

## CHAPITRE IV.

## **4. CHAPITRE IV. LA RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES EST-ELLE MARQUEUR DE PATHOGENICITE ?**

### **4.1. INTRODUCTION.**

L'étude de la sensibilité *in vitro* a été réalisée afin de savoir si les souches avaient une sensibilité différente selon qu'elles étaient environnementales, invasives ou colonisantes.

### **4.2. MATERIEL ET METHODES .**

#### **4.2.1. Souches d'*Aspergillus fumigatus* : origines.**

Cent six souches d'*A. fumigatus* ont été sélectionnées de la façon suivante: 81 isolats cliniques de patients colonisés, 18 isolats cliniques de patients ayant développé une aspergillose invasive et 7 souches issues de l'environnement. De plus, 3 souches de référence d'*A. fumigatus* ont été incluses provenant de l'Institut Scientifique de la Santé publique (ISSP), Département de Microbiologie, Section de Mycologie avec les références suivantes: IHEM 5734, IHEM 6149, et IHEM 13935 (itraconazole-résistante).

Les souches de l'environnement ont été collectées au centre Hospitalier Universitaire du Sart-Tilman (au laboratoire, dans des chambres de patients et dans les couloirs).

Par contre, pour les souches invasives et les souches de colonisation, comme la collection n'était pas suffisante, 20 souches supplémentaires ont été obtenues auprès du service de Microbiologie des Cliniques Universitaires de Mont Godinne (Yvoir).

#### **4.2.2. Culture des souches d'*A. fumigatus*.**

Les souches sont soit conservées à +4°C pour un temps limité (quelques semaines), soit congelées dans du lait écrémé à -80°C.

Elles sont cultivées sur Sabouraud-dextrose-agar (Oxoid, Unipath LTD, Basingstoke, UK), selon les recommandations du document NCCLS M38-P (114) c'est-à-dire repiquées deux fois sur ce

milieu afin de s'assurer de leur vitalité. Les cultures sont incubées 48 heures à 35°C, puis placées à 28°C de façon à obtenir des spores en quantité abondante.

### **4.2.3. NCCLS M38-P.**

Les tests ont été réalisés en microdilution selon la technique de référence NCCLS M38-P (114).

#### **4.2.3.1. Milieu de culture.**

Le milieu utilisé est le RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Gibco BRL, Life technologies, USA) tamponné avec du MOPS (3[N-Morpholino] propane sulfonic acide) (Sigma, St Louis, USA). La préparation de ce milieu de culture est détaillée dans l'annexe 7 « milieux de culture ».

#### **4.2.3.2. Antifongiques.**

Quatre antifongiques ont été testés: amphotéricine B (AmB), itraconazole (Itra), voriconazole (Vor) et posaconazole (Posa). Ils ont été fournis respectivement par les fabricants suivants à savoir Bristol-Myers-squibb, USA (AmB), Janssens Pharmaceutica (Itra), Pfizer, New-York, USA (Vor), et Schering Plough, Kenilworth, USA (Posa).

Tous les antifongiques ont été dissous dans l'acide diméthyl-sulfonique (DMSO) avant leur dilution dans le RMI tamponné.

Les concentrations testées sont les suivantes: 0.031 à 16 µg/ml pour AmB, Itra et Vor ; et 0.004 à 4 µg/ml pour posaconazole. Les dilutions ont été réalisées de deux en deux à partir de la plus élevée, directement dans la microplaque de 96 puits. Les plaques utilisées sont des plaques stériles à fonds plat, avec couvercle (Greiner, Frickenhausen, Allemagne).

#### 4.2.3.3. Méthodologie.

##### 4.2.3.3.1. Préparation des solutions stock d'antifongiques.

Les solutions stock ont été préparées à la concentration de 12,8 mg/ml c'est-à-dire que l'on pèse 12.8 mg de chaque antifongique que l'on dissout dans 1 ml de DMSO. Elles sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  avant utilisation.

##### 4.2.3.3.2. Préparation des solutions de travail d'antifongiques.

Une dilution au 1/40 est réalisée en prélevant 50  $\mu\text{l}$  de la solution stock que l'on dilue dans 1,950 ml de RPMI tamponné. Elle est suivie d'une dilution au 1/10 toujours dans du RPMI tamponné de façon à obtenir une solution de travail à 32  $\mu\text{g/ml}$ .

##### 4.2.3.3.3. Préparation des suspensions fongiques.

Les spores d'*Aspergillus* sont prélevées grâce à un écouvillon et sont introduites dans 2 à 3 ml de liquide physiologique à 0.025% de Tween 80 (Sigma, St. Louis, USA) de façon à dissocier les spores entre elles. La suspension est ajustée à 0.5 % Mc Farland en utilisant un spectrophotomètre ce qui correspond à 80-82% de transmission. La concentration de spores est alors d'environ  $0.4 \cdot 10^4$  à  $5 \cdot 10^4/\text{ml}$ .

Après 3 minutes de sédimentation afin que les plus gros agrégats se déposent au fond du tube, le surnageant est prélevé à la pipette Pasteur et introduit dans un tube stérile qui est mélangé par Vortex pendant 15 secondes, pour séparer les conidies les unes des autres.

Une dilution au 1/50 est réalisée en prélevant 250  $\mu\text{l}$  de suspension fongique qui sont introduits dans 12.5 ml de RPMI tamponné.

##### 4.2.3.3.4. Préparation des microplaques.

Les microplaques contiennent 96 puits répartis en 8 rangées de 12 puits numérotées de A, B, C, D, E, F, G, H. La distribution du tampon et des solutions fongiques est réalisée sous hotte à flux laminaire jusqu'à introduction de la solution de spores.

Chaque antifongique est testé en double et la moyenne des deux CMI est calculée.

Les rangées A et B sont utilisées pour l'amphotéricine B.

les rangées C et D pour l'itraconazole.

les rangées E et F pour le voriconazole

les rangées G et E pour le posaconazole

Les dilutions sont réparties de la rangée 1 à 10.

Le puits 11 sert de témoin positif de croissance et contient 100  $\mu$ l de RPMI et 100  $\mu$ l de suspension de spores.

Le puits 12 sert de témoin négatif, il contient 200  $\mu$ l de RPMI.

La préparation des dilutions d'antifongiques est réalisée de la façon suivante:

Du puits 1 à 11 : 100  $\mu$ l de RPMI

Puits 1 : 100  $\mu$ l de solution de travail de l'antifongique concerné

Après mélange par aspiration refoulement, un volume de 100  $\mu$ l est repris et déposé dans le second puits et ainsi de suite jusqu'au puits 10, dont les 100  $\mu$ l excédentaires sont jetés. Une dilution de 2 en 2 est ainsi réalisée des puits 1 à 10.

#### **4.2.3.4. Incubation des microplaques.**

Les microplaques sont placées en chambre humide à 35°C pendant 46 à 50 heures.

#### **4.2.3.5. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).**

##### **4.2.3.5.1. Lecture visuelle.**

Deux modes de détermination des CMI ont été employés: la méthode recommandée par le NCCLS c'est-à-dire une méthode visuelle ; la seconde est une méthode de lecture spectrophotométrique à 630 nm.

Scores: les scores utilisés pour l'interprétation sont ceux recommandés par la méthode NCCLS à savoir absence de croissance (score 0) pour l'AmB et 50% de réduction de la croissance du puits témoin positif (score 2) pour les azoles qui sont pour la plupart fongostatiques et pour lesquels on accepte la persistance d'une turbidité au delà de la CMI, car on considère que celle-ci demeure, quelque soit la concentration de l'antifongique.

En fait, pour les azoles, seul l'itraconazole entre dans les recommandations NCCLS, cependant, par assimilation, nous avons adopté les mêmes critères pour les autres azoles.

#### 4.2.3.5.2. Lecture spectrophotométrique.

Pour la lecture spectrophotométrique, le même système de scores a été appliqué. Après soustraction de la valeur du puits témoin négatif, et calcul de la moyenne des deux puits (chaque concentration étant réalisée en double) les densités optiques sont analysées.

En ce qui concerne l'amphotéricine B, la CMI correspond à la valeur du dernier puits dont la densité optique est identique à celle du puits témoin négatif (absence de croissance).

En ce qui concerne les azoles, la CMI correspond à la valeur du dernier puits où la densité optique est inférieure ou égale à 50% de la valeur du puits témoin positif.

#### 4.2.4. Etude statistique.

Pour interpréter les résultats nous avons utilisé les tests statistiques suivants: le test de kappa de Cohen qui permet la comparaison de deux moyennes et les tests Anova 1 et 2 qui permettent également de comparer les moyennes. Le test Anova 1 permet de comparer des moyennes de groupes identiques et le test Anova 2 permet de comparer des moyennes de groupes différents.

### 4.3. RESULTATS.

Toutes les valeurs des CMI obtenues sont présentées dans l'annexe 1.

#### 4.3.1. Moyenne des CMI.

Les résultats figurent dans le tableau suivant :

Tableau IV.1. Moyennes géométriques des CMI des 4 antifongiques vis à vis des isolats d'*A. fumigatus* (n=106) : comparaison entre les lectures visuelles et spectrophotométriques.

Lecture	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm
Moyenne des CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.67	0.64	0.37	0.39	0.27	0.28	0.02	0.01
Ecart ( $\mu\text{g/ml}$ )	0.25-2	0.12-2	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.01-0.12	0.01-0.12

1. Il n'y a pas de différence significative entre les lectures visuelles et spectrophotométriques ( $p < 0.05$ ).
2. Au sein des azoles, le posaconazole a les CMI les plus basses ( $p < 0.001$ ).

#### 4.3.2. CMI<sub>90</sub>.

Les valeurs des CMI<sub>90</sub> figurent dans le tableau suivant. Elles représentent la valeur en deça de laquelle sont situées 90% des résultats de CMI.

**Tableau IV.2. CMI<sub>90</sub> des 4 antifongiques: comparaison entre les lectures visuelle et spectrophotométrique.**

Lecture	Amphotéricine B		Itraconazole		Voriconazole		Posaconazole	
	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm	Visuelle	630 nm
<b>CMI<sub>90</sub> (µg/ml)</b>	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.03	0.03
<b>Ecart (µg/ml)</b>	0.25-2	0.12-2	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.06-1	0.007-0.12	0.007-0.12

Les CMI<sub>90</sub> ont les mêmes valeurs sauf pour l'itraconazole dont la lecture spectrophotométrique est une dilution plus élevée ce qui ne constitue pas une différence significative.

#### 4.3.3. Moyenne géométrique des CMI en fonction de l'origine des isolats.

La moyenne géométrique a été calculée en classant les isolats par origine de façon à voir s'il y avait une différence notable. La moyenne a été calculée uniquement par lecture visuelle qui est le mode de lecture de référence.

**Tableau IV.3. Moyenne géométrique des CMI par lecture visuelle.**

Origine des isolats (n=106)	CMI (µg/ml)	Amphotericine B	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
<b>Environnement (n=7)</b>	Moyenne	0.74	0.37	0.25	0.02
	Ecart	0.5-1	0.125-1	0.125-0.5	0.062-0.015
<b>Colonisation (n=81)</b>	Moyenne	0.61	0.43	0.43	0.02
	Ecart	0.25-2	0.125-1	0.125-1	0.007-0.031
<b>Invasion (n=18)</b>	Moyenne	0.67	0.36	0.27	0.02
	Ecart	0.25-2	0.25-1	0.125-0.5	0.007-0.125

Les moyennes ne diffèrent pas significativement selon l'origine des souches ( $p > 0.05$ ).



#### 4.3.4. Moyenne des CMI obtenues pour les souches témoins.

Les CMI obtenues sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau IV.4. Moyenne des CMI obtenues par lecture visuelle pour les souches contrôles tout au long de l'étude.**

Souches de référence	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Amphotéricine B	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole
<b>IHEM 5734</b>	Moyenne	1	0.125	0.5	0.031
	Range	0.5-1	0.125-0.250	0.25-1	0.015-0.12
<b>IHEM 13935</b>	Moyenne	1	$\geq 16$	0.125	0.5
	Range	0.5-1		0.125-0.25	0.25-0.5
<b>IHEM 6149</b>	Moyenne	0.5	0.25	0.25	0.031
	Range	0.25-1	0.125-0.5	0.125-0.5	0.015-0.062

Les CMI ne diffèrent pas significativement selon l'origine des souches. Ainsi la résistance ou la sensibilité ne semblent pas être un marqueur de pathogénicité.

#### 4.3.5. Souches résistantes mises en évidence.

Parmi les 106 souches, trois souches résistantes vis à vis de l'amphotéricine B ont été isolées.

**Tableau IV.5. Résistance de trois souches d'*A.fumigatus* vis à vis de l'amphotéricine B.**

N° des souches	Origine des souches	Amphotéricine B CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Evolution du patient
<b>16</b>	Invasive	2	Décédé d'aspergillose invasive
<b>23</b>	Colonisation	2	Survie sans traitement
<b>35</b>	Colonisation	2	Survie sans traitement

Aucune souche n'a démontré de résistance vis à vis des azoles mise à part la souche de contrôle itraconazole-résistante.

#### 4.4. DISCUSSION.

Si l'on compare les résultats de cette étude réalisée par la méthode de référence NCCLS M38-P (114) avec ceux publiés dans la littérature, on s'aperçoit que les valeurs obtenues sont très proches.

En effet, pour l'amphotéricine B, deux auteurs obtiennent la même CMI<sub>90</sub> vis à vis de souches d'*A. fumigatus* soit 0.5 µg/ml (94, 64). Quand elles sont exprimées sous forme de moyennes géométriques les valeurs des CMI sont plus variables. Ainsi, Moore et coll. () obtient une moyenne de 0.38 µg/ml sur 50 isolats cliniques d'*A. fumigatus*, ce qui est un peu plus bas que notre valeur moyenne de 0.67 µg/ml mais reste à moins d'une dilution d'écart et ne change pas le profil de sensibilité des souches. Arian et coll. (8) obtient une moyenne de 1.33 µg/ml avec une fourchette de valeurs variant de 1 à 2. Le nombre de souches testées est un peu faible (n=24) et de plus les valeurs sont particulièrement élevées dans l'ensemble puisqu'elles s'échelonnent de 1 à 2 µg/ml. Il faut noter que dans cette étude le milieu de culture, RPMI 1640, est supplémenté avec 2% de glucose ce qui peut, peut-être, expliquer des valeurs de CMI plus élevées.

En ce qui concerne les azoles, nos valeurs sont très proches des CMI publiées dans la littérature sauf pour l'itraconazole, drogue pour laquelle Hennequin et coll. (64) obtient une CMI<sub>90</sub> très basse (0.06 µg/ml) sur 73 isolats cliniques d'*A. fumigatus*. La méthodologie diffère cependant par une incubation plus courte (24 heures), ce qui devrait abaisser les valeurs des CMI et une lecture au score 1 (75% de réduction de la croissance du témoin positif), ce qui devrait par contre hausser ces valeurs. Cette différence ne changerait cependant pas le classement des souches parmi les souches sensibles.

D'autres auteurs par contre, obtiennent des résultats très proches de ceux observés dans cette étude (8, 48, 94, 101). Manavathu et coll. (94) obtient des valeurs tout à fait identiques pour tous les antifongiques testés, sauf pour le posaconazole pour lequel les valeurs sont 10 fois plus élevées avec une CMI<sub>90</sub> de 0.25 µg/ml, notre valeur étant de 0.03 µg/ml. Comme les valeurs seuil de ce nouvel azolé ne sont pas encore définies, il est difficile de savoir si cette variation changerait le profil de sensibilité.

Pour le voriconazole et le posaconazole les CMI moyennes publiées sont tout à fait superposables aux résultats présentés ici (8, 25). Les CMI de ces deux nouveaux azolés sont significativement

plus basses que celles de l'itraconazole, toutes souches confondues. De plus, les CMI de ces deux azolés sont beaucoup plus basses pour la souche itraconazole-résistante avec 0.125 µg/ml pour le voriconazole et 0.5 µg/ml pour le posaconazole même si ce dernier montre une CMI dix fois plus élevée par rapport à la moyenne (0.02 µg/ml).

Dans la littérature, seule une augmentation de 2 à 3 fois la CMI moyenne du posaconazole est rapportée pour les souches itraconazole-résistantes (94). En ce qui concerne le voriconazole, Arikan et coll. (8) obtient une bonne activité *in vitro* sur les souches itraconazole-résistantes avec une CMI moyenne de 0.18 µg/ml sur 2 isolats d'*A. fumigatus* itraconazole-résistants. L'efficacité clinique ne peut cependant pas être déduite de ces résultats *in vitro*, car il n'y a pas à ce jour de corrélation entre la sensibilité *in vitro* et *in vivo*.

Par ailleurs, les résultats présentés ici montrent que la standardisation de la méthode NCCLS peut être améliorée par l'utilisation d'un automate pour la lecture de la croissance des souches. Cette technique spectrophotométrique évite la variabilité liée au lecteur et donne une meilleure reproductibilité des résultats. Il n'est pas toujours facile, en effet, d'évaluer à l'œil une réduction de croissance de 50 ou 75 % par rapport à un témoin de croissance. La méthode spectrophotométrique permet d'éviter cet écueil en donnant des valeurs qui sont interprétables dans la majorité des cas. En cas de divergence, il faut cependant refaire le test. Cette étude a nécessité de répéter un test pour un antifongique à 5 reprises, ce qui représente 1,1% des tests et est tout à fait acceptable.

Très peu d'auteurs ont utilisé la lecture spectrophotométrique dans les tests de sensibilité *in vitro* pour *Aspergillus sp.* Dannaoui et coll. (34) a comparé la méthode NCCLS par lecture visuelle et spectrophotométrique à 490 nm sur 180 souches de différentes espèces d'*Aspergillus sp.* vis à vis de deux antifongiques. Il obtient une corrélation de 99% pour l'amphotéricine B et de 95 à 98% selon les espèces, pour l'itraconazole, drogue pour laquelle il utilise le score 1 c'est-à-dire 75% de réduction de croissance.

Une variante colorimétrique a été également appliquée aux tests de sensibilité *in vitro* des champignons filamenteux vis à vis d'antifongiques. Il s'agit en général d'ajouter un sel de tétrazolium qui pénètre dans la membrane des cellules intactes et est transformé en dérivés colorés. La production de ces dérivés est proportionnelle à la quantité de champignons viables dans les puits.

Meletiadis et coll. (101) ont comparé l'utilisation d'un sel de tétrazolium le 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium bromide (MTT) dans les tests de sensibilité *in vitro* et a montré une bonne corrélation avec les méthodes de références NCCLS correspondantes pour les champignons (NCCLS M38-P) et les levures (NCCLS M27-A).

Cependant ces techniques spectrophotométriques ne sont pas très novatrices et ne sont que des variantes très proches de la méthode NCCLS. La question est de savoir si la méthode de référence apporte des résultats corrélés avec la clinique.

En ce qui concerne les résultats de ce travail, peu de différences sont observées sur les 106 souches étudiées, puisque quelque soit l'antifongique testé, les isolats ont des valeurs qui ne diffèrent pas significativement. La corrélation avec les résultats cliniques n'a pas été réalisée, car la plupart des souches ont été collectées tardivement dans le cours de l'aspergillose développée par les patients; il aurait été hâtif de conclure à une absence de corrélation *in vitro-in vivo* alors que l'échec thérapeutique correspondait davantage à un diagnostic tardif et donc une mise sous traitement retardée. D'autre part, comme seule une souche résistante est apparue parmi les souches responsables d'aspergillose invasive, cette étude ne semblait pas nécessaire.

En ce qui concerne l'amphotéricine B, seules trois souches ont une CMI égale à 2, ce qui est à la limite du seuil de résistance admis pour cette molécule. Pour les azoles, aucune résistance n'a été mise en évidence parmi les 106 isolats. Dans la littérature, certains auteurs soulignent l'absence de corrélation entre les tests de sensibilité *in vitro* et l'évolution *in vivo* sur modèle animal (69, 107) et concluent sur l'intérêt limité de réaliser de tels tests pour guider le traitement du patient.

La situation semble différente pour l'itraconazole depuis que Denning et coll. (40), ont décrit trois souches d'*A. fumigatus* itraconazole-résistantes *in vitro*, et *in vivo* sur modèle murin. Les auteurs affirment que les souches sauvages peuvent être naturellement résistantes à cet antifongique et qu'il est nécessaire de réaliser un test *in vitro* avant de mettre un patient sous cet antifongique.

Par ailleurs, les données (non publiées) concernant le voriconazole montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre les tests *in vitro* et l'évolution clinique (Peter Troke, Pfizer, « 6ème TIFI », Prague, 2001). Ainsi, des souches avec des CMI basses peuvent engendrer des infections qui n'évoluent pas favorablement sous traitement et inversement, des infections dues à des souches

avec CMI hautes peuvent être traitées sans problème. Jusqu'à présent, seules des CMI  $\geq 3 \mu\text{g/ml}$  devraient faire renoncer à un traitement par le voriconazole.

Peu de données concernent le posaconazole et encore aucune souche résistante n'a été rapportée.

Très récemment, l'équipe espagnole d'Espinel-Ingroff a publié une étude multicentrique réalisée dans 8 centres sur la sensibilité *in vitro* des *Aspergillus sp.* vis à vis de 4 azoles (itraconazole, posaconazole, voriconazole et ravuconazole) (48). La méthode NCCLS M38-P a été utilisée avec quelques variantes: le milieu RPMI 1640 ou le milieu AM3, supplémentés ou non avec 2% de glucose, une incubation de 24, 48, ou 72 heures et une lecture aux scores 0 ou 2. Les conclusions sont très intéressantes, puisque l'utilisation de la méthode NCCLS M38-P avec le RPMI standard, une incubation de 48 heures et une lecture au score 0 ont donné les meilleures corrélations entre les 8 centres. De plus, cette étude a permis de distinguer les souches itraconazole-résistantes dont la CMI était supérieure à  $8 \mu\text{g/ml}$ . De même, pour le voriconazole, il a été montré que les souches engendrant une infection cliniquement résistante avaient des CMI plus élevées (2 à  $8 \mu\text{g/ml}$ ) que les souches sensibles ( $0.12$  à  $2 \mu\text{g/ml}$ ).

En conclusion, cette étude *in vitro* montre que les CMI les plus basses sont obtenues pour le posaconazole. D'autre part, la lecture spectrophotométrique est très bien corrélée avec la lecture visuelle et peut aisément la remplacer.

A la question, la résistance est-elle un facteur de pathogénicité, il apparaît, dans la mesure où il n'y a pas de corrélation entre les valeurs des CMI et l'origine des souches que le profil de sensibilité d'une souche ne soit en aucun cas un marqueur de pathogénicité.