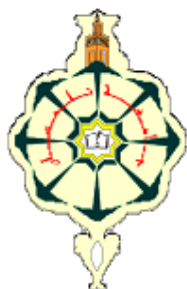


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE, DES SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE

« Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique »

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Détermination de la concentration minimale inhibitrice et fongicide
de quelques antifongiques vis –à- vis des levures isolées du CHU de
Tlemcen**

Présenté par: M^{elle} Malki Fatima Zohra

Soutenu le : 01 juin 2015

Devant le jury suivant :

Président : M^{me} BOUCHERIT Zahia.

Examineur : M^{elle} BENARIBA Nabila

Promoteur : M^{me} SARI Lamia.

Maitre de conférences

Maitre de conférences

Maitre de conférences

Année Universitaire : 2014/2015.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, Synthèse et activité biologique Université Abou bekr Belkaïd TLEMEN

Mes sincères remerciements et gratitudes sont adressés à Mme Boucherit-Atmani Z., Maître de conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, Directeur du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique ». Pour m'avoir accordé l'accès à son laboratoire et pour avoir accepté de présider le jury. La réussite de ce travail ne saurait être possible sans le grand apport de sa part, je voudrais lui dire merci.

Je tiens tout particulièrement à remercier chaleureusement Mme Sari Lamia., Maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, qui m'a encadré tout au long de ce mémoire, sans la quelle rien ne serait là aujourd'hui, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, pour ses conseils précieux et ses orientations scientifiques et surtout pour le plaisir qu'elle a su me faire découvrir et la patience nécessaire dans la recherche. Je lui adresse ma profonde reconnaissance.

Je suis très sensible à l'honneur que me fait Mlle Benariba Nabila. Maître de Conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je souhaite remercier tous les intervenants directs ou non et plus particulièrement ceux qui m'ont encouragé et soutenu durant la réalisation de ce travail, je tiens à remercier tous les membres du laboratoire pour toutes leurs attentions, ainsi que pour les moments de détente et de sympathie que nous avons partagés ensemble.

Résumé :

Les infections fongiques ont considérablement augmenté ces dernières années et sont devenues aujourd'hui une préoccupation importante pour les établissements de soins.

Bien que *Candida albicans* soit le pathogène majoritairement identifié lors de ces infections, d'autres espèces *non albicans* peuvent être impliquées notamment dans de nombreuses pathologies nosocomiales.

En effet, ces levures se développent en adhérant à des implants médicaux, tels que les cathéters formant ainsi des biofilms. Ces derniers leur confèrent des propriétés de résistances aux antifongiques.

Les souches à étudier ont été isolées à partir des cathéters périphériques implantés 48 h et plus et prélevées du CHU de Tlemcen

Sur un total de 11 souches isolées, 8 souches *Candida albicans* et 3 souches de *Candida non albicans*

Les résultats obtenus révèlent que 1 souche *Candida albicans* et 1 souche *Candida non albicans* sont résistantes à l'amphotéricine B, 2 souches *Candida non albicans* sont résistantes au voriconazole.

Mots clés : cathéters, amphotéricine B, voriconazole, résistance, *Candida albicans*, *candida non albicans*.

Abstract:

Fungal infections have dramatically increased in recent years and have now become a major concern for health care institution.

Although *Candida albicans* is the pathogen identified by majority these infections, other *non-albicans* species may be particularly implicated in numerous nosocomial diseases.

In fact, these yeasts grow year adhering to medical implants, such as catheters and forming biofilms. These confer their resistance to antifungal properties.

The strains studied were isolated from peripheral catheters implanted 48 hours and over and picked the University Hospital of Tlemcen

Of a total of 11 strains, 8 strains *Candida albicans* and three strains of *Candida non albicans*

The results reveal that 1 strain *Candida albicans* and 1 strain *Candida non-albicans* are resistant to amphotericin B, 2 strains *Candida non-albicans* are resistant to voriconazole.

Keywords: catheters, amphotericin B, voriconazole, resistance, *Candida albicans*, *non-Candida albicans*.

ملخص :

تعد الخمائر من نوع *Candida* الأكثر تسببا للالتهابات الحادة المتعلقة بالأدوات الطبية احد الأسباب المميّنة لهذه الميكروبات هو تشكيلها للتلاحم الفطري .

الختايا المدروسة تم عزلها من قسطرة طرفية مزروعة 48 ساعة وأكثر و منزوعة من مرضى من المستشفى الجامعي لتلمسان .

من مجموع 11 عينة تحصلنا على 8 سلالات *Candida albicans* و 3 سلالات *Candida non albicans*.

النتائج المحصل عليها تبرهن أن خلية واحدة *Candida albicans* و خلية واحدة *Candida non albicans* مقاومة ل *amphotéricine B* و خليتان *Candida non albicans* مقاومتان ل *voriconazole*.

الكلمات الأساسية : قسطرة , *amphotéricine B* , *voriconazole* , مقاومة , *Candida albicans* , *Candida non albicans*

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHYQUE

1. Introduction	2
2. Les caractères morphologiques de <i>Candida</i>	3
3. Les antifongiques et leurs modes d'action	5
3.1. Les polyènes	6
3.2. Les azolés	7
3.3. Les 5-fluorocytosines	8
3.4. Les échinocandines	9
3.5. Les allylamines	10
4. Mécanisme de résistance de <i>Candida</i> aux antifongiques	11
4.1. Production des gènes responsables de la résistance	11
4.2. Capacité à former les biofilms	13

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel	15
2. Identification des levures	15
2.1 Test de blastèse	15
2.2 Test de chlamidosporulation	15
2.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro- dilutions sur microplaque	15
2.3.1 Préparation de l'antifongique	16
2.3.2 Préparation de l'inoculum	16
2.3.3 Préparation de la microplaque	16
2.4 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF)	17

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

1. Identification des levures utilisées	22
2. Détermination de CMI et CMF de l'amphotéricine B	23
3. Détermination de CMI et CMF du voriconazole	25
QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE	30
CINQUIEME PARTIE : REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES	33

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC : ATP-binding casset

AmB : Amphotéricine B

ADN : l'Acide Désoxyribonucléique

ARN : l'Acide Ribonucleique

ATCC : American Type Culture Collection

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (anciennement appelé NCCLS)

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CMF : Concentration Minimale Fongicide

CWP : Cell Wall Protein

CYP51 : Cytochrome Protéine 51

DMSO: Dimethyl sulfoxide

5-FC: 5- Fluorocytosine

5-FU : 5-Fluorouridine

FURMP: 5-Fluorouridine monophosphate

GlcNAc : N-acétyl-D-Glucosamine

HIV : Virus d'immunodéficience Humaine

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards

P450: Protéine 450

PCB: Pomme de Terre Carotte –Bile

PRRs : Pattern Recognition Receptors

TS : Thymidylate Synthétase

UPRT : l'Uridine Phosphoribosyl-Transférerase

VCZ : Voriconazole

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Morphologie de trois espèces *Candida* : *C.albicans*, *C.lusitaniae*, *C.glabrata*

Figure 2 : Structure de la paroi de *Candida albicans*

Figure 3 : Structure chimique de l'amphotéricine B

Figure 4 : Structure chimique de la nystatine

Figure 5 : Structure chimique d'une molécule voriconazole

Figure 6 : Structure chimique de la flucytosine

Figure 7 : Structure chimique des échinocandines

Figure 8 : Structure chimique de la terbinafine

Figure 9 : Mécanisme d'action des antifongiques

Figure 10 : Détermination de la concentration minimale inhibitrice sur la microplaque

Figure 11 : CMI et CMF ($\mu\text{g/mL}$) de l'amphotéricine B envers les levures isolées.

Figure12 : CMI et CMF ($\mu\text{g/mL}$) du voriconazole envers les levures isolées.

Première partie :
Synthèse Bibliographique

1. Introduction :

Depuis plusieurs décennies, la fréquence des infections fongiques, s'est considérablement accrue en raison des progrès des thérapeutiques médicales et chirurgicales.

Paradoxalement, ces dernières plus efficaces, sont également plus invasives : utilisation des cathéters vasculaires, mise en place des prothèses, intensification des protocoles de chimiothérapies, administration d'antibiotiques à large spectre déséquilibrant la flore, d'immunosuppresseurs et conduisent à des situations de fragilité immunologique ainsi qu'à une exposition majorée aux agents opportunistes. (Camille, 2013)

Les infections fongiques invasives, sont des infections sévères associées à une lourde mortalité. Elles sont actuellement un problème majeur de santé publique et leur incidence augmente. Les candidémies représentent la quatrième cause d'infection hématogène nosocomiales, les cryptococcoses sont responsables de 600 000 décès chaque année en Afrique et l'aspergillose invasive infecte 10% des patients transplantés de cellules souches, la mortalité de ces infections reste élevée avec des taux de 50, 15 et 40% respectivement. L'augmentation de leur incidence est due à l'accroissement des populations immunodéprimées qui risquent de développer des infections fongiques en raison de l'augmentation des thérapeutiques immunosuppressives. Les infections fongiques invasives surviennent chez des patients immunodéprimés, majoritairement dans un contexte d'immunodépression acquise (neutropénie, chimiothérapie, greffe de cellules souches périphériques ou transplantation d'organe solide, diabète, infection par le virus de l'immunodéficience humaine). (Lanternier, 2013)

Hoang et coll (2007) signalent que sur une période de cinq ans entre 1997 et 2002 à l'hôpital de Vancouver et le centre des sciences de la santé, 18 souches de *Cryptococcus neoformans* ont été isolées dont 10 à partir des patients HIV positifs, ce qui montre que l'immunodépression est un facteur important dans la dissémination de ces infections, sinon le taux reste toujours faible.

L'augmentation de la fréquence des infections à levures durant ces trois dernières décennies s'est également accompagnée d'une augmentation de l'incidence de certaines espèces auparavant peu représentées.

Candida albicans est responsable d'infections qui par leurs gravité, se situent au premier rang des infections fongiques (Samaranayake et coll., 2002).

Si *C.albicans* reste de loin l'espèce la plus fréquente, *C.glabrata* est devenue, selon les études et la forme clinique de l'infection, la deuxième ou troisième espèce la plus fréquemment isolée (World Health Organisation, 2007).

Mais depuis 2006, *C.parapsilosis* est devenue la deuxième espèce responsable de candidémies, devançant *C.glabrata* (Paugam et coll., 2010)

Selon Gallien et coll., 2007 l'isolement de *C.parapsilosis* est fortement associé à une infection du cathéter veineux.

Les infections sur cathéters sont responsables d'une augmentation de la durée du séjour, du cout de l'hospitalisation et de la morbidité en raison d'une prescription accrue d'antibiotiques et de la prolongation de la durée de l'hospitalisation. Cette attitude a des effets indésirables et des conséquences néfastes. [(Saidi et coll., 2006) ; (Kibbler, 2007)]

En raison de l'amplitude que prennent les mycoses systémiques en milieu hospitalier, liées à la pose de cathéters, nous avons voulu déterminer les concentrations minimales inhibitrices et fongicides de quelques antifongiques utilisés en thérapeutique au CHU de Tlemcen, pour les levures appartenant au genre *Candida* isolées du CHU de Tlemcen. Mais avant d'aller plus loin rappelons les caractères morphologiques de ce genre de levure.

2. Les caractères morphologiques de la levure :

Les *Candida* sont des champignons levuriformes qui se multiplient par bourgeonnement multilatéral. Ils ont un appareil végétatif constitué de blastopores ovales de 2 à 5 µm et ont la possibilité de changer de morphologie, à l'exception de *Candida glabrata*. Ainsi par bourgeonnement et croissance de bourgeons selon un mode subcylindrique, les levures forment des pseudo-filaments (Fig. 1). Les ramifications du pseudomycélium sont dues aux bourgeonnements multiples. *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* ont en plus la capacité de différencier un véritable mycélium, formé de vrais filaments dont chaque article est séparé du voisin par un septum, cloison transversale percée d'un pore. Les septa permettent le passage intercellulaire du cytoplasme et d'organite. Certaines espèces tel que *Candida*

lusitaniae ont aussi conservé la capacité à se reproduire par voie sexuée (Maruyama et coll., 2005).

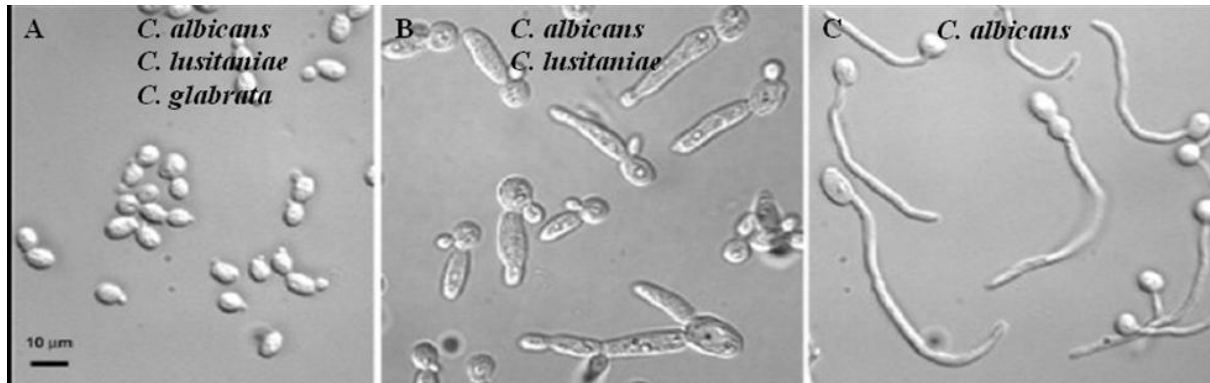


Figure 1 : Morphologie de trois espèces *Candida* : *C. albicans*, *C. lusitaniae* et *C. glabrata*.
A : Levures. B : Pseudo-filaments. C : Vrais filaments. (Kullberg et coll., 2002)

Les cellules de ces microorganismes eucaryotes ont la particularité, comme tous les champignons, d'avoir une paroi contenant de la chitine. Cette paroi joue un rôle de protection contre les attaques physico-chimiques de l'environnement et permet de résister aux variations de la pression osmotique, elle agit comme une membrane imperméable et maintient les caractéristiques morphologique de la levure. C'est aussi cette paroi, partie la plus externe de la cellule, qui permet les premières interactions physiques entre le microorganisme et son environnement hôte. 80 à 90% de la composition de la paroi (fig.2) de *Candida albicans* est représentée par des carbohydrates. (Lopez et coll., 2004).

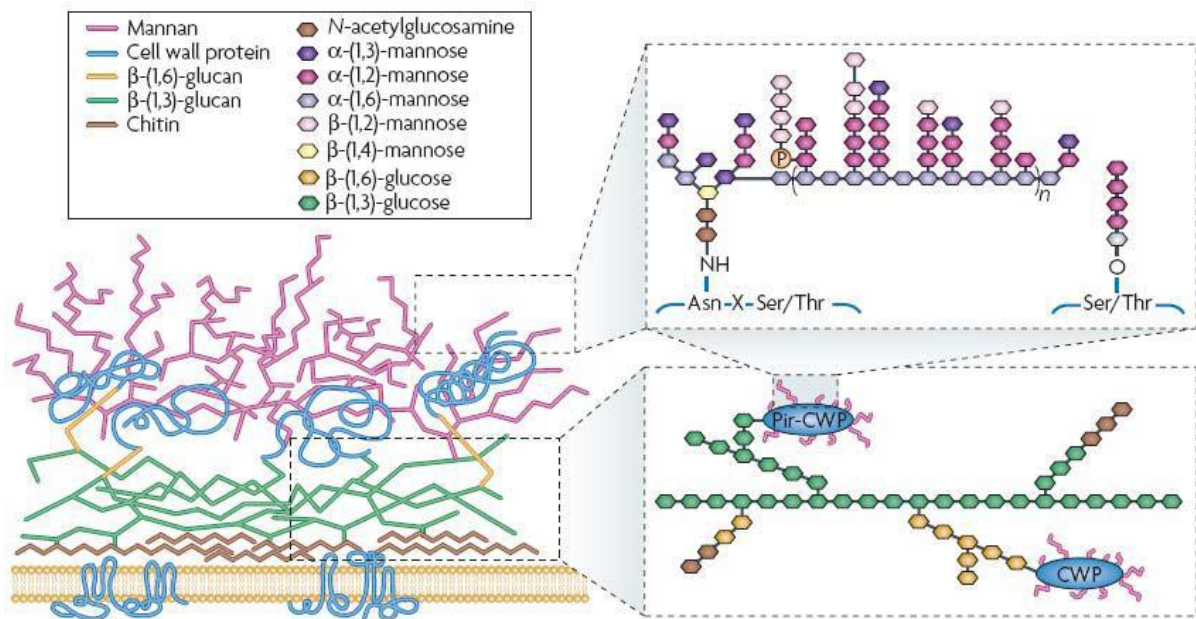


Figure 2 : Structure de la paroi de *Candida albicans* (Netea et coll., 2008)

Le schéma représente l'organisation des composants majeurs de la paroi. Les β -1,3 glucanes et la chitine (poly- β -(1,4)-N acetylglucosamine) sont les principaux composants structuraux et sont proches de la membrane plasmique. Les couches superficielles sont riches en protéines pariétales (CWP) mannosylées et liées aux glucanes.

En particulier, 3 constituants basiques représentent la majorité des polysaccharides de la paroi :

Des polymères ramifiés de glucose branchés en α -1,3 et α -1,6 (α -glucanes). La composition de la paroi en α -glucanes varie en fonction de l'état morphologique de la levure. En effet, elle s'élève à 30-39% de α -1,3-glucanes pour 43-53% de α -1,6-glucanes chez les blastopores et les mycéliums, alors que ces proportions sont inversées dans le cas des tubes germinatifs (Ruiz et coll., 2006). Ces α -glucanes représentent d'un point de vue quantitatif 47 à 60% du poids sec de la paroi. Ce sont donc les constituants majeurs. Ces glucanes constituent la structure de la paroi. Ils forment un squelette rigide, grâce à l'existence de liaisons glycosidiques avec la chitine (Surarit et coll., 1988), et procurent de fortes propriétés physiques à la cellule. Les glucanes peuvent être sécrétés dans le sang des patients infectés ou ils exercent une toxicité pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique chez la souris. De plus, les glucanes de *Candida albicans* peuvent inhiber directement les fonctions des monocytes et celles des cellules T de façon indirecte, ce qui suggère leur rôle prédominant dans le développement de la candidose (Nakagawa et coll., 2003)

Des polymères de mannose (mannanes) associés à des protéines par des liaisons covalentes (glyco[manno]-protéines). Ce sont, avec les α -glucanes, les constituants majeurs de la paroi, puisqu'ils représentent environ 40% de polysaccharides et sont les principaux participants à la formation de la matrice de la paroi [(Calderone et Braun, 1991) ; (Shepherd, 1987)]

Les mannanes sont des édifices complexes de masse moléculaire élevée, constitués de résidus mannose liés en α -1,6, α -1,2, α -1,3 (Poulaine et Feuilhade., 1995). Ces résidus sont reconnus par le récepteur mannose, récepteur de l'immunité innée (PRRs Pattern Recognition receptors), impliqué dans la fixation et la phagocytose de nombreux pathogènes. Les mannanes permettent de différencier les sérotypes A et B de *Candida albicans* (Ruiz et coll., 2006).

Chez l'homme, les mannanes et les glucanes suscitent l'élaboration d'anticorps à des degrés différents chez les sujets sains, les patients colonisés ou infectés [(Jones, 1990) ; (Ishibashi et coll., 2005)]. Ainsi, ils confèrent à la paroi des propriétés antigéniques capables d'alerter le système immunitaire de l'hôte.

Cet ensemble moléculaire apparaît comme un facteur de pathogénicité de *Candida* et fait à ce titre l'objet de nombreuses études visant à définir les relations structure / immunoréactivité des oligomannosides qui le constituent (Ishibashi et coll., 2005).

Des polymères linéaires de N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) contenant des liaisons α -1,4 (chitine) (Ruiz et coll., 2006). La chitine participe, avec les α -glucanes à la composition du squelette de la paroi et est impliquée dans la rigidité de la paroi. Chez les levures, elle participe au processus de bourgeonnement et notamment à la formation de l'anneau de constriction pour la séparation à la cellule mère de la cellule fille (Tronchin et coll., 1981).

La paroi contient également un certain nombre de protéines ayant une activité enzymatique (6 à 25 %) (Chaffin et coll., 1998).

Des lipides (1 à 7%) , dont les phospholipomannanes qui interagissent avec les anticorps spécifiques dirigés contre les β -1,2- oligomannosides et qui participeraient aux mécanismes d'adhésion, de protection et de signalisation chez *Candida albicans* (Mille et coll., 2004).

2. Les antifongiques et leurs modes d'action :

L'arsenal thérapeutique actuellement disponible pour combattre les infections fongiques humaines se compose de traitements médicamenteux lourds et non exempts d'effets

secondaires indésirables (Wingard et Leather, 2004). Parmi les molécules sur le marché, les composés azolés (fluconazole, itraconazole...), les allylamines (terbinafine, naftifine), les équinoïdines (caspofungine...) et les macrolides polyéniques (amphotéricine B, nystatine) constituent les principales thérapies utilisées (Odds *et al.* 2003). Cette palette médicamenteuse reste limitée et peut se révéler inefficace à traiter certains cas.

Les composés antifongiques utilisés actuellement peuvent être divisés en 5 groupes selon leur mode d'action (Odds *et al.* 2003).

Les polyènes, les équinoïdines, les azolés, les fluoro-cytosines, les allylamines, les deux premières sont issues de produits naturels tandis que les trois autres sont synthétiques.

3.1. Les polyènes :

L'amphotéricine B (fig.3), découvert en 1955 par Gold et Vandeputte, est extrait de culture de *Streptomyces nodosus*.

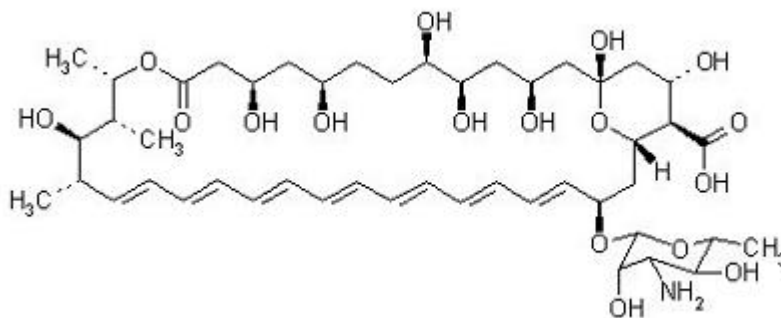


Figure 3 : Structure chimique de l'amphotéricine B (Kirkiakarian, 2010)

L'amphotéricine B est une molécule lipophile qui se lie à l'ergostérol de la membrane cellulaire fongique pour lequel elle a une forte affinité, augmentant ainsi la perméabilité transmembranaire aux cations (sodium : Na⁺, potassium : K⁺) par la formation de canaux. La déplétion du K⁺ intracellulaire entraîne secondairement la mort de la cellule (action fongicide) (Affect, 1999).

Son spectre d'action s'étend à de nombreux champignons pathogènes, agents des mycoses profondes. Il a une bonne activité envers les *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* (Calop, 2008).

La nystatine (fig.4), découverte en 1950 par Hazen et Brown, est extraite de la culture de *Streptomyces noursei*, son mode d'action et ses propriétés antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'amphotéricine B (Kyle et coll., 2004)

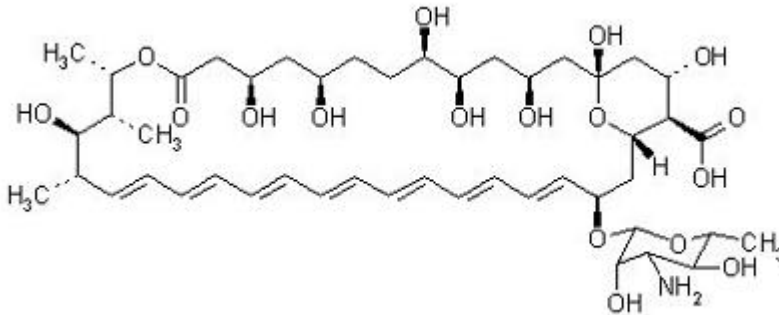


Figure 4 : Structure chimique de la nystatine ((Kirkiakarian, 2010)

3.2. Les azolés :

Les premiers azolés ont été mis sur le marché en 1957.

C'est en 1983 que le premier triazolé a fait son apparition : le kétoconazole.

Plusieurs triazolés vont ensuite être introduits successivement sur le marché : le fluconazole (en 1990), l'itraconazole (1993), le voriconazole (2002) et le posaconazole (2006) (Hinckley-vitratv, 2011).

Les azolés sont des inhibiteurs enzymatiques qui agissent en bloquant le site actif de l'enzyme connue sous le nom de lanostérol 14 α deméthylase. Cette enzyme, appelée CYP51 appartient aux isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques. Elle permet chez la levure la transformation du lanostérol en ergostérol, principal stérol de la membrane fongique [(Granier, 2000) ; (Vandeputte, 2008)], la 14 α deméthylase est codée par le gène ERG11 (Granier, 2003).

L'étape de deméthylation nécessaire pour transformer les 14 α méthyl stérols en ergostérol est dépendante de l'activation du cytochrome P450, sur le plan moléculaire, un des atomes d'azote (le N-3 chez les imidazolés et le N-4 chez les triazolés) se lie à l'atome de fer de l'hème situé dans le site actif de l'enzyme du cytochrome P450, inhibant ainsi l'activation de

ce cytochrome et par conséquent le fonctionnement enzymatique. [(Granier, 2003) ; (Yu et coll., 2010) ; (Van bambeke, 2012)].

Les azolés sont donc actifs sur les enzymes dépendantes du cytochrome P450 (Delaunay, 2006).

L'inhibition conduit à une accumulation de précurseurs dans la chaîne de synthèse :

Lanostérol et divers 14- α demethylstérois ce qui aboutit à l'inhibition de la croissance de la levure (Lortholary, 1999).

Ce sont des antifongiques à large spectre, peu résorbés par voie locale. Ils ont une action antifongique puissante sur les dermatophytes, *Candida* et *Malassezia*. Ils possèdent également des propriétés antibactériennes (Calop, 2008)

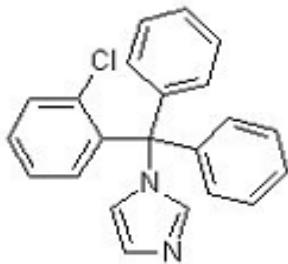


Figure 5 : Structure chimique du voriconazole (kirkiacharian, 2010)

3.3. Les 5-fluorocytosines :

La flucytosine est synthétisée en 1957 par Duschinsky (fig.6), elle agit via 2 mécanismes :

-Elle perturbe la synthèse protéique par substitution de l'uracile par le 5-FU dans l'Acide Ribonucléique (ARN) fongique.

-elle altère la biosynthèse de l'Acide Désoxyribonucléique (ADN) fongique par inhibition de la thymidylate synthétase (TS).

Afin que la 5-FC puisse exercer son action antifongique, elle doit d'abord pénétrer dans la cellule fongique, en compétition avec la cytosine. Pour cela, elle utilise des transporteurs plus ou moins spécifiques, tels que la cytosine perméase ou des transporteurs des pyrimidines.

Elle doit ensuite être transformée en 5-FU grâce à la cytosine désaminase (Herbrecht et coll., 2005).

Le 5-FU est ensuite converti en 5-fluouridine mono phosphate (FURMP) par l'uridine phosphoribosyl-transférase ou UPRT. A terme, ce mécanisme permet d'aboutir au blocage de la multiplication cellulaire (Vandeputte, 2008).

La flucytosine possède un spectre d'action plutôt réduit : *Candida*, *Cryptococcus* (Herbrecht et coll., 2005)

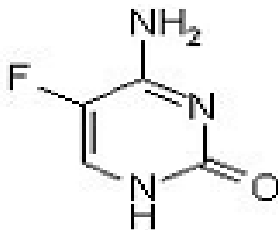


Figure 6 : Structure chimique de la flucytosine (kirkiacharian, 2010)

3.4. Les échinocandines :

Les échinocandines sont une nouvelle classe d'antifongiques systémiques, elle a fait son apparition avec la caspofungine (fig.7) en 2002, l'anidulafungine en 2007 et la micafungine en 2008 présentant un mode d'action innovant, spécifique et original. Ces molécules interfèrent avec la synthèse de la paroi fongique par inhibition non compétitive de la 1, 3 β-d-glucane synthétase, système enzymatique présent chez la plupart des champignons pathogènes mais absent des cellules de mammifères.

Leur spectre d'action est étendu, englobant les *Candida spp*, les *aspergillus spp*. Et *Pneumocystis carinii* mais les *Fusarium spp*. Les mucorales, *Trichosporon spp*.et *Cryptococcus neoformans* sont résistants aux échinocandines. Trois molécules sont actuellement disponibles ou en cours de développement : la caspofungine (Caspofungin-MSD^R), l'anidulafungine et la micafungine. Ces médicaments, tous uniquement disponibles par voie intraveineuse, représentent une réelle avancée dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives (Lacroix et coll., 2003)

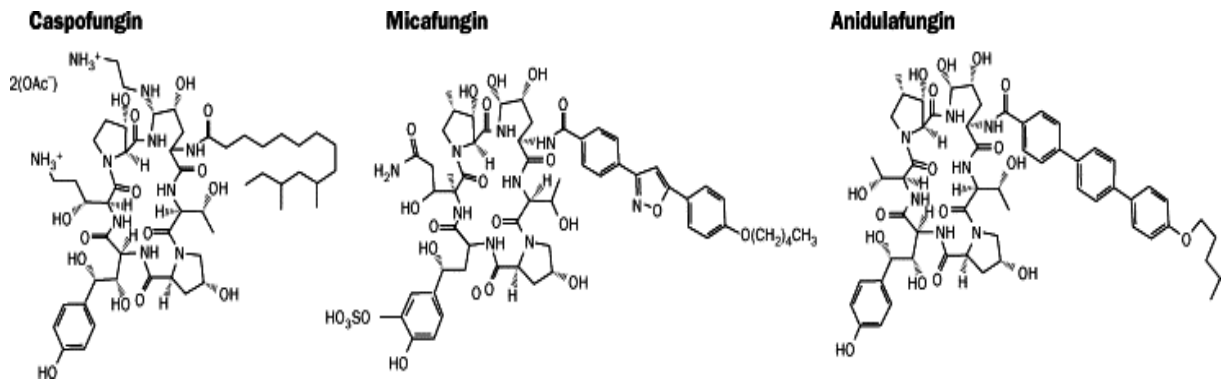


Figure 7 : Structure des échinocandines selon Denning (2003)

3.5. Les allylamines :

Leur représentant, la terbinafine (Lamisil[®]) (fig.8), agit au niveau des premières étapes de la synthèse de l'ergostérol en inhibant la squalène epoxydase (Hincky-vitratv, 2011). Elle inhibe ainsi la biosynthèse de l'ergostérol et conduit à la mort cellulaire [(Granier, 2000) ; (Bretagne, 2005)].

Ce sont des antifongiques fongicides intervenant au niveau du cytochrome P450(CYP2D6) (Calop, 2008).

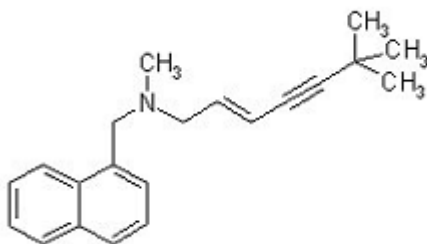


Figure 8 : Structure chimique de la terbinafine (Kirkiacharian, 2010)

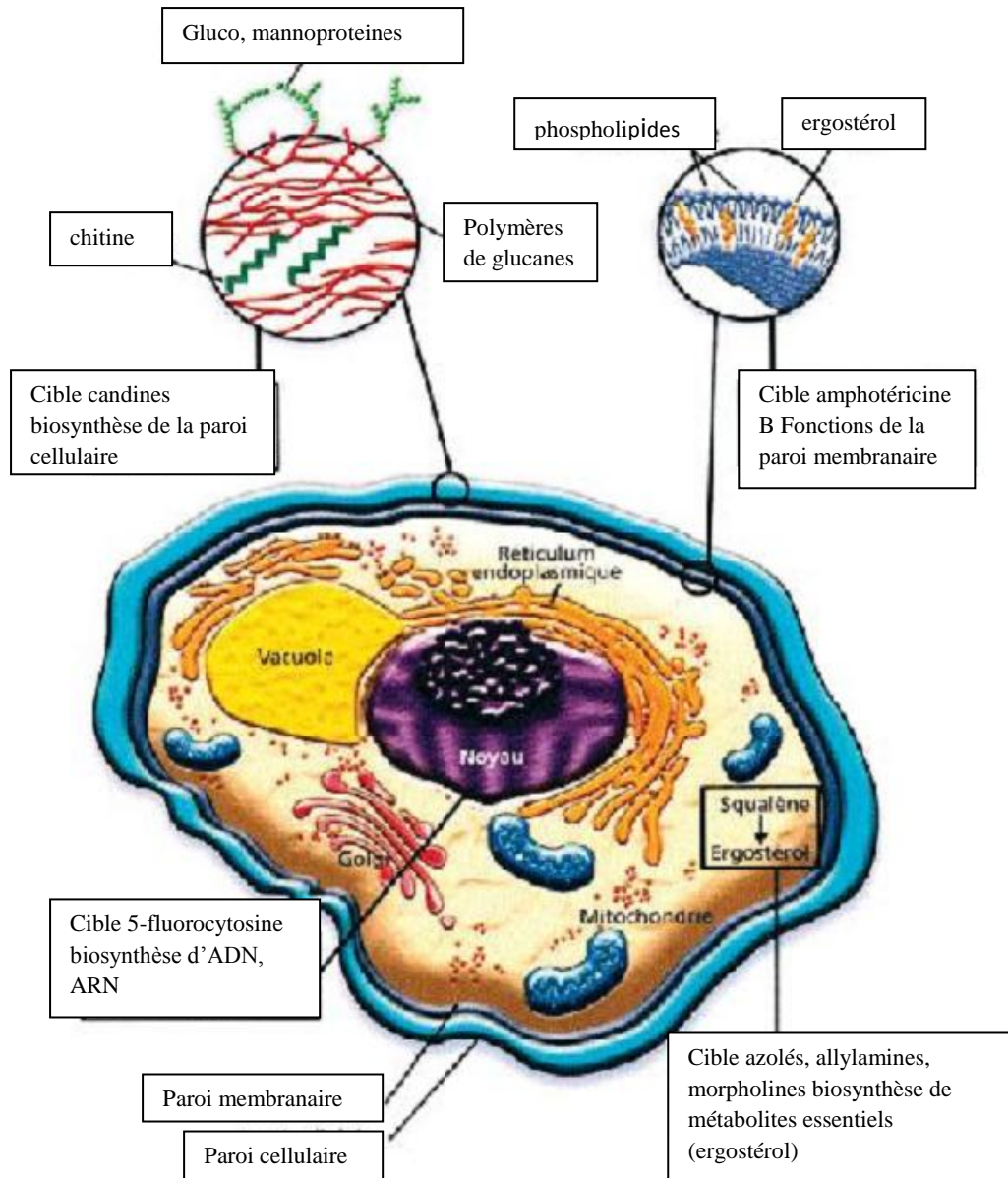


Figure 9 : Mécanisme d'action des antifongiques (Herbrecht et coll., 2005)

4. Mécanismes de résistance de *candida* aux antifongiques :

La résistance aux antifongiques peut résulter d'un mécanisme épigénétique, par exemple la capacité à former des biofilms qui limitent le passage de l'antifongique à l'intérieur de la cellule.

4.1 Production des gènes responsables de la résistance :

La résistance pourrait être due, en partie, à la surface induite par la sup-régulation des pompes à efflux (Jabra-Rizk et coll., 2004). Ces dernières sont codées par la majorité des gènes qui contribuent à la résistance aux différents traitements antimicrobiens [(Chandra et

coll., 2001a) ; (Douglas, 2002) ;(Harry et coll., 2002) ; (Ramage et coll., 2002a) ; (White et coll., 2002)]

L'expression des gènes codant pour les transporteurs multi-drogues joue un rôle important dans l'apparition de la résistance de *Candida albicans* aux antifongiques. En particulier, les transporteurs ABC sont faiblement exprimés chez les souches sauvages. Les promoteurs de deux gènes codant pour des transporteurs ont été analysés et ont permis l'identification de régions régulatrices communes (Donlan, 2002)

4.2 Capacité à former les biofilms :

L'augmentation de la résistance aux antifongiques est induite par l'adhésion des cellules aux surfaces, elle est associée à une augmentation concomitante de l'activité métabolique du développement du biofilm [(Mateus et coll., 2004) ; (Nett et coll. 2008)],

En effet, les biofilms constituent une barrière physique qui empêchent la pénétration efficace des médicaments antimicrobiens, conférant ainsi à ces communautés, une plus grande résistance vis-à-vis de l'activité antimicrobienne que leurs homologues planctoniques [(Chandra et coll., 2001a) ;(Hall-stoodley et coll., 2004)].

Les biofilms sont des communautés de microorganismes adhérentes à une surface et produisant une matrice exopolymérique (Blankenship, Mitchell., 2006) .Les biofilms générés par les *Candida* représentent un vrai problème clinique. Ils peuvent se former sur des surfaces naturelles telles qu'un endothélium vasculaire endommagé (Douglas, 2003), mais le plus souvent sur une surface synthétique, comme celle d'un cathéter veineux central, d'un dentier ou d'une valve cardiaque (Andes et coll., 2004).

Chez *C. albicans*, les biofilms se forment en plusieurs étapes [(Blankenship et Mitchell., 2006) ;(Douglas, 2003)]. Tout d'abord, les cellules à l'état de blastopore doivent adhérer à la surface du support puis commencer à se multiplier pour former des microcolonies, constituant la couche basale du biofilm. La croissance du biofilm se poursuit avec la production de pseudomycélium et de mycélium, permettant le développement de biofilms robustes, et d'une matrice extracellulaire (Richard et coll., 2005). A partir de l'ensemble des données plus haut, nous avons envisagé de déterminer les concentrations minimales inhibitrices et fongicides de quelques antifongiques (Vfend, Fungizone) envers les levures de *Candida* isolées à partir de cathéters prélevés au CHU de Tlemcen.

Deuxième partie :
Matériels et Méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

1-Matériel :

Les levures utilisées pour notre étude proviennent d'une collection de souches isolées de cathéters périphériques, implantés depuis plus de 48 heures et prélevés du service d'hématologie clinique et de maternité de l'établissement hospitalier spécialisé(EHS) mère et enfant du centre hospitalo-universitaire(CHU) de Tlemcen

2. Identification des levures :

2.1 Test de blastèse

La souche à tester estensemencée dans 1mL de sérum humain, puis incubée à 37°C pendant 3 à 4 heures. L'observation de la suspension au microscope optique (Grossissement $\times 400$) est réalisée pour mettre en évidence la formation des tubes germinatifs (Bouchet et coll., 1989)

Seul l'espèce *Candida albicans* filamente sur sérum.

2.2 Test de chlamydosporulation

Une colonie de levure est prélevée puisensemencée par stries sur gélose PCB (terre, carotte, bile) inclinés dans des tubes à essai. En réalisant une petite pique à l'aide de la pipette pasteur, après incubation à 37°C pendant 48 heures la zoneensemencée est mise sur lame et recouverte d'une lamelle en exerçant un écrasement par cette dernière puis observation au microscope.

La présence de chlamidospores indique qu'il s'agit dans 95% des cas de *C.albicans*.

2.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) par la méthode des micro-dilutions sur microplaques :

Nous avons utilisé la méthode décrite par *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27-A3 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de tester l'efficacité des antifongiques et de déterminer les concentrations minimales inhibitrices et les concentrations minimales fongicides correspondantes. La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme étant la concentration la plus faible de la substance antimicrobienne qui inhibe la croissance des microorganismes.

Le principe de cette méthode est d'évaluer la capacité des levures à produire une croissance visible dans les puits d'une microplaque à fonds rond (à 96 puits) contenant le milieu de culture liquide, en présence de concentrations croissantes de l'antifongique.

Le milieu de culture utilisé pour cette technique est le RPMI (Roswell Park Memorial Institute, 1640, liquide).

2.3.1 Préparation de l'antifongique :

Nous avons utilisé la fungizone provenant des laboratoires Bristol-Myers Squibb et le voriconazole provenant des laboratoires Pfizer Ireland Pharmaceuticals Limited.

antifongique	Forme de présentation	solvant
Amphotéricine B	Pureté 50% Substance en poudre	Dissous dans DMSO
Voriconazole	Pureté 5,5% Substance en poudre	Dissous dans DMSO

L'amphotéricine B à une concentration mère de 3200 µg/mL.

Le voriconazole à une concentration mère de 58170 µg/mL.

Une série progressive de doubles dilutions d'antifongique a été réalisée en dehors de la plaque une dilution au 1/2 et une dilution à 1/50.

2.3.2 Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture jeune de levure en boîte sur Sabouraud gélose, nous avons prélevé 1 colonie que nous avons placé dans un tube à hémolyse contenant 3 mL d'eau physiologique stérile.

La concentration cellulaire de cette solution est ensuite ajustée de 10^6 à 5×10^6 cellules/mL.

La concentration cellulaire finale est fixée entre 5×10^2 à $2,5 \times 10^3$ cellules/mL.

Elle est obtenue par deux dilutions successives dans le milieu de test, une dilution au 1/100, suivie d'une autre dilution au 1/20.

2.3.3 Préparation de la microplaque :

Dans chaque puits de microplaque, nous avons introduit 100 μL de milieu RPMI 1640. Ensuite 100 μL de la solution antifongique (AmB ou VCZ), à une concentration finale de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sont ajoutés aux puits N° 1.

Après homogénéisation, une série de dilution est réalisée de puits en puits où 100 μL sont prélevés, déposés et homogénéisés dans les puits suivants jusqu'aux derniers puits.

100 μL de l'inoculum (10^3 cellules/mL) sont ensuite ajoutés dans chaque puits de la microplaque.

Pour chaque agent antifongique, une série de dilution sans inoculum est également réalisée pour servir de témoin négatif.

Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Les CMI sont déterminées à l'œil nu.

2.4 Détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) :

La CMF est définie comme la plus faible concentration de l'antifongique qui tue 99,9% de la concentration cellulaire. Après la détermination de la CMI (durant 24h d'incubation à 35°C), les deux puits contenant les concentrations de substances antifongiques strictement supérieures à la CMI vont servir pour la détermination de la CMF.

Pour se faire, 20 μL de chaque puits vont être transférés dans des boites de pétri contenant du milieu Sabouraud Gélosé. Les boites sont incubées dans une étuve à 35°C pendant 48h.

Cette technique nous permet de vérifier si les cellules sont viables et cultivables. La boite correspondant à la CMF renferme un nombre de colonies inférieures à 3 (Majoros et coll., 2005).

La définition de la résistance *in vitro* aux antifongiques est basée sur les points d'arrêt qui ont été établies par des méthodes normalisées à des levures dans un ensemble de documents du CLSI nommée M27.

Troisième partie :
Résultats et discussion

Les infections fongiques invasives représentent un réel danger pour la vie humaine, elles sont graves et à l'origine d'une mortalité élevée. Leur incidence a augmenté sensiblement pendant les deux dernières décennies. Actuellement, le diagnostic mycologique classique qui repose majoritairement sur la mise en évidence directe ou après culture des champignons dans les prélèvements biologiques n'est pas toujours satisfaisant et parfois ne permet pas un diagnostic précoce. (Tellaa, 2013)

L'augmentation des infections profondes à *Candida* dans les vingt dernières années reste une réalité épidémiologique et clinique et ce, particulièrement observée en service de réanimation. Les raisons de cette progression sont dues à la modification des pratiques médicales, aux progrès thérapeutiques, à l'amélioration des résultats de la réanimation et au vieillissement de la population, qui ont d'une part contribué à l'augmentation du nombre de patients à risque et d'autre part à prolonger la vie de cette même population. (Gauzit et coll., 2001)

Les candidoses restent de très loin les infections fongiques les plus fréquentes dans le milieu hospitalier. L'espèce *Candida albicans* est l'espèce la plus souvent isolée lors d'une candidémie qui peut avoir comme origine un cathéter colonisé [(Hawser et Douglas, 1995),(Hennequin, 1996)]

En effet, Pfaller et Diekema (2007) ont mis en évidence la régression de la fréquence des isolats cliniques de *C.albicans* devant les espèces non-albicans.

De plus, Bassetti et coll. (2011), Ferreira et coll. 2013) ainsi que Kaur et coll.(2014) ont révélé que les isolats cliniques des espèces *non-albicans* de *candida* sont plus importants que ceux de *candida albicans*.

En réalité, même si il existe de très nombreuses espèces pouvant être isolées de prélèvement humain, près de 90% des candidoses invasives sont dues aux cinq espèces suivantes :

C.albicans, *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis* et *C.krusei* (Pfaller et Diekema, 2007)

La résistance microbiologique peut être définie comme la diminution de la sensibilité à un antifongique, mesurée *in vitro* par des méthodes appropriées et standardisées, la sensibilité est estimée le plus souvent par la mesure de la CMI (concentration minimale inhibitrice vis-à-vis d'un antifongique donné. Cette CMI correspond à une concentration d'antifongique inhibant la croissance de la grande majorité d'un groupe d'isolats de la même espèce. Cependant, la

CMI ne peut pas être considérée comme une valeur absolue prédictive du succès ou de l'échec d'un traitement antifongique. (Sanglard, 2003)

On distingue deux types de résistance :

La résistance innée ou naturelle, primaire : elle intervient avant toute exposition à l'agent antifongique *in vivo* ou *in vitro*.

La résistance acquise ou secondaire : elle se développe après exposition à un antifongique, chez les champignons à priori sensibles à ce traitement.

La distinction doit être faite entre la résistance à un antifongique, qui est un élément propre au micro-organisme (résistance innée, acquise) et l'échec thérapeutique, qui dépend, lui, de facteurs cliniques propres à l'hôte (état immunitaire, paramètres pharmacocinétiques,)

L'apparition de résistance aux antifongiques chez certains microorganismes et l'inefficacité d'une antifongothérapie pour protéger l'organisme contre l'envahissement de certaines souches pathogènes constituent un problème sérieux. Ainsi, depuis 1950, l'année de la découverte de la nystatine par HAZEN et BROWN, plusieurs antifongiques furent isolés, mais un nombre très restreint est utilisé à des fins thérapeutiques du fait de leur toxicité et/ou de leur inactivité *in vitro*.

C'est seulement depuis cette dernière décennie que la thérapeutique antifongique s'est réellement développée mais malgré plus de cinquante ans d'utilisation, l'amphotéricine B reste encore l'antifongique polyénique de premier choix dans les infections fongiques profondes, en raison de son spectre très large, de son effet fongicide intense et de l'apparition de relativement peu de cas de résistance. La mise à disposition des dérivés azolés qui sont mieux tolérés que l'amphotéricine B a suscité de grands espoirs malheureusement déçus par l'apparition de cas de résistances de plus en plus fréquentes (Scholer et Polack, 1984). De plus, les dérivés azolés, contrairement à l'amphotéricine B, sont plutôt des inhibiteurs de la croissance des cellules fongiques (Carbon et coll. 1994).

Ce regain d'intérêt pour l'amphotéricine B a incité la renaissance des études concernant cette molécule.

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

L'objectif de notre étude est d'évaluer la sensibilité de nos souches à l'antifongique l'amphotéricine B et le voriconazole en déterminant les concentrations minimales inhibitrices et fongicides.

1-Identification des levures utilisées :

Tableau N°1 : identification des souches isolées à partir de cathéters périphériques.

Tube germinatif = test +

Chlamidospores = test +

Souches isolées	blastèse	pcb
M7	+	+
M6	+	+
M5	+	+
M4	+	+
M16	+	+
M1	+	+
M2	+	+
M9	+	+
H3	Ne filamente pas	Absence de chlamidospores
H4	Ne filamente pas	Absence de chlamidospores
H1	Ne filamente pas	Absence de chlamidospores

Sur les 11 souches isolées du CHU de Tlemcen, 8 appartiennent à l'espèce *C.albicans* et 3 *non albicans*.

Des études antérieures ont classé *C.albicans* comme étant l'agent étiologique le plus souvent isolé lors de candidémie nosocomiales [(Sahiner et coll., 2009) ;(Das et coll., 2011)].

Cependant, au cours des deux dernières décennies, nous assistons à l'émergence des espèces *non albicans*. Ces dernières sont majoritaires dans les candidémies nosocomiales liées aux

cathéters [(Ruan et coll., 2009) ;(Abbès et coll., 2011)] l'épidémiologie des candidoses s'est considérablement modifiée ces dernières années avec l'apparition de nouvelles espèces (Develoux et bretagne, 2005).

Candida albicans est l'espèce la plus souvent isolée, que ce soit aux Etats-Unis (Horn et coll., 2009 ; Pfaller and Diekema 2007), en Europe (Bouza and Munoz 2008 ;Guery et coll., 2009a ; Ortega et coll., 2011 ; Tortorano et coll., 2006) ou sur d'autres continents (Arendrup 2010)

Le genre *Candida* est de loin le genre le plus fréquemment rencontré en pathologie humaine puisqu'il est responsable de près de 80% des levuroses (Chabasse et coll., 1999)

Les tubes germinatifs et pseudohyphes ne sont pas observés chez toute les espèces de candida. *Candida glabrata* ne présente pas ces différent aspects à l'examen direct, leur présence permet donc d'éliminer cette possibilité d'identifications possibles (Bouchara et coll., 2010)

Cependant pour certaines espèces il est possible d'observer des pseudo-filaments ou filaments vrais prenant naissance à partir des tubes germinatifs. *Candida albicans* est l'espèce qui produit le plus fréquemment ces tubes germinatifs (Sudbrery et coll., 2004).

Candida albicans et *C.dublinsiensis* sont deux espèces capables de produire des structures particulières, les chlamidospores. Celles-ci n'apparaissent que dans des conditions de culture stringentes, car il s'agit de formes de résistance et d'adaptation. (Calderone 2002)

L'espèce la plus courante reste le *C. albicans*, mais nous avons assisté ces dernières années à l'émergence croissante d'autres espèces opportunistes du genre, dites «espèces *non-albicans*». (Abi-said et coll., 1997)

Hot et coll., (2007) confirment que le facteur de risque des infections fongiques reste l'utilisation de cathéters.

En effet, *Candida albicans* peut pénétrer l'organisme humain en s'adhérant à une surface en plastique implantée. (Wessenberg-Ward et coll., 2005) La plupart des manifestations de la candidose sont associés à la formation de biofilm qui se produit sur les surfaces des dispositifs médicaux. [(Miao et coll., 2007), (Pierce et coll., 2008)]

2-Détermination de CMI et CMF de l'amphotéricine B :

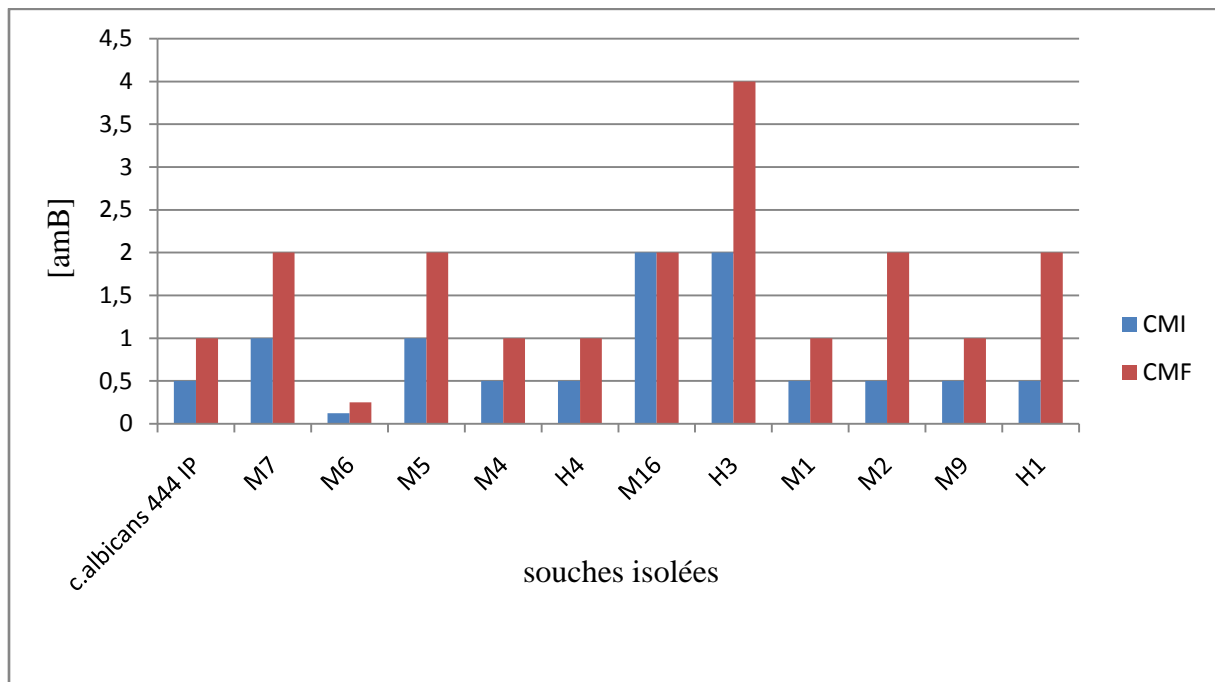


Figure 1 : CMI et CMF (µg /mL) de l'amphotéricine B envers les levures.

Selon les résultats observés, la CMI de la souche *C.albicans* 444IP est de 0,5 µg/mL, la CMF est de 1 µg/mL.

Pour les souches *C.albicans* les CMI sont de 1 µg/mL vis-à-vis de 2 souches, 0,5 µg/mL vis-à-vis de 4 souches, 2 µg/mL vis-à-vis d'une souche, 0,125 µg/mL vis-à-vis d'une souche.

Pour les souches *C. albicans* les CMF sont de 1 µg/mL vis-à-vis de 3 souches, 2 µg/mL vis-à-vis de 3 souches, 0,25 µg/mL vis-à-vis d'une souche.

Pour les souches *C.non albicans* les CMI sont de 0,5 µg/mL vis-à-vis de 2 souches, 2 µg/mL vis-à-vis d' une souche.

Pour les souches *C.non albicans* les CMF sont de 1 µg/mL vis-à-vis d'une souche, 4 µg/mL vis-à-vis d'une souche, 2 µg/mL vis-à-vis d'une souche.

4 souches *C.albicans* présentent des CMI comparables à la souche de référence, pour les souches restantes les CMI sont supérieures à la souche de référence et une souche a une CMI inférieure à la CMI de la souche de référence.

2 souches *C. non albicans* présentent des CMI supérieures à la CMI de la souche de référence une souche *C. non albicans* a une CMI inférieure à la CMI de la souche de référence.

3 souches *C.albicans* présentent des CMF comparables à la CMF de la souche de référence.

4 souches *C.albicans* présentent des CMF supérieurs à la CMF de la souche de référence.

Une souche *C.albicans* présente une CMF inférieure à la CMF de la souche de référence.

Une souche *C.non albicans* présente une CMI identique à la CMI de la souche de référence.

Les deux souches *C.non albicans* ont des CMI supérieures à la CMI de la souche de référence.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'Eloy et ses collaborateurs (2006) qui ont montré que les CMI de l'amB varient de 0,047 à 1 µg/mL.

Le comité national pour l'élaboration des standards de laboratoire (NCCLS, 1997) propose comme valeur consensus (CMI) pour *Candida* 2 µg/mL, au delà de laquelle on peut envisager qu'une souche de *Candida albicans* est résistante.

Les laboratoires Biomérieux (France) recommandent que les concentrations minimales inhibitrices critiques en l'amB vis-à-vis *Candida* en catégorie clinique supérieure ou égale à 2µg/mL suggèrent une résistance. Comme nous avons obtenu des CMI inférieures à 2µg/mL, nous pouvons considérer que la totalité de nos souches sont sensibles à l'amB.

3- Détermination de CMI et CMF du voriconazole:

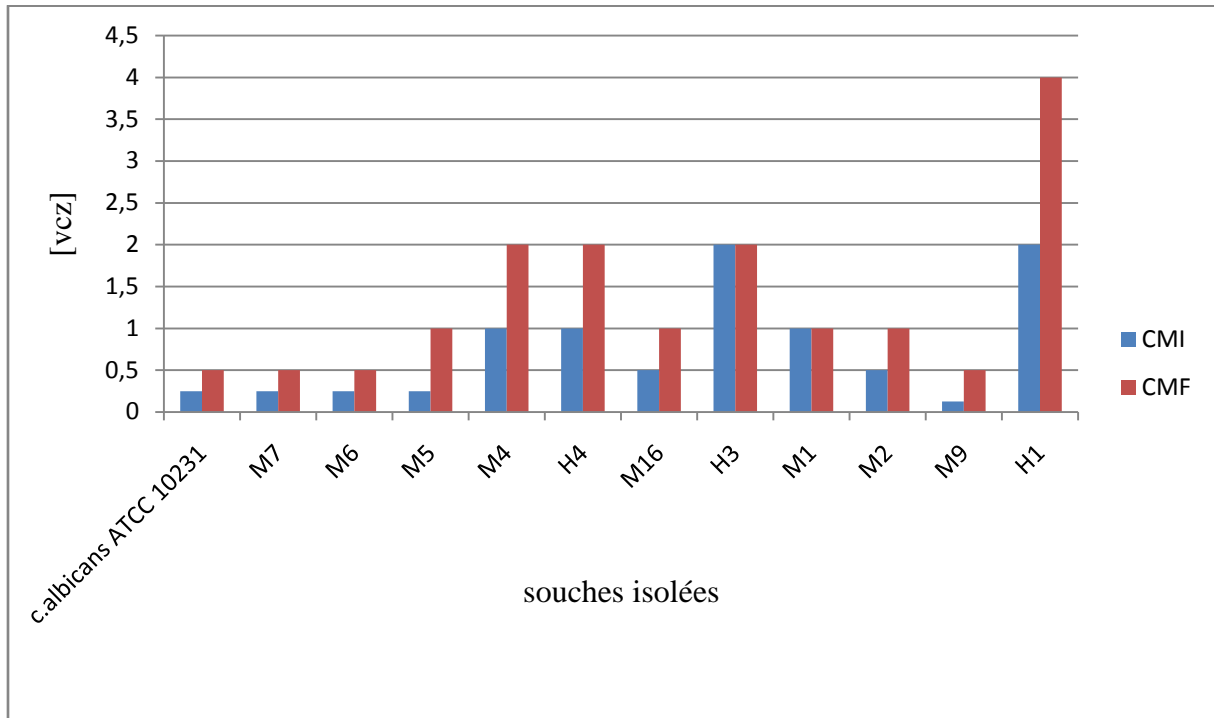


Figure 2 : CMI et CMF (µg /ml) du voriconazole envers les levures.

La souche de référence *C.albicans* 10231 présente une CMI de 0,25 µg/mL et une CMF de 0,5 µg/mL.

Pour les souches *C.albicans* les CMI sont de 0,25 µg/mL vis-à-vis de 3 souches, 1 µg/mL vis-à-vis de 2 souches, 0,5 µg/mL vis-à-vis de 2 souches, 0,125 µg/mL vis-à-vis d'une souche.

Pour les souches *C.albicans* les CMF sont de 0,5 µg/mL vis-à-vis de 3 souches, 2 µg/mL vis-à-vis d'une souche, 1 µg/mL vis-à-vis de 4 souches.

Pour les souches *C. non albicans* les CMI sont de 1 µg/mL vis-à-vis d'une souche, 2 µg/mL vis-à-vis de 2 souches.

Pour les souches *C.non albicans* les CMF sont de 2 µg/mL vis-à-vis de 2 souches, 4 µg/mL

vis-à-vis d'une souche.

3 souches *C.albicans* présentent des CMI identiques à la CMI de la souche de référence.

Les 4 souches restantes ont des CMI supérieurs à la CMI de la souche de référence.

Une souche a une CMI inférieure à la CMI de la souche de référence.

Les souches *C.non albicans* présentent des CMI supérieurs à la CMI de la souche de référence

3 souches *C.albicans* présentent des CMF identiques à la CMF de la souche de référence.

5 souches *C.albicans* présentent des CMF supérieurs à la CMF de la souche de référence.

Les souches *C. non albicans* ont des CMF nettement supérieurs à la CMF de la souche de référence.

Le comité internationale des standards de laboratoire (CLSI, 2008) propose comme valeurs consensus vis-à-vis du voriconazole pour la CMI 1 µg/mL pour *Candida* au delà la souche est dite résistante.

Comme *C.albicans* est une espèce naturellement sensible aux antifongiques, malgré quelques descriptions de cas de résistance sous traitement (Ruhnke et al. 2000).

Le fait que l'espèce *Candida albicans* reste très sensible au cours du temps vis-à-vis des différents antifongiques est une donnée établie dans la littérature (Pfaller et coll., 2008 ; Pfaller et coll . 2010c)

Bien que les résistances acquises aux antifongiques soient rares chez les levures du genre *Candida*, la détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice) reste intéressante notamment en cas d'échec thérapeutique ou d'isolement d'espèce rare. (Garey et al. 2006 ; Morrelle et al. 2005).

La CMI de l'amphotéricine B, fongicide sur les levures, correspond à la première cupule ou la pousse est inhibée de 100% selon le CLSI.

Pour les les azolés, la CMI est lue au niveau de la cupule ou la pousse est inhibée de 50% par rapport à la cupule témoin (Canton et al. 2009).

Historiquement, l'amphotéricine B était le traitement utilisé en première intention lors d'un épisode de candidémie. Ce traitement a été supplanté par la classe thérapeutique des azolés du fait d'une meilleure tolérance ainsi que par l'apparition d'une nouvelle classe

d'antifongiques, les échinocandines, classe dotée d'un large spectre associé à un bon profil de tolérance (Laurent, 2003)

Dans les principales études menées en Europe, la fréquence de la résistance de *C.albicans* est extrêmement faible, la résistance à l'amphotéricine B étant également exceptionnelle (Tortorano et al. 2006)

De même, une étude portant exclusivement sur les espèces rare de *Candida* révèle que la quasi-totalité de ces espèces sont sensibles à tous les antifongiques. (Diekema et al. 2009)

Le voriconazole a été étudié de manière extensive, dans de nombreux essais cliniques randomisés d'infections fongiques invasives. Ceci a permis au voriconazole d'avoir un rôle de premier choix dans le traitement de l'aspergillose invasive, la fusariose et la scédosporiose et de constituer une alternative dans le traitement des candidoses invasives réfractaires ou résistantes au fluconazole. (Aoun, 2004)

Le voriconazole s'est aussi révélé plus actif que l'AmB et contre toutes les espèces de *Candida* exceptée *C. glabrata* (Marco et coll., 1998)

L'évolution des pratiques thérapeutiques montre également un abandon progressif de l'amphotéricine B et du voriconazole comme traitement principal utilisé en cas de candidémie (Horn et coll., 2009 ; Sendid et coll., 2006 ; Tortorano et coll., 2004)

Quatrième partie :
Conclusion générale

Les infections nosocomiales d'origine bactériennes liées aux implants médicaux, notamment les cathéters, font l'objet d'intenses recherches depuis longtemps laissant dans l'ombre les infections fongiques et plus particulièrement celles causées par *Candida albicans*.

Notre travail a porté sur la détermination de la concentration minimale inhibitrice et fongicide de l'amphotéricine B et du voriconazole vis-à-vis des levures isolées du CHU de tlemcen.

Il ressort de notre étude que :

-Les souches M7, M6, M5, M4, H4, M1, M2, M9, H1 étaient sensibles à l'amphotéricine B sauf les souches M16, H3 étaient résistantes.

-Les souches M7, M6, M5, M4, H4, M1, M2, M9, M16 étaient sensibles au voriconazole sauf les souches H3, H1 étaient résistantes.

La prévention des infections liées aux cathéters est obligatoire, elle s'appuie sur un trépied de base :

-le lavage soigneux des mains avec le respect de l'asepsie.

-la référence à des protocoles écrits, simples et régulièrement enseignés.

-l'adhésion de l'ensemble de l'équipe soignante aux règles d'hygiène et aux protocoles de soins

La recommandation essentielle tient dans la limitation des indications et de la durée du cathétérisme, les manipulations sur les lignes de perfusion doivent être réduites au minimum.

En fin, il faudrait une prise de conscience de tout le personnel médical et paramédical et une discipline en matière d'hygiène et d'asepsie dans tout geste thérapeutique pour espérer réduire un maximum ces infections redoutables qui mettent en péril le pronostic vital des malades.

Pour compléter cette étude, il serait souhaitable de développer des stratégies de traitement qui doivent être réévaluées en tenant compte des caractéristiques épidémiologiques locales.

Ceci peut être réalisé par :

-la prise en charge des infections nosocomiales dues aux autres souches de *Candida* ainsi qu'aux autres germes fongiques.

-l'évaluation des biofilms fongiques, surtout ceux de *Candida albicans*, pour percer le mystère de ce monde de micro-organisme et arriver à mettre au point de nouvelles molécules thérapeutiques efficaces contre ces biofilms.

Cinquième partie :
Références bibliographiques

- 1-Abbès S., Sellami H., Sellami A., Makni F., Mahfoudh N., Makni H., Khaled S. and ayadi A. (2011) Microsatellite analysis and susceptibility to FCZ of *Candida glabrata* invasive isolates in Sfax Hospital, Tunisia,. *Med Mycol*; 49: 10-15.
- 2-Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O *et al.* The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1122-8.
- 3-Affect : association française des enseignants de chimie thérapeutique. Traité de chimie thérapeutique : principaux antifongiques et antiparasitaires. Paris: Tec et Doc, 1999. 174 p.
- 4-Andes D Nett J, Oschel P Albrecht R, Marchillo K., (2004) Development and characterization of an *in vivo* central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect Immun* 72:6023-6031
- 5-Aoun M. Voriconazole: a new weapon against invasive fungal infections *Rev Med Brux* 2004 ; 25 : 166-71
- 6-Arendrup, M. C., 2010 Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16: 445-452
- 7-Bassetti M., Taramasso L., Nicco E., Molinari M. P., Mussap M. and Viscoli C. (2011) Epidemiology, Species Distribution, Antifungal Suscetibility and Outcome of Nosocomial Candidemia in a Tertiary Care Hospital in Italy. *PLoS ONE*; 6: e24198
- 8-Blankenship JR, Mitchell AP (2006) How to build a biofilm : a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* 9: 588-594.
- 9-Bouchara, J., M.Pihet, L. De Gentile , B. Cimon and Chaabasse, 2010 Les levures et levurose.
- 10-Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32 Suppl 2: S87-91.
- 11- Bretagne S : Nouveaux antifongiques et nouvelles stratégies thérapeutiques dans les aspergilloses et candidoses invasives. *Antibiotiques*, 2005, 7: 5-15.
- 12- Calderone, R.A.and Braun, P. C. , Adherence and receptor relationships of *candida albicans*. *Microbiol Rev* 1991 .55 : 1-20

- 13-Calderone, R., (2002) *Candida et candidiasis*.
- 14- Calop J., Limat S., Fernandez C. *Pharmacie clinique et thérapeutique*. 3^{ème} éd. Paris : Elsevier Masson, 2008, 1308 p.
- 15-Camille, S. P., (2013) Les antifongiques azolés : Utiles et efficaces mais non dénués de danger. Adaptation de la thérapie antifongique chez une patiente atteinte d'histoplasmosse
- 16-Canton E, Espinel-Ingroff A, Peman J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; **7**: 107-19.
- 17-Carbon C., Regnier B., Saimot G., Valide J.L. and Yeni P. (1994) Antifongiques : données générales. *Ed. Médecine Science Flammarion*: 449-461
- 18-Chabasse, D., Guiguen, C., Contet-Audonneau, N., 1999. *Abrégés de mycologie médicale*. Éditions Masson, Paris, Fr.
- 19- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P., Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998. **62**: 130-180.
- 20- Chandra J. Kuhn. D. M, Mukherjee P. K, Hoyer L. L, McCormick T. and Ghannoum M. A. (2001a) Biofilm formation by the fungal pathogen *candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of bacteriology*; **183**(18):5385-5394.
- 21-CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed., Approved standard M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA*. 2008.
- 22-Das I., Nightingale P., Patel M. and Jumaa P. (2011) Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. *International Journal of Infectious Diseases*; **15**: e759-e763
- 23-Delaunay P. Fissore C. : Interactions médicamenteuses des antifongiques systémiques. *Journal de Mycologie Médicale*, 2006, **16**: 152-158.
- 24-Denning DW (2003). Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* **362**:1142-1151.
- 25-Develoux M, Bretagne S. Candidoses et levures diverses. *EMC Maladies Infectieuses* 2005; **2** : 119–139.

- 26-Diekeman, D. J., S. A. Messer, L. B. Boyken, R. J. Hollis, J. Kroeger et al., 2009 In vitro activity of seven systematically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol* 47: 3170-3177.
- 27-Diggiovine B., Chenoweth C., Watts C., and Higgins M. (1999) The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J respire crit*; 160:976-981.
- 28-Diskin C. J. (2008) Heparin, biofilms, and catheter-related sepsis. *Dianostic Microbiology and infectious Disease*; 61: 80-81.
- 29-Donlan R.M., (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*; 8:881-890.
- 30-Douglas L.J. (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Revlberoam Micol*; 19: 139-143.
- 31-Douglas L.J (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11:30-36.
- 32-Éloy O., Blancb V., Pina P., Gaudart A., Bressolle M.-L., Plainvert C., Decousser J.-W., Pagon B., Allouch P.-Y. (2006) le Collège de bactériologie virologie hygiène., (C0IBVH). Épidémiologie des fongémies dans les hôpitaux français non universitaires en 2004 : enquête multicentrique C0IBVH. *Pathologie Biologie*; 54 523 – 530
- 33-Ferreira A. V., Prado C.G., Carvalho R.RDias., K.S.T. and Dias A.L.T. (2013) *Candida albicans* and Non *albicans Candida* Species: Comparison of Biofilm Production and Metabolic Activity in Biofilms, and Ptative Virulence Properties of Isolates from Hospital Environments and Infections. *Mycopathologia*; 175: 265-272.
- 34-Garey, K. W., M. Rege, M. P . Pai, D. E. Mingo, K. J. Suda et al., 2006 Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia : a multi- institutionnal study *Clin Infect Dis* 43 : 25-31.
- 35-Gauzit R. Epidémiologie et facteurs de risque des candidoses systémiques en réanimation. *Ann. Fr. Anesth. Réanim.*, 2001, 20: 394-399.
- 36-Granier F: les infections fongiques invasives. *La presse médicale*, 2000, 29 :2051.

- 37- Granier F : Antibiotiques : classes thérapeutiques, mécanismes d'action, problèmes de résistance. *Antibiotiques*, 2003, 5: 39-48.
- 38-Guery, B. P., M., C. Arendrup, G. Auzinger, E. Azolay, M. Borges S A et al., 2009a Managements of invasives candidiasis and candidemia in adult non neutropenic intensive care unit patients: Part I. Epidemiology and diagnosis. *Intensive Care Med* 35: 55-62.
- 39-Hall-Stoodley L., Costerton J. W. and Stoodley P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infection diseases. *Nat Rev Microbiol*; 2:95-108.
- 40-Harry J.B., Song J.L., Lyons C.N. and white T.C. (2002) Transcription initiation of genes associated with azole resistance in *candida albicans*. *Med Mycol*; 40: 73-81.
- 41-Hawser, S. P. and Douglas L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother*; 39 :2128-2131.
- 42-Hazen E.L., Brown R., (1950). Fungicidin, an antibiotic produced by a soil actinomycete. *Proc. Soc. Exp. Biol., (NY)*. **76** : 93-97.
- 43-Hennequin C. (1996) Epidémiologie des mycoses invasives. L'expérience d'un centre hospitalo-universitaire parisien. *Rev Méd Interne*; 17: 754 - 760.
- 44-Herbrecht R., Nivoix Y., Fohrer C. et al.: Management of systemic fungal infections: alternatives to itraconazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56: i39-i48.
- 45-Hincky-Vitrat V. : Les antifongiques systémiques. Clinique maladies infectieuses-CHU Grenoble, 2011.
- 46-Hoang L.M.N., Maguire J.A., Doyle P., Fife M. and Roscoe D.L. (2004) *Cryptococcus neoformans* infections at vancouver Hospital and Health science centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *Journal of Medical Microbiology*; 53:935-942.
- 47-Hochart S, Barrier F, Durand-joly I, Horrent S, Decaudin B, Odou P.: Les antifongiques systémiques: Partie 1: éléments pharmaceutiques. *Le Pharmacien Hospitalier*, 2008, 43 : 103-109.
- 48-Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ *et al.* Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 1695-703.

- 49-Hot A., Mittaine B. and Dupont B. (2007) Infections fongiques invasives du grand prématuré. *Journal de Mycologie Medicale*; 17: 33 - 41.
- 50-Ischibashi, K., Yoshida, M., Nakabayashi, I., Shinohara, H., Miura, N. N., Adachi, Y. and Ohno, N., Role of anti-beta-glucan antibody in host defense against fungi. *FEMS ImmunolMed Microbiol* 2005. 44: 99-109.
- 51-Jabra-Rizk M.A., Falkler W.A and Meiller T.F., (2004) Fungal Biofilms and Drug Resistance, *Emerging Infectious Diseases*; 10(1): 14-19.
- 52-Jones, J. M., Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *Clin Microbiol Rev* 1990.3:32-45.
- 53-Kaur R., Goyal R., Dhakad M.S., Bhalla P. and Kumar R. (2014) Epidemiology and Virulence Determinants including Biofilm Profile of Candida Infections in an ICU in a Tertiary Hospital in India. *Journal of Mycology*; 1-8
- 54-Kibbler C. (2007) Evolution de l'épidémiologie des candidoses et aspergilloses invasives *Médecine et maladies infectieuses* ; 37 :2-7.
- 55-Kirkiacharian S., Guide de chimie médicinale et médicaments : conception, structure, synthèse, pharmacochimie, mode d'action et activité des médicaments. Paris-Cachan : Ed. Tec Doc, 2010, 869p.
- 56-Kullberg, B.J., S.G. Filler. 2002. *Candida and candidiasis*. ASM Press.
- 57-Kyle, A. A., Dahl, M.V. Topical therapy for fungal infections. *Am J Clin Dermatol* 2004; 5(6):443-51.
- 58-Lacroix C., Dubach M., Feuilhade M. (2003) Les échinocandines une nouvelle classe d'antifongiques, *Médecine et maladies infectieuses*, Elsevier.
- 59-Lanternier, D (2013) travaux pratiques de biologie des levures .Ellipses :43-49.
- 60-Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Murgui, A. and Martinez, J.P., Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens.*FEMS Immunol Med Microbiol* 2004. 41: 187-196.
- 61-Lortholary O., Tod M., Dupont B.: *Antifongiques*. EMC- Maladies infectieuses, 1999, 1-21.

- 62-Laurent , T.(2003)Th: Epidemiologie des candidemies au CHU de Nantes Etude retrospectives (2004, 2010)
- 63-Marco F, Pfaller MA, Messer SA, Jones RN : Antifungal activity of a new triazole, voriconazole (UK-109,496) compared with three other antifungal agents tested against clinical isolates of filamentous fungi. *Med Mycol* 1998 ; 36 : 433-6
- 64-Maruyama J, Juvvadi PR, Ishi K, Kitamoto K (2005) Three-dimensional image analysis of plugging at the septal pore by Woronin body during hypotonic shock inducing hyphal tip bursting in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 1081-1088.
- 65-Mateus C., Crow S.A., J r., and Ahearn D.G. (2004) Adherence of *Candida albicans* to silicone induces immediate enhanced tolerance to Fluconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 48(9): 3358-3366.
- 66-Miao H., Minquan D., Mingwen F. and Zhuan B. (2007) In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms, *Mycopathologia*, 163: 137-143.
- 67-Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Iyata-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., Jouault, T., Trinel, P.A. and Poulain, D., Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein betamannosylation. *J Biol Chem*. 2004. 279: 47952-47960.
- 68-Morrell, M., V. J. Fraser and M. H. Kollef, 2005 Delaying the empiric treatment of candida blood bloodstream infection until positive culture results are obtained : a potential risk factor hospital mortality. *Antimicrob Agents chemoter* 49 : 3640-3645.
- 69-Nakagawa, Y., Ohno, N. and Murai, T., Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes. *J Infect Dis* 2003. 187: 710-713.
- 70-NCCLS.National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. NCCLS Document M27-A. Wayne PA., national committee for Clinical Laboratory Standards ,1997.

- 71-Netea MG, BGD, Kullberg BJ, Gow NAR (2008) an integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nature Reviews Microbiology* 6: 67-78.
- 72-Nett J.E.Guite K.M., Ringeisen A., Holyda K.A. and Andes D.R. (2008) Reduced Biocide Suscetibility in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;52(2):3411-3413.
- 73- Odds, F. C., Brown, A. J. P., Gow, N. A. R., 2003. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology* 11, 272-279.
- 74-Ortega, M., F. Marco, A. Soriano, M. Almela, J.A. Martinez et al., 2011 candida species bloodstream infection : epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* 77 : 157-161
- 75-Paugam A., Baixench M.T., Taieb F., Champagna C.C.and Dupouy-camet J., (2010) Emergence de candidémies à *candida parapsilosis* à l'hopital cochin. Caractérisation des isolats et recherche de facteurs de risque. *PatholBiol* 59(1) :44-47.
- 76-Pfaller, M. A., Diekema, D. J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews* 20(1): 133-163. 20.
- Scholer H.J. and Polak A. (1984) Resistance to systemic antifungal agents. *Antimicrobial Drug Resistance. Academic Press Inc.*; 23: 398-401
- 77-Pfaller MA, Diekema DJ, Ostrosky-Zeichner L *et al.* Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against caspofungin, anidulafungin, and micafungin: analysis and proposal for interpretive MIC breakpoints. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2620-9.
- 78-Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D.L . Gibbs, V.A. Newall, D. Ellis et al., 2010c results from the ARTEMIS DISK Global antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007 : a 10.5- year analysis of suscetibilities of candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol* 48 : 1366-1377.
- 79-Pierce C. G., Uppuluri P., Tristan A. R., Wormeley F. L. Jr, Mowat E., Ramage G. and Lopez-Ribot J.L.(2008) A simple and reproductible 96-Well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*;3 (9) : 1494—1500. DOL: 10.1038/nprot. 2008. 141.

- 80-Poulain, D. and Feuilhade-de-Chauvin, M., Candidoses et levures diverses : 1995.
- 81-Ramage G., Bachmann S., and Patterson T.F., Wikes B.L. and Lopez.Ribot J.L. (2002a) Investigation of multidrug efflux pumps in relation to Fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemoter*;49:973-980.
- 82-Raoult D., (1998) Dictionnaire de maladies infectieuses, Diagnostic, Epidemiologie, Répartition géographiques, Taxonomie, Symptomatologie. Elsevier
- 83-Richard ML, Nobile CJ, Bruno VM, Mitchell AP (2005) *Candida albicans* biofilms-defective mutants. *Eukaryot Cell* 4: 1493-1502.
- 84-Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R., Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* 2006. 6:14-29.
- 85-Ruan SY., Huang Y. T., Chu C.C., Yu C.J. and Hsueh PR.(2009) *Candida glabrata* fungaemia in a tertiary centre in Taiwan: antifungal susceptibility and outcomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*; 34: 236-239.
- 86-Ruhnke, M., A. Schmidt-Westhausen and J.Morschhauser, 2000 Development of simultaneous resistance to fluconazole in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* in patient with AIDS *J Antimicrob Chemoter* 46 : 291-295.
- 87-Sahiner F., Ergunay K., Ozyurt M., Ard ç N., Hosbul T. and Haznedarolu T (2011) Phenotypic and genotypic identification of *Candida* strains isolated as nosocomial pathogens. *Mikrobiyol Bul*; 45: 478-88.
- 88-Saidi S., Luitaud C. and Rouabhia M. (2006) *In vitro* synergistic effects of farnesol and human gingival cells against *Candida albicans*. *Yeast*; 23: 673-687.
- 89-Samaranayake L.P, Fidel P.L., Naglic J.R., Sweet S.P., Teanpaisan R., Coogam M.M., Blignaut E. and Wanzala P., (2002) fungal infections associated with HIV infection. *Oral Dis*; 2:151-160.
- 90-Sanglard, D., F. Ischer, T. Parkinson, D. Falconer, and J. Bille. 2003. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 2404–2412.

- 91-Scholer H.J. and Polak A. (1984) Resistance to systemic antifungal agents. Antimicrobial Drug Resistance. *Academic Press Inc.*; 23: 398-401
- 92-Sendid B, Cotteau A, Francois N *et al.* Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 80.
- 93-Shepherd, M.G., Cell envelope of *Candida albicans*. *Crit Rev Microbiol* 1987. 15:7-25.
- 94-Sudbrey, P., N. Gow and J. Berman, 2004 The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 12: 317-324.
- 95-Surarit, R., Gopal, P.K. and Shepherd, M. G., Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans* . *J Gen Microbiol* 1988. 134: 1723-1730.
- 96-Tellaa, J. L., (2013) *Mycologie generals et Médicales*. ED Masson. Paris ; 107-120
- 97-Tortorano, A. M., J. Penam, H. Bernhardt, L. Klingspor, C. C. Kibbler *et al.*, 2004 Epidemiology of candidaemia in europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 23: 317-322.
- 98-Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L & Grillot R (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 27: 359-366.
- 99-Tronchin, G., Poulain, D., D., Herbaut, J. and Biguet, J., Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. Fluorescence and ultrastructural studies. *Eur J Cell Biol* 1981. 26: 121-128.
- 100-Van Bambeke F. : Antifongiques. *FARM* 2233-2011-2012.
- 101-Vandeputte P.: Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*-168p. Th : Biologie des organismes : Angers : 2008 ; 930.

102-Wesenberg-Ward K. E., Tyler B. J .and Sears J. T. (2005) Adhesion and biofilms formation of *Candida albicans* on native and Pluronic-treated polystyrene, *Biofiims 2*: 63- 71, *Cambridge University Press*. DOI: 10.1017/S1479050505001687

103-Wingard, J. R., Leather, H., 2004. A new era of antifungal therapy. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 10, 73-90.

104-Yu S., Chai X., Hu H., et al.: Synthesis and antifungal evaluation of novel triazole derivatives as inhibitors of cythochrome P45 14 alpha-demethylase. *European journal of medicinal chemistry*, 2010, 45: 4435-4445.