, il ne faut pas sous-estimer les difficultés qui procèdent au développement d'une molécule antifongique, difficultés liées aux champignons eux-mêmes, au terrain qu'ils envahissent et enfin aux agents antifongiques. Par exemple, la structure déjà évoluée de la cellule fongique la rapprochant de la cellule des mammifères explique la toxicité de nombreux antifongiques également pour l'organisme hôte. De plus, la plupart des champignons ne sont pas des parasites, mais font partie de la flore commensale de l'homme : c'est l'effondrement des mécanismes habituels de défense qui fait le lit de cette pathologie opportuniste et qui explique les fréquents échecs thérapeutiques chez les patients immunodéprimés.

Enfin, la plupart des antifongiques actuels ont une action, aux doses thérapeutiques usuelles, fongistatique et non fongicide, phénomène qui implique des traitements de longue durée pour obtenir une guérison mycologique.

L'objectif de cette synthèse est de rappeler les caractéristiques des antifongiques anciens et de positionner les plus récents. Seuls les antifongiques utilisés dans les infections systémiques seront détaillés.

II – Antifongiques polyéniques :

II.1 - Amphotéricine B :

Isolé de *Streptomyces nodosus*, l'Amphotéricine B (AmB, Fungizone®) est utilisé depuis plus de trente ans dans le traitement des infections fongiques systémiques.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Il reste encore un antifongique majeur malgré sa toxicité, étant le plus efficace dans de nombreuses situations cliniques de mycoses systémiques.

L'AmB est un macrolide polyénique comportant 7 doubles liaisons responsables de la forte lipophilie de la molécule. La présence de sels biliaires (désoxycholate de sodium) dans la formulation commerciale permet de former des micelles mixtes avec l'AmB et de solubiliser la molécule qui doit être administrée dans du sérum glucosé à 5 % pour éviter tout risque de précipitation.

Les effets de l'AmB sur les cellules fongiques ou animales restent encore mal compris. L'étape initiale d'efficacité ou de toxicité consiste en une interaction avec les stérols des membranes plasmiques, dans lesquelles l'AmB forme des pores. Ce phénomène entraîne une fuite des constituants cytoplasmiques, en particulier au niveau des ions Na⁺ et K⁺. Ces pores résultent de l'agrégation de plusieurs molécules d'AmB à l'intérieur de la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique, de manière à former une sorte de cylindre creux par lequel peuvent fuir les ions et les constituants cellulaires essentiels. La sélectivité de l'AmB pour la cellule fongique par rapport à la cellule hôte proviendrait d'une affinité beaucoup plus marquée pour les membranes contenant de l'ergostérol, composant majeur de la membrane fongique, que pour celles contenant du cholestérol, essentiellement présent dans les membranes de mammifères.

Outre cette faculté de former des pores au travers de la membrane cytoplasmique, l'AmB inhibe l'action d'enzymes membranaires et elle peroxyde les lipides insaturés.

L'hyperthermie provoquée chez l'homme par l'AmB administrée par voie intraveineuse résulterait de la stimulation des oxydations cellulaires. Enfin l'AmB pourrait avoir des effets immunostimulants mais les mécanismes impliqués et leurs conséquences cliniques potentielles restent encore très obscurs.

Son spectre est le plus large de tous les médicaments antifongiques actuellement disponibles, incluant la plupart des espèces pathogènes pour l'homme, et la survenue de résistances au sein d'une espèce habituellement sensible est un phénomène exceptionnel. Les *Candida non-albicans* sont toutefois moins sensibles que les autres et la survenue d'une résistance à l'AmB sous traitement a pu être démontrée pour certaines souches. L'activité de l'AmB est inconstante sur *Aspergillus* spp. alors que *Candida lusitaniae*, *Trichosporon cutaneum* et *Actinomyces* spp. sont habituellement résistants.

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer la résistance fongique à l'AmB :

Diminution de la perméabilité de la paroi externe fongique, déplétion de la membrane

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

cytoplasmique en ergostérol réduisant les possibilités de liaison AmB-membrane cellulaire, diminution de sensibilité de la cellule fongique aux phénomènes d'oxydation normalement déclenchés par l'AmB. La détermination *in vitro* de la sensibilité aux antifongiques polyéniques ne présente pas de difficulté particulière, celle-ci étant peu dépendante de la variation des paramètres expérimentaux (taille de l'inoculum, composition du milieu).

La résorption digestive de l'AmB est trop faible (< 5%) pour permettre d'utiliser la voie orale dans l'optique d'un traitement systémique. Cette voie n'est donc utilisée que dans le traitement des candidoses orales ou lorsqu'une décontamination digestive est nécessaire, la voie intraveineuse étant obligatoire dans les autres cas. L'AmB est fortement (> 95 %) lié aux protéines sériques, principalement aux lipoprotéines. Sa diffusion tissulaire est excellente dans le poumon, la rate, le foie et les reins où il se lie aux membranes riches en cholestérol avec un volume de distribution de 4 L.kg⁻¹.

La pénétration de l'AmB dans le cerveau et le liquide céphalo-rachidien est extrêmement faible (de 2 à 4 %) et, le plus souvent, elle y est indétectable alors même qu'elle reste le traitement de référence de certaines mycoses graves cérébro-méningées. Son élimination est principalement tissulaire par dégradation, bien qu'aucun métabolite n'ait été à ce jour identifié. L'excrétion biliaire et urinaire sont faibles, inférieure à 20 % et la demi-vie d'élimination est > 24 h. Aucun ajustement thérapeutique n'est donc nécessaire chez les patients insuffisants rénaux et/ou hépatiques.

La toxicité rénale est la complication majeure du traitement, dont elle limite souvent la durée. Elle est souvent réversible, et comprend une atteinte glomérulaire (réduction de la filtration glomérulaire par vasoconstriction de l'artériole afférente) et surtout tubulaire (au niveau de la branche ascendante de l'anse de Henlé et du tube contourné distal). Il en résulte une polyurie, une fuite électrolytique urinaire responsable de la survenue d'une hypokaliémie et d'une hypomagnésémie, et une acidose tubulaire distale qui apparaissent 2 à 3 semaines après le début du traitement. Une synergie des effets néphrotoxiques est observée avec la ciclosporine, les glycopeptides et les aminosides (surtout la gentamicine).

Une fièvre et des frissons sont souvent observés pendant la perfusion d'AmB ou dans les heures qui suivent, chez plus de la moitié des patients traités qui peut parfois conduire à l'arrêt du traitement. D'intensité variable selon les patients, elles s'atténuent au fur et à mesure des administrations. Probablement secondaires à la synthèse de la prostaglandine E2, ces réactions sont combattues par l'administration préventive d'aspirine, antihistaminiques et hémisuccinate d'hydrocortisone et l'utilisation d'une posologie progressive.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Les thrombophlébites provoquées par l'irritation veineuse liée à la molécule sont prévenues par l'utilisation d'une voie veineuse profonde et l'allongement de la durée de la perfusion. Une diminution de 20 à 30 % de l'hématocrite est observée chez la plupart des patients, en général au bout de plusieurs semaines de traitement, et paraît liée à une toxicité directe sur les cellules souches hématopoïétiques et/ou à une baisse de la production d'érythropoïétine. Enfin, une toxicité neurologique peut survenir après administration intrathécale. Cette voie d'administration doit donc être évitée.

II.2 – Formulations lipidiques d'amphotéricine B :

Les préparations liposomales d'AmB ont été développées pour diminuer la néphrotoxicité de l'AmB conventionnel. Les liposomes peuvent se définir comme des vésicules lipidiques constituées d'une ou plusieurs couches concentriques de nature phospholipidique séparées les unes des autres par un espace aqueux. Elles peuvent donc aisément servir de vecteur à des composés ayant un pôle lipophile et un autre hydrophile, comme l'AmB. La distribution des liposomes se faisant essentiellement au niveau du système réticulo-endothélial (foie, rate, ganglions) et des poumons, ceux-ci véhiculent préférentiellement l'antifongique vers ces sites, y augmentent sa concentration tout en limitant sa toxicité.

Trois formulations sont actuellement utilisables en clinique :

L'AmB liposomal (AmBisome®, 1 à 6 mg.kg-1.j-1 selon l'indication thérapeutique) correspond à des liposomes de très petite taille à une seule couche,

L'AmB-Lipid-Complex (ABLCL, Abelcet®, 5 mg.kg-1.j-1) à des complexes lipidiques structurés en ruban et ;

L'AmB Colloïdal-Dispersion (ABCD, Amphocil, ou Amphotec, pas d'AMM en France à ce jour) à une bicouche lipidique de forme discoïdale. *In vitro*, l'activité antifongique de l'AmB liposomale est comparable à celle de l'AmB standard, mais ses propriétés pharmacologiques et toxicologiques sont différentes. En particulier, les interactions de l'AmB avec les membranes cellulaires des cellules fongiques sont plus sélectives avec les formulations liposomales, expliquant leur moindre toxicité notamment rénale, ce qui aboutit à l'augmentation de leur index thérapeutique. Néanmoins, les réactions générales compliquant leur administration (fièvre, frissons) ne sont pas significativement diminuées par rapport à celles observées avec l'AmB conventionnelle et sont même plus fréquentes avec l'ABCD. L'administration d'AmB mélangé à de l'intralipide, à 20 % ne permet pas de diminuer les

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

complications rénales, sa fabrication n'est pas standardisée et n'a pas obtenu d'agrément pour son utilisation.

Ce mode d'administration n'est actuellement plus recommandé.

III – Analogues nucléosidiques :

III.1 – Flucytosine :

La 5-Fluorocytosine ou flucytosine (5-FC, Ancotil®) est un analogue de la cytosine synthétisée en 1957 pour le traitement des leucémies. Néanmoins, elle était inefficace dans cette indication parce qu'elle n'avait pas d'activité cytotoxique. Son activité antifongique n'a été découverte que huit ans plus tard. Après pénétration dans la cellule fongique, la 5-FC est transformée en 5-fluorouracyle (5-FU) par une cytosine désaminase.

Le 5-FU est incorporé dans l'ARN à la place de l'uracyle conduisant ainsi à la synthèse de protéines anormales et bloque également la synthèse de l'ADN. Même si la 5-FC est actif *in vitro* contre *Candida* spp. (y compris *C. glabrata*), *Cryptococcus neoformans* et à un moindre degré *Aspergillus* spp. les études cliniques ne l'ont utilisé que dans les infections candidosiques ou cryptococciques où elle exerce un effet fungistatique.

La résistance primaire n'est pas rare dans certaines régions et son utilisation en monothérapie conduit toujours à un échec thérapeutique par sélection rapide de mutants résistants.

La 5-FC est un antifongique généralement bien toléré en l'absence de tares viscérales majeures. Sa faible toxicité s'explique par la quasi absence de cytosine désaminase dans les cellules des mammifères. Néanmoins, une toxicité médullaire et digestive (entérocologie) sont observées lorsque les taux sanguins dépassent 100 mg.L⁻¹. Ces surdosages correspondent, plus qu'à des posologies excessives, à une insuffisance rénale négligée ou méconnue. Or, peu de laboratoires sont capables de mesurer les concentrations plasmatiques de 5-FC. Elle correspondrait à une désamination du 5-FC en 5-FU dans la lumière du tube digestif par la flore intestinale, pouvant exercer une toxicité locale ou systémique après réabsorption.

En plus de son spectre, la 5-FC s'oppose à l'AmB par l'ensemble de ses caractéristiques pharmacocinétiques : bonne absorption par le tube digestif, liaison aux protéines plasmatiques faible, bonne diffusion tissulaire avec passage de la barrière méningée, demi-vie d'élimination courte (5 h) par voie urinaire sous forme inchangée.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

IV - Les Azolés :

La découverte de l'activité antifongique des azolés a constitué une avancée considérable dans la thérapeutique des infections fongiques superficielles et systémiques.

Les azolés de première génération sont des imidazolés dont le miconazole est le représentant le plus intéressant actuellement. Il est utilisé dans le traitement des mycoses cutanéomuqueuses à levures ou à dermatophytes. Le kétoconazole (Nizoral®), un autre imidazolé, est le principal représentant des azolés de deuxième génération. C'est le premier azolé bien absorbé par voie orale, mais son hépatotoxicité et ses interactions avec de nombreuses molécules limitent ses conditions d'utilisation.

Enfin, les azolés de troisième génération correspondent aux dérivés triazolés (fluconazole = Triflucan®, et itraconazole = Sporanox®). Leurs propriétés pharmacologiques et leur tolérance généralement satisfaisantes permettent de les utiliser dans les infections fongiques systémiques. D'autres azolés sont en cours d'évaluation préclinique ou clinique.

Tous les azolés inhibent préférentiellement les enzymes du cytochrome P450 fongique, notamment ceux responsables de la conversion du lanostérol en ergostérol. Cela conduit à une déplétion en ergostérol au niveau de la membrane fongique conduisant à des anomalies dans la perméabilité membranaire. La synthèse du cholestérol dans la cellule de mammifère est également bloquée par les azolés mais seulement à des doses bien supérieures à celles bloquant la synthèse de l'ergostérol fongique, sauf pour l'itraconazole, expliquant sa plus grande toxicité, notamment hépatique. L'activité *in vitro* des azolés est variable d'une molécule à une autre, et leur efficacité clinique peut ne pas exactement coïncider avec leur activité *in vitro*. En effet, l'évaluation de l'activité antifongique des composés azolés constitue en mycologie un problème majeur en raison de l'absence de méthodes fiables et reproductibles de détermination de la sensibilité *in vitro*.

Ainsi, les azolés ne sont pas actuellement développés sur la base des études de sensibilité *in vitro* mais sur des modèles animaux. Le fluconazole se caractérise par un spectre ciblé principalement sur certaines espèces de levures (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* notamment). L'itraconazole se positionne plutôt comme un anti-aspergillaire. Généralement, les azolés sont considérés comme fongistatiques, mais la différenciation entre activité fongistatique et fongicide est largement dépendante des méthodologies de laboratoire. L'émergence de souches résistantes aux azolés parmi les différentes espèces de *Candida* au cours du traitement constitue une question encore largement débattue. Néanmoins, des observations récentes mettent en évidence l'augmentation de CMI de souches

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

de *C. albicans* isolés chez des patients sidéens après traitement antérieur au fluconazole ou à l'itraconazole.

Pour le kétoconazole, sa toxicité (essentiellement hépatique, rénale et endocrinienne : diminution de la testostérone et du cortisol) et l'absence de forme intraveineuse ont amené à repreciser ses conditions d'utilisation. De plus, sa faible pénétration dans le système nerveux central le contre-indique dans le traitement des méningites fongiques. Enfin, la variabilité de son absorption orale en fonction du pH gastrique le rend peu maniable d'utilisation, notamment chez le patient sidéen ou polymédicamenté.

Synthétisé en 1981, le fluconazole est utilisable par voie orale ou intraveineuse avec les mêmes caractéristiques pharmacocinétiques, son absorption orale n'étant pas influencée de façon significative ni par l'acidité gastrique ni par la prise de nourriture.

Sa demi-vie d'élimination autorise la dose unique journalière. Il n'est pas métabolisé dans l'organisme et a une bonne diffusion tissulaire y compris au niveau du système nerveux central et des différents compartiments de l'œil. Son élimination principalement rénale sous forme inchangée implique une adaptation posologique chez l'insuffisant rénal. Sa sélectivité sur le cytochrome P 450 de la cellule fongique explique sa très bonne tolérance y compris lors des traitements prolongés.

L'administration d'une dose de charge initiale (2 fois la dose quotidienne usuelle) est recommandée pour atteindre plus rapidement l'état d'équilibre. Enfin, l'intérêt de l'utilisation de posologies élevées (jusqu'à 1600 mg par jour) est en cours d'évaluation.

Découvert en 1986, l'itraconazole n'est administrable que par voie orale et peut être donné en une prise quotidienne. Néanmoins, des fortes posologies peuvent être nécessaires pour le traitement d'infections sévères qui doivent être données en deux prises journalières. Son absorption orale pouvant être erratique, son administration devra être concomitante des repas pour augmenter la biodisponibilité. Son absorption est diminuée chez les patients leucémiques ou sidéens, et les concentrations d'itraconazole sont négligeables dans le liquide céphalorachidien, l'humeur aqueuse et la salive.

De nombreuses interférences sont rapportées entre l'itraconazole et d'autres médicaments.

Sa tolérance est moins bonne que celle du fluconazole et de nombreuses interactions médicamenteuses ont été observées.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

V – Indications actuelles des antifongiques :

L'AmB est actuellement recommandé dans le traitement des blastomycoses sévères (notamment méningées), les coccidioidomycoses pulmonaires, méningées et disséminées, les paracoccidioidomycoses, les histoplasmoses sévères (notamment méningées ou endocarditiques), les fusarioses, les cryptococcoses méningées, les candidoses (incluant les candidémies, les candidoses disséminées, les endophtalmies, les endocardites, les péritonites et les infections du système nerveux central à *Candida*) et toutes les formes d'aspergillose invasive.

Les formulations liposomales d'AmB sont essentiellement recommandées dans le traitement des infections fongiques invasives (candidoses et aspergilloses) chez les patients chez qui la thérapeutique classique a échoué ou a entraîné des phénomènes toxiques (insuffisance rénale +++) ou chez les patients présentant une insuffisance rénale préexistante et persistante. Lorsqu'elles ont été utilisées en première intention, elles ont entraîné une moindre néphrotoxicité mais sans amélioration significative de l'efficacité.

Des études randomisées sont encore nécessaires pour comparer les différentes formulations liposomales actuellement disponibles et déterminer leur posologie optimale. Kétoconazole Itraconazole Fluconazole.

La 5-FC a été utilisée en association avec l'AmB dans le traitement des endophtalmies ou méningites candidosiques ou dans les cryptococcoses neuro-méningées. Son association avec les azolés est également synergique *in vitro* sur les levures, mais l'intérêt clinique de cette association reste à démontrer. Le développement de médicaments antifongiques plus efficaces et mieux tolérés diminuera très probablement son utilisation dans le futur.

Le kétoconazole a été très utilisé dans le traitement des candidoses, coccidioïdomycoses, paracoccidioïdomycoses, blastomycoses et histoplasmoses. La mise à disposition d'azolés plus récents a diminué son utilisation actuelle.

Le fluconazole est le traitement de choix des candidoses oropharyngées, oesophagiennes, urinaires et vaginales, notamment chez le patient sidéen. Il est également efficace dans le traitement des candidoses hépatospléniques, péritonéales et disséminées, y compris chez le neutropénique. Il est aussi efficace que l'AmB dans le traitement des candidémies du sujet non neutropénique. Le fluconazole a été utilisé avec succès dans le traitement des cryptococcoses pulmonaires, méningées et disséminées, notamment chez le sujet sidéen. Il est également le traitement prophylactique primaire et secondaire de choix des infections cryptococciques du sujet sidéen.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Enfin, il est utilisé dans la prophylaxie des infections fongiques du sujet neutropénique ou transplanté.

L'itraconazole est utilisé dans le traitement des blastomycoses, des histoplasmoses et des paracoccidioïdomycoses peu sévères et non méningés. Il est également indiqué dans le traitement préventif des rechutes d'histoplasmosse disséminée du sujet sidéen.

L'itraconazole est également modérément actif sur les aspergilloses et peut-être utilisé comme traitement relai de l'AmB IV dans les aspergilloses invasives, les candidoses, les coccidioïdomycoses et les paracoccidioïdomycoses. Il est moins actif que le fluconazole dans le traitement préventif ou curatif des cryptococcoses.

Les données actuelles (essentiellement *in vitro* ou animales) montrent que les associations 5-FC et AmB sont le plus souvent synergiques, parfois indifférentes, mais jamais antagonistes. En revanche, les associations AmB et azolés ne sont jamais synergiques quelle que soit la molécule utilisée, mais le plus souvent indifférentes avec l'itraconazole et surtout le fluconazole, voire antagoniste avec le kétoconazole.

Ici aussi, les manques de données cliniques ne permettent pas d'élaborer des recommandations définitives sur les indications et le choix des associations d'antifongiques.

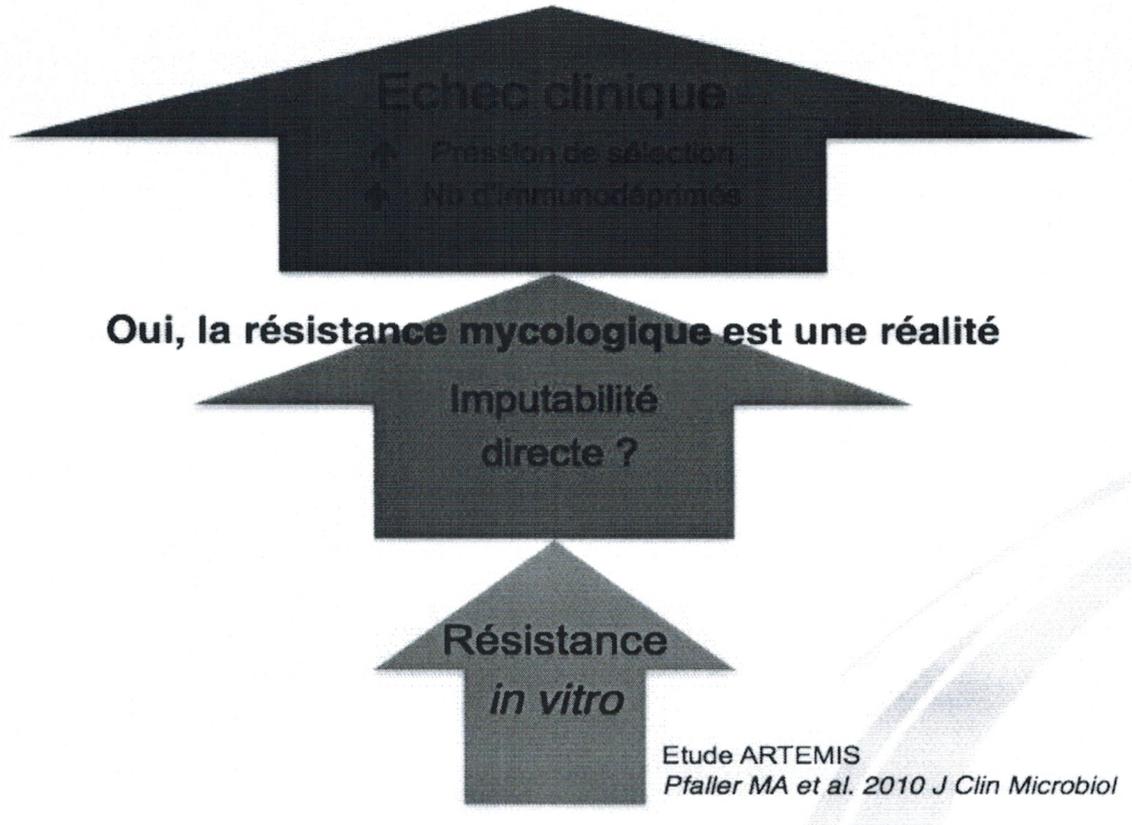
VI – Molécules en cours de développement :

De nouveaux polyènes, de nouveaux azolés (comme le véroconazole, dont les paramètres cinétiques sont proches du fluconazole, et dont l'efficacité sur *Aspergillus* mime celle de l'itraconazole) et des nouvelles classes d'antifongique (échinocandines, pneumocandines, pradimicines, benanomicines, nikkomycines, allylamine, thiocarbamates, sordarines, peptides cationiques...) sont en cours d'évaluation. Même si plusieurs de ces molécules paraissent prometteuses, seules leurs utilisations à large échelle chez l'homme et leur comparaison au traitement de référence, l'AmB, permettront de mieux définir leur place future. En effet, de nombreuses molécules prometteuses ont vu leur développement stoppé devant l'apparition d'événements toxiques fréquents ou rares mais gravissimes.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

VII - Mécanismes de résistance aux Antifongiques :

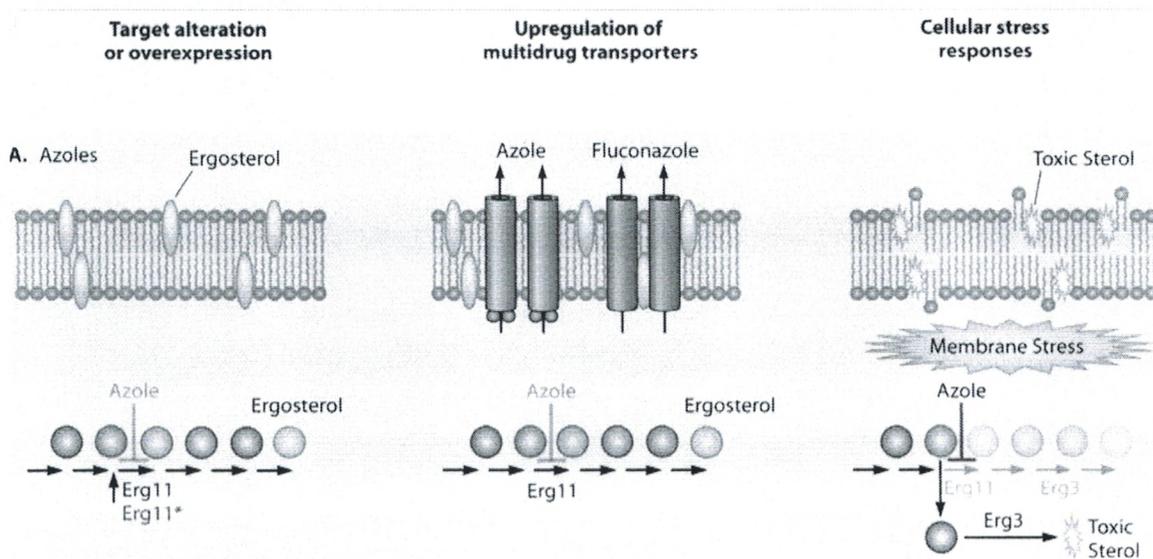
Infections fongiques invasives réfractaires ?



VII.1 – Résistance de *Candida albicans* :

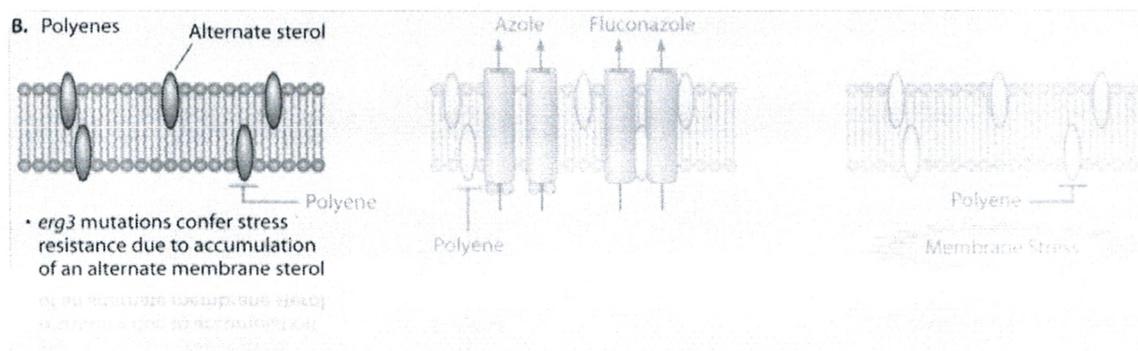
CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

VII.1 - Résistance de *C. albicans* aux azolés



C. albicans can acquire resistance to the azoles through multiple mechanisms, including the upregulation or alteration of the drug target Erg11; the upregulation of the multidrug transporter Cdr1, Cdr2, or Mdr1 (fluconazole specific); or the induction of numerous cellular stress responses.

VII.2-Résistance de *C. albicans* aux polyènes

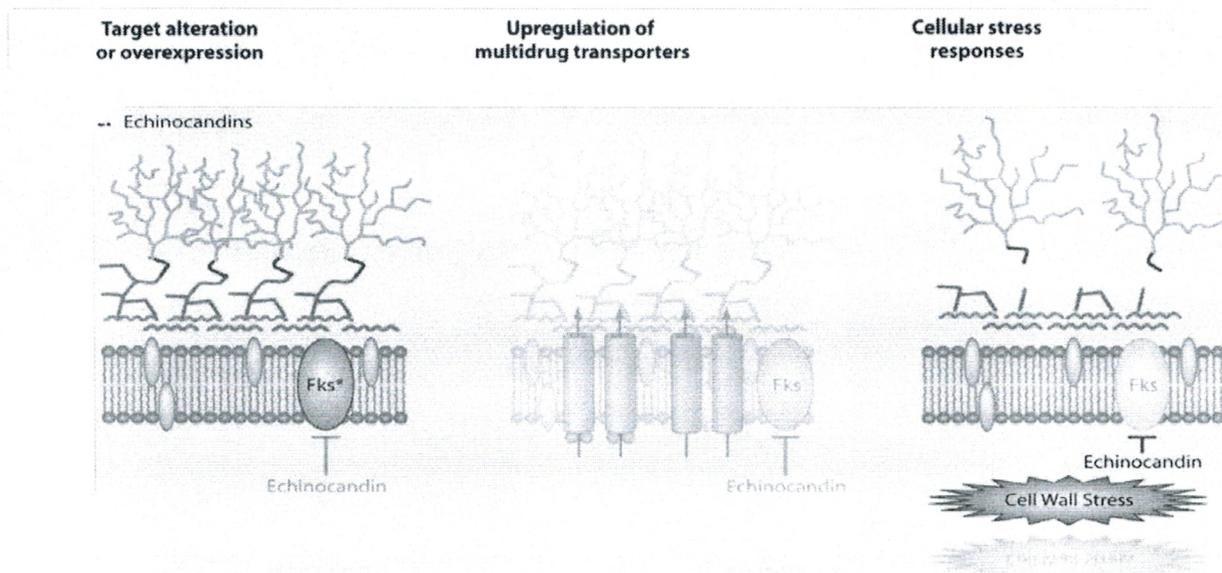


Although resistance to the polyenes is rare in *C. albicans*, resistance is acquired **through loss-of-function mutations in ERG3**, which block the production of ergosterol, **inhibit the formation of the drug-lipid complex**, and therefore prevent osmotic cellular lysis.

The alteration of the drug transporters does not play a major role in polyene resistance, and cellular stress responses have not been implicated as major determinants of resistance.

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

VII.3 - Résistance de *C. albicans* aux échinocandins



Resistance to the echinocandins through mutations in two distinct hot-spot regions in FKS1, encoding the catalytic subunit of

(1,3)-B-D-glucan synthase, has been widely found in *C. albicans* isolates. The upregulation of drug transporters does not play a major role in resistance; however, the induction of cellular stress responses is important for echinocandin resistance.

VIII – Conclusion :

Polyènes

Avantages : fongicidie, spectre large

Inconvénients: maniabilité, IV strict, effets secondaires, prix des formulations lipidiques.

Azols:

Avantages: PO/IV, bonne couverture de spectre, bonne diffusion tissulaire

Inconvénients: interactions médicamenteuses/métabolisation inter-individuelle = dosages = ajustement de dose, large utilisation = émergence résistance.

Echinocandines:

Avantages: relative innocuité, bon spectre

Inconvénients: IV strict, prix

Flucytosine

CHAPITRE 3 : TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Avantages: activité anti-*Candida*, synergie avec azolés et échinocandines, très bonne diffusion tissulaire, peu cher

Inconvénients: spectre étroit, proscription monothérapie, hématotoxicité = dosage = ajustement de dose.

CHAPITRE 1 : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

I.1. Introduction

Les résultats du diagnostic biologique font partie du faisceau d'arguments recueillis par le clinicien pour :

- confirmer une mycose (sinon, réorienter le diagnostic) ;
- identifier l' (ou les) agent(s) fongique(s) incriminé(s) et adapter au mieux la thérapeutique
- comprendre la pathogénie de la mycose et amoindrir (voire supprimer) les facteurs favorisant son développement.

La démarche mise en œuvre par le laboratoire est influencée par : - les facteurs épidémiologiques inhérents au patient ; - le « terrain » immunitaire sous-jacent ; - la symptomatologie clinique ; - les données fournies par l'imagerie et la biologie médicales.

D'une manière générale, le diagnostic biologique d'une mycose repose sur :

- la révélation d'une éventuelle fluorescence sous rayonnement ultra-violet de certaines lésions fongiques cutané-phanériennes ;
- la mise en évidence du (ou des) Champignon(s) à l'état parasitaire par examen direct du produit biologique prélevé et l'isolement et l'identification de ce(s) Champignon(s) par cultures (« diagnostic mycologique ») ;
- en cas de suspicion de mycose profonde, la recherche d'anticorps spécifiques éventuellement élaborés par les défenses humorales et/ou d'antigènes fongiques circulants prouvant le développement du Champignon chez le patient (« diagnostic immunologique »).

Encore non utilisée en routine actuellement, la biologie moléculaire (PCR) devrait prochainement contribuer de manière appréciable au diagnostic des mycoses profondes.

I.2. Recherche d'une fluorescence sous rayonnement ultra-violet ("lampe de Wood")

Les voies biochimiques utilisées par certaines espèces particulières de Champignons pour dégrader les molécules organiques constitutives de la peau et des phanères (notamment la kératine) aboutissent à la présence, dans les tissus colonisés, de substances spontanément fluorescentes sous un rayonnement ultra-violet d'une fréquence donnée. L'examen de ces lésions cutané-phanériennes ainsi éclairées à l'aide de la lampe de Wood peut révéler cette fluorescence, et donc fortement étayer le diagnostic positif de mycose. La teinte de la fluorescence oriente vers un type de Champignon (ou, éventuellement, vers un diagnostic différentiel non mycologique). L'étendue des zones cutanées fluorescentes permet un bilan d'extension de l'activité du Champignon et guide le geste de prélèvement en vue de l'examen

CHAPITRE 1 : DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

mycologique proprement dit. Toute-fois, l'absence de fluorescence nette n'infirmes en rien le diagnostic de mycose.

En pratique courante, cet examen para-clinique fait partie du diagnostic des **pityrospores** (= malassezioses) et de **certaines dermatophytoses** :

- * l'examen sous lampe de Wood des lésions hyperchromiques (plus rarement des lésions hypo- ou achromiques) du pityriasis versicolor met en évidence une fluorescence en plaques variant du jaune verdâtre au jaune orangé. Il révèle les atteintes invisibles à l'œil nu et permet un bilan d'extension à l'ensemble du tronc, des hanches, des cuisses, ... ;
- * cette même fluorescence jaunâtre : - en plaques sur le cuir chevelu est fortement en faveur d'un pityriasis capitis ; - ponctuelle au niveau des follicules pilo-sébacés oriente vers une pityrospore folliculaire ;
- * une fluorescence verte sous rayonnement ultra-violet des petits cheveux cassés courts est un argument majeur du diagnostic de certaines teignes tondantes microscopiques, notamment des teignes à *Microsporum canis* (également à *M. audouini langeroni*) et, plus accessoirement en Europe, du favus à *Trichophyton schoenleini*. Ce sont, bien entendu, ces petits cheveux fluorescents qui seront prélevés en priorité en vue de l'examen mycologique.

I. Diagnostic mycologique

Le diagnostic mycologique a pour buts :

- de mettre en évidence le (ou les) Champignon(s) à l'état parasitaire (« **examen direct** ») dans les tissus, mucosités, liquides biologiques, etc. ... prélevés correctement et en quantité suffisante chez le patient (« **prélèvements** »):
- d'isoler et d'identifier le (ou les) Champignon(s) impliqué(s) (« **cultures** »)
- occasionnellement, d'évaluer la sensibilité *in vitro* du Champignon à divers antifongiques (« **Antifongigramme** »).

I.1. Prélèvements

De l'efficacité du geste de prélèvement et de la quantité du matériel biologique prélevé dépend le succès des étapes ultérieures du diagnostic mycologique. Les prélèvements doivent être effectués avant tout traitement antifongique par voie générale ou en application locale.

Les précautions d'usage de stérilité visent, entre autres, à éviter la contamination du matériel biologique par les Bactéries, mais également par des Levures ou des Champignons filamenteux présents dans le milieu extérieur ou à l'état saprobiontique chez le patient : conditions optimales d'asepsie, stérilité du matériel de prélèvement et de recueil ...

Le matériel stérile utilisé pour le prélèvement est fonction du type et de la localisation de la lésion et du produit biologique à recueillir : écouvillon humidifié au moyen d'un peu de liquide physiologique stérile, curette de Broc fenêtrée, scalpel mousse (c'est à dire non aiguisé) ou vaccinostyle, pinces à épiler, ciseaux fins, pinces et ciseaux à ongles, bistouri d'Harouet (ou Punch-biopsy®), ... Certains prélèvements nécessitent des matériels particuliers au lit du malade (recueil de sang, ponction lombaire, ...), en local médico-technique (lavage bronchio-alvéolaire, ponctions, ...), en bloc opératoire ou en salle de nécropsie (biopsies, excrèses, ...).

Les produits biologiques prélevés sont :

- les mucosités (écouvillonnage de muqueuses);
- le suintement des intertrigos, le pus des péri-onyxis (écouvillonnage);
- les squames (scalpel mousse, curette de Brocq);
- les fragments d'ongles et la matière sous-unguéale (scalpel mousse, curette de Brocq);
- les cheveux, poils et duvets (pinces à épiler);
- les selles;
- les urines;

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

- le liquide de lavage bronchio-alvéolaire, les produits d'aspiration bronchique (préférables aux expectorations);
- les fragments tissulaires (biopsies, pièces opératoires);
- le sang (sur flacon pour hémoculture, sur tube sec pour le diagnostic immunologique);
- les autres liquides biologiques (liquide céphalo-rachidien, bile, pus, ...);
- les cathéters, drains, sondes, matériels chirurgicaux divers (prothèses valvulaires, osseuses,...),

I.2. Conditionnement et transport

Le conditionnement et le transport de ces produits biologiques se font en récipients stériles (tubes, flacons, petites boîtes de Petri, ...) bien fermés, éventuellement après ajout de quelques gouttes de liquide physiologique stérile pour éviter la dessiccation. En particulier, les fragments de tissus ou d'organes destinés à l'examen mycologique doivent être conditionnés dans du liquide physiologique stérile, sans fixateur, totalement séparés de ceux, fixés, destinés à l'anato-mo-pathologiste.

Si, d'une manière générale, une conservation courte des produits biologiques est possible à 4° C (sauf flacon pour hémoculture : 37° C), la longue survie à sec et à température ambiante des Champignons dans les squames, cheveux et poils, fragments d'ongles et de matière sous-unguéale permet un envoi à distance sans risque de détérioration.

Le produit biologique ainsi prélevé sera ensuite partagé en deux parties sensiblement égales par le laboratoire pour effectuer en parallèle examen direct et culture.

I.3. Examen direct

Il s'agit, bien évidemment, de l'examen direct du matériel prélevé, et non de l'examen microscopique des produits de la culture ! Dans le langage courant, cette évidence est pourtant loin d'en être une pour tout le monde ... L'organisme humain est en permanence au contact des spores fongiques disséminées dans le milieu extérieur et héberge naturellement (tube digestif, peau, ...) des Champignons saprobiontes. A l'état normal, les défenses immunitaires générales et locales inhibent la prolifération de ces Champignons. L'affaiblissement de ces défenses laisse libre cours à la multiplication et au bourgeonnement (et souvent la filamentation) des Levures et à la germination, suivie de filamentation, des spores de Champignons fila-menteux. **La preuve formelle d'un état pathologique, corollaire de cette permissivité immunitaire, est apportée en quelques minutes par l'examen direct, technique indispensable pour mettre en évidence le Champignon sous cet**

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

« **État parasitaire** » (alors que l'éventuelle croissance en culture et l'identification d'un Champignon peuvent prendre plusieurs semaines). A elle seule, en effet, la positivité de cet examen direct permet d'impliquer un (ou plusieurs) Champignon(s) dans le processus pathologique, donc d'affirmer la mycose en révélant, par exemple, selon le « terrain » immunitaire sous-jacent et la symptomatologie clinique, la présence : de Levures bourgeonnantes du genre *Candida*, éventuellement accompagnées de mycélium, sur les muqueuses, dans les selles, les urines, le liquide de lavage bronchiol-alvéolaire ... ; d'arthrospores de *Geotrichum candidum* dans les selles ; de Levures capsulées (Cryptocoques) dans le liquide céphalo-rachidien ; de filaments de Dermato-phyte dans les squames, les fragments d'ongles ... ; de filaments d'*Aspergillus* spp. ou de « kystes » de *Pneumocystis jiroveci* dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire.

En cas de positivité de l'examen direct, le diagnostic de mycose sera bien évidemment maintenu, même si les cultures restent ultérieurement négatives ou sont souillées par d'autres spores « contaminantes » présentes sur ou dans le matériel biologique prélevé.

A contrario ; la croissance en culture, alors qu'un examen direct minutieux et approfondi est resté négatif, de colonies de Champignons dont les spores sont connues pour être présentes en grand nombre à l'état normal dans le milieu extérieur et/ou hébergées naturellement par le patient, ne permet pas, à elle seule, d'affirmer la mycose.

Un examen microscopique minutieux de la morphologie des éléments fongiques dans les produits biologiques permet de préciser le(s) type(s) de Champignon(s) impliqué(s). Il oriente ainsi son (leur) identification ultérieure par cultures. De plus, la constatation de la coexistence de plusieurs types de mycélium permet la détection de fréquentes associations. Plusieurs modalités d'examen direct peuvent être mises en œuvre :

I .3.1 Examen direct à « frais »

L'examen direct « à frais » (Tableau I) se pratique directement sur le produit biologique, sans fixation ni coloration spécifique. Il est facilité par l'utilisation d'éclaircissants (p. ex. : lactophénol d'Amann). Sont ainsi examinés : les appositions sur lame d'écouvillons, les selles, les urines et divers liquides biologiques. L'examen direct « à frais » du liquide céphalo-rachidien est optimisé par l'ajout de quelques gouttes d'encre de Chine, cette technique « par contraste » (ce n'est pas une coloration !) permettant de mettre plus facilement en évidence les

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

éventuelles capsules des Cryptocoques qui refoulent les grains noirs de suie contenus dans l'encre.

Tableau I. - Examen direct « à frais »

Mucosités , pus , bile , divers liquides biologiques ...	levures bourgeonnantes, (+/- mycélium) de <i>Candida spp</i>
Selles	levures bourgeonnantes, (+/- mycélium) de <i>Candida spp</i> arthrospores de <i>Geotrichum candidum</i>
Cheveux , poiles , duvets	Filaments intra-pilaires et spores de dermatophytes Spores de malassezia furfur intra-foliculaires
Liquide céphalo-rachidien (+encre de chine)	Cryptocoques capsulés levures bourgeonnantes (+/- mycélium) de <i>Candida spp</i> .

I .3.2. Examen direct après coloration

Les deux principales colorations utilisées en Mycologie (après fixation par 50% alcool - 50% éther) sont des « colorations après oxydation » : La coloration en rose « fuchsia » foncé selon la technique de Hotchkiss-MacManus (HMM) (Tableau II) est adaptée de la coloration P.A.S. (acide périodique, réactif de Schiff) des histo-pathologistes. Elle est particulièrement indiquée pour mettre en évidence les Levures (blastospores et filaments) et les filaments des Dermatophytes et de certains Champignons opportunistes (*Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium spp.*). L'imprégnation argentique de Gomori-Grocott ou Gomori-méthénamine-argent (GMA ou GMS) (Tableau III) colore en brun-noir la paroi des filaments d'*Aspergillus*, de *Fusarium*, de *Penicillium*, des Mucorales, ... ainsi que celle des « kystes » de *Pneumocystis jiroveci*.

I.4. Cultures

Le but des cultures est le développement et l'isolement de colonies qui, une fois dénombrées (notamment dans le cas des Levures), permettront l'identification du (ou des) Champignon(s) impliqué(s). Le résultat de cette identification doit être corrélé à l'image observée à l'examen direct. Autrement dit, le(s) Champignon(s) qui « pousse(nt) » doivent être celui (ceux) attendu(s) d'après le résultat de l'examen direct.

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

Tableau II Examen direct après coloration selon la technique de Hotchkiss-MacManus (HMM)

squames	levures bourgeonnantes (+/-mycélium) de <i>Candida</i> spp. spores et filaments de <i>Malassezia furfur</i> filaments de Dermatophytes
fragments d'ongle et matière sous-unguéale	levures bourgeonnantes (+/-mycélium) de <i>Candida</i> spp. filaments de Dermatophytes filaments de Champignons opportunistes
produits biologiques d'origine respiratoire (contenu de sinus, liquide de lavage bronchio-alvéolaire, produit d'aspiration bronchique, expectorations.) fragments tissulaires (biopsies, pièces opératoires ou nécrosiques, ...)	levures bourgeonnantes (+/-mycélium) de <i>Candida</i> spp. ...

Tableau III. - Examen direct après imprégnation argentique de Gomori-Grocott

produits biologiques d'origine respiratoire (contenu de sinus, liquide de lavage bronchio-alvéolaire, produit d'aspiration bronchique, expectorations,	filaments d' <i>Aspergillus</i> spp, de <i>Fusarium</i> spp. de Mucorales ... « kystes » de <i>Pneumocystis jiroveci</i> ...
fragments tissulaires (biopsies, pièces opératoires ou nécrosiques, ...)	filaments d' <i>Aspergillus</i> spp, de <i>Fusarium</i> spp., de Mucorales ...

I.4.1. Isolement

L'isolement se fait par ensemencements pratiqués de façon stérile (près d'un bec Bunsen), classiquement sur tubes de gélose glucosée (2 %) de Sabouraud, contenant des antibiotiques antibactériens et des vitamines (en ayant soin de conserver une quantité suffisante de matériel biologique pour l'examen direct s'il n'a pas encore été effectué). L'adjonction de cycloheximide (Actidione®) dans une partie des milieux permet d'inhiber la croissance d'éventuels Champignons contaminants (mais, attention ! il inhibe également celle de

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

certaines Champignons impliqués en pathologie humaine : *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, ...) et d'utiliser la résistance ou la sensibilité du Champignon à ce produit comme critère d'identification.

Les exigences métaboliques (besoins en oxygène, ...) de nombreux Champignons impliqués en pathologie respiratoire et cutanéophanérianne nécessitent toutefois l'utilisation de géloses de culture conditionnées : - en grands tubes contenant au moins 20 ml de milieu refroidi incliné, de façon à ce que la pente soit la plus longue possible, s'arrêtant à 3 cm du bouchon, pour une aération maximale, le bouchon étant vissé à fond; - en boîtes de Petri de 9 cm de diamètre, contenant 30 ml de milieu pour optimiser la place disponible pour les colonies fongiques.

Les milieux ainsiensemencés sont conservés au moins une semaine à 27° C et à 37° C (cette dernière température est indispensable pour les produits biologiques d'origine profonde). En cas de positivité, le développement :

- en deux à quatre jours (parfois davantage, notamment quand le patient est déjà traité par antifongiques), de colonies blanchâtres, crémeuses, épaisses, luisantes suggèrera une (ou des) Levure(s), notamment du genre *Candida*. Les colonies sont dénombrées, habituellement de façon semi-quantitative (de « rares » à « très nombreuses »).
- en trois à huit jours, de colonies en nappe de consistance et de teinte variables (bleutée, verte, ocre, rose, blanche, ...) orientera vers les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, et autres Champignons filamenteux, ...
- en une à trois semaines, parfois plus, de colonies dont la forme, la consistance et la couleur, variables, seront des critères macroscopiques d'identification des Dermatophytes.

Ces délais de croissance, véritables critères d'identification des Champignons, conditionnent, bien entendu, le délai de réponse définitive de la part du Laboratoire.

Par ailleurs, la négativité des cultures (souvent du fait de prises antérieures d'antifongiques) n'infirmes bien évidemment pas le diagnostic (en particulier quand l'examen direct est positif) et n'a aucune valeur de guérison d'une mycose précédemment prouvée tant que l'examen direct reste positif.

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

I.4.2. Identification

L'identification des espèces de Levures ou de Champignons filamenteux permet d'adapter la thérapeutique et, souvent, de préciser le mode de contamination. Elle se fait sur des caractères morphologiques (macro- et microscopiques) et/ou physiologiques (vitesse de croissance, besoins vitaminiques, utilisation et fermentation des sucres, ...).

☐ *Identification des Levures.* La phase d'identification des Levures, notamment de celles du genre *Candida*, doit, désormais, impérativement tenir compte de l'éventualité de l'association de deux, trois, voire quatre espèces ou plus dans un même échantillon biologique (ces associations sont liées à la fois à l'augmentation constante du nombre de patients atteints de pathologies et/ou soumis à des traitements déterminant la prolifération des Levures, et à la prescription au long cours d'antifongiques favorisant des Levures naturellement peu sensibles à ces molécules, par exemple *Candida glabrata*, *C. krusei* ...). Classiquement, la détection de ces associations passe par un repiquage sur milieu de Sabouraud contenant du triphényl-2,3,5-tétrazolium, substance que chaque espèce est plus ou moins apte à réduire en fournissant un composé coloré. Les colonies prenant des teintes différentes (du blanc au rouge violacé) doivent être considérées comme autant de souches d'espèces différentes, qui seront repiquées et identifiées séparément. Récemment, la détection de ces associations a pu bénéficier de la mise au point de milieux contenant des chromogènes, teintant plus ou moins les colonies de couleurs particulières à certaines souches, sans pour autant permettre leur identification spécifique précise.

L'identification de *Candida albicans* passe par la révélation d'au moins un des deux caractères suivants : formation de chlamydospores caractéristiques, 24 à 48 heures après repiquage en stries profondes (anaérobiose) sur des milieux pauvres en sucres et tensio-actifs (PCB = Pomme de terre - Carotte - Bile; RAT = Rice - Agar - Tween); fi-lamentation en sérum (= blastèse) à 37° C en quatre heures au maximum.

L'identification spécifique des autres espèces de *Candida* nécessite l'étude de certaines propriétés physiologiques de la Levure, en particulier son aptitude (actuellement évaluée en « galeries » commercialisées) à assimiler divers sucres (« auxanogramme ») et à les fermenter (« zymogramme »). L'identification spécifique par agglutination de particules inertes sensibilisées par des anticorps monoclonaux est en cours d'évaluation.

Outre par sa mise en évidence à l'état parasitaire par l'examen direct, il est important d'évaluer l'implication réelle dans la pathologie d'une Levure isolée d'un échantillon biologique par le nombre de colonies développées en culture, par sa croissance ou non à

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

37° C (candidoses profondes) et par son isolement à plusieurs reprises dans le même type de matériel biologique.

Cette phase d'isolement et d'identification de la (des) Levure(s) dure au minimum 3 jours et peut demander une semaine.

Identification des Champignons filamenteux. Le milieu glucosé d'isolement de Sabouraud favorise la croissance du mycélium des Champignons filamenteux, mais non leur sporulation. Or, en pratique, la morphologie microscopique des organes de reproduction asexuée est le critère majeur d'identification spécifique de ces Champignons. Il est donc nécessaire de repiquer les colonies sur des milieux d'identification non glucosés qui stimuleront la fructification des organes sporigènes (p. ex. « têtes » aspergillaires) et des spores (p. ex. micro- et macroconidies des Dermatophytes). Les principaux critères d'identification des Champignons filamenteux sont : - le délai d'apparition des colonies et la vitesse de leur croissance ; - la thermotolérance du Champignon et son optimum thermique de croissance ; - les caractères macroscopiques des colonies : forme (plane, bombée, cérébriforme, ...), consistance (poudreuse, duveteuse, cotonneuse, dure, élastique, ...), couleur (recto et verso), ... ; - les caractères microscopiques : mycélium (diamètre, régularité, ramifications, arthrospores, chlamydoconidies, ...), organes sporigènes (conidiophores et vésicules, phialides, ...), spores (abondance, dimensions, morphologie, coloration, segmentation, ...), ornements du mycélium (nœuds, vrilles, chandeliers, ...).

1.5. Antifongigramme

Malgré le pouvoir protéolytique, toxique et d'envahissement tissulaire certain des Champignons impliqués dans les pathologies fongiques chez l'Homme, le principal facteur pathogénique des mycoses reste la perméabilité des défenses immunitaires locales et générales de l'hôte. Le but d'un traitement antifongique n'est pas, en fait, de « stériliser » le malade, mais d'inhiber suffisamment la croissance et la prolifération du Champignon pour permettre aux défenses cellulaires et humorales de « reprendre le dessus ». D'autre part, la corrélation entre « concentrations minimales inhibitrices » *in vitro* et action antifongique intra-tissulaire n'a pas encore été formellement établie à ce jour. L'utilité de l'« antifongigramme » pour le thérapeute est donc loin d'égaliser celle de l'« antibiogramme » couramment utilisé lors des traitements antibactériens. Toutefois, l'adaptation du traitement antifongique (molécule, dosage, voie d'administration) peut, dans certaines circonstances particulières, justifier une

CHAPITRE 2 : DIAGNOSTIQUE MYCOLOGIQUE

évaluation de la « sensibilité *in vitro* » du Champignon à certaines molécules (traitement prolongé d'une mycose profonde chez un insuffisant hépatique et/ou rénal, candidose œsophagienne du sidéen, ...).

En pratique en Europe, l'évaluation de la sensibilité d'une souche se fait classiquement en observant les dimensions des zones d'inhibition de la croissance du Champignon sur une gélose sur laquelle ont été disposés des disques imprégnés de différentes concentrations de divers antifongiques et/ou des bandelettes imprégnées, d'une extrémité à l'autre, de concentrations croissantes de ces molécules. Peut ainsi actuellement être évaluée en routine la sensibilité à : la 5-fluorocytosine, l'amphotéricine B, la caspo-fungine et certains imidazolés (fluconazole, itraconazole, voriconazole, et, depuis peu, posaconazole).

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

I. ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

I.1. INTRODUCTION ET OBJET DU TEST

La galerie ATB FUNGUS 3 permet de déterminer la sensibilité des *Candida* et *Cryptococcus* neoformans aux antifongiques en milieu semi-solide dans des conditions très proches de la technique de référence de microdilution (selon les recommandations de l'EUCAST (1, 6, 8) et du CLSI/NCCLS (2, 6)).

I.2. PRINCIPE

La galerie ATB FUNGUS 3 comporte 16 paires de cupules. La première paire, sans antifongique, sert de témoin de croissance. Les 15 suivantes contiennent 5 antifongiques à plusieurs concentrations permettant de déterminer des CMI et/ou des catégories cliniques.

La levure à tester est mise en suspension puis transférée dans le milieu de culture et inoculée dans la galerie.

Après incubation, la lecture de la croissance se fait soit visuellement, soit avec l'automate ATB ou *mini API*®.

Le résultat obtenu permet de fournir une CMI (Amphotéricine B [AMB], Fluconazole [FCA], Itraconazole [ITR], Voriconazole [VRC]) et/ou de catégoriser la souche Sensible, Intermédiaire ou Résistante (Flucytosine [5FC]).

I.3. PRESENTATION :

COMPOSITION

Galeries

La composition de la galerie ATB FUNGUS 3 est mentionnée dans le tableau « Contrôle de Qualité » de cette notice.

Milieu ATB F2 Medium

Yeast Nitrogen Base 6,7 g

Glucose 6,5 g

Asparagine 1,5 g

Phosphate disodique 2,5 g

Citrate trisodique 2,5 g

Nitrate de potassium 5,5 g

Agar 1,5 g

Eau déminéralisée 1000 ml

PH : 6,5 à 6,8

NOTE : selon les ampoules d'ATB F2 Medium, il est possible d'observer de légères variations de coloration du milieu. Ceci n'engendre pas de modifications des performances du produit.

REACTIFS ET MATERIEL NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS

Réactifs et instruments

- API NaCl 0.85 % Medium ou API Suspension Medium
- McFarland Standard ou DENSIMAT ou Densitomètre ATB
- Pipette Electronique ATB (consulter bioMérieux) ou Inoculateur ATB et Embouts (Réf 15 710)
- Automate ATB ou mini API avec logiciel

I.4. Matériel

- Pipette
- Protège-ampoule
- Portoir pour ampoules
- Boîtes hermétiques type Jarre «GENbox» (bioMérieux)
- Equipement général de laboratoire de bactériologie

I.5. PRECAUTIONS D'UTILISATION

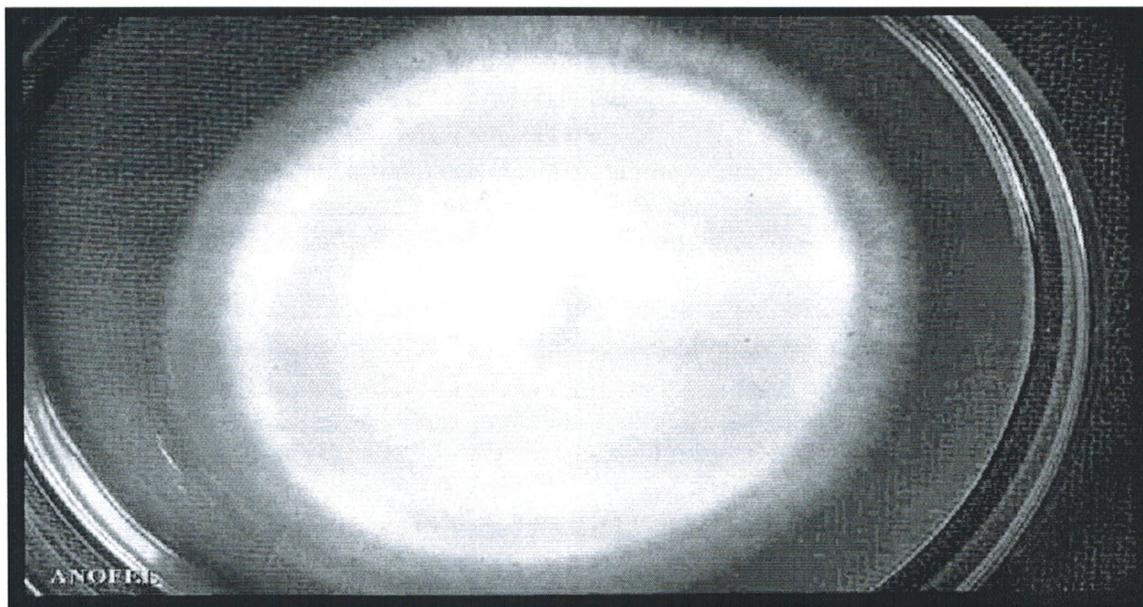
Les performances présentées sont obtenues avec la méthodologie indiquée dans cette notice. Toute déviation de méthodologie peut altérer les résultats.

L'interprétation et la validation des résultats de l'antifongigramme doivent être faites en tenant compte du contexte clinique, de l'origine du prélèvement, de l'identification de la souche, éventuellement des résultats de tests complémentaires et des recommandations locales en vigueur. L'interprétation et la validation sont facilitées par le système Expert ATB.

I.6. CONDITIONS DE STOCKAGE

Les galeries et milieux se conservent à 2-8°C à l'obscurité jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur le coffret.

ECHANTILLONS (PRELEVEMENT ET PREPARATION)



La galerie ATB FUNGUS 3 ne doit pas être utilisée directement à partir des prélèvements d'origine clinique ou autres.

Les microorganismes à tester doivent dans un premier temps être isolés sur un milieu de culture adapté selon les techniques usuelles de microbiologie. Les milieux d'isolement bioMérieux suivants peuvent être utilisés :

- Gélose Sabouraud 2,
- Gélose Sabouraud + 2 % Glucose [milieu recommandé par l'EUCAST (1, 8) et le CLSI/NCCLS (2)],
- Gélose Sabouraud Gentamicine-Chloramphénicol 2,
- Gélose CPS ID 3,
- Gélose Columbia + 5 % sang de mouton,

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

- Gélose Trypcase Soja + 5 % sang de cheval,
- Gélose Chocolat + PolyViteX,
- Gélose BCP,
- Gélose Candida ID 2.

I.7. MODE OPERATOIRE

Préparation de la galerie

Sortir la galerie de son emballage.

Noter l'identifiant de la levure à tester sur la languette latérale de la galerie.

Préparation de l'inoculum

Réalisation d'un E test (24-48h)

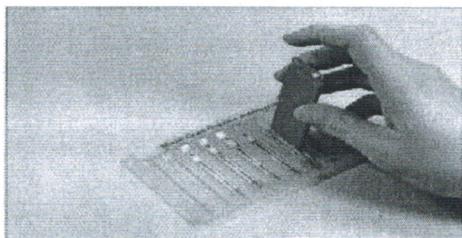
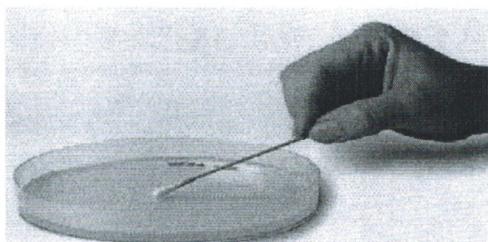


Figure 2.

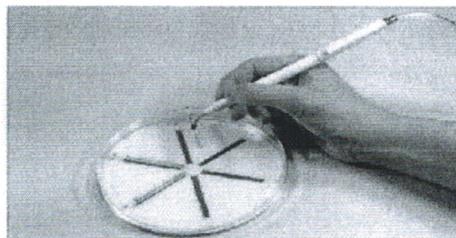
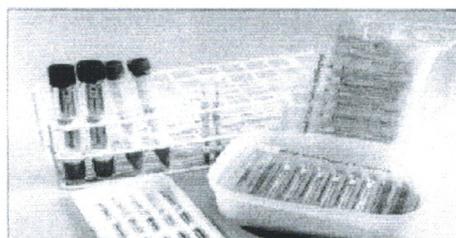


Figure 3.



Ouvrir une ampoule d'API® NaCl 0.85 % Medium (ou API Suspension Medium) comme indiqué au paragraphe "Précautions d'utilisation" de la notice du produit.

A l'aide d'une pipette, prélever plusieurs colonies dont l'âge n'excède pas 4 jours. Réaliser une suspension d'opacité équivalente à **l'étalon 2 de McFarland**.

Comparer au témoin d'opacité du kit McFarland Standard ou utiliser le Densitomètre ATB ou le DENSIMAT (se reporter au manuel d'utilisation).

Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

NOTE : il est recommandé de contrôler la pureté de l'inoculum et de réisoler dans le cas de cultures mixtes.

Transférer 20 µl de cette suspension dans ATB F2 Medium à l'aide d'une pipette.

Inoculation de la galerie

Inoculation MANUELLE :

- Homogénéiser ATB F2 Medium avec la Pipette Electronique ATB en évitant la formation de bulles.

- Inoculer la galerie en distribuant 135 µl d'ATB F2

Medium par cupule avec la Pipette Electronique ATB (environ 3x10⁴ levures/ml ou 4x10³ levures/cupule).

Inoculation AUTOMATIQUE :

Se reporter au manuel d'utilisation de l'inoculateur ATB.

Mettre un couvercle sur la galerie.

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

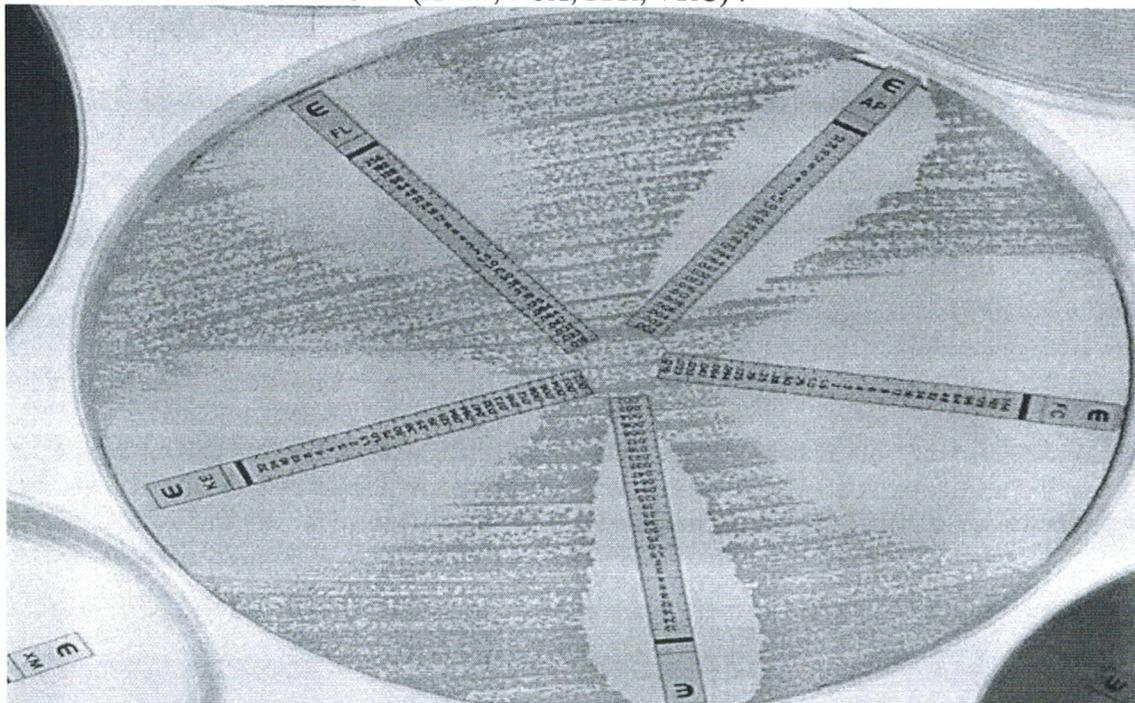
Placer la galerie dans une boîte hermétique ou en jarre type GENbox contenant du papier absorbant humide.

Incuber pendant 24 heures (± 2 heures) pour les Candida et 48 heures (± 6 heures) pour les Cryptococcus neoformans à 35°C (± 2 °C) en aérobiose.

LECTURE ET INTERPRETATION

Vérifier la présence d'une croissance suffisante dans les cupules témoins. Pour les Candida, en cas de croissance insuffisante rendant la lecture de la galerie difficile ou impossible après 24 heures d'incubation, réincuber 24 heures supplémentaires dans les mêmes conditions.

1. Détermination de la CMI (AMB, FCA, ITR, VRC) :



Rechercher et quantifier dans chaque cupule une croissance par lecture visuelle ou automatique par l'automate ATB ou mini API (se reporter aux manuels d'utilisation).

Avant de procéder à la lecture visuelle, il est recommandé de poser la galerie sur un fond noir (planche de lecture ATB FUNGUS 3 disponible auprès de bioMérieux). Pour chaque antifongique, partir de la concentration la plus faible et noter sur la fiche de résultats un score de croissance pour chacune des cupules comparativement aux cupules témoin :

Définition Score

Absence de réduction de croissance 4

Légère réduction de croissance 3

Réduction marquée de croissance 2

Très faible croissance 1

Absence de croissance 0

- Pour l'Amphotéricine B (AMB), la CMI correspond à la concentration la plus faible permettant d'obtenir une inhibition complète de la croissance (score 0).

Note : une (ou des) colonie(s) isolée(s) ou un aspect de croissance en périphérie de cupule doit être lu avec un score 1.

- Pour le Fluconazole (FCA), l'Itraconazole (ITR) et le Voriconazole (VRC), du fait de la possibilité d'un phénomène de croissance résiduelle, la CMI correspond à la concentration d'antifongiques la plus faible permettant d'obtenir un score 2, 1 ou 0.

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

Note : un aspect de croissance en périphérie d cupule doit être lu avec un score 0 ou 1.

2. Interprétation de la Flucytosine (5FC) : (voir tableau 1)

Rechercher et quantifier dans les deux cupules une croissance par lecture visuelle ou automatique par l'automate ATB ou mini API ® (se reporter aux manuels d'utilisation). Pour la Flucytosine testée à deux concentrations :

Tableau 1 :

Aspect des cupules		Résultats			La souche est :
c	C	c	C		
0/1/2	0/1/2	-	-	S	Sensible
3/4	0/1/2	+	-	I	Intermédiaire
3/4	3/4	+	+	R	Résistante

Notes :

- La définition des scores de croissance est la même que celle décrite ci-dessus pour la détermination des CMI.
- Un aspect de croissance en périphérie de cupule doit être lu avec un score 0 ou 1.

3. Concentrations critiques utilisées :

Concentrations critiques (mg/L) recommandées par le CLSI/NCCLS pour <i>Candida</i> spp			
	S	I	R
Flucytosine	≤ 4	8-16	≥ 32
Amphotéricine B*	ND	ND	ND
Fluconazole	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Itraconazole	≤ 0,125	0,25 - 0,5	≥ 1
Voriconazole	≤ 1	2	≥ 4

ND : Non formellement défini par le CLSI/NCCLS.

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

Notes :

- *Candida krusei* étant une espèce intrinsèquement résistante au Fluconazole, le test doit être interprété R systématiquement.

- *: pour l'Amphotéricine B, une CMI 2 mg/l suggère une résistance (2).

Données fournies à titre informatif (absence de recommandations officielles) :

Concentrations critiques (mg/L) recommandées par le CLSI/NCCLS pour <i>Candida</i> spp			
	S	I	R
Flucytosine	≤ 4	8-16	≥ 32
Amphotéricine B*	ND	ND	ND
Fluconazole	≤ 4	8	≥ 16
Itraconazole	ND	ND	ND
Voriconazole	ND	ND	ND

ND : Non Défini

() : Référence bibliographique

Note :

- *: pour l'Amphotéricine B, une CMI 2 mg/l suggère une résistance (les CMI habituellement obtenues pour *Cr. neoformans* sont 0,5 et 1 mg/l).

NOTES :

Lors de la lecture automatique de la galerie :

- vérifier la propreté de la partie centrale de la galerie, afin de permettre la reconnaissance du code de la galerie par le lecteur,

- vérifier la concordance entre l'intitulé imprimé sur la galerie et l'intitulé de la galerie proposé par le logiciel.

L'absence de croissance dans une (ou deux) cupule(s)- témoin invalide l'antifongigramme qui doit être recommencé.

Une galerie dont les cupules sont partiellement desséchées suite à l'incubation peut induire de faux résultats. L'antifongigramme doit être recommencé.

Pour l'Amphotéricine B (AMB), et en cas de lecture automatique, il est recommandé de contrôler visuellement l'absence de colonies isolées ou de croissance en périphérie de cupule (interpréter avec un score 1).

Pour le Fluconazole (FCA), l'Itraconazole (ITR) et le Voriconazole (VRC), la catégorisation Intermédiaire obtenue avec ATB FUNGUS 3 est assimilée à la catégorisation SDD (Sensibilité Dose Dépendante) définie par le CLSI/NCCLS (2).

CONTROLE DE QUALITE

Pour vérifier la standardisation de la méthode suivie, des contrôles de qualité avec les souches tests indiquées pour cette galerie doivent être réalisés (voir tableau Contrôle de Qualité en fin de notice).

Il est de la responsabilité de l'utilisateur de s'assurer que le contrôle de qualité est mis en œuvre conformément à la législation locale en vigueur.

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

LIMITES DU TEST

Un temps d'attente entre les diverses étapes de la manipulation (de la préparation de l'inoculum à l'incubation de la galerie) peut affecter les résultats.

Seules des cultures pures contenant un seul type de microorganisme doivent être utilisées. Des cultures mixtes ou contaminées peuvent affecter les résultats.

L'espèce *Candida haemulonii* ne doit pas être testée avec la galerie ATB FUNGUS 3 du fait d'une croissance variable entraînant une interprétation aléatoire des CMI aux antifongiques.

Les espèces *C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*, peuvent présenter un phénomène de croissance résiduelle (trailing growth) entraînant une surestimation des CMI des antifongiques azolés (Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole), plus particulièrement en cas de lecture automatisée de la galerie ATB FUNGUS 3. En conséquence, il est recommandé de vérifier visuellement les CMI des antifongiques azolés pour ces espèces, notamment dans le cas d'une résistance apparente au Voriconazole (du fait de la résistance très peu fréquente à cet antifongique).

Il est recommandé d'interpréter Intermédiaire (I) les souches de *C. glabrata* présentant un résultat Sensible (S) au Fluconazole et/ou à l'Itraconazole, du fait d'une moindre sensibilité naturelle de cette espèce vis-à-vis de ces antifongiques.

RESULTATS ATTENDUS

Les profils de résistance des tests antifongiques varient en fonction de la zone géographique, les résultats attendus sont donc directement dépendants de l'écologie microbienne locale (espèces / mécanismes de résistance).

PERFORMANCES

Les performances de la galerie ATB FUNGUS 3 ont été déterminées en utilisant trois souchiers comprenant les espèces de levures suivantes :

- *Candida albicans*
- *Candida dubliniensis*
- *Candida famata*
- *Candida glabrata*
- *Candida guilliermondii*
- *Candida kefyr*
- *Candida krusei*
- *Candida lusitaniae*
- *Candida norvegensis*
- *Candida parapsilosis*
- *Candida tropicalis*
- *Cryptococcus neoformans*

Le premier souchier a permis d'établir le taux d'exactitude des CMI ou de concordance en catégorie (5FC) pour chaque antifongique. Les CMI de référence ont été déterminées selon les recommandations CLSI/NCCLS (2) et EUCAST (1), sauf pour l'Amphotéricine B et sauf pour *Cryptococcus neoformans* qui ne disposent pas de recommandations EUCAST.

Il y a exactitude lorsque les CMI obtenues avec ATB FUNGUS 3 sont identiques, à ± 2 dilutions près, à celles déterminées par la méthode de référence.

Le second souchier a permis de vérifier l'expression des mécanismes de résistance. Un mécanisme de résistance est exprimé lorsque les résultats de CMI ou de catégorisation des antifongiques marqueurs sont compatibles avec le profil attendu.

Le troisième souchier a permis d'établir la reproductibilité de la galerie ATB FUNGUS 3. Un résultat est dit reproductible si les 3 résultats de CMI déterminés de manière indépendante sont identiques à ± 1 dilution près.

Exactitude

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

Le taux d'exactitude de la galerie ATB FUNGUS 3 obtenu à partir de 120 souches est de 97,5 % pour la lecture

visuelle et de 91 % pour la lecture automatique et la méthode CLSI/NCCLS. Il est de 94,3 % pour la lecture

visuelle et de 88,3 % pour la lecture automatique et la méthode EUCAST.

Le taux d'exactitude en CMI (%) pour FCA, ITR, AMB et VRC et le taux de concordance en catégorie (%) pour 5FC sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

	5FC	FCA	ITR	AMB	VRC
Lecture visuelle (CLSI/NCCLS)	95	96	97	100	97
Lecture automatique (CLSI/NCCLS)	93	86	89	100	89
Lecture visuelle (EUCAST)	89	94	92	NA	97
Lecture automatique (EUCAST)	89	85	92	NA	88

NA : absence de recommandations EUCAST

Expression des mécanismes de résistance

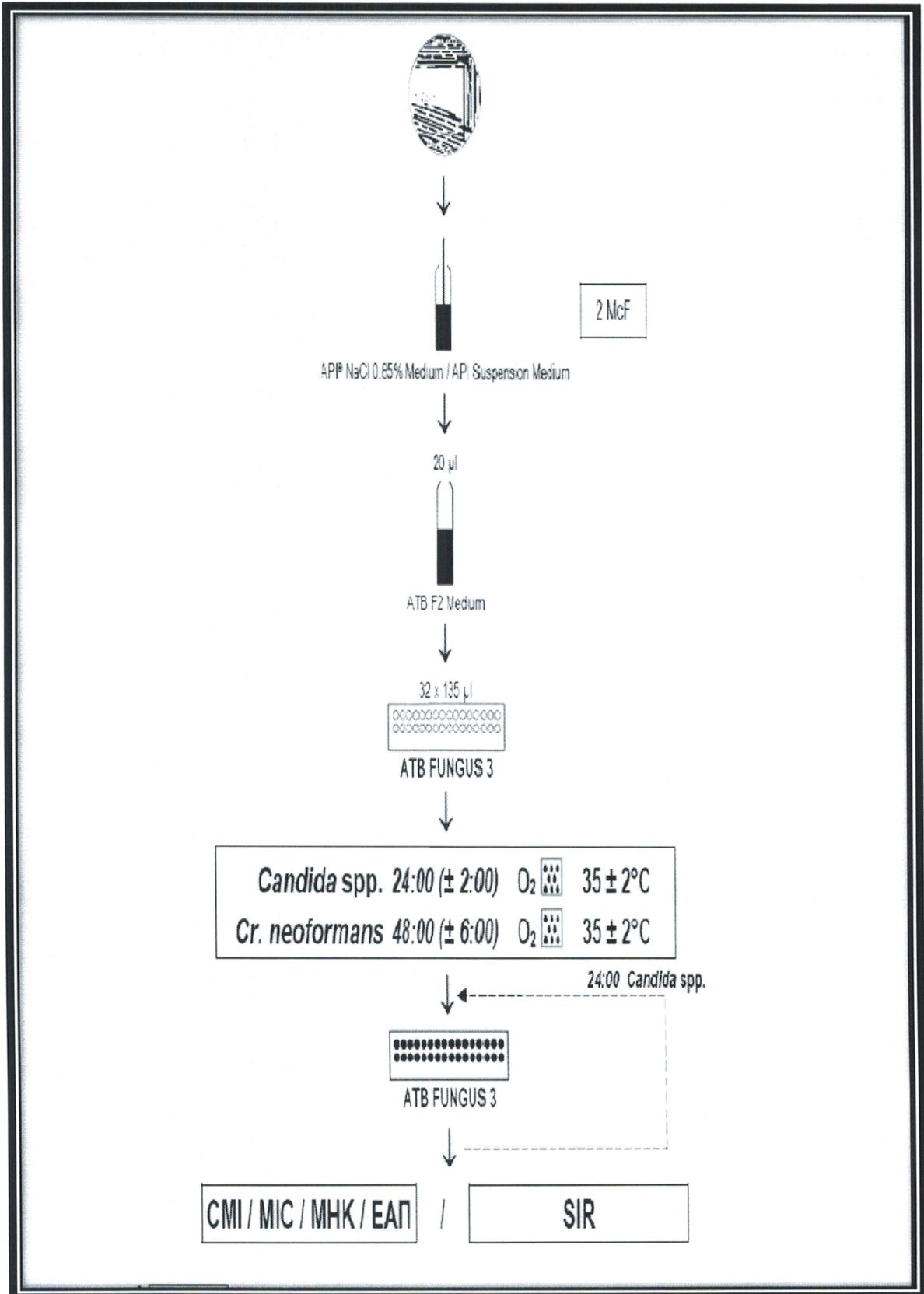
L'étude, portant sur 20 souches, a permis de vérifier que les principaux mécanismes de résistance aux antifongiques azolés s'expriment avec la galerie ATB FUNGUS 3 avec les 2 modes de lecture.

Reproductibilité

Le taux de reproductibilité global de la galerie ATB FUNGUS 3 est de 98,4 % pour la lecture visuelle et de 99 % pour la lecture automatique (établi avec 29 souches).

I.8. METHODOLOGIE E FICHE DE RESULTAT

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES



ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

ATB FUNGUS 3

REF 14 204

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem /
Προέλευση / Källa / Pochodzenie

	c	0 / 1 / 2 / 3 / 4	C	CMI/MIC/MHK (mg/l)	S/I/R
	0		0		
5 FC	4		16		
AMB	0.5		4		
AMB	1		8		
AMB	2		16		
FCA	1		16		
FCA	2		32		
FCA	4		64		
FCA	8		128		
ITR	0.125		1		
ITR	0.25		2		
ITR	0.5		4		
VRC	0.06		1		
VRC	0.125		2		
VRC	0.25		4		
VRC	0.5		8		

Note / Anmerkung / Nota / Σημείωση / Notering / Uwagi : _____

ANTIFONGIGRAMME POUR LES LEVURES

ATB FUNGUS 3

REF 14 204

Levures / Yeasts / Hefen / Levaduras / Lieviti / Leveduras / Ζύμες / Jästsvampar / Drożdżaki

Position Posición Posizione Posição Θέση Pozycja	Sigle Abbreviation Abkürzung Abbreziatura Abbreviazione Συνομογραφία Förkortning Skrót		Antifongique / Antifungal agent / Antimykotikum / Antifúngico / Antimicotico / Αντιμυκηθιασικός παράγοντας / Antimykotikum / Lek przeciwgrzybowy	mg/l		
00			TEMOIN / CONTROL / KONTROLLE / CONTROLLO / CONTROLO / ΕΛΕΓΧΟΣ / KONTROLL / KONTROLA	TEMOIN / CONTROL / KONTROLLE / CONTROLLO / CONTROLO / ΕΛΕΓΧΟΣ / KONTROLL / KONTROLA		
01	5FC	5FC	FLUCYTOSINE / FLUCYTOSIN / FLUCITOSINA / ΦΛΟΥΚΥΤΟΣΙΝΗ / FLUCITOSIN / FLUCYTOZYNA	FLUCYTOSINE / FLUCYTOSIN / FLUCITOSINA / ΦΛΟΥΚΥΤΟΣΙΝΗ / FLUCITOSIN / FLUCYTOZYNA	4	16
02	AMB	AMB	AMPHOTERICINE B / AMPHOTERICIN B / ANFOTERICINA B / ΑΜΦΟΤΕΡΙΚΙΝΗ Β / AMFOTERICIN B / AMFOTERYCYNA B	AMPHOTERICINE B / AMPHOTERICIN B / ANFOTERICINA B / ΑΜΦΟΤΕΡΙΚΙΝΗ Β / AMFOTERICIN B / AMFOTERYCYNA B	0.5	4
03					1	8
04					2	16
05	FCA	FCA	FLUCONAZOLE / FLUCONAZOL / FLUCONAZOLO / ΦΛΟΥΚΟΝΑΖΟΛΗ / FLUKONAZOL	FLUCONAZOLE / FLUCONAZOL / FLUCONAZOLO / ΦΛΟΥΚΟΝΑΖΟΛΗ / FLUKONAZOL	1	16
06					2	32
07					4	64
08					8	128
09	ITR	ITR	ITRACONAZOLE / ITRACONAZOL / ITRACONAZOLO / ΙΤΡΑΚΟΝΑΖΟΛΗ / ITRAKONAZOL	ITRACONAZOLE / ITRACONAZOL / ITRACONAZOLO / ΙΤΡΑΚΟΝΑΖΟΛΗ / ITRAKONAZOL	0.125	1
A					0.25	2
B					0.5	4
C	VRC	VRC	VORICONAZOLE / VORICONAZOL / VORICONAZOLO / VORIKONAZOΛΗ / VORIKONAZOL / WORIKONAZOL	VORICONAZOLE / VORICONAZOL / VORICONAZOLO / VORIKONAZOΛΗ / VORIKONAZOL / WORIKONAZOL	0.06	1
D					0.125	2
E					0.25	4
F					0.5	8

IV. Diagnostic immunologique

Complément du diagnostic mycologique, le diagnostic immunologique ne concerne que les mycoses profondes. Il repose sur l'éventuelle mise en évidence, d'une part des anticorps circulants, d'autre part des antigènes circulants.

IV.1. Recherche des anticorps circulants

La présence d'anticorps circulants dans le sang permet une première approche du diagnostic de mycose profonde chez les sujets dont les défenses immunitaires ont été assez permissives pour laisser un Champignon proliférer. En Europe, la recherche des anticorps circulants est utilisée pour le diagnostic des candidoses et des aspergilloses, mais n'est actuellement d'aucune utilité dans celui de cryptococcose et de pneumocystose. Tout individu héberge naturellement des Levures du genre *Candida* et inhale en permanence des spores d'*Aspergillus*, et synthétise donc des anticorps spécifiques. Lors de l'interprétation du résultat de l'analyse immunologique, il est donc indispensable de tenir compte, pour chaque technique, d'un seuil de positivité.

Il est également impératif d'interpréter les résultats de cette recherche d'anticorps en fonction du contexte immunitaire. Ainsi, un résultat négatif n'infirmes pas le diagnostic de mycose, celle-ci pouvant survenir sur un terrain immunodéprimé incapable de répondre à la sollicitation antigénique. De même, une augmentation significative des taux entre deux analyses successives (15 à 20 jours d'intervalle) fait partie du faisceau d'arguments permettant de confirmer le diagnostic de mycose profonde. Lors du suivi du patient, une variation (en plus ou en moins) des taux permet également de juger de l'évolution de l'état des défenses immunitaires du patient.

Les techniques le plus souvent utilisées pour la recherche d'anticorps antifongiques sont : les réactions d'hémagglutination, d'immunofluorescence indirecte et les réactions immuno-enzymatiques de type ELISA, et de précipitation (immunoélectrophorèse, électrosynérèse).

IV.2. Recherche des antigènes circulants

La mise en évidence des antigènes circulants s'effectue soit par agglutination de particules inertes revêtues d'anticorps mono- ou polyclonaux anti-mannanes, soit par des techniques de type ELISA, beaucoup plus sensibles. Ces réactions sont utilisées principalement sur le sérum sanguin (et dans le liquide céphalo-rachidien pour le diagnostic de cryptococcose).

Ces tests de détection d'antigènes circulants sont spécifiques. Utilisés avec succès pour le diagnostic des cryptococcoses et des aspergilloses, où ils représentent la seule possibilité de diagnostic immunologique chez les malades en état d'immunodépression profonde, ils donnent des résultats moins probants dans le diagnostic des candidoses, en partie, du fait de la présence de *Candida* à l'état normal dans le tube digestif de l'Homme, donc de métabolites de ces Levures dans le sang. Ils ne sont pas non plus utilisables pour le diagnostic de pneumocystose.

CONCLUSION

Au cours de ces vingt dernières années, il a été observé une très nette augmentation du nombre d'infections nosocomiales dues aux champignons pathogènes, notamment aux levures du genre *Candida* responsables chez l'homme de candidoses. Si *Candida albicans* reste le principal agent responsable des candidoses (50 à 70 % des infections), on constate l'émergence d'espèces non-*albicans* qui sont souvent plus réfractaires aux traitements classiques, telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. lusitanae*.

Ces pathologies sont en forte recrudescence, en raison de trois principaux facteurs :

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

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

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

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

Dans ce contexte, cette formation a pour but de familiariser les biologistes avec quelques techniques commerciales employées en milieu hospitalier et en laboratoire d'analyses pour déterminer la sensibilité des levures du genre *Candida* aux antifongiques. Cette formation permettra de comparer ces différentes techniques en termes de rapidité de mise en œuvre, de fiabilité et de reproductibilité des résultats, de facilité d'interprétation dans le contexte thérapeutique actuel et de coût de revient.

LISTE DE BIBLIOGRAPHIE

- ✓ **Diagnostic des mycoses superficielles** 2008 Pr Ag Anane Sonia Faculté de Médecine de Tunis.
- ✓ **Utilisation des antifongiques** 2007 N Milpied Service des maladies du sang CHU Bordeaux.
 - ✓ **Les Antifongiques** 2009 Pr Agregé Samir BENYOUCEF.
- ✓ **Mycologie médicale Intérêt et limites des méthodes de diagnostic** 2007 Marie France Biava M.C.U. - P.H. C.H.U. – Nancy Service de Parasitologie et Mycologie.
- ✓ **Epidémiologie des mycoses profondes** 2006 Claire Lacroix Mycologie – Hôpital Saint-Louis.
- ✓ **Identification des champignons d'importance médicale** 2012 Guy St Germain.
- ✓ **Les candidoses vaginales récidivantes à Candida albicans-2001** Thèse de Vanessa CARDINALE. Univ de Nancy.
 - ✓ **Les mycoses vaginales récidivantes.** 2007 S.Ronger Savlé / Dr Julien.
- ✓ **Modes d'action des antifongiques (ATFs) Nouveaux antifongiques.** 2008 Florence Ader.
- ✓ **Prévalence des mycoses chez les sujets vivant avec le VIH.** 2001 Magatte Niang Univ Cheikh anta Diop de Dakar.
- ✓ **Prise en charge des mycoses superficielles.** 2004 Pr O Chosidow Univ Paris 6 Pierre et Marie-Curie
 - ✓ **Les résistances aux antimycosiques** 2012 Dr Parmentier J.
 - ✓ **Surveillance des traitements antifongiques.** 2011 Pr. Michèle Mallié.
 - ✓ **Traitement antifongiques.** 2001 O. Mimosz, D.A.R. Bicêtre,
- ✓ **Rôles du Laboratoire dans l'utilisation des antifongiques.** 2012 Dr A. Paugam C.H.U. Cochin, Paris.

*Lu et corrigé
le 20/01/2013*

