

INTRODUCTION

L'approvisionnement en quantité et de qualité des médicaments dans les structures sanitaires les plus reculées pose problème du fait de la vente illégale de médicaments et du développement fulgurant de circuits illicites. De là, vient la notion de principe actif du médicament. Ainsi, nous nous posons la question à savoir si le principe est vraiment actif. Sa présence n'implique pas une bonne activité. Il demeure plus que nécessaire de s'assurer de la qualité des médicaments au Sénégal.

A ce propos, le Laboratoire National de Contrôle des médicaments (**LNCM**) a été créé et a pour mission d'assurer le contrôle des médicaments circulants au Sénégal. Il a pour rôle de tester la qualité et l'efficacité des médicaments.

Le but de notre travail était :

- de valider les méthodes de contrôle microbiologique des médicaments antifongiques dans le cadre de la mise en place d'un système d'assurance qualité : déterminer la limite de la répétabilité et de la reproductibilité, la robustesse par rapport à des influences extérieures.
- d'étudier les facteurs influençant l'activité des médicaments antifongiques tels que l'opacité de la suspension fongique, le temps de contact entre la souche de référence (germe fongique) et le médicament, le pH du milieu utilisé et la température d'incubation.

La première partie de ce travail est relative à une étude bibliographique portant sur les agents fongiques, les différentes classes d'antifongiques et les paramètres de validation.

Dans le cadre de l'approche qualitative, la deuxième partie traite de la méthode d'identification et de dosage des médicaments antifongiques les plus utilisés dans les structures sanitaires.

GENERALITES

I/ DEFINITION - HISTORIQUE

1 – DEFINITION

Les médicaments antifongiques sont des substances naturelles (microbiologie) semi-synthétiques ou synthétiques (chimie) capables d'inhiber ou d'arrêter la croissance des champignons sans être toxiques pour l'homme. Ils sont donc utilisés pour lutter contre les infections locales ou profondes à champignons microscopiques.

2 - HISTORIQUE [28]

La chimiothérapie des mycoses date de 1903. Les chercheurs **DAYMOND** et **BEAURMANN** ont préconisé l'iodure de potassium comme remède dans le traitement oral de la sporotrichose. Aux anciens agents chimiques actifs sur les mycoses superficielles comme les sels de métaux lourds (mercure, argent, cuivre, zinc), les métalloïdes (fluore, chlore, brome), les composés à base de soufre, les dérivés benzoïques phénoliques, les quinolones, les colorants, de nouveaux composés à base d'ammonium quaternaire d'acides gras se sont ajoutés les dérivés azolés.

La découverte de 1950 par **Hazen** et **BROWN** de la nystatine (polyène dérivé du mycélium de *Streptomyces noursei*) active par voie orale et locale dans les candidoses (digestives, cutanéomuqueuses) a révolutionné le début de la chimiothérapie antifongique.

Un autre polyène (amphotericine B) fut découvert en 1955 par **Gold** et **Vandeputte**. Il a été isolé de *Streptomyces nodosus*. La griséofulvine produite par *Penicillium griseofulvum* fut découverte par **Oxford** en 1939. Son action sur

les dermatophytes a été démontrée en 1958 par **Gentles** lors d'une administration orale, plus récemment la 5 fluorocytosine (5 Fc), une pyrimidine fluorée fut synthétisée en 1957 par **Duschinsky** et collaborateurs. Son activité antifongique (in vivo) a été démontrée en 1964 par **Grunberg**.

A partir de 1967, les azolés font leur apparition avec comme chef de file le micronazole (1969). Il a été le premier antifongique azolé utilisable par voie orale et intraveineuse.

D'autres azolés possédant des propriétés antifongiques furent synthétisés. Leurs propriétés dépendent du nombre d'atomes d'azotes (N). Nous avons les imidazolés (deux atomes d'azotes) et les triazolés (3 atomes d'azote). Nous avons le kétoconazole (1976), fluconazole et le dernier azolé mis sur le marché l'itraconazole.

L'arsenal thérapeutique des médicaments antifongiques est entrain de s'élargir avec le système de vectorisation lipidique des polyènes (amphotéricine B, nystatine).

Deux grands groupes d'antifongiques se dégagent. Ceux utilisés pour les mycoses superficielles et ceux des mycoses profondes (systémique).

II/ LES AGENTS FONGIQUES

Les caractères utilisés dans l'identification et la classification des levures sont très nombreux. Nous ne détaillerons que les caractères utilisés en pratique courante pour l'identification des levures du genre *Candida* et *Saccharomyces*.

II-1 CARACTERES MORPHOLOGIQUES

Ils sont très importants à préciser pour l'identification des levures. Certains éléments peuvent être caractéristiques d'un genre ou même d'une espèce [1, 17].

II-1-1 Mode de reproduction végétative

Nous avons le mode par bourgeonnement : c'est le mode de reproduction le plus fréquent. Une évagination apparaît à un point de la cellule mère. Le bourgeon grandit peu à peu et forme une nouvelle cellule qui se détache de la cellule mère. La microscopie électronique a permis de différencier le bourgeonnement holoblastique (toutes les couches de la cellule mère sont intéressées et il ne peut y avoir qu'un seul bourgeon produit en un même point) propre aux Saccharomycetales, du bourgeonnement entéroblastique (seule la membrane cytoplasmique s'évagine après rupture de la couche externe) caractéristique des basidiomycètes.

Fission : mode de reproduction caractéristique du genre *Schizosaccharomyces* . Il se forme une paroi transversale au grand axe de la levure.

Bourgeonnement sur les sterigmates : la cellule fille naît au sommet d'une protubérance formée sur la cellule mère. Ce mode de reproduction est propre au genre *Sterigmatomyces*.

II-1-2 Caractéristiques des cellules végétatives

II-1-2-1 Morphologie des levures

Les levures ont des formes variées : rondes, ovoïdes, ellipsoïdes, allongées, apiculées, triangulaires. Leur taille varie de 1 à 10µm. Mais la forme et la taille peuvent varier dans les espèces suivantes de souches.

II-1-2-1-1 Milieu liquide

Nous avons la formation d'un sédiment, d'un anneau, d'une pellicule.

II-1-2-1-2 Milieu solide

La texture est crémeuse, muqueuse, coulant.

La couleur est blanche à beige pour la majorité des levures. Un certain nombre de levures produisent des pigments soit caroténoïdes : les colonies sont alors colorées en orange à rouge (*Rhodotorula sp* , *Sporobolomyces sp*). La surface est lisse, rugueuse, cérébriforme. La surface se modifie souvent avec l'âge des colonies.

II-1-2-2 Formation de vraie filamentation , de pseudo-filamentation

Les levures peuvent filamenter dans un certain nombre de cas, soit in vitro, en fonction des milieux utilisés, soit in vivo, (*Candida sp* passant de l'état saprophyte à l'état pathogène).

Nous distinguons deux types de filamentation qu'il est important de savoir reconnaître car ces caractères sont utiles au diagnostic.

- ***La pseudofilamentation :***

Il s'agit en réalité d'une succession de bourgeons allongés, produits en chaînes ramifiées. Chaque bourgeon produit s'allonge d'une certaine longueur sans se détacher de la cellule mère et des bourgeons précédents. La longueur est constante pour tous les bourgeons dans un même filament. Le dernier bourgeon du pseudofilament aura une longueur inférieure ou au plus égale à la longueur des bourgeons précédents. Les parois du pseudofilament ainsi formé ne sont pas parallèles. Il n'y a pas de véritable septation mais uniquement une constriction entre chaque bourgeon. Nous pouvons observer des bouquets de blastospores à l'endroit des constriction.

- ***La vraie filamentation***

Il s'agit de la croissance continue du bourgeon par son extrémité. Les parois du filament sont parallèles. Des cloisons apparaissent secondairement pour séparer les articles. Chaque article a la même longueur. Le dernier article aura une longueur toujours supérieure à celle des articles précédents. Des ramifications peuvent se produire.

II-1-2-3 Arthrospores

Les arthrospores sont des spores formées par certaines levures qui présentent une vraie filamentation. Des cloisons très rapprochés se forment à partir de l'extrémité du filament. Puis le filament se désarticule au niveau des cloisons libérant des «arthrospores» rectangulaires. Le filament prend alors un aspect de zig-zag. Les arthrospores, une fois libérées vont s'ovaliser et sont capables de bourgeonner ou de filamento à nouveau. Ce mode de reproduction est caractéristique du genre *Trichosporon*.

II-1-2-4 Clamydospores et Ballistospores

La formation d'un certain type de clamydospores est particulière de l'espèce *Candida albicans*. Il s'agit de spores rondes, (10 à 15µm), à paroi épaisse qui se forment sur les filaments. Elles sont toujours terminales. Nous ne connaissons pas leur signification, car, contrairement aux clamydospores observées dans d'autres champignons, elles ne filamentent jamais. Nous les obtenons facilement sur des milieux particuliers et servent au diagnostic de l'espèce.

Les ballistospores sont caractéristiques de certains genres de levures : *Sporobolomyces*. Ces spores sont produites au sommet d'une protubérance de la mère et sont éjectées à distance grâce à un mécanisme de «goutte».

II-1-2- 5 Formation de tube de germination

Elle est caractéristique de *Candida albicans* : les levures de cette espèce sont capables de former en moins de 4 heures, un tube de filamentation très mince, sans constriction à la base lorsqu'elles sont incubées dans du sérum à 37°C.

II-1-3 Ultrastructure de la paroi et les cloisons :

Les ascomycètes (tableau I) ont une paroi formée de deux membranes : l'une, externe, fine et sombre, l'autre, interne, large et claire.

Les basidiomycètes (tableau I) ont une paroi formée de plusieurs membranes. L'épaisseur et le nombre de couches varient avec l'âge de la cellule.

Les cloisons des ascomycètes ont un pore simple avec quelques corps de Woronin. Celles des basidiomycètes ont un dolipore avec une cape de réticulum endoplasmique bien développé.

II-1-4 Reproduction sexuée

La forme sexuée, dite **parfaite** ou **téléomorphe** n'existe ou n'est connue que pour un certain nombre de levures. Nous pouvons observer :

- Des asques contenant des ascospores. La morphologie et le nombre d'ascospores est très variable d'un genre à l'autre. Les levures forment des asques nus, sans organes protecteurs.
- Des teliospores, résultant de la conjugaison entre des cellules mâles et des cellules femelles.
- Des basides contenant des basidiospores de formes variables.

La forme asexuée, dite **imparfaite** est appelée **anamorphe**.

Lorsque les **deux formes** coexistent, nous parlons **d'halomorphe**. Ces formes sexuées peuvent être directement observées sur les milieux d'identification usuels, dans le cas de souches homothalliques.

Dans certains cas, il est conseillé de repiquer la levure sur les milieux favorisant la reproduction sexuée. Les milieux les plus couramment utilisés sont le milieu à l'acétate de sodium (MAS) pour *Saccharomyces*. Il faut parfois attendre trois à six semaines à 27°C pour obtenir des formes sexuées.

II-2 CARACTERES PHYSIOLOGIQUES [19]

Les levures produisent l'énergie nécessaire à leur synthèse en oxydant et/ou en fermentant certains composés carbonés et azotés. L'étude de l'utilisation de ces composés est utilisée dans le diagnostic biologique.

II-2-1 Les composés carbonés

Nous étudierons :

- **L'auxanogramme** ou **assimilation** des sucres. Un nombre restreint de sucres est étudié. Nous choisissons ceux qui ont le meilleur pouvoir discriminant.
- **Le zymogramme** ou **fermentation** des sucres (**tableau II**). Pour pouvoir fermenter un sucre, la levure doit être capable de l'assimiler. En pratique courante, nous étudions la fermentation du glucose, du maltose.

II-2-2 Les composés azotés

Les levures sont capables d'utiliser une grande variété de sources d'azote. Un certain nombre de genres de levures sont incapables d'utiliser les nitrates. En pratique courante, nous étudions l'assimilation du nitrate de potassium.

L'hydrolyse de l'urée : si les levures sont pratiquement capables d'utiliser de faibles concentrations d'urée comme seule source azotée, toutes n'ont pas la

possibilité d'hydrolyser de fortes concentrations d'urée en ammonium. Cette capacité, généralement absente parmi les levures ascosporées, est particulièrement marquée par les genres *Cryptococcus* et *Rhodotorula*.

II-2-3 La réduction du tétrazolum

Certaines levures sont capables de réduire les sels de tétrazolum et de les transformer en un composé coloré : le formazan qui, incorporé dans la levure va colorer la colonie. Ainsi, sur le milieu de Sabouraud contenant des sels de tétrazolum, *Candida tropicalis* qui réduit fortement les sels de tétrazolum sera coloré en violet, *Candida albicans*, qui ne les réduit pratiquement pas restera blanc.

II-2-4 La résistance à cycloheximide (actidione)

La cycloheximide est un antifongique qui empêche les moisissures de pousser sur les milieux de Sabouraud contenant ce produit. Certaines levures sont sensibles à ce produit.

D'autres, telles *Candida albicans*, sont résistantes.

II-2-5 L'activité phénoloxydase :

La synthèse de pigments mélaniques à partir de phénols est caractéristique de *Cryptococcus neoformans*. Cette propriété utilisée pour l'identification de cette levure se recherche sur les milieux à base de grains de niger (*Guizotia abyssinica*) ou sur des milieux à l'acide cafeique. Ensemencé sur de tels milieux, *Cryptococcus neoformans* se colore en brun foncé à noir.

II-2-6 La croissance à 37°C

La majorité des levures se développe à une température comprise entre 20 et 28°C. Certaines peuvent pousser jusqu'à 45°C (parmi les genres *Kluyveromyces* ou *Hansenula*).

La possibilité de croissance à 37°C pour une levure est un facteur de pathogénicité pour l'espèce humaine. On peut donc tester la croissance d'une levure à 37°C pour vérifier son pouvoir pathogène.

II-3 CARACTERES BIOCHIMIQUES

Ils ont contribué aux modifications dans la classe des levures.

II-3-1 La composition en base de l'ADN des levures

Dès 1960, plusieurs auteurs étudient la composition en bases de l'ADN (acide désoxyribonucleique) de levures. Ils montrent que c'est la teneur en guanine et cytosine (G + C %) qui est la plus intéressante pour séparer les germes de levures. Les ascomycètes ont une G + C % comprise entre 38 et 54%, chez les basidiomycètes, elle varie de 46 à 63%. La zone limite de chevauchement dépendrait en réalité des techniques utilisées.

II-3-2 La structure du coenzyme Q :

C'est **YAMADA et coll.**, qui, analysant la structure du coenzyme Q (nombre d'unités isoprènes dans la chaîne de la quinone) ont montré que celui-ci variait de Q₆ à Q₁₀. Les ascomycètes possèdent des types Q₆ à Q₈, les basidiomycètes, les types Q₈ à Q₁₀.

II-3-3 Le test au bleu de diazonium :

VAN DER WALT, en 1976, a observé que le bleu de diazonium colore en rouge la paroi des levures basidiomycètes alors qu'il ne colore pas celle des ascomycètes. Le mécanisme de cette réaction n'a pas été élucidé.

II-3-4 Le caryotype des levures :

Les techniques d'analyses moléculaires ont permis d'établir la carte des chromosomes d'un certain nombre de levures. On a démontré, selon les techniques utilisées de 8 à 11 chromosomes pour *Candida albicans*, 5 pour *Candida tropicalis*, 8 à 12 pour *Cryptococcus neoformans* et 9 chromosomes pour *Saccharomyces cerevisiae*.

Il est actuellement possible de déterminer le caryotype électrophorèse des levures par différentes techniques, dont l'électrophorèse en champ pulsé. Ces nouvelles techniques ont un intérêt taxonomique certain puisqu'elles permettent de séparer des espèces entre elles .

II-4 CARACTERES SEROLOGIQUES

La structure antigénique des levures a été étudiée depuis de nombreuses années. C'est en 1960 que **HASENCLEVER** démontre qu'il existe 2 sérotypes pour *Candida albicans* : le plus répandu en Amérique et en Europe, le sérotype B, plus fréquent en Afrique. Des travaux complémentaires ont montré par ailleurs une résistance plus fréquente du sérotype B à la fluorocytosine.

En 1970, les travaux de **TSUCHIYA** et collaborateurs, basés sur la composition des polysaccharides thermostables de la paroi permettent de séparer les levures en 5 groupes antigéniquement indépendants. Ces travaux ont trouvé une application pratique, puisqu' à partir de sérums monospécifiques préparés

chez le lapin, il est possible d'identifier, par simple agglutination sur lame, les principales espèces de levures incriminées en pathologie humaine.

Tableau I : Classification des levures

<p>I/ ASCOMYCOTINA</p> <p><i>Hemiascomycetes</i></p> <p><i>Endomycetales</i></p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Spermophthoraceae</i> : 3 genres- <i>Saccharomycetaceae</i> :<ul style="list-style-type: none">• <i>Schizosaccharomycetoideae</i> : 1genre <i>Shizosaccharomyces</i>• <i>Nadsonioideae</i> : 4 genres• <i>Lipomycetoideae</i> : 1 genre• <i>Saccharomycetoideae</i> : 24 genres dont <i>saccharomyces</i>
<p>II/ BASIDIOMYCOTINA :</p> <p><i>Ustilaginales</i></p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Filobasidiaceae</i> : 3 genres dont <i>Filobasidiella neoformans</i>- Levures formant des teliospores 3 genres <p><i>Tremellales</i></p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Sirobasidiaceae</i> : 2 genres- <i>Tremellaceae</i> : 2 genres
<p>III/ DEUTERROMYCOTINA</p> <p><i>Blastomycetes</i></p> <ul style="list-style-type: none">- <i>Cryptococcaceae</i> : 15 genres dont <i>Candida</i><ul style="list-style-type: none"><i>Cryptococcus</i><i>Malassezia</i><i>Rhodotorula</i><i>Trichosporon</i>- <i>Sporobolomycetaceae</i> : 2 genres

II-5 PRINCIPE DE L'IDENTIFICATION DES LEVURES

II-5-1 Isolement des levures

Il est préférable d'ensemencer systématiquement un milieu Sabouraud-Chloramphénicol-actidione (SCA) en plus du milieu de Sabouraud-chloramphénicol (SC). Il est ainsi plus facile d'isoler *Candida albicans*, quand il y a des levures associées.

La résistance à l'actidione est par ailleurs utilisée dans de nombreuses galeries d'identification. Les résultats obtenus peuvent être discordants avec le résultat de l'ensemencement sur Sabouraud-chloramphenicol-actidione. Cela est dû au manque de standardisation de la concentration en actidione des divers milieux, celle-ci pouvant varier de 0,01 à 0,5%.

C'est **WHIFFEN** (1948) qui, le premier, a montré l'intérêt de ce test pour la séparation de levures en trois groupes : les sensibles (inhibées par des concentrations de 1µg/ml), les modérément sensibles (inhibées à 25µg/ml) et les résistantes (non inhibées par des concentrations au moins égales à 100µg/ml).

Pour **KREGER – VAN – RIJ**, la concentration idéale à utiliser en pratique courante est de 0,1%.

L'examen macroscopique des colonies de levures donne des renseignements utiles. Nous pourrions apprécier la couleur des colonies : blanc, beige ou rouge, la texture et l'aspect qui pourraient déjà évoquer un diagnostic ou la présence d'une association de levures [48].

II-5-2 Identification des levures

Dans un laboratoire d'analyses médicales, les critères d'identification seront d'une part morphologiques, d'autre part physiologiques. Il est indispensable d'associer les deux.

Candida albicans étant la levure la plus fréquente (75% de levures isolées, tous prélèvements confondus), nous essayerons de l'identifier en premier, le plus rapidement possible grâce à des tests spécifiques.

La première étape consiste en l'identification du genre de la levure. Elle est basée sur des caractères morphologiques.

La deuxième étape est l'identification de l'espèce de la levure. Nous utilisons alors les caractères physiologiques.

II-5-2-1 Identification du genre

5-2-1-1 Examen macroscopique de la souche

- Couleur :
 - Rouge saumon : genre *Rhodotorula*
 - Beige, coulante ou brillante : évoquer le genre *Cryptococcus*
 - Blanc autres genres
- Texture et aspect : très variables suivant les espèces et les souches.

5-2-1-2 La recherche de la pseudofilamentation

Elle se fait par repiquage sur milieux spéciaux.

- Rice Agar Tween 80 (RAT) ou Agar Tween 80 (AT),
- Pomme de terre – Carotte – Bile (PCB)

5-2-1-2-1 La technique

- RAT ou AT

Coulons le milieu en boîte de Pétri de 5cm . L'épaisseur du milieu doit être d'environ 5mm.

Ensemençons directement les levures à l'aide d'une pipette stérile, en surface et au centre de la boîte.

Recouvrons d'une lamelle passée à la flamme.

L'incubation se fait à 27°C. La lecture se fait 24 heures après en posant directement la boîte sans le couvercle sur la platine du microscope.

- PCB

Coulons un tube de PCB en boîte de pétri de 5cm.

Ensemençons à l'aide d'une pipette un peu de levures en surface, puis terminons par trois stries en profondeur dans la gélose. Recouvrons d'une lamelle.

La lecture se fait 24 heures après (ou 48 heures) à 27°C, directement sur la platine du microscope.

5-2-1-2-2 Les résultats

Ces milieux favorisent la pseudofilamentation de levures. Au microscope, nous parcourons toute la partieensemencée à l'objectif x 10 en faisant varier la profondeur de champ. Sur PCB, la filamentation se fait en anaérobiose, donc en profondeur dans la gélose, sous la lamelle et le long des stries.

Puis nous passerons à l'objectif x 25 ou x 40 pour mieux préciser la morphologie des levures. A noter, que c'est à l'objectif x 10 que nous reconnaissons le mieux les associations, par une différence de taille ou de morphologie.

Nous pouvons observer :

- Une pseudofilamentation bien développée : genre *Candida* ;
- Une pseudofilamentation et des chlamydospores terminales : espèce *Candida albicans* ;
- Une vraie filamentation avec présence d'arthrospores bourgeonnantes : genre *Trichosporon* ;
- Absence de filamentation : la taille (en mesurant si nécessaire) et la forme des levures
 - Levures rondes ou ovoïdes de petite taille, d'aspect très homogène : genre *Torulopsis*
 - Levures rondes de taille très variable, non jointives : genre *Cryptococcus*
 - Levures rondes ou ovoïdes de grande taille : genre *Saccharomyces*
 - Levures rondes ou ovoïdes de taille moyenne : genre *Saccharomyces* var. *boulardii*

5-2-1-3 Recherche de la reproduction sexuée

Nous recherchons principalement des asques et des ascospores. En effet, la production de basides ne se fait que dans des conditions de culture très particulières. Il est possible, dans certains cas de voir directement des asques sur le milieu RAT ou PCB, lorsqu'il s'agit d'une souche homothallique d'une levure ascomycète.

La levure sexuée la plus fréquente étant *Saccharomyces cerevisiae*. Le repiquage se fait sur le milieu à l'acétate de sodium (MAS), milieu qui favorise la production d'asques.

Après 48 heures d'incubation à 27°C, un simple examen au bleu lactophénol permet de reconnaître facilement des asques contenant de 1 à 4 ascospores, ronde, réfringentes. Il est possible de faire un étalement sur lame et de colorer par la méthode de Wirtz : les ascospores sont colorées en vert, alors que les blastospores sont en rose.

II-5-2-2 Identification de l'espèce

Elle se base principalement sur les caractères d'assimilation et de fermentation de sucres. (tableau II).

5-2-2-1 Auxanogramme : Etude de l'assimilation des sucres

La technique repose sur l'utilisation du milieu Yeast-nitrogen-base (YNB) fondu au bain marie, ramené à 45°C ;

- Préparons une suspension à 10^7 levures/ml de la levure à étudier dans 2ml d'eau distillée stérile ;
- Dans une grande boîte de pétri (d = 15 cm), versons la suspension de levures puis le milieu YNB ;
- Mélangeons le tout, laissons solidifier ;
- Disposons les disques de sucre à la surface de la gélose ;
- L'incubation se fait entre 24 heures à 48 heures à 27°C ;

L'assimilation du sucre se traduit par la croissance de la levure autour du disque correspondant.

5-2-2-2 Zymogramme : Etude de la fermentation des sucres (tableau II)

La technique repose sur l'utilisation d'une batterie de tubes de milieu gélose molle par fermentation ;

- Ajoutons dans chaque tube 1ml de sucre à étudier après avoir fait fondre la gélose. Laissons solidifier ;
- Prélevons une pointe de pipette de la levure et ensemençons chaque tube par piqûre centrale jusqu'au fond du tube.
- L'incubation se fait entre 24 heures à 48 heures à 37°C.

5-2-2-3 Réduction des sels de tétrazolium

Ce test sert à vérifier l'absence d'association de levures ou à confirmer un diagnostic. Il est, en réalité, utile pour différencier *Candida albicans* de *C. tropicalis*, ces deux levures ayant des caractères d'assimilation très proches. Pour les autres levures, ce caractère est souvent variable en fonction de l'origine du milieu ensemencé.

5-2-2-4 Assimilation du nitrate de potassium

La technique est la même que pour l'auxanogramme. Nous utilisons un milieu Yeast Carbon Base (YCB) sur lequel on dépose un disque imprégné d'une solution de nitrate de potassium.

5-2-2-5 Recherche de l'uréase

L'hydrolyse de l'urée doit être recherchée systématiquement pour confirmer le diagnostic du genre *Cryptococcus*. Nous utilisons le milieu urée-indol.

Ensemençons une bonne pointe de pipette de levures dans un tube à hémolyse contenant une ampoule de milieu. L'incubation se fait à 37°C. *Cryptococcus neoformans* fait virer le milieu au rouge fuchsia en moins de 4 heures.

Les autres cryptocoques nécessitent, en moyenne, 24 heures d'incubation.

5-2-2-6 Tests enzymatiques

Fongis creen 4 H[®] permet d'identifier en 4 heures, 4 levures parmi les plus pathogènes et les plus fréquentes : *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *Cryptococcus neoformans*.

Elle se base sur la recherche de 5 enzymes spécifiques, la réduction du tétrazolium, et l'assimilation du tréhalose. L'identification correcte a été obtenue dans 93,6% de 79 levures testées.

II-5-3 Le genre *Candida*

II-5-3-1 Diagnostic du genre

Les cellules sont de formes variables : globuleuses, ovoïdes, cylindriques à allongées. La reproduction se fait par bourgeonnement multilatéral [21]. Le pseudomycelium est absent, rudimentaire ou bien développé. Un vrai mycélium est présent dans quelques espèces. Nous avons une absence de pigmentation qui est visible.

Nous avons aussi une fermentation absente ou présente .

Le genre *Candida* comprend actuellement 196 espèces. Un petit nombre seulement d'entre elles est retrouvé chez l'homme.

II-5-3-2 Les principales espèces

Elles sont répertoriées dans le tableau II en fonction du Zymogramme.

Nous citerons les principales espèces de *Candida* isolées de l'homme

Tableau II : Fermentation des sucres

Espèces	Glucose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose
<i>Candida sensu stricto</i>					
<i>C. albicans</i>	+	v	-	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	v	+	-	-
<i>C. kefyr</i>	+	+	+	-	v
<i>C. krusei</i>	+	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	+	V	+	±	-
<i>C. norvegensis</i>	+	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	+	V	±	±	-
<i>C. rugosa</i>	-	-	-	-	-
<i>C. sake</i>	+	+	V	V	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	v	+	-
<i>C. utilis</i>	+	-	+	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	±	-	-	-	-
<i>Candida ex torulopsis</i>					
<i>C. famata</i>	V	-	V	-	-
<i>C. glabrata</i>	+	-	-	-	-
<i>C. inconspicua</i>	-	-	-	-	-
<i>C. norvegica</i>	V	-	-	-	-
<i>C. sphaerica</i>	+	+	v	v	+

+ = positif

v = variable

- = négatif

II-5-3-3 Diagnostic sérologique

La recherche des anticorps anti *Candida* peut avoir un intérêt pour le diagnostic des candidoses profondes. De nombreuses techniques sérologiques ont été mises au point : immunofluorescence, immunoprécipitation, hémagglutination, ELISA. Des antigènes très purifiés ont été utilisés. Mais les résultats sont relativement décevants pour deux raisons :

- Le manque de spécificité des réactions, dû au saprophytisme de *Candida albicans*
- Le manque de sensibilité chez l'immunodéprimé, terrain favorisant les candidoses profondes.

II-5-3-4 Diagnostic mycologique de *Candida albicans*

L'examen macroscopique montre une colonie blanche, crémeuse, lisse. Certaines souches sont plus rugueuses. Après quelques jours de culture, nous observons des filaments qui s'enfoncent dans la gélose.

L'examen microscopique montre la présence de levures ovoïdes à bourgeonnement multilatéral mesurant de (3 – 6) x (6 – 10)µm. Après 8 à 15 jours, nous avons la présence de pseudofilamentation et de vraie filamentation [1, 5].

5-3-4-1 Méthodes d'identification rapide

En raison de son écologie, *Candida albicans* est la levure la plus fréquemment isolée chez l'homme (66,5% de toutes les levures).

Nous chercherons à l'identifier en premier et le plus rapidement possible par quelques méthodes.

- **Test de blastèse (test de germination ou de Tschadjian)**

Ce test décrit par **Tschadjian** en 1960 est inspiré des travaux de **Reynolds** et **Braune**, qui avaient montré en 1965, que les constituants du sang favorisaient la formation de filaments par certaines levures.

La technique consiste à émulsionner une pointe de pipette de levures dans un tube en verre contenant 1ml de sérum de veau ou autre. Il faut éviter le sérum humain qui contient souvent des anticorps ou des antifongiques. L'incubation se fait à l'étuve à 37°C, 3 à 4 heures maximum. Prélevons une goutte du culot et regardons au microscope entre lame et lamelle. Nous avons aussi une variante : dans une lame, mettons 100µl de sérum de veau. Emulsionnons un peu de levures. Recouvrons d'une lamelle. Incubons 3 à 4 heures à 37°C dans une boîte étanche afin d'éviter la dessiccation.

La lecture se fait directement sous l'objectif du microscope.

➤ **Résultats :**

Si la levure est *Candida albicans*, nous observons un ou plusieurs fins tubes de germination partant de la levure, ne présentant aucune constriction à la base du filament. Le filament peut être cloisonné. Ce test est positif dans près de 86% des cas. Il permet l'identification de *Candida albicans*, en moins de 4 heures. Son principal inconvénient est qu'il n'est pas possible, dans 2/3 des cas de voir d'éventuelles associations. Il est donc vivement recommandé de lui adjoindre la recherche des chlamydospores sur le milieu RAT ou PCB.

- **Méthodes enzymatiques**

Ces méthodes utilisent la détection d'activités enzymatiques caractéristiques des espèces à identifier.

Il existe dans le commerce, une galerie d'identification qui permet d'identifier *Candida albicans* des autres levures. Nous pouvons citer le CHROMagar® *Candida* (CHROMagar) : ce milieu contenant un substrat chromogène permet l'identification présomptive immédiate de *Candida albicans* (vert), *Candida tropicalis* (bleu métallique), et *Candida krusei* (rose pâle).

Encore en évaluation, il semble intéressant pour détecter les associations de levures.

5-3-4-2 Identification du germe

Sur milieu RAT ou PCB, présence en 24 à 48 heures d'une pseudofilamentation bien développée. La filamentation est très longue. A chaque constriction se forment de gros bouquets de blastospores. Dans 95% des cas, nous observons sur ces filaments, une présence de clamydospores. Ce sont des spores globuleuses, à paroi épaisse, mesurant 10 à 15µm, toujours terminales ou latérales.

Elles se forment souvent sur une protubérance de filaments appelée protoclamydospore. Il faut y avoir jusqu'à 3 clamydospores successives. Ces clamydospores sont caractéristiques de l'espèce *albicans*.

Chez des malades sous traitement antifongique, il peut arriver que nous n'observons ni pseudofilamentation, ni clamydospores, alors qu'il s'agit bien de *Candida albican* [12].

Le diagnostic sera posé par l'étude des caractères physiologiques [23].

5-3-4-3 Identification de l'espèce

Elle est indispensable lorsqu'il n'y pas de clamydospores.

➤ Fermentation des sucres

- Glucose, maltose : positive ;
- Galactose : variable ;
- Saccharose, lactose : négative.

➤ Assimilation des sucres

- Galactose, saccharose, maltose, tréhalose : positive
- Cellobiose, lactose, raffinose : négative

➤ Nitrate de potassium : négative

➤ Réduction de tétrazolium : négative

➤ Résistance à l'actidione

5-3-4-4 Sérotype

La recherche de sérotype de *Candida albicans* n'a pas d'utilité en pratique de laboratoire.

II-5-4 Le genre *Saccharomyces*

II-5-4-1 Diagnostic du genre [46]

Il se présente sous forme de levures globuleuses, ellipsoïdales ou cylindriques. Nous avons une pseudofilamentation courte ou rudimentaire. Les ascospores sont globuleuses, à paroi lisse, au nombre de 1 à 4 par asque. La fermentation est rigoureuse. Nous n'avons pas d'assimilation de nitrate.

Parmi les sept levures référencées dans ce genre, seule *Saccharomyces cerevisiae*, utilisée dans l'industrie agroalimentaire, est souvent isolée chez l'homme.

II-5-4-2 Diagnostic mycologique de *Saccharomyces cerevisiae*

L'examen macroscopique montre des colonies blanc à crème, crémeuses, lisses et bombées.

L'examen microscopique met en évidence des levures globuleuses, de grande taille, mesurant de (5 - 8) x (6 – 12) µm.

5-4-2-1 Diagnostic du genre

Sur RAT ou PCB, absence de pseudofilamentation. Néanmoins, certaines souches peuvent présenter une pseudofilamentation courte ou rudimentaire. Il est parfois possible d'observer, sur ces milieux, des asques contenant de 1 à 4 ascospores rondes.

En l'absence d'asques, nous repiquons la souche sur le milieu à l'acétate de sodium (MAS). Sur ce milieu, après 48 heures d'incubation à 27°C, pratiquement toutes les souches forment des asques. Un simple examen au bleu – lactophénol permet de les reconnaître. Les ascospores sont incolores, très réfringentes, alors que les blastospores sont colorées en bleu. Nous pouvons également faire un frottis sur lame et colorer par la méthode de Wirth.

Les ascospores sont colorées en vert, les blastospores en rose.

5-4-2-2 Diagnostic d'espèce

✓ Fermentation des sucres

- glucose très positif
- galactose, saccharose, maltose variables ;
- lactose négatif

✓ Assimilation des sucres

- galactose, saccharose, maltose, raffinose variables ;
- lactose négatif

✓ Nitrate de potassium négatif

✓ Réduction des sels de tétrazolium positive : la colonie prend une couleur rouge

✓ Sensible à l'actidione

III/ LES MEDICAMENTS ANTIFONGIQUES

III-1 CLASSIFICATION

III-1-1 Polyènes [26, 28]

Les deux principaux polyènes utilisés sont l'amphotéricine B (Fungizone*) et la nystatine (Mycostatine*). Plus de 200 molécules à action antifongique élaborées par les actinomycètes appartiennent à cette famille. Elle est caractérisée par un spectre d'absorption aux ultra violets et par un groupe chromophore formé de double liaisons conjuguées (**CH = CH**)_n d'où le nom de polyènes. Ces derniers ont en outre un grand anneau lactone macrocyclique (**figure 1**) et sont dénommées, pour cette raison, macrolides polyéniques. La partie active de ces composés est l'anneau macrolide, avec une partie rigide lipophile et une partie flexible hydrophile [26].

III-1-1-1 Amphotéricine B

1-1-1-1 Propriétés physico-chimiques

L'amphotéricine B est un heptaène (**figure 1**), d'un poids moléculaire de 924,09 ; c'est une poudre jaune insoluble dans l'eau et dans l'alcool, soluble dans les solvants organiques : diméthylsulfoxyde (30 à 40 mg/ml) ou diméthylformamide (4 mg/ml). Combinée à des sels biliaires tel que le dexocholate de sodium, l'amphotéricine B est facilement mise en suspension dans un soluté glucosé isotonique à 5%, réalisant ainsi une suspension colloïdale et non une solution injectable par voie intraveineuse (IV) [14].

La poudre sèche est stable à 4°C en suspension dans un milieu aqueux, il existe une discrète diminution d'activité au bout de 24 heures. L'exposition à la

lumière dégrade légèrement la molécule. Ces deux paramètres sont négligeables en thérapeutique humaine. Un flacon d'amphotéricine B injectable contient 50 mg d'amphotéricine B, 41 mg de desoxycholate de sodium et 25,2 mg de tampon phosphate de sodium.

1-1-1-2 Cibles cellulaires

L'amphotéricine B est une molécule lipophile, insoluble dans l'eau à pH physiologique, qui augmente la perméabilité transmembranaire (notamment des membranes fongiques) aux cations (Na^+ , K^+). La déplétion du potassium intracellulaire entraîne secondairement la mort de la cellule. La relative sélectivité de la toxicité de l'amphotéricine B pour les cellules fongiques s'explique de la manière suivante : en solution aqueuse, l'amphotéricine B à l'état de monomères solubles, d'oligomères solubles et d'agrégats insolubles qui se forment successivement lorsqu'on augmente la concentration. Les monomères se lient à l'ergostérol de la membrane de la cellule fongique pour lequel ils ont une forte affinité, ce qui conduit à la formation de canaux. A plus forte concentration, des oligomères solubles s'insèrent dans la membrane des cellules de mammifères sous l'action favorisante du cholestérol, et forment des canaux. Ainsi l'action tonique de l'amphotéricine B s'exerce à une même concentration plus basse sur les cellules fongiques que sur les cellules de mammifères.

L'amphotéricine B possède par ailleurs une activité antifongique indirecte, médiée par les macrophages. Elle potentialise l'action de l'interféron-gamma sur les macrophages, action qui se traduit par une synthèse de Tumor Necrosis Factor ($\text{TNF-}\alpha$) de l'interleukine (IL-1) et finalement par une production de monoxyde d'azote (NO). Le NO a une action antifongique, notamment vis-à-vis de *Cryptococcus neoformans* [44]. Cette activité de l'amphotéricine B entraîne une réduction de 1log CFU / ml en 24 heures pour

une concentration de 1mg/ml en présence de 20 U/ml d'interféron-gamma et de 10^6 macrophages. Ce mécanisme pourrait participer à l'action de l'amphotéricine B in vivo, car son efficacité est moindre en cas de leucopénie.

L'amphotéricine B peut également être incorporée dans des vecteurs lipidiques, notamment les liposomes. Les liposomes sont des véhicules consistant en un environnement aqueux de couches phospholipidiques : la dimyristoylphosphatadylcholine (DMPC) et le dimyristoylphosphotidylglycérol (DMPG) contenant 5 à 10% d'amphotéricine B par rapport aux lipides. Trois formulations en sont actuellement commercialisées ou en cours de développement :

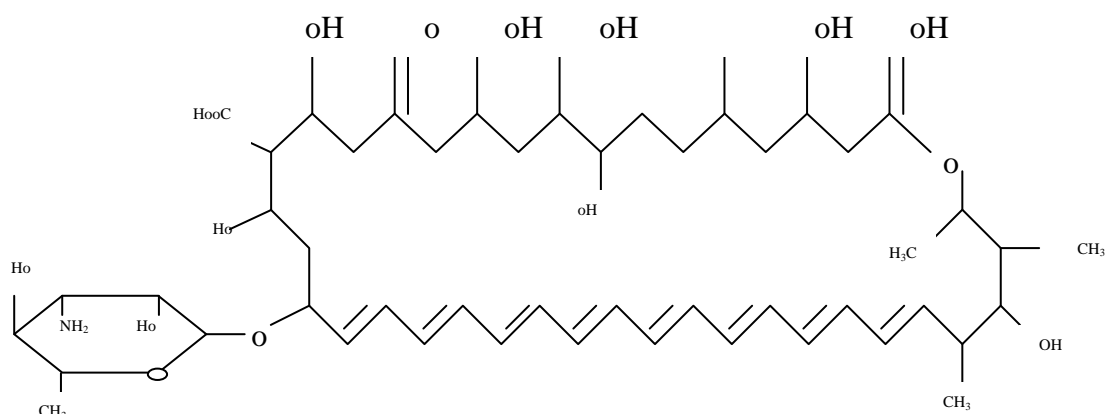
- L'amphotéricine B liposomal (Ambisome*), qui consiste en des vésicules unilamillaires de 80 nm contenant 10% mol d'amphotéricine B ;
- Le complexe lipidique d'amphotéricine B (ABLC : Abelcet*), contenant des lipides et de l'amphotéricine B à une concentration de 33% mol ;
- La dispersion colloïdale d'amphotéricine B (ABCD : Amphocil®-Amphocec® qui contient du sulfate de cholestérol en qualité équivalente à l'amphotéricine B, formant des particules colloïdales.

Le mélange d'amphotéricine B et d'intralipid® a été également proposé, mais l'absence de formulation commerciale rend difficile, en dehors d'essais thérapeutiques, la généralisation de cette association.

III-1-1-2 Nystatine

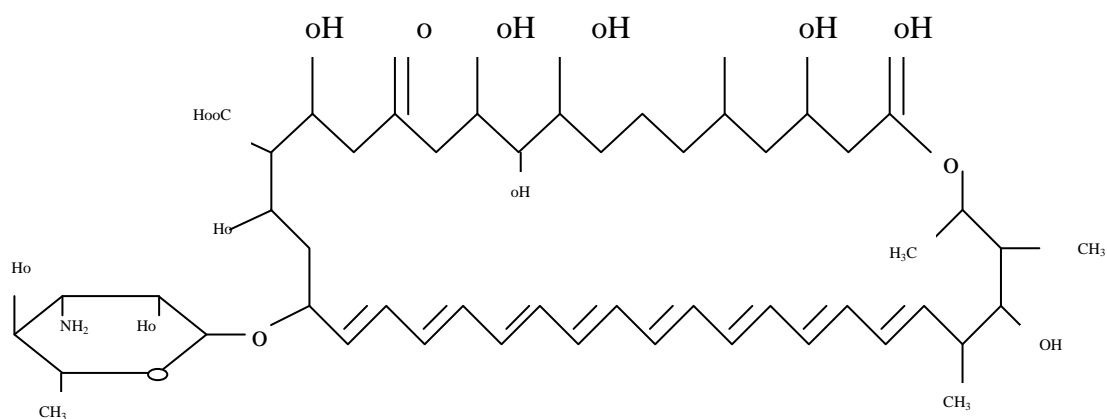
La nystatine (Mycostatine*) est un tétraène d'un poids moléculaire de 926,1. C'est une substance amphotère qui subit une détérioration en milieu acide (**figure 1**).

Son mode d'action et ses propriétés antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'amphotéricine B. L'absence d'absorption intestinale et la toxicité en cas d'injection intramusculaire ou intraveineuse limitent sa prescription aux mycoses cutanées, vaginales et digestives. L'incorporation de la nystatine dans des liposomes a permis de l'administrer par voie intraveineuse chez la souris et de documenter son efficacité dans l'aspergillose expérimentale de l'animal neutropénique. Des études de phase III sont en cours pour évaluer son activité dans le traitement des mycoses systémiques humaines.



Amphotéricine B (heptaène)

C₄₇ H₇₃ O₁₇ N PM 924,09



Nystatine (Tétraène)

C₄₇ H₇₅ O₁₇ N PM 926,1

Figure 1 : Structure et formule des polyènes [21, 51]

III-1-2 Fluorocytosine [25]

III-1-2-1 Propriétés physico-chimiques

La 5-FC ou fluorocytosine, est une pyrimidine fluorée (**figure 2**). C'est une poudre blanche cristalline, faiblement soluble dans l'eau distillée à 20°C (1,2%), soluble dans l'eau à 60°C ou dans l'alcool. La solution est relativement stable à la température du laboratoire. La présentation orale ne contient pas de sodium. La forme injectable de la 5-FC a pour véhicule un soluté physiologique à 9 pour mille (9‰) de NaCl. Le poids moléculaire est de 129,1. La 5-FC est peu liée (10 à 12%) aux protéines sériques et elle est dialysable.

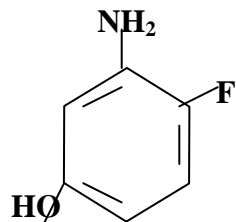
III-1-2-2 Cibles cellulaires

Les deux principaux modes d'action connus sont une perturbation de la synthèse protéique par substitution de 5-fluoro-uracile (5-FC) à l'uracile dans l'acide ribonucléique (ARN) fongique et une altération de la biosynthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) fongique par inhibition de la thymidilate synthétase.

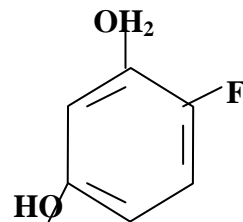
Deux étapes sont indispensables pour que la 5-FC exerce son action : la pénétration dans la cellule fongique (en compétition avec la cytosine) régie par la cytosine perméase et la transformation en 5-FU (toxique) grâce à une cytosine désaminase. L'absence ou la perte de ces enzymes rend le champignon résistant à la 5-FC. Les cellules de mammifères étant pratiquement dépourvues de cytosine désaminase, peu de 5-FU toxique est formée dans les cellules humaines, ou pas du tout.

Dans la cellule fongique la 5-FU est transformée en 5-Fluoro uridine qui est mono, di puis triphosphatée et finalement incorporée dans l'ARN à la place de l'uracile, faussant ainsi le code de la synthèse protéique. La production de 5-

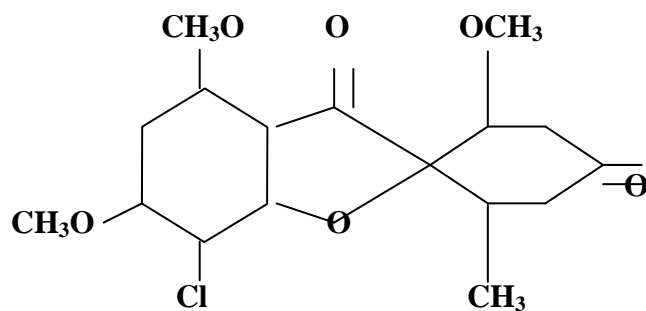
Fluorodeoxy-uridine diphosphate, puis de 5-fluorodeoxy-uridine monophosphate, inhibiteur non compétitif de la thymidilate synthétase, interfère avec la synthèse de l'ADN du champignon.



5-Fluorocytosine 5-FC



5-Fluorouracil 5-FU



Griseofulvine

Figure 2 : Structure chimique de la 5-fluoro-cytosine, du 5-fluoro-uracile de la griséofulvine [28]

III-1-3 Imidazolés et triazolés

L'utilisation à partir de 1968, de dérivés azolés obtenus par synthèse chimique, a constitué une étape importante de la thérapeutique antifongique. Tous ces composés ont en commun le noyau azolé (**figure 4**). Le miconazole (DAKTARIN*) a été le premier imidazolé bien absorbé par voie orale. Il est caractérisé chimiquement par un noyau dioxolanne et un noyau pipérazine.

III-1-3-1 Propriétés physico-chimiques

Il s'agit de poudre complètement insoluble dans les solvants organiques : polyéthylène glycol, alcools, chloroforme, diméthylformamide, dimethylsulfoxyde. Elles sont hygroscopiques et se conservent plus de 1 an à plus 4°C. Les molécules sont généralement lipophiliques. La liaison avec les protéines plasmatiques et les érythrocytes est proche de 100%.

III-1-3-2 Cibles cellulaires

Les antifongiques imidazoles (miconazole, kétoconazole) et les triazolés (fluconazole, itraconazole) (**figure 5**) sont des inhibiteurs enzymatiques qui bloquent certains isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques [33, 39]. Cette inhibition s'exerce en particulier sur la 14-alpha-déméthylase, qui effectue la transformation du lanesterol en ergostérol, principal stérol membranaire. On observe donc une accumulation des précurseurs dans la chaîne de synthèse : Lanestérol et divers 14-méthylstérols.

D'autres modes d'action ont été proposés : lésions directes par fixation sur la membrane avec perte de potassium intracellulaire ; accumulation de peroxyde toxique, résultat de l'interaction des dérivés azolés sur les enzymes oxydatifs.

Outre l'atteinte des systèmes membranaires, ces molécules peuvent altérer la paroi fongique, avec défaut de séparation des bourgeons de la levure mère, et inhiber la formation de *Candida albicans*. Les triazolés sont nés de la N-substitution des imidazolés. Les propriétés pharmacologiques, le spectre d'activité et surtout la moindre interaction avec le système des cytochromes P-450, séparent les triazolés et les imidazolés. Le mode d'action des antifongiques azolés est résumé dans la **figure 3**.

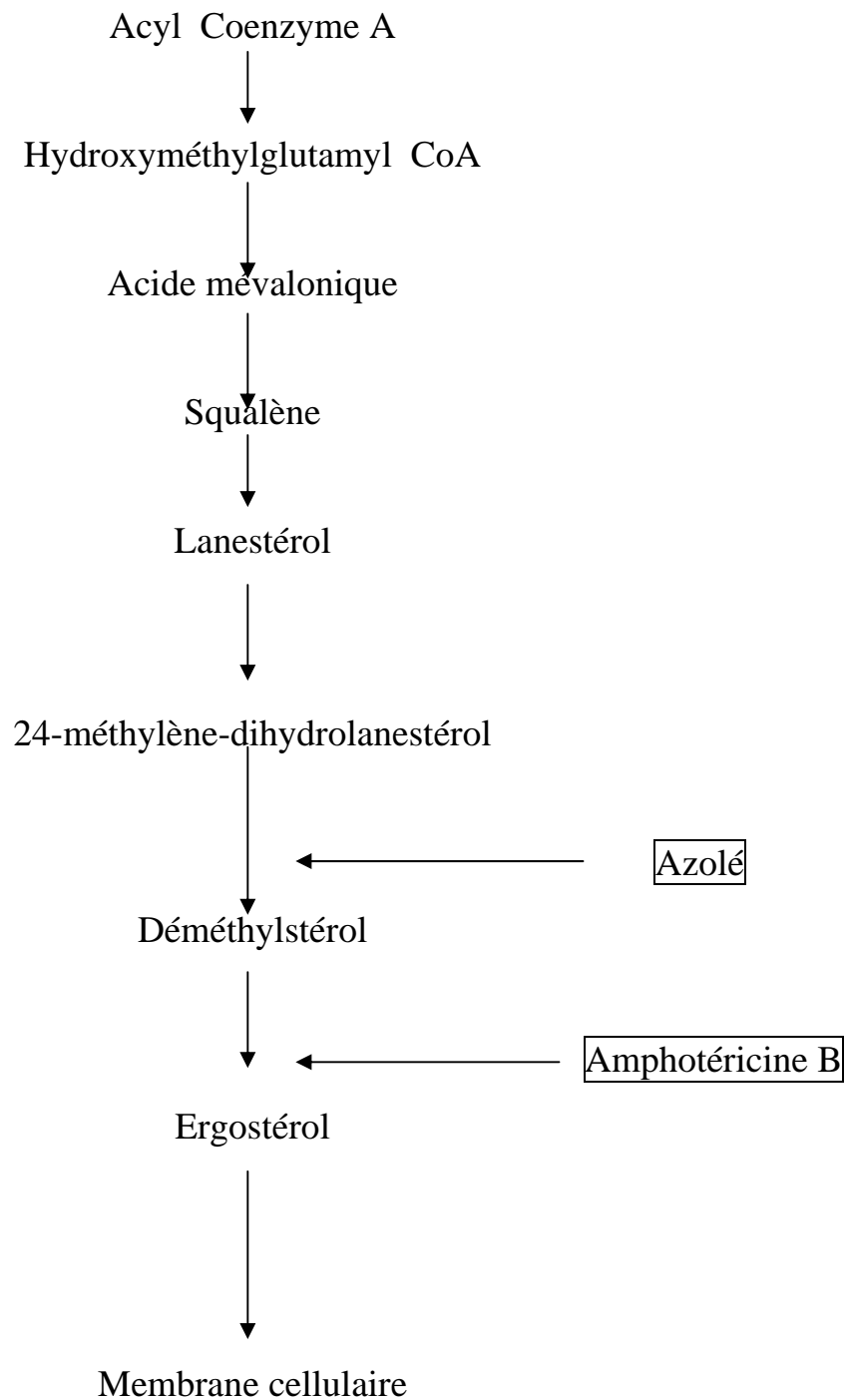
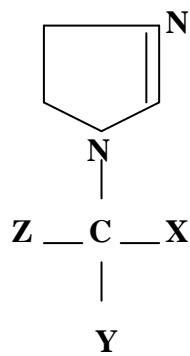
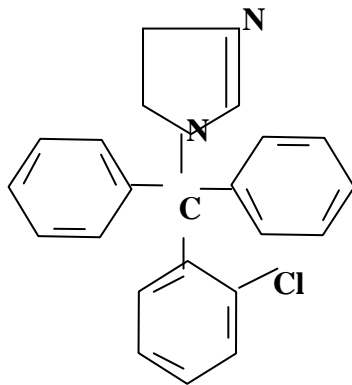


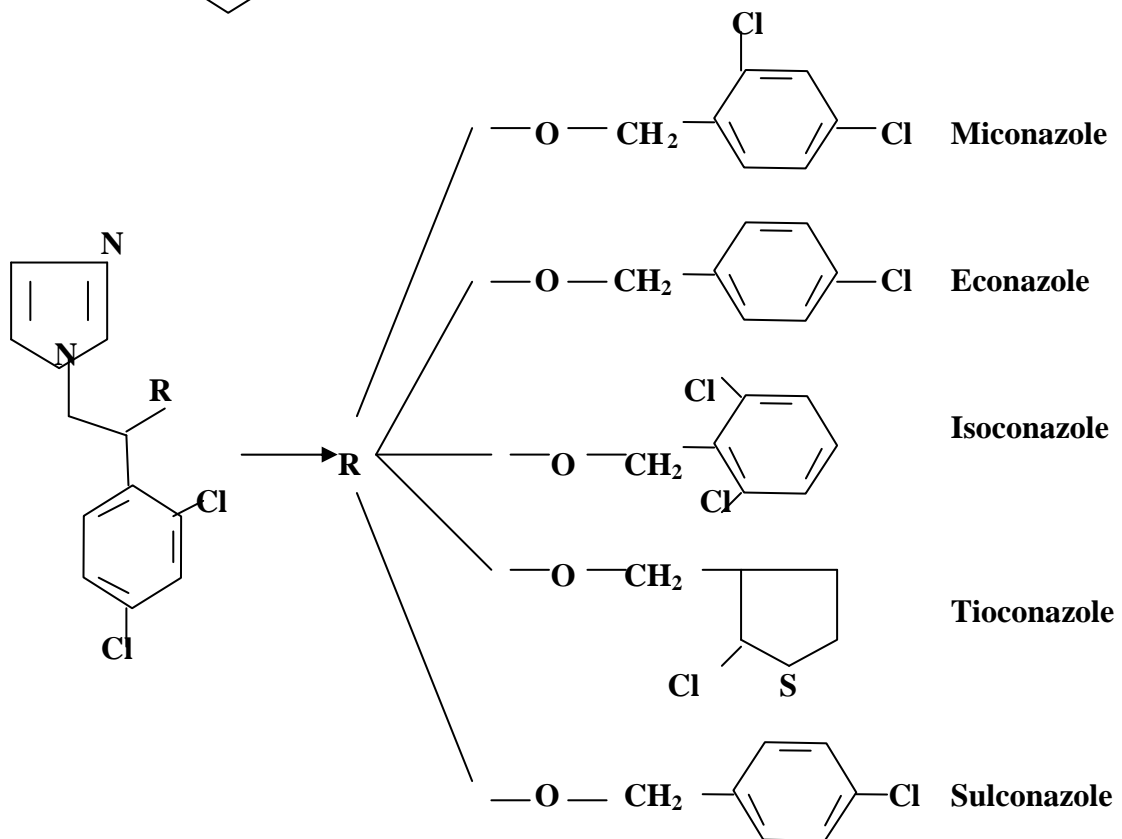
Figure 3 : Mode d'action des dérivés azolés sur la synthèse de l' ergostérol, principal stérol membranaire des champignons et cible de l'amphotéricine B [28, 50]



Azolés



Clotrimazole



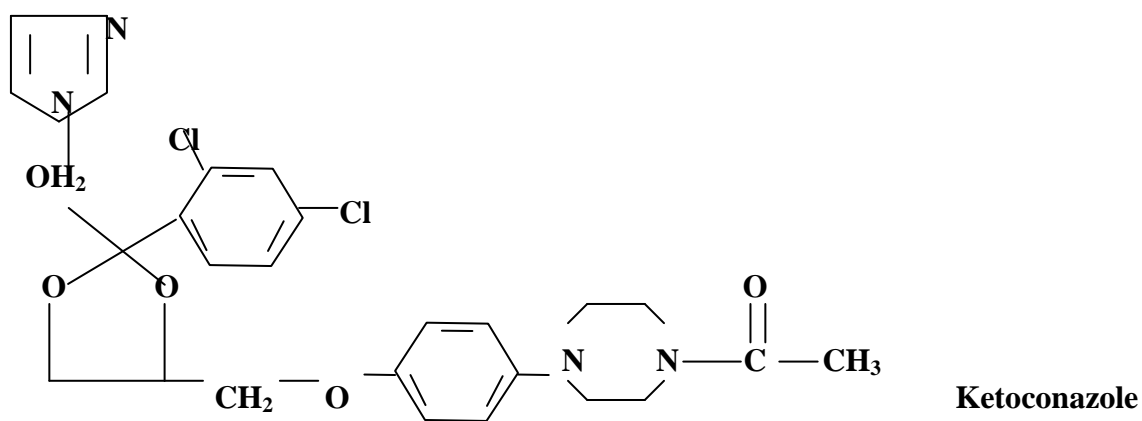


Fig 4 : Noyau Azolé et Dérivés azolés, biazole [28]

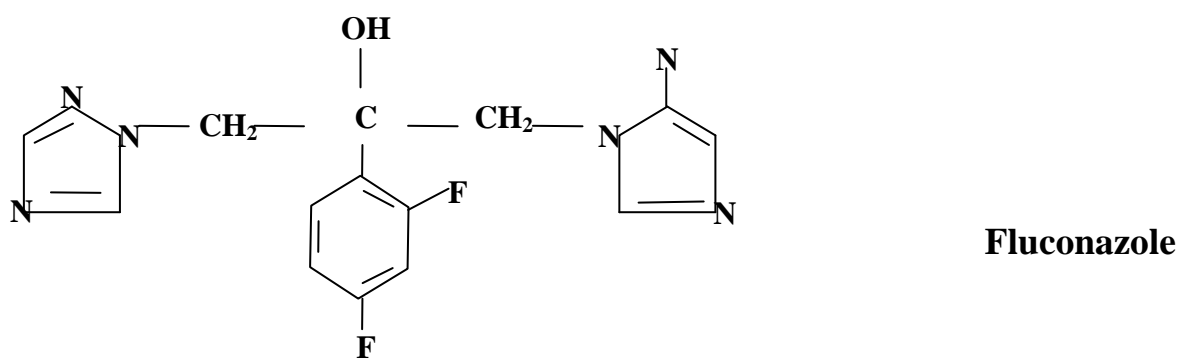
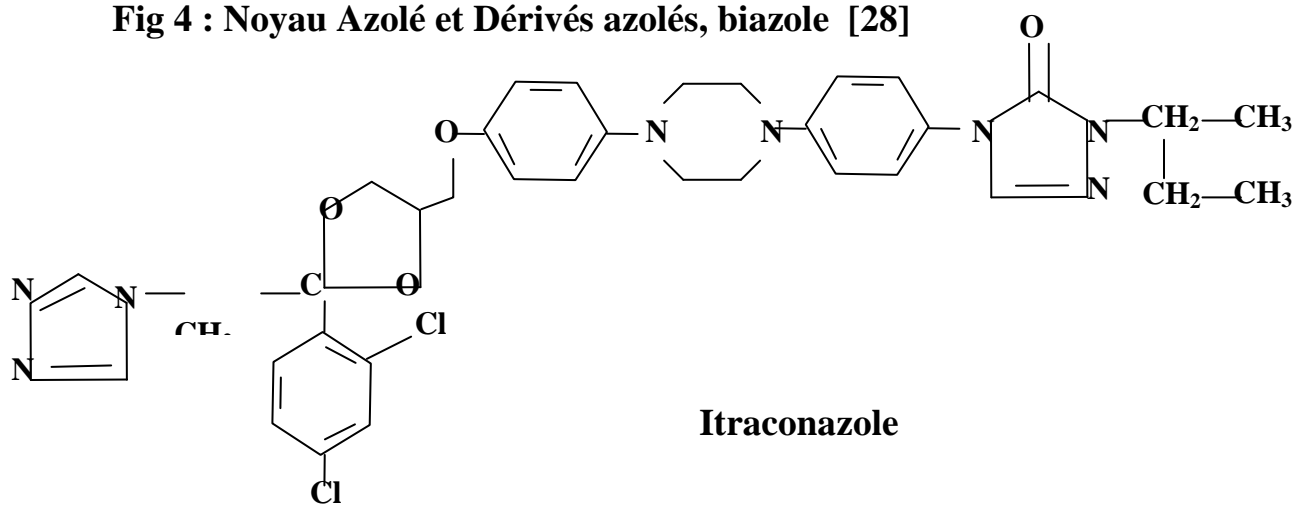


Fig. 5 : Dérivés Azolés, Triazolés [28]

III-1-4 Griséofulvine

III-1-4-1 Propriétés physico-chimiques

La griséofulvine isolée de *Penicillium griseofulvum* et d'autres *Penicillium* *sp* se présentent sous forme d'une poudre blanche cristalline de saveur amère (**figure 2**). Pratiquement insoluble dans l'eau, elle est facilement soluble dans l'alcool et les solvants organiques. La griséofulvine supporte l'autoclave à condition de ne pas être en solution. Elle est chimiquement stable à la température du laboratoire et à l'abri de la lumière. Son poids moléculaire est de 352,8.

III-1-4-2 Cibles cellulaires

La griséofulvine inhibe la mitose cellulaire par son action sur les microtubules. Fongistatique, elle est responsable d'altération de la paroi fongique s'accompagnant d'anomalies de développement des hyphes terminaux qui sont élargis, épaissis et enroulés. L'action in vivo est de type fongistatique. L'apparition de résistance est possible.

III-1-5 Antifongiques utilisés par voie locale dans des mycoses superficielles

Les principales molécules actuellement disponibles sont mentionnées dans le **tableau I**. Il existe de nombreuses substances à action antifongique spécifique utilisées par voie locale, d'autres sont des antiseptiques avec un spectre d'activité touchant également de nombreux micro-organismes non fongiques.

La terbinafine a également une action in vivo dans le traitement de certaines mycoses systémiques, mais nous nous limiterons à son utilisation dans le traitement des mycoses superficielles.

III-1-6 Autres antifongiques

La cycloheximide est un antifongique toxique incorporée à certains milieux de culture pour éviter la croissance de nombreux contaminants. Certaines levures, tel *Cryptococcus*, sont sensibles à la cycloheximide. L'iodure de potassium a pour seule indication le traitement de la sporotrichose. Les sulfamides d'action prolongée donnent des résultats seulement dans les mycétomes actinomycosiques et les nocardioses à actinomycètes. Divers sulfamides agissent dans une certaine mesure dans les formes monocutanées de la paracoccidioïdomycose et peuvent être de l'hystoplasmosse à *Histoplasma capsulatum* [27].

Les diamidines aromatiques (Lomidine), utilisées autrefois avec quelques succès dans les infections à *Blastomyces dermatidis*, ne le sont actuellement plus dans l'arsenal thérapeutique antifongique, sauf dans le traitement des infections à *Pneumocystis carinii* (récemment classé dans les champignons, mais n'est pas considéré dans cette étude) également sensible au Cotrimoxazole, à l'atovaquone et à l'amphotéricine B. La ciclopiroxolamine appartenant à la famille des hydroxypyridones est le seul représentant des inhibiteurs énergiques, original par son mode d'action qui est double :

- Elle inhibe le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant le blocage de la synthèse d'ATP indispensable au métabolisme de la cellule fongique.

- Elle est un chélateur des ions ferreux, constituant de nombreux systèmes enzymatiques. Elle bloque ainsi les enzymes responsables de la dégradation du peroxyde d'hydrogène dont l'accumulation endommage la cellule. Utilisable uniquement par voie locale, il est utilisé dans le traitement des mycoses cutanées [32].

L'amorolphine est un dérivé de la diméthyl-morpholine dont l'activité antifongique est déjà connue en agriculture. Elle se présente sous la forme de poudre blanche, peu hydrosoluble et très lipophile. Son poids moléculaire est de 353,98.

Elle agit en inhibant deux enzymes successivement impliquées dans la synthèse de l'ergostérol : la δ^7 - δ^8 isomérase.

Par ailleurs, l'accumulation de stérols anormaux semble inhiber la chitine-synthétase nécessaire à la synthèse de la chitine de la paroi fongique.

Tableau III : Principaux antifongiques utilisés dans les mycoses superficielles [28]

Dénomination commune internationale	Noms génériques	Formes galéniques
Polyènes Nystatine Amphotéricine B	Mycostatine ® Fungizone ®	Comprimés 500 000 UI Gélules 250mg Lotion 3% Suspension orale 100 mg/ml
Dérivés azolés Butoconazole Econazole Isoconazole Kétoconazole Miconazole Sulconazole	Gynomyk® Pévaryl® Gyno-Pévaryl® Terlomexin® Fazol® Kétoderm® Daktarin® Gyno-daktarin® Myk® 1%	Ovule 100mg Lait, crème, poudre 1% lotion Ovule 150mg Capsule vaginale 200mg Crème, émulsion, poudre 2% Crème 2%, gel moussant Comprimés 125mg, gel dermique 2% , lotion Capsule vaginale 100– 400mg Crème, solution, poudre 1%
Griséofulvine	Griséofoline®	Comprimés 250 – 500mg
Tolnaftate	Sporilline®	Lotion 1%
Terbinafine	Lamisil®	Comprimés 250mg, crème 1%
Amorolfine	Loceryl®	Solution filmogène 5%
Ciclopiroxolamine	Mycoster®	Solution 1%, crème 1%
Acide undecylenique	Mycodecyl®	Crème 10%, poudre 10%
Sulfure selenium	Selsun®	Suspension 2,5%
Dérivés iodées	Bétadine®	Solution 4 – 5 – 10%

Les spécialités comportant plusieurs principes actifs n'ont pas été citées.

III-2 PHARMACOCINETIQUE

III-2-1 Les polyènes

III-2-1-1 Cinétique de l'amphotéricine B administrée sous forme de Fungizone

La cinétique de l'amphotéricine B reste très mal connue en dépit de son utilisation très ancienne.

La concentration plasmique maximale est de 1,5 à 2mg/l et la décroissance des concentrations est triexponentielle. La demi-vie des dernières phases est de 24 à 48 heures. Cependant, la demi-vie cliniquement pertinente c'est à dire celle qui instaure dans le calcul du délai d'équilibration, est celle de la deuxième phase (24 à 48 heures).

L'amphotéricine B est caractérisée par un volume de distribution très élevé de l'ordre de 4 L/Kg qui indique une pénétration tissulaire intense.

Les facteurs de variation de la cinétique de l'amphotéricine B ont été peu étudiés. Chez l'enfant, le volume de distribution est plus petit et la clairance plus élevée par rapport à l'adulte lorsqu'ils sont rapportés au poids.

Il en résulte des concentrations plasmiques environ deux fois plus basses que chez l'adulte, à dose équivalente en mg/kg ainsi qu'une demi-vie plus courte (7 à 20 heures). Chez le nouveau-né, la clairance est parfois très basse surtout dans les premiers jours après la naissance, tandis que le volume de distribution rapporté en poids est équivalent à celui de l'adulte. Il en résulte une demi-vie plus longue 60 à 700 heures qui risque d'entraîner une accumulation importante et qui justifie un allongement à 48 heures de l'intervalle posologique.

III-2-1-2 Cinétique de l'amphotéricine B administrée dans un excipient lipidique

Elle dépend de la cinétique propre du vecteur lipidique et de la cinétique de libération de l'amphotéricine B de son vecteur. Les deux phénomènes dépendent à leur tour de la composition du vecteur et de la taille des particules. Le tableau II résumé les relations connues entre les caractéristiques physico-chimiques du vecteur et les caractéristiques pharmaceutiques de l'amphotéricine B.

Par rapport à la Fungizone, à doses équivalentes d'amphotéricine B, les formulations lipidiques induisent des concentrations deux à cinq fois plus élevées dans le foie et la rate, cinq fois moins élevées dans le rein, comparables ou plus élevées dans le cerveau. En ce qui concerne la cinétique plasmatique, la comparaison entre les différentes formulations est compliquée par le fait que les concentrations n'évoluent pas proportionnellement aux doses administrées : elles s'accroissent de manière supraproportionnelle pour l'Ambisome (en raison d'une baisse de clairance et du volume de distribution) mais de manière infraproportionnelle pour l'Abelcet® et de l'amphocil-Amphotec (par augmentation de la clairance et du volume de distribution). Le tableau résume les différentes évolutions qui montrent l'influence considérable de la formulation et de la dose sur la cinétique de l'amphotéricine B. Cependant la traduction de ces différentes cinétiques reste encore incertaine [28].

Les facteurs de variabilité de la cinétique des formes lipidiques de l'amphotéricine B ont été encore peu étudiés [14].

Tableau IV : Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et les caractéristiques pharmacocinétiques de l'amphotéricine B [4, 28]

Caractéristiques Spécialités	Forme de particules	Taille des particules	Composition de l'excipient	Stabilité dans le sang	Captation tissulaire
Ambisome®	Liposome	80 nm	Complexe LSH-DSPG Chol- amphotéricine B 2-0,8-1-0,4	+++	Foie, Rate
Abelcet®	Rubans	1,6 - 11 µm	Complexe DMPC DMPG Amphotéricine B 7-3-1	+	Poumon, Foie, Rate
Amphocil/Amphotec	Disques	122 ± 48nm	Complexe sulfate Chol- amphotéricine B 1 – 1	+++	Foie, Rate

LSH : Lécithine de soja hydrogénée

DMPC : Dimirylstoylphosphatidylcholine

DSPG : Distéaroylphosphatidylcérol

DMPG : Dimirylstoylphosphatidylglycérol

CHOL : Cholestérol

Tableau V : Paramètres pharmacocinétiques de l'amphotéricine B administrée dans différentes formulations [3, 4, 28]

Paramètres Spécialités	Dose (mg/kg)	Cmax (mg/l)	T _{1/2} β(h)	CL (ml/min/kg)	V(l/kg)
Fungizone®	1	2	24 – 48	0,43	4
Ambisome®	1	7,3	25	0,27	0,58
	5	57,6	17	0,17	0,22
Abelcet®	1,2	2,2 ± 0,8	77 ± 21	2,6 ± 0,6	21 ± 8
	5	2,4 ± 0,9	173 ± 78	7,3 ± 1,1	131 ± 58
Amphocil®	1	2,2	28 ± 9	1,5	2,8 ± 0,7
Amphotec®	5	3	28 ± 9	2	4 ± 1,6

CL = Clairance **Cmax** = Concentration maximale **V** = Volume

III-2-2 Flucytosine

L'absorption digestive de la 5-FC est rapide et complète. La diffusion tissulaire est excellente avec notamment 74% des concentrations sériques retrouvées dans le liquide céphalorachidien et 90% dans le liquide synovial. La demi-vie est de 3 à 5 heures, l'excrétion urinaire est de 90% sous forme inchangée [25].

III-2-3 Griséofulvine

Administrée par voie orale, elle est absorbée par l'intestin de façon très inégale selon les sujets. L'administration orale de 1g donne, en moyenne à la quatrième heure, un pic sérique de 1,5 à 2µg/l. Les taux sériques baissent fortement entre 8 à 10 heures et sont à l'état de traces au bout de 72 heures.

III-2-4 Antifongiques azolés

Tableau VI : Paramètres pharmacocinétiques des antifongiques azolés [28, 32, 39]

Antifongiques Paramètres	Kétoconazole	Itraconazole	Fluconazole	Voriconazole
Biodisponibilité (%)	75	73	95	90 maxi
C _{max} (200 mg per os)(mg/l)	1,5 – 3	0,2 – 0,4	4 – 6	ND
T _{max} (heure)	1 – 4	3 – 4	2 – 4	2
C _{max} (200mg/j)(mg/l)	3 – 4	1	10 – 12	ND
T 1/2 (heure)	2,7 – 4,7	34 – 72 18 – 27	30 – 35	6
Délai d'équilibration (jour)	1 – 1,5	14 – 15	6 – 10	ND
% liaison protéines plasmatiques	99	99,8	12 – 23	65
Volume de distribution (L/kg)	0,3 – 0,4	10	0,7 – 0,8	2
Diffusion du LCR	-	+	+++	7
% élimination rénale	< 5	< 5	70 à 90	< 5
Métabolisation	+++	+++ (OH-itraconazol : actif)	10 à 25%	95%
Effet de premier passage	+++	+++	0	+
Élimination biliaire	ND	++	ND	ND
Voie d'administration	PO	PO (IV en développement)	PO et IV	PO et IV

% : pourcentage

ND : non documenté

LCR : liquide céphalo-rachidien

PO : per os

IV : intraveineuse

III-3 PHARMACODYNAMIE

III-3-1 Polyènes et leurs formes lipidiques

III-3-1-1 Mécanisme d'action [16]

In vitro, l'amphotéricine B induit une fongicidie concentration dépendante, qui est nettement perceptible pour une concentration égale à une concentration minimale inhibitrice (CMI) et qui augmente jusqu'à 32 fois la CMI. A ce niveau de concentration, elle atteint 1 log CFU/ml/h pour souches partiellement sensibles.

In vivo l'efficacité de l'amphotéricine B, administrée sous forme de désoxycholate ou de chacune des formulations lipidiques actuellement commercialisées, est dose dépendante.

D'une manière générale l'incorporation de l'amphotérine B dans un vecteur lipidique (liposome) a tendance à majorer les CMI de l'amphotéricine B vis à vis des champignons, ainsi qu'à réduire la vitesse de fongicidie in vitro. Cependant, la dissociation de l'amphotéricine B à partir de son vecteur lipidique est très différente in vitro et in vivo. L'importance clinique de ces observations reste à démontrer.

L'activité de l'amphotéricine B est soumise à un effet inoculum : la CMI vis à vis de *Fusarium spp* augmente 10 à 20 fois lorsque l'inoculum passe de 10^2 à 10^5 conidies/l. Cette observation pourrait expliquer la difficulté à éradiquer l'infection en situation d'inoculum fort. L'amphotéricine B est moins active sur les champignons en phase stationnaire, surtout pendant les premières heures de contact. Il faut trois à cinq fois plus longtemps pour ramener l'inoculum à un

niveau indétectable, selon que cet inoculum est issu d'une culture en phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire [28].

III-3-1-2 Effet postantifongique

L'amphotéricine B induit un effet postantifongique période pendant laquelle il existe une inhibition de la croissance du champignon. L'exposition à l'antifongique dépend de la concentration et du temps de contact. Pour des concentrations comprises entre 0,5 et 32 fois la CMI, la durée de cet effet varie entre 0,5 et 10,6 heures vis à vis de *Candida spp* et de 2,8 à 10,4 heures vis à vis de *C. neoformans*. La durée de cet effet postantifongique conduit à penser qu'il n'est pas obligatoire d'obtenir une concentration résiduelle supérieure à la CMI au site de l'infection pour assurer une efficacité maximale.

III-3-1-3 Pénétration et activité intracellulaire

L'amphotéricine B desoxycholate (Fungizone) est active sur *Candida albicans* en situation intracellulaire. In vitro la Fungizone est capable d'éradiquer *Candida albicans* en 24 heures à une concentration égale à 16 fois la CMI. En revanche, l'amphotéricine B liposomale (Ambisome) n'est active sur les germes intracellulaires qu'après une période d'incubation (24 heures), permettant la libération de l'amphotéricine B encore faut-il atteindre une concentration huit fois supérieure à celle de la Fungizone pour observer la même efficacité.

III-3-1-4 Influence d'une Neutropénie

Expérimentalement, la neutropénie (induite par la cyclophosphamide) se traduit par une baisse importante de l'activité de l'amphotéricine B, aussi bien en termes de suivie que la réduction de l'inoculum fongique dans les tissus infectés [28].

III-3-1-5 Influence du vecteur lipidique sur l'efficacité

Dans un modèle expérimental de cryptococcose murine, l'Amphocil® et l'Ambisome® ont démontré une efficacité similaire et se sont montrés supérieurs à l'Abelcet®. Ces trois produits sont administrés à raison de 10mg/kg. La Fungizone® administrée à la dose maximale tolérée était nettement moins active dans le même modèle. Des résultats qualitativement similaires ont été observés dans la leishmaniose viscérale murine en comparant les différents produits à posologie identique. Ces résultats sont controversés avec notamment une moindre efficacité de l'Abelcet®, de l'Amphocil® et de l'Amphotec® mais une meilleure efficacité de l'Ambisome en comparaison à l'amphotéricine B libre dans le modèle expérimental d'aspergillose invasive [33].

III-3-2 Flucytosine

III-3-2-1 Mécanisme d'action

Il ne semble pas que le mode d'action, temps dépendant ou concentration dépendante, ait été déterminé pour la flucytosine [25].

III-3-2-2 Effet postantifongique

La flucytosine induit un effet postantifongique dont la durée est typiquement comprise entre 2 à 6 heures pour *Candida albicans* et *Crystococcus neoformans* pour une concentration de quatre à huit fois la CMI. La durée de cet effet dépend de la durée d'exposition des levures à la flucytosine, et de sa concentration. En association avec l'amphotéricine B, l'effet postantifongique est plus long qu'avec la flucytosine seule [25].

III-3-3 La griséofulvine

III-3-3-1 Mode d'action

A dose fongicide, elle inhibe la synthèse des acides nucléiques et affecte la mitose cellulaire.

Elle a une action sur la polymérisation des microtubules.

A dose fongistatique, elle interfère avec la synthèse de la chitine de la paroi fongique, se traduisant par le développement de filaments terminaux épais, élargis et enroulés : le « curling effect ».

III-3-3-2 Effet postantifongique

L'effet postantifongique est dépendant d'une part de la concentration en antifongique et d'autre part de la durée de contact avec l'agent fongique.

III-3-4 Antifongiques azolés

III-3-4-1 Mécanisme d'action

Les azolés en milieu Sabouraud, sont fongistatiques vis à vis de *Candida albicans* ou de *Cryptococcus neoformans*. Leur effet est inexistant à 0,5 fois la CMI et devient maximal entre deux et quatre fois la CMI. A cette concentration l'inoculum reste parfaitement stable pendant 24 heures. Cependant l'ajout de 10% de sérum humain au milieu de Sabouraud confère au fluconazole un effet fongicide vis à vis de *Cryptococcus neoformans* de type concentration dépendante [28].

Par ailleurs, même en milieu dépourvu de sérum, l'incubation de *Candida albicans* en milieu nutritif (eau pure), en présence de fluonazole pendant 28 jours, provoque une fongicidie concentration dépendante qui est maximale environ à 10 fois la CMI. Ainsi les champignons en phase stationnaire seraient plus sensibles aux azolés que ceux en phase exponentielle de croissance. Enfin, in vivo, la fongicidie du fluconazole augmente en fonction de la dose administrée.

III-3-4-2 Effet postantifongique

In vivo cet effet est majoré en présence de sérum, lorsque les expositions à l'antifongique sont répétées, en présence de polynucléaires et en cas d'association à la 5FC. L'effet postantifongique est d'autre part dépendant de la concentration en antifongique (supérieure à quatre fois la CMI) et de la durée de contact qui doit être supérieur à 12 heures. Dans ces conditions la durée de l'effet postantifongique est de l'ordre de 1 à 3 heures in vitro [13, 20].

III-3-4-3 Pénétration et activité intracellulaire

Les azolés systémiques pénètrent dans les cellules et s'y concentrent de manière variable selon les composés. Dans certains modèles les azolés sont fongistatiques vis à vis des germes intracellulaires phagocytés par les macrophages ou les polynucléaires. Dans d'autres modèles ils ont une activité fongicide qui est majorée par les facteurs de croissance tels que les **G-CSF** (granulocyte macrophage colony stimulating factor).

III-3-4-4 Influence d'une neutropénie

La réalisation d'un modèle d'infection systémique à *Candida albicans* chez la souris rendue ou non neutropénique permet d'apprécier l'impact des polynucléaires sur la réponse aux antifongiques. Le fluconazole et l'itronazole sont fongistatiques dans ce modèle et leur efficacité est fonction de la dose administrée, sans qu'il existe de différence sensible entre la souris immunocompétente ou neutropénique. L'activité des antifongiques azolés semble donc préservée en cas de neutropénie [28].

III-4 TEST DE SENSIBILITE IN VITRO [11, 20, 22]

Les tests de sensibilité des champignons aux antifongiques posent d'une part le problème de leur standardisation mais également et de manière plus aiguë pour les thérapeutiques, le problème de la relevance clinique du résultat.

Pour l'étude de la sensibilité des levures aux antifongiques, des effets importants de standardisation ont été réalisés au cours des dernières années, notamment par la

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Actuellement la technique d'études des CMI en microplaques est proposée. Cependant, certaines étapes de la méthode (notamment détermination de la taille de l'inoculum et lecture peuvent rendre difficile son interprétation. De nombreux tests in vitro sont actuellement commercialisés permettant d'étudier la CMI elle-même pour certains antifongiques (E-test®, ATB fungus®). Le milieu de culture optimal pour l'utilisation du E-test® reste à déterminer. Quant aux antifongigrammes, ils permettent de mesurer des diamètres d'inhibition.

L'étude de la sensibilité in vitro des champignons filamenteux reste purement du domaine de la recherche microbiologique. Des perspectives s'ouvrent dans le futur grâce à de résultats récemment obtenus dans un modèle expérimental d'aspergillose invasive élevé de l'itraconazole.

L'étude des tests de sensibilité in vitro reste donc le domaine de la recherche clinique et de la surveillance épidémiologique [37].

III-4-1 Polyènes [22]

La méthode de NCCLS ne permet pas de bien séparer des souches de moindre sensibilité in vitro à l'amphotéricine B. Le milieu utilisé influence le résultat de la CMI mais l'importance de l'inoculum intervient peu. La technique des disques ne peut être recommandée pour les polyènes en raison des problèmes de diffusion. La plupart des champignons pathogènes usuels ont des CMI entre 0,1 et 1mg/l, en particulier les levures. Ainsi il est possible de prédire l'efficacité de l'amphotéricine B dans une infection systémique à *Candida sp* au vu du résultat de la CMI. Quelques champignons ont des CMI élevées tels *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium inflatum*, *Candida lusitanae* et *Candida*

tropicalis peuvent également avoir une CMI élevée à l'amphotéricine B ou qui s'élève sous traitement. Il faut également noter que l'amphotéricine B est active sur certains protozoaires : *Leishmania*, *Entamoeba*, *Naegleria*, *Trypanosoma*, *Trichomonas* [31].

III-4-2 Flucytosine [9]

La 5-FC a un spectre antifongique limité à un nombre restreint de champignons jouant un rôle important en pathologie. Il s'agit essentiellement des levures : *C. albicans*, *Cryptococcus* ; inconstamment et à un degré moindre de champignons filamenteux : *Geotrichum*, *Aspergillus* etc...

La CMI des levures semble se situer généralement entre 0,1 et 1mg/ml et il existe une corrélation entre les diamètres d'inhibition et les CMI. Pour *C. albicans*, environ 95% des souches isolées sont sensibles. Il est intéressant de noter que dans l'espèce *C. albicans*, le sérotype A est en règle sensible alors que le sérotypage B est souvent résistant mais il est plus rarement isolé. Pour les espèces non *albicans*, en particulier *C. tropicalis*, *C. krusei* 25 à 30% des souches sont résistantes lors de l'isolement. La grande majorité des souches de *C. neoformans* et *C. glabrata* sont sensibles.

En suivant la technique du NCCLS, les souches dont la CMI est supérieur ou égale à 32mg/l sont résistantes et celles dont la CMI est inférieure à 4mg/l sont sensibles. Sous traitement, des mutants peuvent être sélectionnés par l'antifongique : il s'agit de résistance secondaire. La sensibilité des champignons filamenteux est souvent limitée, expliquant les médiocres résultats chimiques sous 5-FC. Toutefois certains champignons noirs (*Dermatiaceae*) sont sensibles. La 5-FC est l'antifongique pour

lequel un antifongogramme est nécessaire avant le traitement d'une mycose systémique [45].

III-4-3 Antifongiques azolés

Le spectre antifongique est pratiquement superposable pour tous les produits dans leur utilisation en tant que topique (**tableau I**). Il s'agit des agents classiques des mycoses superficielles : *Candida*, dermatophytes, *Geotrichum candidum* et *Scopulariopsis brevicaulis* sont incontestablement sensibles. *C. glabrata* est souvent résistant. Les différences de sensibilité parfois notées in vitro ne permettent pas d'hiérarchiser les produits quant à leur activité in vivo. En outre, les différences de quelques microgrammes in vitro ont peu de significations lorsque l'application locale sur les lésions apporte quelques milligrammes de produit actif.

La méthode des disques peut être utilisée pour le fluconazole mais elle n'est pas bien corrélée à l'étude de la CMI que pour les souches sensibles. Par expérience, la résistance intrinsèque de *C. krusei* et celle de *C. dubliniensis* contre-indiquent le recours aux dérivés azolés et donc rendent inutile l'étude de la sensibilité in vitro.

III-4-4 Griséofulvine

Les dermatophytes représentent l'indication majeure du traitement par la griséofulvine. Selon le genre en cause, *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton*, la CMI varie de 0,14 à 2,5mg/l. Hormis certains agents de mycetomes parfois sensibles, les bactéries, les levures et les agents des mycoses viscérales profondes sont résistants. L'antifongique est sans action dans le traitement du *Pytirisias versicolor*.

IV/ PARAMETRES DE LA VALIDATION

La validation est la confirmation par examen et l'apport de preuves effectives du fait que les prescriptions particulières d'une méthode analytique en vue d'une utilisation prévue déterminée sont remplies. La validation a pour principal objectif de s'assurer qu'une méthode analytique déterminée donnera des résultats suffisamment fiables et reproductibles, compte tenu du but de l'analyse. Il faudra donc définir correctement à la fois les conditions dans lesquelles la méthode sera utilisée et le but dans lequel il sera employé. En effet la validation inclut la spécification des exigences, la détermination des caractéristiques des méthodes, la comparaison des exigences aux valeurs des caractéristiques de la méthode, ainsi qu'une déclaration relative à la validité [30].

Ainsi la validation d'une méthode permet de connaître ses caractéristiques pour définir et juger la qualité du processus analytique : (reproductibilité, répétabilité, précision, exactitude, spécificité, linéarité et domaine d'utilisation, sensibilité, limite de détection) et d'en préciser les limites de validité.

La validation peut se décomposer en différents modules correspondant à l'évaluation de chacune de ses caractéristiques :

- Linéarité et domaine d'utilisation
- Répétabilité et reproductibilité
- Limite de détection
- Précision
- Exactitude
- Sensibilité

IV-1 LINEARITE OU DOMAINE D'ANALYSE

Il s'agit d'une évaluation de la limite haute et basse de la relation linéaire existant entre la concentration de l'analyte observée et la dilution effectuée.

La linéarité d'une méthode analytique est sa capacité à donner des résultats directement proportionnels à la concentration de l'analyte dans les échantillons.

Ces caractéristiques sont déterminées en appliquant la méthode à une série d'échantillons dont les concentrations en analyte couvrent tout le domaine d'utilisation proposé. Il faut analyser chaque dilution en triple, répéter l'essai, le cas échéant, dans d'autres conditions de temps.

IV-2 LIMITE DE DETECTION

C'est la plus petite quantité ou concentration qui peut être distinguée, avec une probabilité connue, d'un blanc de la réaction réalisé dans les mêmes conditions. Elle est égale à k fois l'écart type de précision, mesuré sur le blanc. Si le nombre de valeur = 30, la valeur de 3 sera retenue pour k.

$LD = S \times k$

LD = limite de détection

S = écart-type

k = facteur dépendant du nombre de mesures effectuées

IV-3 PRECISION [30]

C'est le degré d'accord entre les résultats obtenus lors d'essais différents. Elle est mesurée par la dispersion des résultats individuels de part et d'autre de la moyenne et elle est généralement représentée par l'écart type ou par le coefficient

de variation calculé après avoir appliqué la méthode complète de façon répétée à un certain nombre d'échantillons identiques sur le même lot homogène du produit à analyser.

IV-4 REPETABILITE ET REPRODUCTIBILITE

C'est une évaluation de la dispersion des résultats obtenus à partir des aliquotes d'un même spécimen distribuées dans une même série d'analyse (répétabilité), ou dans des séries différentes (reproductibilité).

IV-4-1 Répétabilité

La mesure de la variation des résultats obtenus au sein d'un même laboratoire caractérise la précision obtenue lorsque la méthode est répétée par le même analyste dans les mêmes conditions (réactifs, matériel, réglage, laboratoire) dans un court intervalle de temps. Il faut calculer les variances de chaque série de mesure, puis la variance intra-série et l'écart type (S) en utilisant les formules :

$$V = \frac{V_1 (n_1 - 1) + v_2 (n_2 - 1) + \dots}{n_1 - 1 + (n_2 - 1) + \dots}$$

$$S = \sqrt{V}$$

IV-4-2 Reproductibilité

C'est la précision de la méthode lorsqu'elle est appliquée dans des conditions différentes, généralement dans des laboratoires différents, à des échantillons distincts, théoriquement identiques, prélevés sur le même lot homogène de produit à analyser.

La comparaison des résultats par différents analystes, avec un matériel différent, à des dates différentes, peut aussi fournir des informations précises à cet égard.

Il suffit de calculer la moyenne et l'écart type des valeurs obtenues pour un même spécimen au cours des séries indépendamment effectuées en exploitant les formules :

$$m = \frac{\sum x_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - m)^2}{n-1}}$$

x_i = chaque valeur

n = nombre total de valeurs

S = écart-type

m = moyenne

IV-5 SPECIFICITE

C'est l'aptitude d'une méthode à mesurer la concentration de l'analyte sans interférence de la part des autres constituants de l'échantillon.

La sélectivité (ou l'absence de la sélectivité) peut s'exprimer par l'erreur systématique constatée dans les résultats obtenus avec l'analyte en présence des concentrations escomptées des autres constituants, par comparaison des résultats obtenus en l'absence de ces substances [43]

IV-6 SENSIBILITE [42]

C'est l'aptitude de la méthode à détecter de petites variations de concentration. Elle est représentée par la pente de la courbe d'étalonnage. On doit éviter de donner à ce terme un sens plus général englobant la limite de détection et / ou de dosage.

IV-7 EXACTITUDE ET JUSTESSE

Il s'agit d'une évaluation de l'exactitude d'une méthode B par rapport à une méthode A reconnue pour sa fiabilité (technique de référence), avec des spécimens de contrôle.

L'exactitude d'une méthode est le degré de concordance entre les résultats obtenus et la vraie valeur de la grandeur mesurée.

Remarque :

Toutes ces caractéristiques ne sont pas toujours applicables à toutes les méthodes d'essai ni à tous les produits à analyser.

Dans tous les cas, chacune des caractéristiques de performances applicables à la méthode analytique doit faire l'objet d'une évaluation fondée sur des données expérimentales.

I/ CADRE DE L'ETUDE

Le laboratoire national de contrôle des médicaments (LNCM) est situé en face de l'hôpital Aristide Le Dantec. C'est un service rattaché au ministère de la santé et dont les principales activités sont le contrôle de qualité des médicaments. Il est composé de différentes sections :

- Section physico-chimique
- Section microbiologique
- Section des vaccins
- Section Assurance qualité

Les différentes sections sont dirigées par des enseignants d'université. D'où son rôle de partenariat avec l'université, les structures sanitaires et laboratoires pharmaceutiques.

II/ MATERIELS ET METHODES

1- PRINCIPE

Il repose sur deux techniques :

- Méthode de diffusion en milieu gélosé (USP)
- Méthode par ensemencement par inondation sur Mueller Hinton.

L'activité d'un antifongique est estimée par la méthode de diffusion en milieu gélosé en comparant les diamètres d'inhibition de la croissance de

microorganismes sensibles provoquée respectivement par des concentrations connues de l'antifongique à tester et d'une substance de référence [41,42].

2- MATERIEL ET REACTIFS

2-1 Matériels

2-1-1 Matériels lourds

DOMINATION	REFERENCE	FABRIQUANT
Autoclave stérilisant	10933	Sili AVX 130 E
Autoclave lecture	10933	Sili AVX 130 E
Balance de précision	50511211	BOCH SAE 200
Hotte	BK 2 B	FLUFRANCE
Étuve	2002471	SELECTA
Four micro-onde	4B76120A	MULTIWAVE
Bain Marie	6001237	SELECTAT [®]
Lecteur	22938	PBI READ BIOTIC
MICROSCOPE optique	004622	XSZ-10BN
SPECTRO photomètre		JASCO V-570
STERILISANT	T5025	HERAEUS
VORTEX	54111	HEIDOLPH

2-1-2 Matériel léger

- Bec bunsen
- Briquet
- Cupules
- Disques
- Pincés
- Pipettes
- Portoirs
- Agitateur
- Seringue
- Filtre
- Coton cardé stérile

2-2 Réactifs

- Souches : *Candida tropicalis* ATCC ε
Candida albicans ATCC γ
Saccharomyces cerevisiae ATCC₁
- Substance de référence : **A**
- Solvant : **X**
- Diluant : Tampon **Y**
- Milieu de culture :
 - Antibiotic Médium₁₉ (AM₁₉)
 - Mueller Hinton (MH)
- Eau physiologique stérile

3 - MODE OPERATOIRE

3-1 Préparation de la solution tampon phosphate

* Nous avons dissout ag de phosphate dipotassique et 4ag de phosphate monopotassique dans de l'eau (multiple de 100ml x 2, 3, 4,, 10) suivant la quantité de solution qu'on a besoin pour la manipulation.

* Soit dissoudre bg de phosphate dipotassique + Eau (100ml x 2, 3,, 10) + KOH 10N (en ml)

Le pH est ajusté de manière convenable suivant le produit à tester et la souche test en se basant sur les facteurs favorisant de croissance (acidité, basicité...), avec H_3PO_4 ou NaOH (KOH) 10N.

Nous avons stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15mn et le pH est ajusté après stérilisation (NaOH 1N ou HCL 1N).

3-2 Préparation des milieux

3-2-1 Milieu AM₁₉

3-2-1-1 Formule

- | | |
|---------------------|-------|
| - Peptone | 0,94g |
| - Extrait de levure | 0,47g |

- Extrait de viande de bœuf 0,24g
- Chlorure de sodium (NaCl) 1,0g
- Dextrose 1,0g
- Agar 2,35g
- Eau qsp 100ml

3-2-1-2 Préparation

Nous avons mis en suspension la poudre dans de l'eau qsp (eau distillée), mélangé, chauffé en agitant, porter à ébullition environ 1 minute, réparti et stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Le pH est ajusté de façon convenable

3-2-2 Mueller Hinton 2 – milieu

3-2-2-1 Formule en g/l d'eau distillée

- Infusion de viande de bœuf 300
- Bio case 17,5
- Amidon 1,5
- Gélose 17

pH = 7,3

3-2-2-2 Préparation

Nous avons mis en suspension 38g de poudre dans un litre d'eau distillée, mélangé, chauffé en agitant, puis porté à ébullition environ 1mn, ensuite réparti et stérilisé 15mn à 116°C. (Eviter toute surchauffe).

3-3 Préparation de la suspension bactérienne

Nous avons préparé une suspension bactérienne d'opacité 0,5 Mc Farland avec 5ml d'eau physiologique stérile.

3- 4 Préparation des gammes de dilution

3-4-1 Solution mère de la substance de référence

- Nous avons dissout la quantité de l'antifongique à tester pesée de manière précise, ou le contenu d'un flacon entier dans le solvant (X) approprié.
- Nous avons dilué en respectant la concentration indiquée.

Faisons des dilutions de travail à partir de la dilution précédente en respectant un ratio de 1,25 ou 2 avec les diluants.

3-4-2 Echantillon à tester

Suivant la préparation inconnue à tester, nous avons fixé une activité présumée par unité de poids ou de volume .

Nous avons préparé une solution mère et une dilution-test comme spécifié pour chaque antifongique avec le même diluant final que la substance de référence.

La concentration de l'antifongique à tester doit être égale à la médiane de la gamme d'étalonnage de la substances de référence.

3-4-3 Gamme à tester

Nous avons encadré la dose moyenne de deux concentrations inférieures à gauche et deux concentrations supérieures à droite.

- Etalon : substance de référence **A**
- Titre : en $\mu\text{g}/\text{mg}$
- Dose moyenne d'activité : $\mu\text{g}/\text{ml}$

$$\text{Masse à peser} = \frac{\text{Volume (ml)} \times \text{concentration } (\mu\text{g}/\text{ml})}{\text{Titre } (\mu\text{g}/\text{mg})}$$

3-4-4 Préparation de l'inoculum

- Conditions d'incubation :
 - Milieu AM₁₉
 - Température : 29 – 31°C
 - Temps : 48h
- Composition inoculum (1ml par 100ml de milieu)

4- TITRAGE

4-1 AM₁₉

Nous avons régénéré le milieu AM₁₉ et le laisser en suspension à 45 –50°C,

- * mélangé 1ml de suspension bactérienne avec le milieu,
- * coulé sur 3 à 5 boîtes de pétri et laissé solidifier
- * déposé les disques à l'aide d'une pince stérile
- * chargé les disques avec 15µl de chaque dilution
- * laissé diffuser 2h
- * incubé à 37°C pendant 48h

4-2 Mueller Hinton

Avant utilisation, il est conseillé de sécher les boîtes 10 à 30mn à l'étuve à 35°C pour éliminer l'excès d'humidité et ramener le milieu à la température normale d'incubation. En effet, certains germes fragiles ne nécessitent pas à des variations de température importantes et risquent de ne pas se développer .

5 - EXPRESSION DES RESULTATS

5-1 Formules

$$\text{DR} = \frac{\text{D}}{\text{E}} \times \text{DT}$$

DR = Dose réelle

DT = Dose mentionnée sur la forme pharmaceutique

D = Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'échantillon

E = Moyenne des diamètres des zones d'inhibition de l'étalon

5-2 Détermination de l'activité (A)

DT = 100% d'activité

DR = A%

$$A\% = \frac{100\% \times DR}{DT}$$

❖ Tracé de la droite de régression

- Mesurer les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme étalon.
- Etablir sur papier semi logarithmique la droite : logarithme (base 2) de

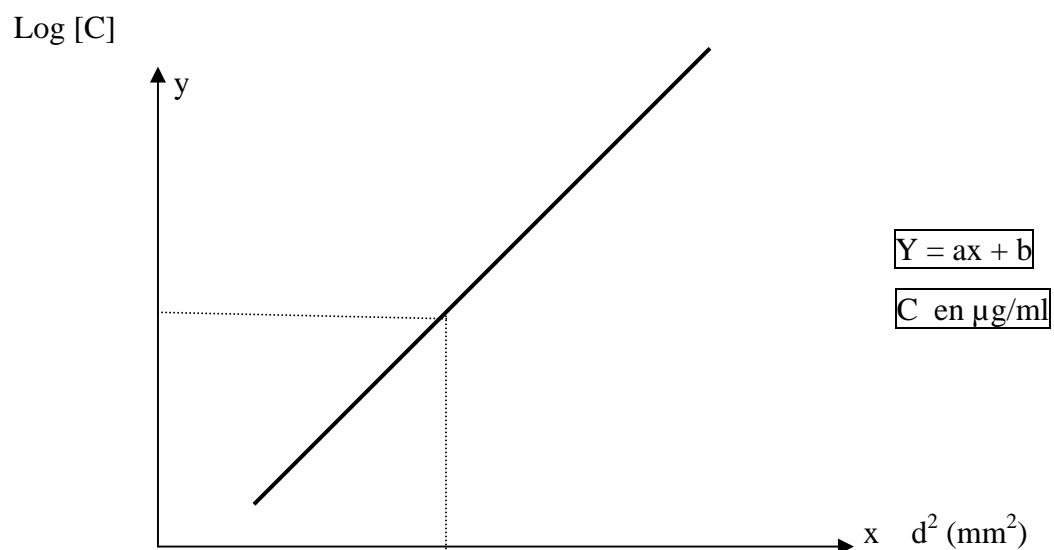
la concentration en fonction du diamètre au carré (d^2)

$$\text{Log [C]} = f(d^2)$$

ou

$$d^2 = f(\text{Log [C]})$$

- Déduire la concentration de l'antifongique correspondant en utilisant le système de projection sur la droite



6- APPLICATION

6-1 Nystatine

6-1-1 Caractères

Elle se présente sous forme suspension, comprimés gynécologiques ou gélules.

La poudre est très peu soluble dans l'eau, assez soluble dans les solvants organiques : diméthylformamide (DMF), diméthylsulfoxyde (DMSO). La poudre est détruite par la chaleur. Elle se détériore en milieu acide.

6-1-2 Dosage

6-1-2-1 Principe

Il se repose sur la méthode de diffusion en milieu gélosé, ou par turbidimétrie

6-1-2-2 Réactifs

- Souches tests : *Candida tropicalis* ATCC 13 803

Candida albicans ATCC 24 433

Sacharomyces cerevisiae ATCC 2601

- Substance de référence : Nystatine
- Solvant : Diméthylformamide
- Diluant : Tampon 6 : 10% pH = 6,0
- Milieu de culture : AM₁₉
- Eau physiologique stérile

6-1-2-3 Mode opératoire

6-1-2-3-1 Préparation de la solution **tampon phosphate**

Nous avons dissout 2g de phosphate dipotassique et 8g de phosphate monopotassique dans 100ml.

Le pH est ajusté à $6,0 \pm 0,1$ avec H_3PO_4 18N ou NaOH 10N.

Nous avons stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15mn.

6-1-2-3-2 Préparation du milieu **(référéce protocole général)**

6-1-2-3-3 Préparation de suspension **bactérienne (protocole)**

6-1-2-3-4 Préparation des gammes de **dilution**

- Etalon : Nystatine
- Titre : 1000 UI/mg
- Dose moyenne d'activité : 20µg/ml
- Nystatine 1000 UI/ml (Solution mère)



DMF

[624 ; 500 ; 400 ; 320 ; 256] µg /ml



Tampon 6

[31,2 ; 25 ; 20 ; 16 ; 12,8]µg/ml (dilution de travail)

NB : nous avons dissout 5mg d'étalon dans 5ml de DMF, fait des dilution.

- Antibiotique à tester : Nystatine comprimés ou gélules 500,000 UI.

Nous avons réalisé les mêmes gammes de dilution que l'étalon

- Masse à peser mg (Référence protocole général) : Pour les formes liquides ou pâteuses nous avons calculé le volume de solvant à ajouter pour avoir la concentration de la solution mère.

6-1-2-3 Titrage (référence protocole)

6-1-2-4 Expression des résultats

Après incubation , les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme étalon ont été mesurés. Le calcul du titre de l'antifongique a été effectué à l'aide de la somme de trois lectures obtenues pour chaque dilution de l'étalon et de l'antifongique à titrer .

De la moyenne nous avons déduit le pourcentage d'activité et par la suite le titre de l'antifongique en mg ou en UI.

Soit SE_1 ; SE_2 ; SE_3 la somme des trois dilutions de l'étalon

et SD_1 ; SD_2 ; SD_3 la somme des trois dilutions de l'échantillon

❖ Moyenne des étalons

$$ME_1 = \frac{SE_1}{3} ; \quad ME_2 = \frac{SE_2}{3} \quad ME_3 = \frac{SE_3}{3}$$

❖ Moyennes échantillons

$$MD_1 = \frac{SD_1}{3} ; \quad MD_2 = \frac{SD_2}{3} \quad MD_3 = \frac{SD_3}{3}$$

❖ $MD_1 \longrightarrow X_1\% ; \quad MD_2 \longrightarrow X_2\% ; \quad MD_3 \longrightarrow X_2\%$

ME₁ —————> 100% Activité ; ME₂ —————> 100 % ; ME₂ —————> 100 %

❖ Pourcentage de l'activité de l'échantillon

$$X\% = (X_1 + X_2 + X_3) \times 1/3$$

6-2 Amphotericine B

6-2-1 Caractères

Le produit se présente sous forme de poudre, lotion, gélules, suspension, poudre pour préparation injectable. C'est une poudre jaune, insoluble dans l'eau et l'alcool, soluble dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO) et DMF. Son poids moléculaire est de 960 ; sa forme liquide (lotion 3%) est opaque jaune et l'odeur pratiquement nulle.

L'identification en présence d'acide phosphorique à 85% a donné une coloration bleu-vert. Nous avons aussi une coloration bleu-vert fugace en présence d'acide nitrique. Nous pouvons faire une chromatographie sur couche mince (CCM).

6-2-2 Dosage

6-2-2-1 Principe

Le dosage bactériologique utilise la méthode par turbidimétrie. Nous utilisons aussi la méthode de diffusion sur gélose.

La croissance en milieu liquide de *Candida* en présence de concentration inconnue d'amphotéricine B est comparée à celle obtenue avec des concentrations connues.

6-2-2-2 Réactifs

- Souches test : *Candida tropicalis* ATCC 13803
Candida albicans ATCC 24433
- Solvant : Dimethylsulfoxyde (DMSO)
- Diluant : Tampon 10 : 0,2M ; pH = 10,5
- Milieu de culture : AM₁₉
- Eau physiologique stérile

6-2-2-3 Mode opératoire

6-2-2-3-1 Préparation de la solution **tampon**

Nous avons dissout 3,5g de phosphate dipotassique dans 100ml + KOH 10N.
Le pH est ajusté à 10,5 par H₃PO₄ 18N ou KOH 10N \pm 0,1.

6-2-2-3-2 Préparation du milieu **(référence protocole)**

6-2-2-3-3 Préparation de la suspension

bactérienne (protocole)

6-2-2-3-4 Préparation des gammes de dilution

- Etalon : amphotéricine B
- Titre = 1mg/ml
- Dose moyenne 20 µg/ml

	Volume (ml) x concentration (µg/ml)
Masse à peser =	_____
	Titre (µg/mg)

- Dilutions avec le dimethylsulfoxyde (DMSO)

Amphotéricine B 1,6 mg/ml (solution mère)



DMSO

[800 ; 400 ; 200 ; 100 ; 50] µg/ml



tampon 10

[80 ; 40 ; 20 ; 10 ; 5] µg/ml (dilution de travail)

NB : pour les formes liquides ou pateuses nous avons calculé le volume de solvant à ajouter pour avoir la concentration de la solution mère.

6-2-2-4 Titrage (référence protocole)

6-2-2-5 Résultats (identique à la nystatine)

II-6-3 Etude préliminaire avant le dosage microbiologique

Nous avons établi un plan de travail en utilisant des fiches.

Nous avons différentes fiches :

- Fiches pour milieux
- Fiches pour souches de référence
- Fiches pour tampon

6-3-1 Régénération des souches de référence

Les souches de référence sont présentées dans des tubes contenant de la gélose d'entretien de souches (GES). Ces tubes contiennent *Candida albicans* et *Candida tropicalis*. Le genre *Saccharomyces* est livré sous forme de pastille. Les souches utilisées sont de type ATCC.

Les pastilles transférées dans un bouillon nutritif (**Sabouraud**). Elles ont été incubées pendant 24 heures et ont été effectuées sur des colonies de 48 heures.

Nous avons ensuite validé la souche de référence en utilisant les caractères morphologiques et physiologiques [1].

6-3-2 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture ainsi préparé, est stérilisé à l'autoclave à 121°C pendant 15 à 20 minutes. Le pH est ajusté après stérilisation.

Nous avons réparti le milieu de culture dans des boîtes de pétri puis incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures. Ceci nous permet de vérifier la stérilité du milieu de culture. Nous avons ensuite ensemencé trois boîtes de pétri avec les différentes souches de référence. L'incubation s'est faite à 37°C pendant 48 heures.

6-3-3 Contrôle de l'activité de la substance de référence

Nous avons mis en contact la substance de référence avec la souche de référence. La suspension fongique est mélangée avec le milieu en respectant les proportions et la turbidité. Nous avons ainsi posé deux à trois disques sur la gélose.

Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, nous avons mesuré les diamètres d'inhibition. Ceci nous permettait de voir si la substance de référence est bonne avant de commencer la manipulation proprement dite.

Nous avons considéré le premier essai comme préliminaire. Nous avons un intervalle d'activité compris entre 80 et 125%. Ceci nous permettra de mesurer la reproductibilité de nos essais. Le même contrôle a été fait avec l'échantillon.

7- FACTEURS INFLUENÇANT L'ACTIVITE DE L'ANTIFONGIQUE

7-1 Température

Il s'agit d'étudier la température maximale qui permet d'inhiber ou de tuer les germes. Les boîtes de Pétri contenant différentes dilutions de l'antifongique à

tester et de la référence (substance) sont incubées à différentes températures : 30°C , 37°C , 38°C , 39°C , 40°C.

7-2 Charge fongique

Il s'agissait d'évaluer la concentration des champignons qu'il faut avoir pour un volume de milieu donné pour effectuer un bon test de contrôle. Nous avons déterminé un niveau correct de la turbidité pour la préparation de la suspension fongique.

7-3 Temps de contact de l'antifongique à tester avec la souche de référence

Il s'agissait de déterminer le temps d'incubation. La durée a varié de 24 heures, 48 heures, 72 heures.

7-4 Le pH du milieu

Il s'agissait d'utiliser un milieu à pH acide, neutre et basique. Ensuite comparer les résultats.

8/ CONTROLE DE QUALITE

8-1 Etude de la répétabilité de la méthode

Il s'agissait de répéter la méthode plusieurs fois dans les mêmes conditions et de pouvoir trouver les mêmes résultats.

8-2 Etude de la reproductibilité

Il s'agissait de l'utilisation des mêmes souches de référence pour différents tests avec la même gamme de concentration. Ces souches de référence devaient présenter les mêmes résultats.

8-3 Etude de la réalisation

Elle est déterminée en prenant le temps effectué par deux autres membres du personnel depuis la pesée jusqu'à l'introduction des boîtes dans l'étuve pour l'incubation.

8-4 Etude de la stabilité dans le temps

Il s'agissait de déterminer le temps au bout duquel les milieux et les tampons resteraient efficaces et donneraient de bons résultats.

Pour cela, contrôlons la gélose. Il faut vérifier la date de péremption du milieu en poudre .

- Respecter la formule donnée sur la boîte ;
- Ajuster le pH du milieu ;
- Auto claver pour avoir un milieu stérile ;
- Respecter la profondeur de la gélose en coulant le milieu dans les boites de pétri

8-5 Validité des souches

Il est nécessaire de faire une étude parallèle avec les souches référence.

8-6 Evaluation du coût de la méthode

Cette évaluation s'est faite en essayant de substituer quelques réactifs ou matériels moins chers ou plus facilement disponibles que ceux proposés par la pharmacopée américaine.

III/ RESULTATS

III-1 PHYSICO-CHIMIQUES

1-1 IDENTIFICATION DE L'AMPHOTERICINE B

Fungizone gélules 250 mg est composé de :

- Amphotéricine B, équivalent en activité de 250mg
 - Polyvidone
 - Amidon de maïs
 - Stéarate de magnésium
 - Lactose
 - L'enveloppe de la gélule : gélatine, indigotine, dioxyde de titane, oxyde de fer jaune. Calibrage n° 0
- Les gélules propres sont lisses, brillantes, dures, à corps bleu et à tête verte contenant un granulé jaune peu foncé sans impuretés visibles .
- Temps de délitement
- A 37°C le temps de délitement a été de 8mn 45 secondes dans l'eau .
- Spectre à l'UV (voir annexes)

Le spectre de Fungizone gélule présente 3 maximums d'absorption

$$\gamma_1 = 370 \text{ nm}$$

$$A_1 = 0,0973$$

$$\gamma_2 = 389 \text{ nm}$$

$$A_2 = 0,1881$$

$$\gamma_3 = 413 \text{ nm}$$

$$A_3 = 0,2063$$

$$\frac{A_2}{A_3} = \frac{A_{389}}{A_{413}} = \frac{0,1881}{0,2063} = 0,91$$

$$\frac{A_1}{A_2} = 0,51$$

1-2 IDENTIFICATION DE LA NYSTATINE PAR HPLC OU A L'UV

1-2-1 HPLC

La phase mobile est composé :

✓ Méthanol	70
✓ Eau	20
✓ Diméthylformamide	10

Le détecteur à l'ultra violet donne $\lambda = 254 \text{ nm}$

La colonne est de type C18 :

Longueur = 25 cm

Diamètre = 4,6 cm

1-2-2 Spectre UV

Nous avons représenté les spectres de la :

- Nystatine standard
- Nystatine comprimés 500 000UI

III-2 RESULTATS MICROBIOLOGIQUES

2-1 DOSAGE MICROBIOLOGIQUE DE LA NYSTATINE COMPRIMES

A 500.000 UI

2-1-1 Etude de la répétabilité et de la reproductibilité sur

Candida albicans

	Groupes d'Essais		
	C ₁	C ₂	C ₃
ESSAI N°1	21,68 mm	20,44 mm	15,81 mm
ESSAI N°2	21,70 mm	20,43 mm	15,77 mm
ESSAI N°3	21,72 mm	20,48 mm	15,76 mm
moyenne	21,70 mm	20,45 mm	15,78 mm
ECART type	0,016	0,021	0,021

- ❖ Les résultats ont été obtenus sur 3 groupes et 3 essais pour chaque concentration (C₁, C₂, C₃). La moyenne a été calculée pour chaque concentration.
- ❖ La reproductibilité est obtenue en agissant sur le paramètre temps
- ❖ Les mêmes essais ont été faits pour les autres molécules (échantillons, amphotéricine)
- ❖ Variance de répétabilité

$$S_r^2 = \sum_{j=1}^k S_j^2 / k$$

$$Sr^2 = \frac{0,000256 + 0,000441 \times 2}{3}$$

$$Sr^2 = 0,0003$$

❖ Répétabilité :

$$CVr = \frac{100 \times Sr}{\bar{m}}$$

\bar{m} : moyenne des moyennes

$$CVr = 0,0896$$

❖ Reproductibilité : $1,33 \times \text{répétabilité} = 1,33 \times 0,0896 = 0,119$

2-1-2 Tableau des diamètres d'inhibition en fonction des concentrations : (décroissantes) pour la substance référence

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	C_1	C_2	C_3
Diamètre moyen en mm	21,70	20,45	15,78

$C_0 = 1\text{mg / ml}$ **Moyenne** = 19,31mm $d_0 =$
25,30mm

σ = écart type 3,12 $S_m = 2,206$ $S = \text{variance} = 9,73$

Intervalle = 19,31mm + 4,412

2-1-3 Tableau des diamètres de la substance à doser : échantillon

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	C_1	C_2	C_3
Diamètre moyen en mm	20,49	18,26	11,54

$$d_0 = 24,00\text{mm} \quad \text{Moyenne} = 17,76\text{mm} \quad \text{Ecart type} = 3,00$$

$$\text{Variance} = S = 9 \quad S_m = 2,12$$

$$\boxed{\text{Limite de confiance } 95,5\% = 17,76 \pm 4,24\text{mm}}$$

$$S_m = \text{écart type standard de la moyenne symbolique} = \frac{\text{Ecart type}}{\sqrt{n-1}}$$

$$\boxed{\text{Intervalle de confiance} = \text{Moyenne} \pm 2S_m}$$

2-1-4 Calcul de l'activité

$$\boxed{\text{DR} = \frac{D}{E} \times \text{DT}}$$

$$\underline{\text{AN}} : \text{DR} = \frac{17,76}{19,31} \times 500.000$$

$$\boxed{\text{DR} = 459.865,354 \text{ UI}}$$

$$A\% = \frac{100 \times \text{DR}}{\text{DT}}$$

$$\boxed{A\% = 91,97\%}$$

2-2 ACTION DE LA NYSTATINE COMPRIME : ACTION SUR

Saccharomyces cerevisiae

2-2-1 Action de la substance de référence

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	C_1	C_2	C_3
Diamètre moyen en mm	13,74	12,93	12,15

$C_0 = 1\text{mg/ml}$ $\bar{x} = \text{moyenne} = 12,94\text{mm}$ $d_0 = 14,48\text{mm}$

Ecart type = 0,79

Sm = 0,55

Intervalle de confiance 95,5% = $12,94 \pm 1,1$

2-2-2 Action de la substance à doser

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	C_1	C_2	C_3
Diamètre moyen en mm	14,43	13,88	13,22

\bar{x} = Moyenne = 13,84 mm $\bar{\sigma}$ = 0,60 S_m = 0,42

Intervalle de confiance = 13,84mm \pm 0,84

2-2-3 Calcul de l'activité

$$DR = \frac{D}{E} \times DT$$

AN $DR = \frac{13,84}{12,94} \times 500.000 \text{ UI}$

$$DR = 534.775,8 \text{ UI}$$

$$A\% = \frac{100 \times DR}{DT} \times DR$$

$$A\% = 106,9\%$$

2-3 DOSAGE DE L'AMPHOTERICINE B : ACTION SUR *Candida albicans* ATCC 24433

2-3-1 Action de la substance de référence

Concentration en µg/ml	C ₁	C ₂	C ₃
Diamètre moyen en	12,19	9,55	7,81

mm			
----	--	--	--

$$C_1 = 80\mu\text{g/ml} \quad C_2 = 40\mu\text{g/ml} \quad C_3 = 20\mu\text{g/ml}$$

$$C_0 = 1,6\text{mg/ml} \quad x = \text{Moyenne} = 9,85\text{mm}$$

$$d_0 = 20\text{mm} \quad \text{écart type} = 1,96 \quad S_m = 1,38$$

Intervalle = 7,86mm \pm 2,76

2-3-2 Action de la substance à doser :forme gélules de 250mg

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	C_1	C_2	C_3
Diamètre en mm	9,92	7,67	6

$$d_0 = 17,90\text{mm} \quad \text{Moyenne} = 7,86\text{mm}$$

2-3-3 Calcul de l'activité

$DR = \frac{D}{E} \times DT$	s
------------------------------	---

7,86



$$\text{AN DR} = \frac{\quad}{9,85} \times 250\text{mg}$$

$$\text{DR} = 199,49\text{mg}$$

$\text{A\%} = \frac{100 \times \text{DR}}{\text{DT}} \times \text{DR}$

$\text{A\%} = 79,79\%$

2-4 ACTION DE L'AMPHOTERICINE B : SUR *Candida tropicalis* ATCC 13803

2-4-1 Action de la substance de référence

Concentration en µg/ml	C ₁	C ₂	C ₃
Diamètre moyen en mm	16,07	14,71	11,83

$$C_0 = 1,6\text{mg/ml} \quad \text{Moyenne} = 14,20\text{mm} \quad d_0 = 19,4\text{mm}$$

$$\text{Ecart type} = 2,16 \quad \text{Sm} = 1,52$$

$\text{Intervalle} = 14,20\text{mm} \pm 3,04$

2-4-2 Action de la substance à doser :forme gélules de 250mg

Concentration en $\mu\text{g/ml}$	C_1	C_2	C_3
Diamètre moyen en mm	16,28	14,36	11,11

$$\text{Moyenne} = 13,91\text{mm} \quad \text{Sm} = 1,84 \quad \bar{\sigma} = 1,84$$

$$\text{Intervalle de confiance} = 13,91\text{mm} \pm 3,68$$

2-4-3 Calcul de l'activité

$$\text{DR} = 244,89 \text{ mg}$$

$$\text{A\%} = 97,95\%$$

Tableaux de valeurs

Action de l'amphotéricine B sur *Candida tropicalis*

Log (C)	1,30	1,60	1,90
d ²	139,95	216,38	258,24

Action de la nystatine sur *Candida albicans*

Log (C)	1,30	1,40	1,50
d ²	249,008	418,202	470,890

Action de la nystatine B sur *Saccharomyces cerevisiae*

Log (C)	1,30	1,40	1,50
d ²	147,622	167,184	188,787

IV/ DISCUSSION

Nous avons proposé deux méthodes alternatives aux techniques classiques de dosage des médicaments antifongiques. La technique de diffusion en milieu gélosé est surtout soumise à des nombreux facteurs dont la variation peut compromettre la précision des résultats.

1/ MISE AU POINT ET STANDARDISATION DE LA METHODE DE DOSAGE

1-1 MILIEU GELOSE

Le choix du milieu utilisé pour le dosage microbiologique est primordial la qualité du dosage. La composition et le pH du milieu de culture interfèrent avec l'activité de l'antifongique. La diffusion du médicament est dépendante de la croissance de la souche de référence. Chaque famille d'antifongique possède un pH optimum. Le pH est neutre à alcalin pour les macrolides (nystatine, amphotéricine B) [42, 43].

1-2 SOLVANT ET DILUANT

La solution mère d'antifongique est généralement préparée dans un solvant organique (Diméthylformamide ou diméthylsulfoxyde). Les dilutions sont faites avec des tampons phosphate. Le pH optimum d'activité doit être respecté (pH = 6 ou 10). Cependant certains antifongiques (macrolides) sont peu ou pas solubles dans l'eau. Il faut d'abord les solubiliser dans un solvant organique.

La gamme d'étalonnage est réalisée à partir de la solution mère en utilisant un solvant adéquat. La solution mère est préparée et utilisée le jour même du dosage.

1-3 SOUCHE DE REFERENCE

Les critères de choix de la souche sont :

- Sa grande sensibilité à l'antifongique à doser, pouvant détecter une concentration plus faible qu'il est possible.
- Une croissance rapide et s'effectuant correctement dans les conditions du dosage.
- Obtention des diamètres d'inhibition clairement délimités après un temps d'incubation adéquat (24 à 48 heures).

La souche est adaptée à chaque famille d'antifongique. Elle est choisie parmi les souches de référence répertoriées dans les instituts spécialisés [41] : ATCC (American Type Culture Collection).

2- EVALUATION DE LA METHODE

2-1 AVANTAGES ET INCONVENIENTS DE LA METHODE

La méthode de dosage microbiologique présente l'avantage de ne nécessiter qu'un matériel peu coûteux. Ce matériel est souvent disponible dans tous les laboratoires de microbiologie.

Sa réalisation est simple et d'exécution facile par le personnel technique. Elle s'applique au dosage de plusieurs antibiotiques [24].

Cette méthode mesure l'activité antibiotique de l'échantillon en prenant en compte les éventuels métabolites actifs.

Cependant, elle constitue une méthode de réalisation longue (4 à 6 heures). Son délai de réponse peut varier entre 24 à 48 heures . c'est pour cette raison qu'elle est difficilement applicable en urgence.

Son exactitude est relativement modeste (de l'ordre de 15%). Sa spécificité est conditionnée par la présence dans l'échantillon de substances qu'il est important de connaître. La fidélité de la méthode est limitée par la reproductibilité de l'inoculum employé. Le seuil de détection varie avec la souche référence.

Nous avons montré sur des exemples ponctuels que la technique pouvait donner des résultats intéressants.

2-2 LIMITES TECHNIQUES DE LA METHODE

2-2-1 Problème de solubilité des poudres

Les polyènes sont très peu solubles dans l'eau. La substance de référence doit être dissoute dans un volume adéquat de solvant.

2-2-2 Problème de diffusion

Certains antifongiques diffusent très mal dans la gélose et les diamètres obtenus sont petits. Il est possible d'améliorer le dosage en utilisant un milieu à base d'agarose [43].

2-3 REPRODUCTIBILITE ET REPETABILITE

La technique de diffusion en milieu gélosé est répétable et reproductible à plus de 94% suivant les résultats obtenus sur les différentes souches.

Nous avons répété les essais sur un court terme. Pour chaque concentration, nous avons fait neuf déterminations. La moyenne a été calculée pour chaque concentration (C_1 , C_2 , C_3). La concentration C_1 a été faite trois fois dans un court terme et trois fois dans la semaine suivante. Les diamètres ont été calculés en faisant la moyenne des diamètres obtenus individuellement. Le diamètre moyen est calculé suivant le procédé de la pharmacopée [43].

La reproductibilité des résultats est obtenue en changeant un seul paramètre. Ce paramètre est le temps. Nous avons comparé les résultats obtenus pendant la première, la deuxième semaine puis la troisième semaine.

Les manipulations se sont déroulées dans une durée de trois semaines. La dose de principe actif indiquée dans les médicaments à doser était pratiquement conforme aux normes de la pharmacopée [41]. Elle se retrouve dans la marge d'efficacité qui est comprise entre [80% - 125%].

Les résultats ont été calculés suivant les activités (A%). Pour la nystatine nous avons retrouvé 91,97% d'activité sur *Candida albicans*, 106,9% sur *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601. Avec l'amphotéricine B nous avons obtenu 79,79% (\simeq 80%) sur *Candida albicans*, 97,95% sur *Candida tropicalis*.

Ces deux paramètres de validation ont l'avantage de refléter la fidélité de notre méthode. Nous avons trouvé un coefficient de variation de 8,38% (< 15%).

2-4 PREPARATION DE L'INOCULUM

En comparant nos résultats avec ceux de la pharmacopée, nous recommandons de préparer un bon inoculum à partir de la suspension fongique de 0,5 Mac Farland [41].

Ceci nous a permis d'obtenir une meilleure précision des diamètres d'inhibition (zones claires). La lecture sera facile avec le lecteur ou le pied à coulisse. Nous avons ainsi obtenu une meilleure appréciation de l'efficacité de l'antifongique à tester.

Nous nous sommes efforcés pour respecter la proportion 1 ml de suspension fongique pour 100 ml de milieu. Le problème s'est posé lors de la technique par inondation sur le milieu Mueller Hinton.

Il est important de préciser que cette charge fongique agit directement sur l'activité de l'antifongique surtout avec l'amphotéricine B. C'est ce qui explique l'activité de 79,79% sur *Candida albicans*. Plus la concentration fongique est importante plus les concentrations antifongiques sont élevées. La culture fongique s'arrête lorsqu'elle rencontre une concentration égale à sa concentration minimale inhibitrice (CMI). La mesure du diamètre d'inhibition reflète la valeur de la CMI du médicament [8, 20, 22].

2-5 TEMPS DE CONTACT ENTRE L'ANTIFONGIQUE A TESTER ET LA SOUCHE DE REFERENCE :

Nos résultats sont obtenus après un temps de prédiffusion de 2 heures. Cette étape se fait à la température du laboratoire.

Nous avons ensuite incubé les boîtes de Pétri pendant 24 à 48 heures. Le temps de contact varie suivant l'antifongique [11].

Nous avons constaté que l'étape de prédiffusion permettait d'éliminer l'humidité résiduelle. Ceci nous a permis d'avoir des zones claires et nettes. Ainsi

nous avons obtenu des contours précis et une bonne lisibilité. Nous pouvons en déduire que plus ce temps est long plus l'activité antifongique est meilleure. Ce facteur doit être pris en compte dans le traitement des mycoses [2, 8].

2-6 LE pH DU MILIEU UTILISE

L'ajustement du pH après stérilisation demeure très important. Il influence fortement l'activité de l'antifongique. Le pH acide diminue l'activité des polyènes. Il favorise la croissance des champignons. Ceci constitue un élément important dans le traitement des candidoses vaginales [6, 12].

2-7 LA TEMPERATURE

C'est l'un des facteurs à maîtriser. Elle peut rapidement fausser les résultats. Nous avons pris la peine de surveiller la chaîne de froid pour la conservation des substances de référence des milieux et des tampons. Nous avons ainsi établi des fiches de surveillance de l'incubateur et du réfrigérateur.

La température agit à deux niveaux :

- ✓ Pendant l'inoculation, le milieu de culture est maintenu en surfusion. Il faut disposer d'un bon bain-marie. Une variation importante de la température peut entraîner une inhibition de la croissance des champignons. Ceci va se répercuter sur les résultats. L'activité des antifongiques est meilleure pendant que les champignons sont en phase de croissance exponentielle [31].

- ✓ Pendant la période d'incubation : il est important de noter qu'au delà de 37°C, les souches de référence sont inhibées.

2-8 LA STABILITE

La précision de la méthode est aussi liée à la stabilité des tampons, des milieux et des substances de référence. Les milieux sont préparés la veille ou le même jour de la manipulation. Nous vérifions le pH des tampons chaque fin de semaine. Les tampons restaient stables pendant tout le mois de l'essai. Leur préparation était fastidieux.

Il faut noter que les poudres d'amphotéricine B et de nystatine sont conservées entre 4 à 5°C. Leurs solutions deviennent instables après 24 heures de conservation [38, 41].

V/ CONCLUSION

Nous avons entrepris ce travail sur les médicaments antifongiques dans le but de valider des essais et d'étudier l'activité des différents antifongiques généralement utilisés en thérapeutique. Nous nous sommes efforcés de proposer des méthodes utilisables en pratique.

Notre étude a porté sur les polyènes (nystatine, amphotéricine B) et sur trois souches de référence isolées au niveau du laboratoire.

L'activité des médicaments sur ces différentes souches a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé qui offre plusieurs avantages parmi lesquels la réalisation simple et l'utilisation d'un matériel peu coûteux.

Au cours de cette étude, nous avons noté que ces différents antifongiques étaient actifs sur toutes les souches.

Sur *Candida albicans*, nous avons obtenu une activité de 91,97% avec la nystatine et 79,79% avec l'amphotéricine B gélules.

Sur *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, nous avons obtenu une activité de 106,9% avec la nystatine comprimés.

Sur *Candida tropicalis*, nous avons obtenu une activité 97,95% avec l'amphotéricine B gélules.

Ces résultats ont été obtenus avec des écarts type compris entre 0,6 et 3,12.

Les différents résultats nous ont montré que la méthode de diffusion en milieu gélosé est reproductible et répétable si nous respectons les conditions opératoires.

Les principaux facteurs qui peuvent influencer l'activité des antifongiques en particulier les polyènes ont été décrits : l'effet de la température, la concentration

des champignons, le temps de contact entre le médicament et la souche de référence et le pH du milieu de culture.

Une variation si minime soit-elle d'un de ces facteurs peut modifier la précision et la confiance des résultats. Cette étude nous a montré que cette technique de diffusion en milieu gélosé était performante et facilement réalisable. Il suffit d'être rigoureux dans la procédure de stérilisation du matériel et de contrôle de la souche de référence.

A partir de cette étude nous pouvons indiquer que le respect de la température d'incubation (36 – 37,5°C), le temps de diffusion du médicament (2 heures), la température du milieu de culture pendant l'inoculation ainsi que l'ajustement du pH des tampons demeurent nécessaires pour effectuer un test de contrôle. En outre il faudra laisser un temps de contact entre le médicament à doser et la souche de référence (24 à 48 heures). La suspension fongique doit avoir une turbidité comparable à 0,5 Mac Farland et utiliser 1 ml de cette suspension pour 100 ml de milieu de culture.

Les tests microbiologiques d'activité sont sujettes à des variables inter-essai ainsi qu'intra essai de sorte que plusieurs essais sont exigés pour une estimation sûre de l'activité de l'antifongique à doser. Démarrer par des solutions stocks de préparations différentes et des dilutions tests de la substance de référence puis avec l'échantillon. Ensuite répéter le test un autre jour. Si l'activité du second test diffère significativement de celle du premier, effectuer un ou plusieurs tests supplémentaires. Le résultat combiné des séries de tests plus petites et indépendantes, faites sur un nombre étalé de jours, est une estimation plus sûre de l'activité.

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi validée est performante. Cependant elle ne permet pas d'apprécier l'effet fongistatique et nécessite généralement des délais de réponses longs.

Des études ultérieures pourront être menées pour déterminer cet effet dans le but de lutter contre certaines infections fongiques. En plus cette étude pourra s'élargir à d'autres types de médicaments comme les antituberculeux pour le bien de la santé publique.

BIBLIOGRAPHIE

1 Ann O'fel

Maladies parasitaires et fongiques

Parasitologie – Mycologie.

5^{ème} édition, Edition C. et R la Madeleine 1992 ; 323 – 346, 362 – 372

2 Bennet, JE

« Antifungal agents ».

In : Principales and practice of infections diseases,

3rd edition, edited by G. L. Mandell et al ; Churchill Livingstone ; New York 1990; 361 – 370.

3 Bertan Gkat Zung;

Pharmacologie fondamentale et clinique.

Piccin, Nuova LIBRARISPA. Padoue – Italie 1996 ; 853 – 860.

4 Bindschalder, D. And Bennet, J. E.

« A Pharmacological guide to the clinical use of Amphotericin B ».

In Infection Dis.1969 ; 120, 427 – 436

5 Bouvenot G., Devulder B., Guillevin L. , Queneau P., Schaeffer.

Pathologie Médicale 5 Dermatologie.

Masson 1996; 120 – 126

6 Cauwen Bergh G.

Développements nouveaux et perspectives dans la thérapeutique antifongique.

Bull. Soc. Fr Mycol. Med 1984 ; 2 ; 415 –423.

7 CMR.

« Current and Emerging Azole Antifungal Agent ».

Janvier 1999; p 40 – 79, vol. 12, N°1

8 CMR

« Antifungal Susceptibility Testing »

Octobre 2001; Vol. 11 p 643. 658 , N°4; 140

9 Dupont B. Et Drouhet A.

Méthode rapide de la synergie antifongique

Bull. Soc. Fr. Mycol. Méd. 1977 ; 6 ; 291

10 Domp Martin D. , Drouhet E.

Folliculite à *Pityrosporum*. Action de l'éconazole.

Bull. Soc. Fr Mycol. Méd. 1977; 6 ; 15

11 Dromer F. ; Improvisi L. ; Dupont B.

Les tests de sensibilité des levures aux antifongiques

Option Biologie 1998 ; 1999 (suppl) : 45 – 46

12 Drouhet E. Et Dupont B.

Traitements antifongiques.

In Encyclopédie Médico – chirurgicale, Mal. Infect. PARIS, 1990 ; 8004 M 9 – 10.

13 Espinel – Ingroff, A

Antifungal susceptibility testing

Clin. Microbiol Newsl 18. 1996 ; 161 – 167

14 Fungizone

Dossier réservé à l'usage des Pharmaciens hospitaliers ;

Service de documentation médicale du laboratoire Bristol, Paris.

15 Gallis, H. A.

Amphotéricine B: a commentary on its role as an antifungal agent and as comparative agent in clinical trials.

Clin. Infect. Dis. 22, 1996 ; (suppl 2) : S 145 – 147

16 Ghannoun, M. A., Rice, L. B.

“Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and correlation of these a Mechanism with bacterial resistance”

CMR 12, 1999; 501 – 517.

17 Gentillini Marc

Antifongiques

Médecine tropicale 5^{ème} édition Flammarion, 1993 ; 274

18 Gray bill, JR

The futur of antifungal therapy

Clin. Infect. Dis. 22, 1996 (suppl. 2): S 166 – S 178

19 Grigoriu D. ; Delacretaz J. ; Borreli D.

Traité de mycologie médicale

Payot Lausanne – Doin Editeurs – Paris 1986 ; 169 ; 445 – 447

20 Grigoriu D. ; Grigoriu A.

In vitro study on the Antifungal Activity of Econazole Nitrate. The contact test.

MYKOSEN 1979 ; 22 , 409

21 Helen Koenig

Guide de mycologie médicale

Ellipses (ed Marketing SA) 1995 ; 22 – 27 ; 33 – 49 ; 74 – 75 ; 252 – 265

22 Jupeas Vessieres, A et Scavizzi M.

Sensibilités des bactéries aux antibiotiques. Méthodes d'étude en biologie clinique.

Ed. techniques , Encycl. Méd. Chic Paris – France. Mal. Infect. 8005 A30, 9 - 1999 ; 11.

23 Kenneth A. Arndt, M.D. Et Coll.

Thérapeutique dermatologique

Editions Pradel Paris 1997 ; 109 – 124

24 Larpent J. P.

Biotechnologie des antibiotiques

Masson – Paris – Milan – Barcelone – Mexico – 1989 ; 15, 19

25 Larsen A. R. ; Leal M. A. E. ; Chan L. S.

Fluconazole compared with amphotericin B

Flucytosine for cryptococcal meningitis in AIDS.

Ann. Intern. Med.; 1990 ; 113 ; 183 – 187.

26 Lechat P.

Pharmacologie médicale

2^{ème} édition Masson et Cie Editeurs 1975 ; 175 – 179.

27 Lortholary O. , Guillerin L. , Dupont B. , Drouhet E.

Traitement des hytoplasmoses de la coccidiomycose.

Méd. Mal. Infect. 1995 ; 25 , 63 – 73

28 Lortholary O. ; Todd M. ; Dupont B.

Antifongiques

Encycl. Med. Chir. (Elseviron , Paris), Mal. Infect., 8004 – M.O. , 1999 ; 21

29 Maddox (IS) et Richert (SH)

Use of response surface methodology for the rapid Optimization of microbiological media.

J. Appl. Bacteriol. 1977 ; 43; 197 - 204

30 Mare L.

Contribution à l'assurance de la qualité dans un laboratoire d'essais :

Cas du laboratoire de chimie analytique et de toxicologie de la faculté de Médecine et pharmacie.

Thèse pharm : Dakar, 2001, N°61 : 67 – 68

31 Marmonier A.A.

Introduction aux techniques d'études des antibiotiques

In : «Bactériologique médicale, techniques usuelles»

Simep Paris 1987 ; 227 – 235

32 Medecine Tropicale

Les nouvelles molécules antifongiques

Vol. 47⁽¹⁾, le pharo , Marseille 1987 ; 47 – 48

33 Medoff G. ; Brajtborg J. ; Kibayashi G. S. et Bolard J.

Antifungal Agent Useful in systematic fungal infections.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1983 ; 23 , 303 – 330.

34 Meyos Has Mc. , Meynad J.L., Poivot J.L ; Frottier J.

Apports des azolés dans le traitement des cryptoccoses.

Med. Mal. Infect. 1995 ; 25 , 58 – 62

35 Mc Ginnis M. R. And Rinaldi M. G. In Lorian V.

Antibiotics in laboratory medicine

Ed. WILLIAMS and WILKINS 3rd edition ed., Baltimore, 1991; 198 – 257

36 National Committee for Clinical Laboratory Standards

Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts:
approved standard.

NCCLS document M 27 - A. 1997 NCCLS, Wayne, Pa.

37 Odds, F. C.

Antifungal susceptibility testing of *Candida* spp by relation growth measurement at single concentrations of antifungal agents.

Antimicrob. Agents Chemother. 36, 1992 ; 1727 – 1737

38 OMS

Série de rapports techniques n°210, deuxième rapport du comité d'expert des antibiotiques.

Edition OMS , ed. Genève 1997; 106 – 138

39 Petit Jean O. ; Jacolot A. , Todd M.

Pharmacologie des antifongiques azolés systémiques

Med. Mal. Infect. 1995 ; 14 – 26

40 P Faller, M. A.; J. H. Rex, and M. G. Rinaldi

Antifungal susceptibility testing : technical advances and potential clinical applications

Clin. Infect. Dis. 24, 1997 ; 776 – 784

41 PHARMACOPEE AMERICAINE (USP)

Médicaments antifongiques

2003 ; 145 – 147, 682 , 1341 , 1345

42 PHARMACOPEE EUROPEENNE

Méthodes de dosage des médicaments

1999 ; 56 , 517 , 1292

43 PHARMACOPEE INTERNATIONALE

Epreuves, méthodes, normes générales. Normes de qualité pour les substances, excipients et préparations pharmaceutiques.

3^{ème} édition, OMS Genève. 1994, volume 4 ; 270 – 271

44 Pilly E.

Médicaments antifongiques

15^{ème} édition, Montmorency, Edition 2M2 1996 ; 461 – 469

45 Pollack A.

Détermination de la synergie entre la 5-fluorocytosine et l'amphotéricine B au moyen de différents modèles in vitro et in vivo.

Bull. Soc. Fr. Mycol. 1974 ; 2 175

46 Richard M. , Comland T.W.

The rapid detection of brewery contaminants belonging to the genus *saccharomyces* by a serological technique

J. Inst. Brew., 1967; 73 ; 552 – 558.

47 Schorderet Michel

Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques

2^{ème} édition. Editions Frisson – Roche et Slatkine, Paris – Genève 3 ; 775 - 782

48 Secretain G. , Drouhet E. , Mariat F.

Diagnostic de laboratoire en Mycologie médicale

4^{ème} édition Maloine S.A. Editeur Paris 1979 ; 39 – 45 , 103 – 112

49 Sugar, A. M.

Use of amphotericine B with azole antifungal drugs : what are we doing?

Antimicrob Agents Chemother. 39 : 1995; 1907 – 1912.

50 Van Cutsem J. ;S Janssen Pa J.

Les azolés antifongiques

Med. Mal. Inf. , 1984 ; 14 , 510 – 517

51 Wolf Manfred E.

Burger's Medicinal chemistry and discovery fifth Edition,

Vol. 2 : therapeutic Agents New York 1996; 637 – 652