

INTRODUCTION

Bien qu'un personnel compétent et des structures sanitaires accessibles aux populations soient nécessaires pour un bon système de santé, ces éléments ne peuvent pas à eux seuls garantir des soins de santé efficaces. De bons médicaments sont indispensables, utiles surtout en cas de maladie, ils permettent de crédibiliser les services de santé.

En raison principalement de l'introduction des médicaments essentiels génériques dans le cadre de l'initiative de Bamako et le développement fulgurant de circuits illicites d'approvisionnement et de vente illégale de médicaments, il demeure plus que jamais nécessaire de s'assurer de la qualité des médicaments utilisés au Sénégal.

Dans ce but, le Laboratoire National de Contrôle des Médicaments a été créé et a pour mission d'assurer le contrôle technique des médicaments importés et ceux produits au Sénégal, c'est à dire tester la qualité, la sécurité et l'efficacité des médicaments.

Le but de ce travail est :

- de valider des méthodes de contrôle de qualité des médicaments antifongiques dans le cadre de la mise en place d'un système d'assurance qualité au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments : déterminer la sélectivité de la méthode, la limite de la répétabilité et/ou de la reproductibilité, la stabilité et la fiabilité, la robustesse par rapport à des influences extérieures.
- d'étudier des facteurs influençant l'activité des médicaments antifongiques tels que la concentration des champignons, le temps de contact entre les dilutions tests d'antifongiques et les germes fongiques utilisés comme

souche de référence sensible indicatrice, le pH du milieu de culture utilisé et la température d'incubation.

Au cours de cette étude, nous ferons le point sur une étude bibliographique récente portant sur les différentes classes d'antifongiques, et les caractères d'identifications des souches de référence fongiques sensibles indiquées pour le contrôle de qualité. Ensuite nous étudierons les méthodes d'identification et de titrage des antifongiques utilisés en thérapeutique.

CHAPITRE I : GENERALITES

La thérapeutique antifongique (antifongique) est longtemps restée cantonnée à un petit nombre de médicaments, en particulier dans les mycoses systémiques.

L'amphotéricine B par voie intraveineuse, chef de file chronologique des antifongiques systémiques, reste la première en efficacité, notamment chez les sujets immunodéprimés. L'arrivée de la flucytosine, des dérivés azolés, et de manière plus récente des formes lipidiques d'amphotéricine B ont représenté des étapes importantes dans l'amélioration de l'efficacité, mais également de la tolérance des antifongiques systémiques. De nouvelles molécules, appartenant ou non aux classes thérapeutiques déjà disponibles, sont en cours de développement in vitro, en expérimentation animale, et pour certaines d'entre elles, dans de larges protocoles thérapeutiques multicentriques internationaux. (23)

La constitution anatomique et la physiologie des champignons (levures ou filamenteux) sont bien particulières, différentes entre autres de celles des bactéries ; de ce fait la plupart des antibactériens ne sont pas antifongiques. La composition de la paroi cellulaire, du matériel qui l'entoure et de la membrane cytoplasmique joue un rôle considérable dans la perméabilité de la cellule. Toute substance susceptible d'agir sur les cellules fongiques doit d'abord traverser ces enveloppes formées de chitine (absentes chez les bactéries et les actinomycètes) de polysides (glucanes, mannanes) liés à des protéines de phospholipides et de stérols (absents chez les bactéries). (20, 23)

Antifongiques

I - DEFINITION

Les antifongiques sont des substances naturelles, semi-synthétiques ou synthétiques capables d'inhiber ou d'arrêter la croissance des champignons à différentes concentrations.

II - HISTORIQUE (23)

La chimiothérapie des mycoses date de 1903, quand DE BEAURMANN et DAYMOND préconisent l'iodure de potassium par voie orale dans le traitement de la Sporotrichose. Aux anciens agents chimiques actifs sur les mycoses superficielles comme les sels de métaux lourds mercure (Hg), argent (Ag), cuivre (Cu), zinc (Zn), les métalloïdes (F, Cl, Br, I, Sc...), 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 (acide Undecylenique) de tolnaftate) et de dérivés azolés ont été ajoutés.

Dans le traitement des mycoses systémiques pendant une période de 50 ans, le seul médicament utilisable, mais d'efficacité discutable, était les sulfamides dans la paracoccidioïdomycose (24), les mycétomes actinomycosiques et les diamidines aromatiques dans la blastomycose. La découverte de 1951 par HAZEN et BROWN de la nystatine, polyène dérivé de *streptomyces noursei*, active par voie orale et locale dans les candidoses digestives et cutanéomuqueuses, a véritablement marqué le début de la chimiothérapie antifongique efficace.

Après la candidine (LECHAVELIER, WAKSMAN, 1952) et la trichomycine (HOSOYA, 1952), plus de 60 autres polyènes produits par les actinomycètes ont été découverts. L'amphotéricine B (GOLD, VANDEPUTTE, 1955) était jusqu'à une date récente le seul polyène utilisable par voie IV (intraveineuse), au prix d'une toxicité importante. La griseofulvine, découverte dès 1939 (SIMONART,

RAISTRICK), n'a trouvé une application thérapeutique qu'en 1958 (GENTLES), lorsqu'elle a été administrée par voie orale dans un traitement des teignes. Par voie orale, d'autres antifongiques comme la variotine isolée de *Paecilomyces variotii*, ont été ajoutés à l'arsenal thérapeutique antidermaphyte. Plus récemment (GRUNBERG et al, 1963), la 5-fluorocytosine (5-Fc) ou flucytosine, un antimétabolique de la série des 5-fluoropyrimidines, synthétisé dès 1957, a constitué un progrès important dans le traitement des infections à levures. A partir de 1957, la famille des dérivés azolés, avec initialement le clotrimazole, l'éconazole et le miconazole a été développée. Elle comporte actuellement de nombreux produits à usage local. D'autres ont été développés comme antifongiques systémiques : le miconazole et le Ketoconazole, suivis du fluconazole et de l'Itraconazole .

Les azolés les plus récents sont en cours de développement. De plus, la vectorisation par des lipides de molécules existantes (l'amphotéricine B, et plus récemment la nystatine) a élargi l'arsenal thérapeutique antifongique.

Enfin de nouvelles classes thérapeutiques sont en développement, essentiellement préclinique.

Les antifongiques actuels comprennent actuellement schématiquement deux types de médicaments : ceux utilisés dans le traitement des mycoses superficielles et alors essentiellement administrés par voie locale, et ceux utilisés dans le traitement des mycoses systémiques. Il faut cependant noter qu'un même produit peut être topique ou systémique selon le mode d'administration.

III - CLASSIFICATION : PROPRIETES PHYSIOCHIMIQUES ET CIBLES CELLULAIRES

III.1 - POLYENES (20,23)

Les deux principaux polyènes utilisés sont l'amphotéricine B (Fungizone*) et la nystatine (Mycostatine*). Plus de 200 molécules à action antifongiques 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 doubles liaisons conjuguées $(\text{CH}=\text{CH})_n$ d'où le nom de polyènes, ont en outre un grand anneau lactone macrocyclique (**fig 1**) et sont dénommés, 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.(23)

III.1.1 - Amphotéricine B

III.1.1.1 - Propriétés Physico-chimiques

L'amphotéricine B est un heptaène (**fig 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). Combiné à des sels biliaires tel le desoxycholate 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 IV.

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 h. 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

de poudre d'amphotéricine B, 41 mg de desoxycholate de sodium et 25,2 mg de tampon phosphate de sodium.(20, 23)

III.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 monovalents (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 a 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, les oligomères solubles s'insèrent dans la membrane des cellules de mammifères sous l'action favorisante du cholestérol, et forment des canaux. Ainsi l'action toxique de l'amphotéricine B s'exerce à une même concentration plus basse sur les cellules fongiques que sur les cellules de mammifères. **(20, 23)**

L'amphotéricine B possède par ailleurs une activité antifongique indirecte, médiée par les macrophages, l'amphotéricine B potentialise l'action de l'interféron gamma sur les macrophages, action qui se traduit par une synthèse de Tumor Necrosis Factor (TMF)- α et 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* **(27)**. Cette activité de l'amphotéricine B entraîne une réduction de 1 log CFU /ml en 24 h pour une concentration de 1 mg/ml en présence de 20 U/ml d'interferon-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 leucopenie.**(23)**

L'amphotéricine B peut également être incorporée dans des vecteurs lipidiques, notamment les liposomes. Les liposomes sont des vésicules consistant en un environnement aqueux de couches phospholipidiques : la dimyristoylphosphatadylcholine (DMPC) et le dimyristoylphosphatidylglycérol (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 unilamellaires 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®-Amphotec®) qui contient du sulfate de cholestérol en quantité équimolaire à l'amphotéricine B, formant des particules colloïdales.

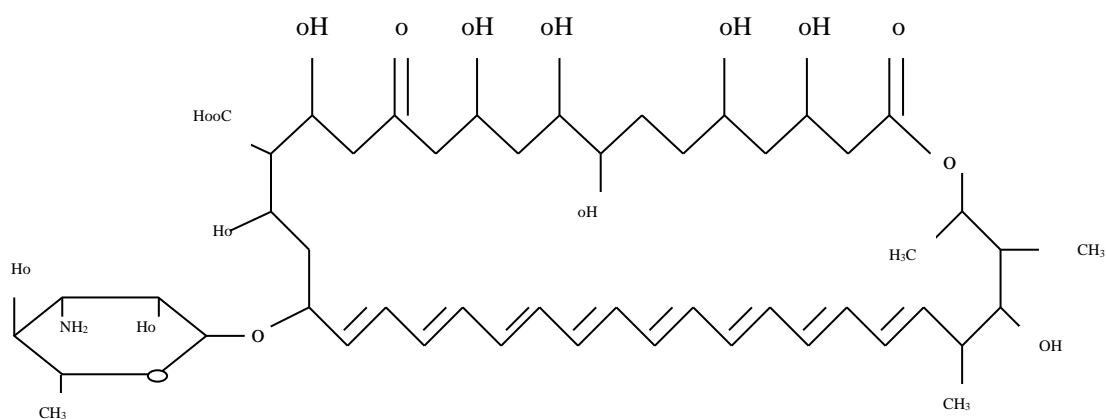
Le mélange d'amphotéricine B et d'intralipide a été également proposé, mais l'absence de formulation commerciale rend difficile, en dehors d'essais thérapeutiques, la généralisation de cette association.

III.1.2 - Nystatine

La nystatine (Mycostasine*) est un tétraène d'un poids moléculaire de 926,1. C'est une substance amphotère qui subit une détérioration en milieu acide (**fig1**).

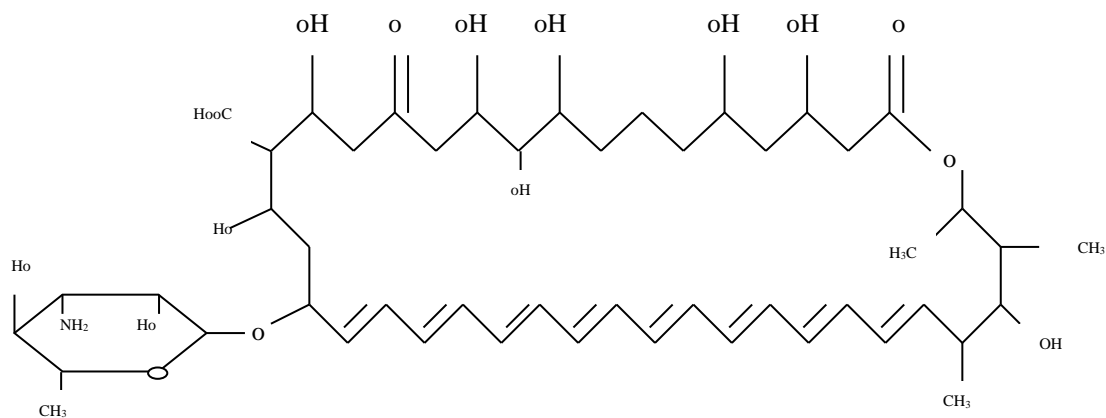
Son mode d'action et ses propriétés antifongiques sont tout à fait comparables à ceux de l'amphotéricine B. l'absence d'absorption intestinale et la toxicité en cas d'injection IM ou IV limitent sa prescription aux mycoses cutanées, vaginales et digestives. L'incorporation de la nystatine dans des liposomes a permis de l'administrer par voie IV 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. **(22)**



Amphotéricine B (heptaène)

C₄₇ H₇₃ O₁₇ N PM 924,09



Nystatine (Tétraène)

C₄₇ H₇₅ O₁₇ N PM 926,1

Fig 1 : Structure et Formule des polyènes utilisés en thérapeutique

(20, 23, 40)

III.1.3 - Fluorocytosine (8)

III.1.3.1 - Propriétés physico-chimiques

La 5-FC ou fluorocytosine, est une pyrimide fluorée (**fig 2**), c'est une poudre blanche cristalline, faiblement soluble dans l'eau distillée à 20°C (1, 2%), soluble dans l'eau à 60° 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 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.

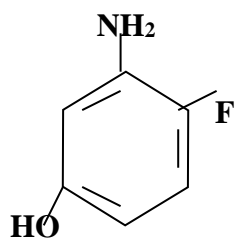
III.1.3.2 - Cibles cellulaires

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 desoxyribonucleique (ADN) fongique par inhibition de la thymidilate synthetase.

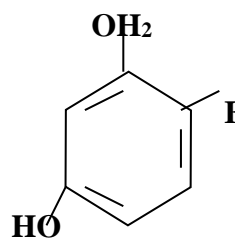
Deux étapes sont indispensables pour que la 5-FC exerce son action : la pénétration dans la cellule fongique (en compétition avec la cytosine) régie par la cytosine perméase et la transformation en 5-FU (toxique) grâce à une cytosine désaminase. L'absence ou la perte de ces enzymes rend le champignon 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-puis 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-Fluorodeoxyuridine diphosphate, puis de 5-fluorodeoxy-uridine

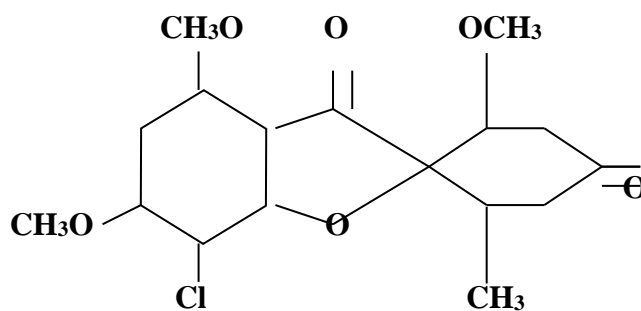
monophosphate, inhibiteur non compétitif de la thymidilate synthetase, interfère avec la synthèse de l'ADN du champignon.



5-Fluorocytosine 5-FC



5-Fluorouracil 5-FU



Griseofulvine

Fig 2 : Structure Chimique de la 5-fluoro-cytosine, du 5-fluoro-uracile de la griseofulvine (8, 23)

III.1.4 - Antifongiques azolés (Imidazoles et triazoles)

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 (**fig 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.1.4.1 - Propriétés physico-chimiques (29)

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

III.1.4.2 - Cibles cellulaires (1, 23, 29)

Les antifongiques imidazolés (miconazole, kétoconazole) et triazolés (fluconazole, Itraconazole (**fig 5**)) sont des inhibiteurs enzymatiques qui bloquent certains isoenzymes des cytochromes P450 des mitochondries des cellules fongiques. Cette inhibition s'exerce en particulier sur la 14- α -déméthylase, qui effectue la transformation du lanesterol en ergosterol, principal stérol membranaire. On observe donc une accumulation des précurseurs dans la chaîne de synthèse : Lanestérol et divers 14-méthylsterols.

D'autres modes d'actions 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 humains , séparent les triazoles des imidazolés. Le mode d'action des antifongiques azolés est résumé dans la **fig 6**

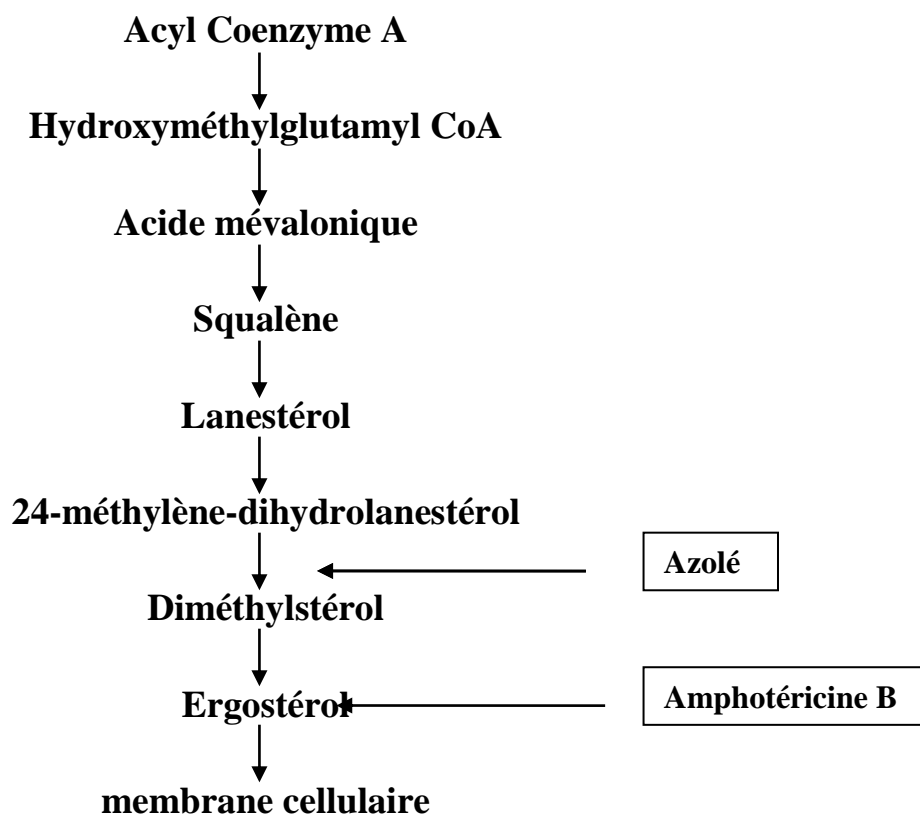
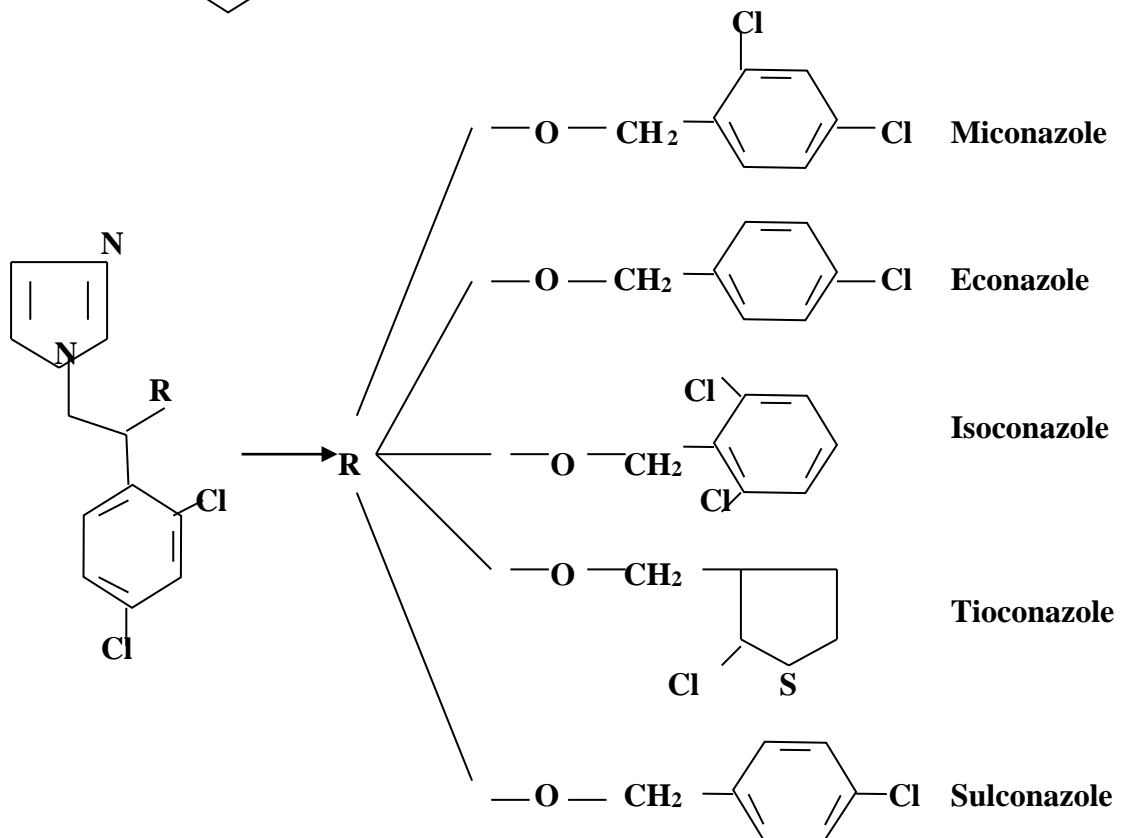
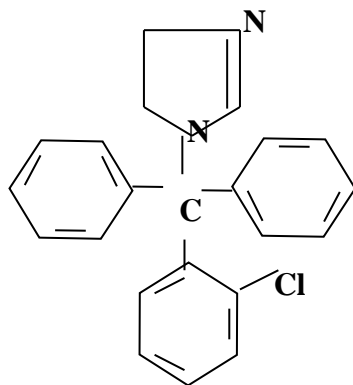
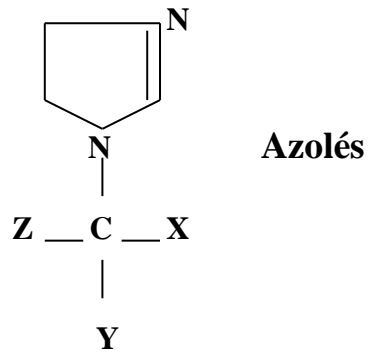


fig 3 : Mode d'action des dérivés azolés sur la synthèse de l'ergostérol, principal stérol membranaire des champignons et cible de l'amphotéricine B (20, 23, 29, 40)



TSVP...

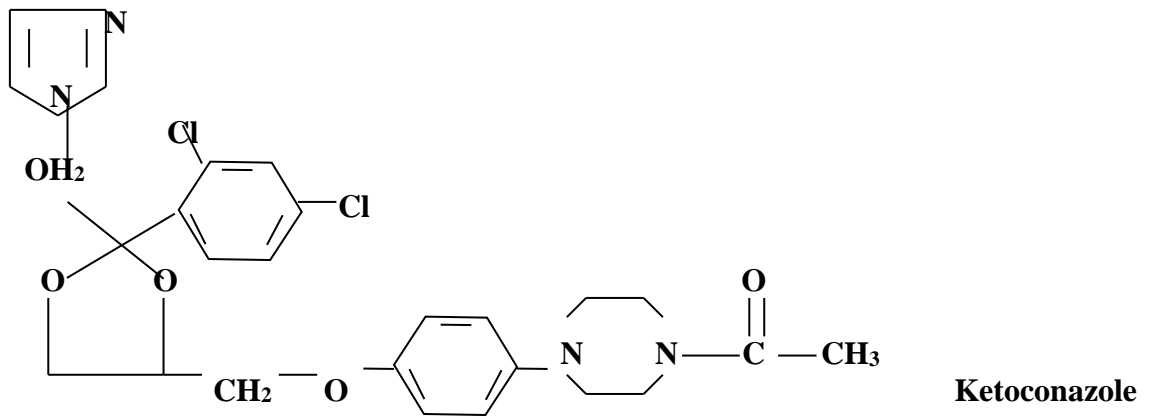


Fig 4 : Noyau Azolé et Dérivés azolés, biazole (23 , 29)

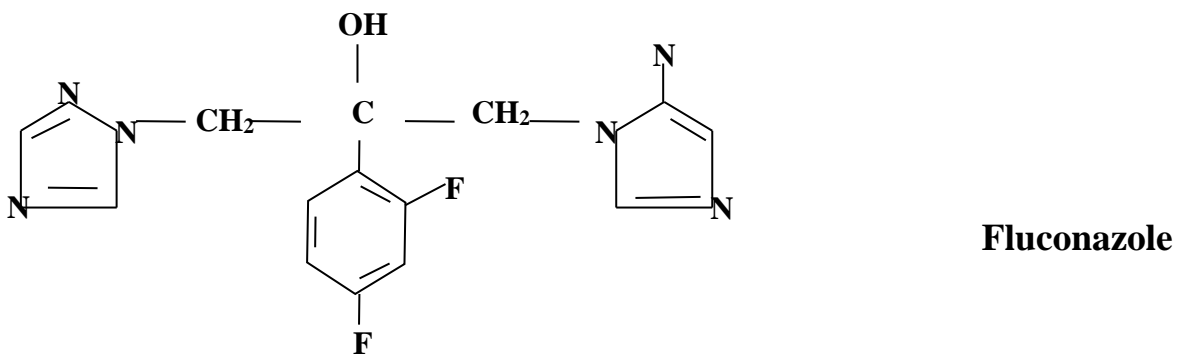
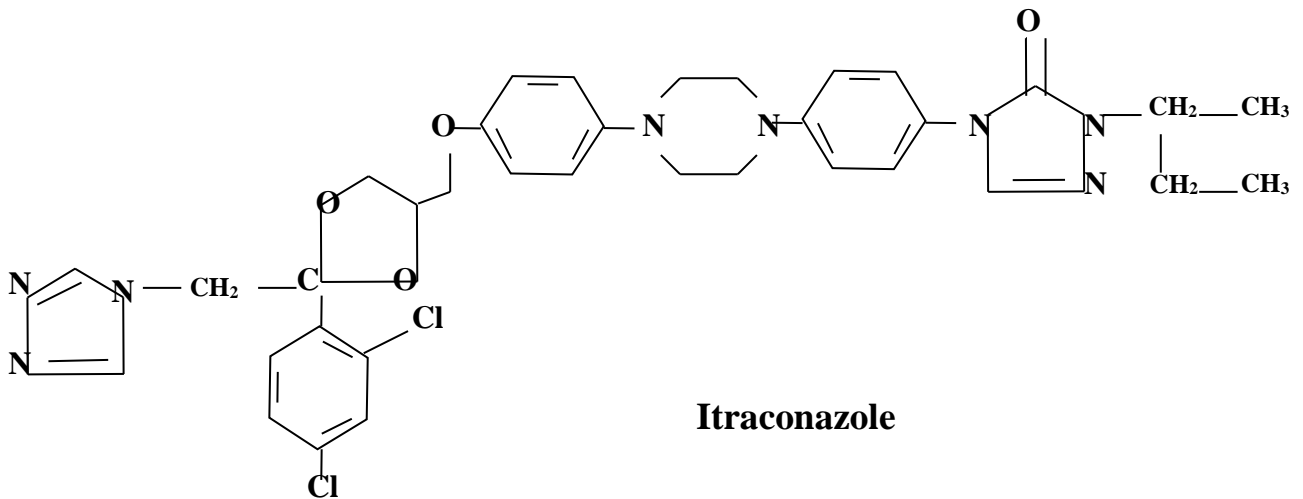


Fig. 5 : Dérivés Azolés, Triazolés (11, 19, 23, 25, 29)

III.1.5 - Griseofulvine

III.1.5.1 - propriétés physico-chimiques

La griseofulvine isolée de *Penicillium griseofulvum* et d'autres *penicillium* sp se présentent sous la forme d'une poudre blanche cristalline de saveur amère (**fig 2**). Pratiquement insoluble dans l'eau, elle l'est facilement dans l'alcool et les solvants organiques. La griseofulvine 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.1.5.2 - Cibles cellulaires

La griseofulvine 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. (**20, 23**)

III.1.6 - Terbinafine (20)

III.1.6.1 - Propriétés physico-chimiques

La terbinafine (LAMISIL*) est un antifongique de synthèse de la classe des allylamines. C'est un produit très lipophile, lié à 90% aux protéines sériques.

III.1.6.2 - Cibles cellulaires

Son mode d'action concerne les premières étapes de la synthèse de l'ergostérol par inhibition de la squalène époxidase. L'action est fongicide *in vitro*.

III.1.7 - 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. (23)

III.1.8 - Autres antifongiques

La cycloheximide est un antifongique toxique incorporée à certains milieux de culture pour éviter la croissance de nombreux contaminants. Certaines levures, telles *Cryptococcus*, sont sensibles à la cycloheximide. L'iodure de potassium a pour seule indication le traitement de la Sporotrichose et 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'histoplasmose à *histoplasma capsulatum*.

Les diamidines aromatiques (Lomidine), utilisées autrefois avec quelques succès dans les infections à *Blasmyces 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 pas considéré dans cette étude) également sensible au cotrimoxazole, à l'atovaquone et à l'amphotéricine B. La ciclopiroxolamine appartient à la famille des hydroxy-

pyridones est le seul représentant des inhibiteurs énergétiques, original par son mode d'action qui est double : **(20)**

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

⇒ La ciproxolamine 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.

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, très lipophile, son poids moléculaire est de 353,98.

Elle agit en inhibant 2 enzymes successivement impliquées dans la synthèse de l'ergostérol : la $\delta 7$ - $\delta 8$ isomérase.

Par ailleurs, l'accumulation de stérols anormaux semble inhiber la chitine-synthétase nécessaire à la synthèse de la chitine de la paroi fongique. **(20)**

Tableau I : Principaux antifongiques utilisés dans les mycoses superficielles (23)

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

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

IV - PHARMACODYNAMIE

IV.1 - POLYENES ET LEURS FORMES LIPIDIQUES

IV.1.1 - Mode d'action

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 des 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'amphotéricine 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 étant 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 (34). 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. (22, 23)

IV .1.2 - Effet postantifongique

L'amphotéricine B induit un effet postantifongique (EPantifongique) période pendant laquelle il existe une inhibition de la croissance du champignons après l'exposition à l'antifongique qui 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 EPantifongique 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.

IV.1.3 - Pénétration et activité intracellulaire

L'amphotéricine B desoxycholate (Fungizone) est active sur *Candida albicans* en situation intracellulaire. In vitro les macrophages péritonéaux de souris, 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. (3, 39)

IV.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 terme de suivie que la réduction de l'inoculum fongique dans les tissus infectés. (5, 23, 32)

IV.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'Albecet®, ces trois produits étant 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, les résultats sont controversés, avec notamment une moindre efficacité de l'Abelcet® et de l'Amphocil®, Amphotec®, mais une meilleure efficacité de l'Ambisome en comparaison à l'amphotéricine B libre dans le modèle expérimental d'aspergillose invasive. (9, 39)

IV.2 - FLUCYTOSINE

IV.2.1 - Mode d'action

Il ne semble pas que le mode d'action, temps dépendant ou concentration dépendante, ait été déterminé pour la flucytosine. (8)

IV.2.2 - Effet postantifongique

La flucytosine induit un effet post antifongique dont la durée est typiquement comprise entre 2 à 6 heures pour *Candida albicans* et *cryptococcus 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 post antifongique est plus long qu'avec la flucytosine seule. (8)

IV.3 - ANTIFONGIQUES AZOLES

IV.3.1 - Mode 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 h. 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. **(10, 23, 26)**

Par ailleurs, même en milieu dépourvu de sérum, l'incubation de *Candida albicans* en milieu nutritif (eau pure), en présence de fluconazole 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. **(1, 19, 23, 26, 29)**

IV.3.2 - Effet postantifongique

In vitro 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 supérieure à 12 heures. Dans ces conditions la durée de l'effet postantifongique est de l'ordre de 1 à 3 heures in vitro. **(3, 4, 25)**

IV.3.3 - 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). **(25, 29)**

IV.3.4 - 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'Itraconazole 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. **(6, 23, 29, 32)**

V - PHARMACOCINETIQUE

V.1 - AMPHOTERICINE B

V.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 2 mg/l et la décroissance des concentrations est triexponentielle. La demi-vie des dernières phases est de 24 à 48 heures et de l'ordre de 15 jours. 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 45 h).

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 plasmiqes 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.

V.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 résume les relations connues entre les caractéristiques physico-chimiques du vecteur et les caractéristiques pharmaceutiques de l'amphotéricine B. **(5, 39)**

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, comparable 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 la clairance et du volume de distribution) mais de manière infraproportionnelle pour l'Abelcet® **(2)** et de l'Amphocil-Amphotec (par augmentation de la clairance et du volume de distribution). Le tableau III 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 clinique de ces différentes cinétiques reste encore incertaine. **(21, 23)**

Les facteurs de variabilité de la cinétique des formes lipidiques de l'amphotéricine B ont été encore peu étudiés. **(5, 9)**

Tab II : Relations entre les caractéristiques physico-chimiques et les caractéristiques pharmacocinétiques de l'amphotéricine B : (21, 23, 39)

Nom	Forme des 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 ± 48 nm	Complexe sulfate Chol amphotéricine B 1-1	+++	Foie, Rate

LSH : Lecithine de soja hydrogénée

Amphotéricine B : Amphotéricine B

DMPC:Dimirylstoylphosphatidylcholine **CHOL** : Cholestérol

DSPG : Distéaroylphosphatidylcérol

DMPG:Dimirylstoylphosphatidylglycérol

Tab III: Paramètres pharmacocinétiques de l'amphotéricine B administrée dans différentes formulations (2, 10, 21, 23)

DCI	Dose (mg/kg)	Cmax (mg/L)	AUC (mg/L-h)	T _{1/2β} (h)	CL (mL/min/kg)	V(L/kg)
Fungizone®	1	2	18±5	24-48	0,43	4
Ambisome®	1	7,3	6,9	25	0,27	0,58
	5	57,6	713	17	0,17	0,22
Abelcet®	1,2	2,2± 0,8	6,7±1,0	77±21	2,6±0,6	21±8
	5	2,4±0,9	9,5±1,4	173±78	7,3±1,1	131±58
Amphocil®/ Amphotec®	1	2,2	9,7±4,0	28±9	1,5	2,8±0,7
	5	3	33,3±15	28±9	2	4±1,6

DCI : Dénomination commune Internationale

V.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 LCR et 90% dans le liquide synovial. La demi-vie est de 3 à 5 heures, l'excrétion urinaire est de 90% sous forme inchangée. (8)

V.3 - ANTIFONGIQUES AZOLES

**Tab IV : Paramètres pharmacocinétiques des antifongiques azolés
(7, 19, 23, 26, 29)**

	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} (200 mg/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 plasmitiques	99	99,8	12 - 23	65
Volume de distribution (L/kg)	0,3 - 0,4	10	0,7 - 0,8	2
Diffusion dans le LCR	-	±	+++	7
% élimination rénale	<5	<5	70 à 90	<5
Métabolisation	+++	+++	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

V.4 - GRISEOFULVINE

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 de 8 à 10 heures et sont à l'état de traces au bout de 72 heures. **(23)**

V.5 - TERBINAFINE

Après administration orale, le pic plasmatique est obtenu en deux heures. L'antifongique est intensément métabolisé par le foie et éliminé sous forme inactive dans les urines (80%) et les selles (20%). La demi-vie est de 17 heures. **(16, 23)**

VI - TEST DE SENSIBILITE IN VITRO ET RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES

VI.1 - TESTS DE SENSIBILITE IN VITRO

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 efforts importants de standardisation ont été réalisés aux cours des dernières années, notamment par la National committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Actuellement la technique d'étude 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. **(14, 15)**

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.

VI.1.1 - Polyènes

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 de problèmes de diffusion. La plupart des champignons pathogènes usuels ont des CMI entre 0,1 et 1 mg/l, en particulier les levures. Ainsi il est impossible 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 élevés tels *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) et *Scedosporium inflatum-Candida lusitaniae* 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. (22, 23, 34)

VI.1.2 - Flucytosine

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 Asperfillus* etc....

La CMI des levures semble se situer généralement entre 0,1 et 1 mg/ ml et il existe une bonne 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 générale 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. **(8,14)**

En suivant la technique du NCCLS les souches dont la CMI est supérieure ou égale à 32 mg/l sont résistantes et celles dont la CMI est inférieure à 4 mg/l sont sensibles. Sous traitement, des mutants peuvent être sélectionnées 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 (Dematiaceae) sont sensibles. La 5-FC et l'antifongique pour lequel un antifongogramme est nécessaire avant le traitement d'une mycose systémique. **(8, 23)**

VI.1.3 - Antifongiques azolés

Le spectre antifongique est pratiquement superposable pour tous les produits dans leur utilisation en tant que topique (tab. I). il s'agit des agents classiques des mycoses superficielles : *Candida*, *Dermatophytes* et *Malassezia sp*, *geotrichum candidum* et *Scopulariopsis brevicaulis* sont incontestablement sensibles. *C. glabrata* est souvent résistant. Les différences de sensibilité parfois notées in vitro ne permettent pas de hiérarchiser les produits quant à leur activité in vivo. En outre les différences de quelques microgrammes in vitro ont peu de signification lorsque l'application locale sur les lésions apporte quelques milligrammes de produit actif. **(18, 23, 26, 29)**

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. **(23, 25, 29)**

VI.1.4 - Griseofulvine

Les dermatophytes représentent l'indication majeure du traitement par la griseofulvine. Selon le germe en cause, *Microsporum*, *Trichophyton* et *Epidermophyton*, la CMI varie de 0,14 à 2,5 mg/l, hormis certains agents de mycetome parfois sensibles. Les bactéries, les levures et les agents des mycoses viscérales profondes sont résistants. L'antifongique est sans action dans le traitement du *pytiriasis versicolor*. (23, 25)

VI.1.5 - Terbinafine

Le spectre in vitro concerne surtout les dimatophytes qui sont très sensibles, le champignon *Dematiae* dont les agents des chromomycoses, certains filamenteux comme *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillum*, les dimorphiques, *trichosporon sp.*, *Malassezia* et *Cryptococcus neoformans* sont sensibles.(23,24)

Scopulariopsis sp, *Scytalidium sp* et *Onychoïcha canadensis* ont des CMI basses. La sensibilité des *candida* varie selon l'espèce et les méthodes utilisées, *Candida parapsilosis* étant moins sensible. (23, 24)

Comme la griseofulvine, la terbinafine est essentiellement un antidermatophyte. C'est également un excellent traitement des chromomycoses. (23)

VI.2 - MECANISME DE RESISTANCE

Les échecs des traitements antifongiques et les améliorations apportées dans l'étude de la sensibilité in vitro des antifongiques ont permis de décrire des souches de champignons résistants aux traitements usuels et d'en préciser le mécanisme.

VI.2.1 - Polyènes

La résistance acquise à l'amphotéricine B est souvent associée à une modification des lipides membranaires, notamment l'ergosterol. Les souches de *Candida* résistants à l'amphotéricine B et présentant une modification du système de la delta-5-6 désaturase. Ont été récemment décrites. Une souche de *C. neoformans* présentant un défaut de la delta-8-7 isomérase a également été décrite. Un autre mécanisme possible de résistance de l'amphotéricine B serait médié par une augmentation de l'activité catalase, diminuant l'effet oxydatif induit par l'antifongique. (3)

VI.2.2 - 5 – Fluoro cytosine

La résistance intrinsèque des champignons à la 5-FC peut être due à une modification de la cytosine perméase. La résistance acquise peut être due à un défaut de métabolisation de la 5-FC en 5-FUTP et 5-FdU F/P, ou à une perte de contrôle de la biosynthèse de la pyrimidine. (1, 8, 23)

VI.2.3 - Azolés

De nombreux mécanismes sont à l'origine de la résistance des levures au fluconazole : (1, 23, 26, 29)

- Défaut d'accumulation cellulaire de l'antifongique. ce mécanisme est documenté par *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*
- Modification de l'affinité de CYP51A1 (14-alpha-déméthylase) pour ces médicaments. Ce mécanisme a été décrit chez *C. albicans* et *C. neoformans* ;
- Evolution du contenu cellulaire de CYP51A1. ce mécanisme a été rapporté chez quelques isolats de *C. albicans* et *C. glabrata*.

- Inactivation de la delta 5-6-desaturase. Ce mécanisme a été rapporté chez *C. albicans* avec une résistance croisée à l'Am B. **(3, 4)**

AGENTS
FONGIQUES
(LEVURES)

Pour le contrôle de la qualité des antifongiques, il est nécessaire d'identifier les champignons sur lesquels seront appliqués les antifongiques. Nous ne détaillerons que les caractères utilisés pour l'identification des levures qui sont en général indiquées comme souche de référence notamment *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Saccharomyces cerevisiae*.

I – CARACTERES MORPHOLOGIQUES

Ils sont très importants à préciser pour l'identification des levures. Certains éléments peuvent être caractéristiques d'un germe ou même d'une espèce donnée.

I.1 – MODE DE REPRODUCTION VEGETATIVE (20)

Bourgeonnement : C'est le mode de reproduction le plus fréquent. Une évagination apposant 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.

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

Bourgeonnement par des Sterigmates : La cellule fille naît au sommet d'une protubérance formée par la cellule mère.

I.2 – CARACTERISTIQUE DES CELLULES VEGETATIVES(20)

I.2.1 – Morphologie des levures

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

I.2.1.1 – En milieu liquide

Formation d'un sédiment, d'un anneau, d'une pellicule.

I.2.1.2 – En milieu solide

Texture : crémeuse, muqueuse, coulante

Couleur : la majorité des levures est de couleur blanche à beige

Surface : lisse, rugueuse, cérébriforme, etc. La surface se modifie souvent avec l'âge des colonies.

I.2.2 – Formation d'une vraie filamentation, de pseudo-filamentation :

On distingue deux types de filamentation qu'il est important de savoir reconnaître car ses caractères sont utiles au diagnostic.

- La pseudo-filamentation : 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. Ce dernier bourgeon du pseudo-filament aura une longueur inférieure ou au plus égale à la longueur des bourgeons précédents.
- 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. Le dernier article aura une longueur toujours supérieure à celles des articles précédents.

I.2.3 – Arthrospores

Ce 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. Le filament prend alors un aspect en zig-zag (Trichosporon).

I.2.4 – Chlamydospores et Balistospores

La formation d'un certain type de Chlamydospores est particulière à l'espèce *Candida albicans*. Il s'agit de spores rondes, de grandes tailles (10 à 15 µm), à paroi épaisse qui se forment sur les filaments. Elles sont toujours terminales.

Les Balistospores sont produites au sommet d'une protubérance de la cellule mère et sont ensuite éjectées à distance grâce à un mécanisme de goutte.

I.2.5 – Formation de tube de germination

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

I.3 – ULTRASTRUCTURE DE LA PAROI DES CLOISONS (20)

Les ascomycètes ont une paroi formée de deux membranes : l'une externe, fine et sombre ; l'autre interne, large et claire, les basidiomycètes ont une paroi formée de plusieurs membranes. L'épaisseur et le nombre de couches varient avec l'âge de la cellule.

I.4 – REPRODUCTION SEXUEE (20)

La forme sexuée, dite parfaite ou téléomorphe n'existe pas, ou n'est pas connue que pour un certain nombre de levures. On peut observer :

- Des asques contenant des ascospores
- Des telliospores résultant de la conjugaison entre des cellules mâles et femelles.
- Des basides contenant des basidiospores de forme variable.

II – CARACTERES PHYSIOLOGIQUES

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 des levures. (20)

II.1 – COMPOSES CARBONES

On étudiera :

- L'auxanogramme ou assimilation des sucres. Un nombre restreint de sucre est étudié. On choisit ceux qui ont le meilleur pouvoir discriminant.
- Le zymogramme ou fermentation des sucres. Pour pouvoir fermenter un sucre, la levure doit être capable de l'assimiler. En pratique courante, on étudie la fermentation du glucose, du maltose et du trehalose.

II.2 – COMPOSES AZOTES(20)

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 on étudie l'assimilation du nitrate de potassium.

Hydrolyse de l'urée : si les levures sont pratiquement toutes 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.

II.3 – REDUCTION DU TETRAZOLIUM

Certaines levures sont capables de réduire les sels de tétrazolium et de les transformer en un composé coloré : le formazan qui incorporé dans la levure va colorer la colonie.

Ainsi, sur le milieu Sabouraud contenant des sels de tétrazolium, *C. tropicalis* qui réduit fortement ces sels sera coloré en violet, *C. albicans* qui ne les réduit pratiquement pas restera blanc.

II.4 – RESISTANCE A L'ACTIDIONE (CYCLOHEXIMIDE)

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 *C. albicans* sont résistantes.

II.5 – ACTIVITE PHENOXYDASE

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 pour des milieux à base de graine du Niger ou sur des milieux à l'acide caféique. Ensemencé sur de tels milieux, *Cryptococcus neoformans* se colore en brun foncé à noir.

II.6 - CROISSANCE A 37°C

La majorité des levures se développe à une température comprise entre 20 et 28°. Certaines peuvent pousser jusqu'à 45° (parmi les genres *Kluyveromyces* ou *Hansenula*). La possibilité de croissance à 37° 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.

III – CARACTERES BIOCHIMIQUES (20)

III.1 – COMPOSITION A BASE DE L'ADN DES LEVURES

Dès 1940, plusieurs auteurs étudient la composition à bases d'ADN des levures. Ils montrent que c'est la teneur en guanine et cytosine (G+C%) qui est la plus intéressante pour séparer les genres de levures. Les ascomycètes ont une G+C% comprise entre 38 et 54% ; chez les basidiomycètes, elle varie de 46 à 63%.

III.2 – STRUCTURE DU COENZYME Q (20)

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 les types Q6 à Q8 : les basidiomycètes, les types Q8 à Q10.

III.3 – TEST AU BLEU DE DIAZONIUM (20)

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

III.4 – CARYOTYPE DES LEVURES (20)

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

IV – IDENTIFICATION DES LEVURES (20)

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

La deuxième étape est l'identification d'espèce de la levure, on utilise alors les caractères physiologiques.

⇒ *Candida albicans*

- Examen macroscopique : colonie blanche, crémeuse, lisse. Certaines souches sont rugueuses. Après quelques jours de cultures, on observe des filaments qui s'enfoncent dans la gélose.
- Examen microscopique : présence de levures ovoïdes à bourgeonnement multilatéral mesurant $(3 \times 6) \times (6 \times 10) \mu\text{m}$. Après 8 à 15 jours, présence de pseudo-filamentation et de vraie filamentation.

Méthode d'identification rapide :

- Test de Blastèse : test de germination
- Méthodes enzymatiques : utilisation de galerie d'identification. Fongiscreen 4H® (Sanofi – diagnostic – Pasteur), albicans ID® (bio Mérieux) etc.

IDENTIFICATION DU GENRE

Sur milieu RAT ou PCB, présence en 24 à 48 heures d'une pseudo filamentation bien développée. La filamentation est très longue. A chaque constriction se forment de gros bouquets de blastospores. Dans 95% des cas, on observe sur ces

filaments la présence de Chlamydozspores qui sont caractéristiques de l'espèce albicans.

IDENTIFICATION DE L'ESPECE (20)

Elle est indispensable lorsqu'il n'y a pas de Chlamydozspores :

⇒ Fermentation des sucres

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

⇒ Assimilation des sucres

- Galctose, saccharose, maltose,trehalose : positive
- Cellobiose, lactose, raffinose : négative

⇒ Nitrate de potassium négative

⇒ Réduction du tetrazolum : négative

⇒ Résistance à l'actidrone :

⇒ *Saccharomyces cerevisiae* :

⇒ Examen macroscopique : colonies blanches à crème, crémeuses, lisses et bombées

⇒ Examen microscopique : levures globuleuses de grande taille mesurant (5-8) à (6-12) µm

IDENTIFICATION DU GENRE

Sur RAT ou PCB, absence de filamentation. Néanmoins, certaines souches peuvent présenter une pseudofilamentation courte ou rudimentaire. Il est parfois possible d'observer sur ces milieux des asques contenant 1 à 4 ascospores rondes. En absence d'asques on repique sur milieu à l'acétate de sodium (MAS). Sur ce milieu, après 48 h à 27° 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 colorés en bleu.

On peut également faire un frottis sur lame et colorer par la méthode de Wirth. Les ascospores sont colorées en vert, les blastospores en rose.

IDENTIFICATION DE L'ESPECE

⇒ Fermentation des sucres

- Glucose très positif
- Galactose, saccharose, maltose : variable
- Lactose négative

⇒ Assimilation des sucres

- Galactose, saccharose, maltose, raffinose variables
- Lactose négative

⇒ Nitrate de potassium négatif

⇒ Réduction des sels de tetrazolium positive : la colonie prend une couleur rouge.

⇒ Sensible à l'actidione.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I – MATERIEL

I.1 – SOUCHES DE REFERENCE

Les souches de référence :

Candida albicans ATCC 2091

Saccharomyces cerevisiae 2601

Elles sont présentées sous formes de pastilles et elles ont été régénérées, conservées et validées (40). Les souches de référence ont été choisies pour contrôler l'exactitude et la précision des tests de diffusion et relèvent d'une sélection rigoureuse.

I.2 – MATERIEL

Le titrage des antifongiques par méthode de diffusion en milieu gélosé a nécessité le matériel suivant :

Matériel de laboratoire :

- autoclave
- distillateur
- four Pasteur
- hotte
- four micro ondes (stérilisateur des matières plastiques)
- balance de précision - spatule
- microscope optique
- bain-marie
- échelle MC Farland
- lecteur

- étuve
- agitateur mécanique
- vortex
- bec bunsen
- briquet
- cupules
- disques
- pinces
- eau physiologique stérile
- eau distillée stérile
- papier pH
- pipette man
- pipette aid
- mouchoirs à jeter
- portoirs
- agitateur
- seringue
- filtre
- coton cadré stérile

II – METHODES

Le titrage microbiologique des antifongiques peut être effectué en utilisant deux méthodes :

- Le titrage par turbidimétrie
- Le titrage par diffusion en milieu gélosé.

L'activité des antifongiques est étudiée par comparaison à l'activité d'une substance référence.

Les préparations de référence utilisées dans les titrages sont des substances dont l'activité a été déterminée avec précision par rapport à l'étalon international correspondant ou à la préparation de la référence internationale.(31)

Avant de déterminer l'activité antifongique des produits à tester pour le contrôle de qualité, nous avons procédé à l'identification du principe actif de l'antifongique à tester par différents essais et contrôles physico-chimiques.

II.1 – METHODES PHYSICO-CHIMIQUES D'IDENTIFICATION DE DIFFERENTES FORMES D'ANTIFONGIQUES (POLYENES)

II.1.1 – IDENTIFICATION DE L'AMPHOTERICINE B (12, 17)

II.1.1.1 - Formes solides (gélules)

- **Aspect**

Gélules propres, lisses, brillantes, dures, à corps bleu et à tête verte contenant un granulé jaune sans impuretés visibles.

- **Poids moyen**

Le poids moyen théorique est de 420 mg

Le poids moyen réel doit être compris entre 399 et 411 mg

- **Uniformité de poids du contenu**

(Sur 20 gélules de poids moyen compris entre 0,399 g et 0,441 g)

- Le poids individuel d'au moins 18 gélules doit être compris entre l'intervalle du poids moyen $\pm 7,5\%$
- Le poids individuel de 2 gellules ou plus doit être compris dans l'intervalle du poids moyen $\pm 15\%$.

- **Temps de délitement ou de désintégration**

Le test est effectué sur six gélules. Avec l'appareil de type ERWEKA le temps est inférieur ou égal à 30 mn.(12)

- **Perte à la dessiccation**

La perte à la dessiccation est effectuée à 60°C sur une prise d'essai d'un contenu d'une gélule. L'appareil utilisé est un dessiccateur IR (SARTORIUS®) il détermine le pourcentage d'humidité et la durée de l'essai.

- **Identification de l'Amphotéricine B**

- spectre UV

nous avons déterminé le spectre UV de l'Amphotéricine B par spectrophotométrie UV-visible (JASCO V-570®) qui est comparée avec un spectre de référence.

- réaction colorée

Après mise en présence du contenu de la gélule et de l'acide phosphorique à 80% et agitation, nous avons obtenu une coloration bleue.

II.1.1.2 - Forme liquide (lotion)

Fungizone lotion 3%

- **Aspect**

Liquide opaque jaune, odeur pratiquement nulle

- **Identification de l'Amphotérine B**

Après mise en présence de lotion et de l'acide phosphorique à 85% et agitation, nous avons obtenu une coloration bleue.(12)

- **Densité à 25°C**

Nous avons déterminé la densité à l'aide d'un pycnomètre. La densité est le rapport entre la masse de la lotion et celle d'un volume égal d'eau.

$$\text{Densité} = d = \frac{\text{Poids de la lotion}}{\text{Poids de l'eau}}$$

Elle doit être comprise entre 0,92 et 1,00

- **Identification par UV**

Nous avons déterminé le spectre UV à l'aide d'un spectrophotomètre, qui est comparé avec un spectre de référence.

II.2 - Titrage microbiologique des antifongiques : Méthode de diffusion en milieu gélosé (proposée par la pharmacopée américaine USP) (30)

Principe

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.

Procédure

a - Souches sensibles :

- *Candida Albicans* ATCC n°2091 (amphotéricine B et Nystatine)
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC n° 9763 (amphotéricine B)
- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC n° 2601 (Nystatine)

b - Milieu

- Peptone 9,4 g
- Extrait de levure..... 4,7 g
- Extrait de viande de bœuf 2,4 g
- Chlorure de sodium..... 10,0 g
- Dextrose..... 10,0 g
- Agar (gélouse)..... 23,5 g
- Eau QSP..... 1000 ml

c - Solvant à utiliser pour préparer la solution mère

- Amphotéricine B..... Diméthylsulfoxyde DMSO
- Nystatine..... Diméthylformamide DMFM

d - Solution tampon ou diluant

- Amphotéricine B : Tampon 10: 0,2 M pH=10,5

Dissoudre : Phosphate Dipotassique (35,0 g)

+ Eau (1000) ml + KOH 10 N (2 ml)

Ajuster le pH à 10,5 par H₃PO₄ 18 N ou KOH 10N ±0,1

- Nystatine: Tampon 6: 10% pH=6,0

Dissoudre : Phosphate Dipotassique (20 g)

+ phosphate Monopotassique (80 g)

+ Eau (1000 ml)

Ajuster le pH à 6,0 ± 0,5 H₃PO₄ 18N ou KOH 10N

- Les tampons préparés ont été stérilisés après préparation et le pH ajusté après stérilisation.
- Les composants des milieux sont dissous dans 1 litre d'eau.
- Les solutions ont été ajustées avec NaOH 1N ou HCl 1N après étuvage et stérilisation, au pH indiqué.

e - Préparation de la solution mère de la substance de référence

Pour préparer une solution mère de la substance de référence, nous avons dissous la quantité de l'antifongique à tester pesée de manière précise, ou le contenu d'un flacon entier dans le solvant spécifié et nous avons dilué à la concentration indiquée.

Amphotérine B= 1 mg/ ml Nystatine= 1000 UI (/ml)

Les dilutions de travail ont été faites à partir de la dilution précédente en respectant un ratio de 1,25 ou 2 avec les tampons.

Amphotérine B.....Tampon 10

NystatineTampon 6

◆ **Amphotericine B.....1 mg/ ml(solution mère)**

↓ DMSO

(µg/ml) 12,8 ; 16 ; 20 ; 25 ; 31,2

↓ tampon 10

(µg/ml) 0,6 ; 0,8 ; 1 ; 1,25; 1,5 (dilutions de travail)

◆ **Nystatine 1000 UI/ml DMFM (solution mère)**

↓ DMFM

(µg/ml) 256 ; 320 ; 400 ; 500 ; 624

↓ Tampon 6

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

f - Préparation de l'échantillon à tester

A partir des informations disponibles sur la préparation inconnue à tester, nous avons fixé une activité présumée par unité de poids ou de volume. Partant de cette hypothèse nous avons préparé une solution-mère et une dilution-test comme spécifié pour chaque antifongique mais 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 substance de référence

Pour l'essai nous avons utilisé des disques de 6 mm. La quantité de produit à utiliser pour charger le disque a été de 15 µl ; pour les cupules elle a été de 50 µl

g - Gamme à tester

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

(1 à 2 concentrations < et> à la charge moyenne

Amphotericine B : charge moyenne 1 µg /ml

Nystatine : charge moyenne 20 µg /ml

h - Masse à préparer pour préparer les solutions

$$\text{Masse à peser (mg) = } \frac{\text{Volume à préparer (ml) x concentration (} \mu\text{g/ml)}}{\text{(Activité } \mu\text{g / mg)}}$$

i - Préparation de l'inoculum

Conditions d'incubation

- Milieu 19
- Température : 29 – 31°C
- Temps : 48 h

Composition de l'inoculum volume (ml / 100 ml)

- Milieu 19
- Composition inoculum (1 ml / 100 ml)

j - Essai proprement dit

Nous avons inoculé à partir d'une culture récente en pente la surface de 250 ml de milieu gélosé contenu dans un flacon de Roux.

Nous avons étalé la suspension de façon homogène à la surface de la gélose à l'aide de billes de verre stériles à 29°C et incubé pendant 48 heures. Après l'incubation nous avons préparé une solution stock en collectant les germes en surface dans 50 ml d'eau physiologique stérile.

Nous avons dilué une partie de la suspension stock en ajoutant un volume d'eau physiologique stérile (1 ml / 100ml) et nous avons déterminé la transmission de la dilution à 580 nm avec un spectrophotomètre. Nous avons ajusté de sorte que l'inoculum ait une transmission de 25% (l'eau physiologique considérée comme le blanc).

A partir d'une portion de la suspension fongique nous avons ajouté une quantité suffisante de milieu gélosé liquéfié et maintenu à 45°C, nous avons mélangé pour obtenir une suspension homogène

La dilution de la suspension stock pour obtenir la transmission de 25% constitue le contrôle de qualité de la suspension et n'est pas utilisée pour préparer l'inoculum.

Nous avonsensemencé une partie de la gélose (3 boîtes) dans le milieu qui a servi à tester.

Nous avons coulé dans chaque boîte 21 ml de milieu utilisé. Ensuite nous avons ajouté 8 ml de l'inoculum au milieu utilisé et incliné la boîte de long en large pour étaler régulièrement l'inoculum au dessus de la surface et nous avons laissé solidifier.

Nous avons déposé 6 disques un cupule sur la surface inoculée, et nous avons assuré un espacement correcte entre les disques ou les cupules (2,8 cm) et couvert les boîtes pour éviter toute contamination.

Après remplissage des 6 disques ou cupules dans chaque boîte avec les dilutions de l'antifongique, contenant les niveaux test spécifiés, nous avons incubé à 29°-31°C. Après incubation pendant 16 à 18 h. nous avons mesuré et noté le diamètre de chaque zone d'inhibition de croissance avec une précision de 0,1 mm au moins.

Nous avons considéré le premier essai comme préliminaire. Si son activité calculée a été moins de 80% ou plus de 125% de celle présumée dans la préparation de la solution stock de l'échantillon, nous avons ajusté son activité présumée et répété l'essai.

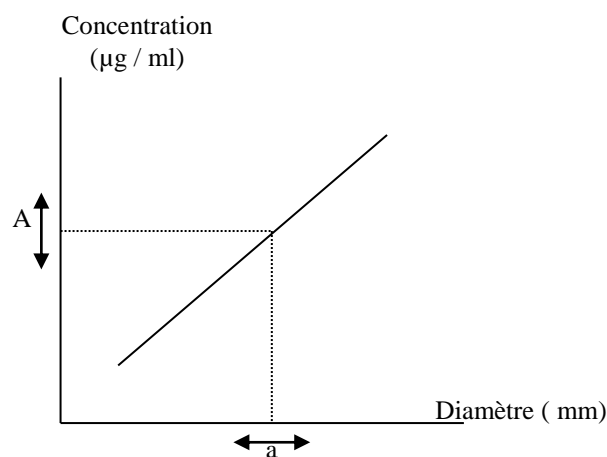
RESULTATS

Après incubation de 16 à 18 h à 29°C, les diamètres des zones d'inhibition correspondant aux concentrations de la gamme étalon sont mesurés. La droite reliant le logarithme (log de base 2) de chaque concentration au diamètre correspondant a été établie sur papier semi logarithmique. Le diamètre d'inhibition de chaque échantillon est reporté sur la droite, ce qui permet de réduire la concentration antifongique correspondante. Il s'agit là d'une simplification car ce n'est pas le diamètre d mais la surface de la zone (d^2) qui est fonction du Log de la concentration.

a : Diamètre de la zone d'inhibition entraînée par la concentration de l'antifongique A testé

b : Droite obtenue à partir des mesures de la gamme de référence.

En mesurant a on connaît A



II.3 – Etude détaillée de la méthode microbiologique standardisée

II.3.1 – Régénération des souches de référence

Jour 0 : Les souches de référence (SR) sont livrées et présentées sous forme de pastilles par différents fournisseurs comme, NTC, ATCC, CIP.

Les stocks de culture de toutes SR ont été obtenus à partir de sources sûres (ATCC CIP.)

Les pastilles sont transférées dans un bouillon nutritif (Sabouraud), elles ont été incubées pendant 24 h et, ont été isolées, sur boîte gélosée pour obtenir des colonies isolées.

Les tests de contrôle ont été effectués sur des colonies de 48h. nous avons ensuite validé la souche par identification en utilisant les caractères morphologiques et physiologiques (généralités pages : 46 - 48).

Jour 1 : Préparation du milieu de culture (AM₁₉)

Nous avons pesé les différents constituants du milieu de culture (AM₁₉) ainsi que ceux des tampons 10 et tampon 6 et l'eau physiologique.

Préparation de l'eau distillée stérile, les milieux et les tampons sont stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 min et le pH est ajusté après stérilisation.

- Nous avonsensemencé deux boîtes de Pétri contenant le milieu de culture avec la SR et incubé les boîtes pendant 48h.

Jour 2 :

- Nous avons vérifié et rassemblé tout le matériel nécessaire pour le test de contrôle.

- Nous avons stérilisé tout le matériel

Jour 3 : Jour de la manipulation

Avant de commencer la manipulation, nous avons validé d'abord la SR inoculée dans le milieu de culture et nous nous sommes assuré de sa pureté pour éviter toute contamination.

L'identification de la SR s'est effectué en utilisant les caractères morphologiques et physiologiques de l'agent fongique. Nous n'avons utilisé que les caractères morphologiques au cours de notre étude.

***Candida albicans* :**

- Examen macroscopique : colonie blanchâtre, lisses certaines souches ont été rugueuses, avec une odeur de savon bouilli.
- Examen microscopique : présence de levures ovoïdes à bourgeonnement multitéral.

A l'état frais : cytoplasme clair, membrane cytoplasmique violette.

Coloration Gram+ comme tous les champignons.

***Saccharomyces cerevisiae* :**

Examen macroscopique : colonies blanchâtres à crème, crémeuses, lisses et bombées odeur de savon bouillie plus accentuée que celle de *Candida*

Examen microscopique : levure globuleuse plus grande que *Candida albicans*, à l'état frais il a eu les mêmes caractéristiques que *Candida albicans*.

II.3.2 - Manipulation proprement dite

- Nous avons identifié et validé la SR et, bien nettoyé la hotte avant de commencer la manipulation
- Nous avons fixé la gamme à tester

1,6 mg/ml - 1,28 mg/ml - 1,024 mg/ml - 0,819 mg/ml 0,6553 mg/ml

En progression logarithmique de raison 1,25

Nous avons fixé les concentrations des solutions mères(2 mg/ml).

Les solvants sont utilisés pour obtenir les solutions mères. Les diluants ou tampons sont utilisés pour préparer les dilutions de travail.

Pour les polyènes, nous avons utilisé comme solvant le Diméthylformamide et le Diméthylsulfoxyde et comme diluant, le tampon 10 pour l'amphotéricine B et le tampon 6 pour la Nystatine.

Ces tampons au cours du temps ont été substitués par de l'eau distillée stérile qui ont donné le même résultat.

- Nous avons calculé les masses à peser en fonction du volume à préparer, du titre de l'antifongique et de la concentration fixée

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

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

- Après avoir pesé les masses calculées ou mesuré les volumes calculés, nous avons préparé la gamme d'étalonnage de la substance de référence et les dilutions de travail de l'échantillon à tester.
- Nous recommandons de ne pas filtrer les polyènes
- Nous avons préparé l'inoculum à partir de colonies bien isolées et bien développées et préalablement validées.

La suspension fongique est préparée en les délayant dans de l'eau physiologique stérile dont le pH aura été ajusté si nécessaire (pH neutre)

La turbidité de la suspension fongique était ensuite comparée à l'échelle 0,5 MCF.

La suspension homogénéisée par vortexage était alors prête à être utilisée.

- Nous avons inoculé 1 ml à 1,2 ml de cette suspension fongique dans 100 ml de milieu (AM₁₉) et à une température comprise entre 29 et 35°C. Les milieux ont été maintenus dans un bain-marie réglé à une température comprise dans cette intervalle. Nous contrôlions rigoureusement la température du bain-marie. Tout excès de température peut inhiber la croissance des germes fongiques.
- Nous avons coulé ce milieu inoculé dans des boîtes de Pétri 18 à 22 ml soit 4 mm d'épaisseur.
- Nous avons laissé solidifier pendant quelques minutes et avons placé 6 cupules ou 6 disques.
- Pour les résultats exprimés en pourcentage nous avons fait trois dilutions de la substance de référence et trois dilutions de l'antifongique à tester. L'antifongique et la substance de référence ont subi la même procédure.

- Pour les résultats exprimés par une droite d'étalonnage, nous avons effectué 5 dilutions de travail de la substance de référence et une dilution de l'antifongique à tester dont la concentration est présumée proche de celle de la moitié de la gamme de la substance de référence.
- Après avoir chargé les capsules (50µl) ou les disques (15µl) avec les différentes solutions de travail, nous avons préincubé à la température ambiante pendant 2 à 4 heures.
- Après l'incubation nous avons lu les diamètres des zones d'inhibition avec une grande précision de 0,1 mm.
- selon le nombre de dilution, nous avons exprimé les résultats en pourcentage ou par une droite d'étalonnage.

Préalablement à l'incubation, une période de diffusion de 1h à 4 h à la température ambiante a été nécessaire afin de réduire les effets dus au décalage de temps entre l'application des solutions sur les disques et, ainsi améliorer la pente de régression.

Le nombre de répétitions par dose dans chaque titrage a été suffisant pour assurer la précision requise. Le titrage a été répété et les résultats combinés statistiquement afin d'obtenir la précision requise et de vérifier que l'activité de l'antifongique n'a pas été inférieure à l'activité minimale requise.(31)

RESULTATS

Le calcul du titre de l'antifongique à titrer par rapport à l'étalon est effectué à l'aide de la somme des 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 SE1, SE2, SE3 la somme des trois dilutions de l'étalon et SD1, SD2, SD3 la somme des trois dilutions de l'échantillon.

Moyenne des étalons

$$ME1 = \frac{SD\ 13}{3}$$

$$ME2 = \frac{SD\ 2}{3}$$

$$ME3 = \frac{SD\ 3}{3}$$

Moyenne des échantillons

$$MD1 = \frac{SD\ 1}{3}$$

$$MD2 = \frac{SD\ 2}{3}$$

$$MD3 = \frac{SD3}{3}$$

MD1 → X1 %
ME1 → 100% d'activité

MD2 → X2 %
ME2 → 100% d'activité

MD3 → X3 %
ME3 → 100% d'activité

le pourcentage de

l'activité de l'échantillon

$X\ \% = X1 + X2 + X3$

II.3.3 - Evaluation des facteurs influençant l'activité de l'antifongique

II.3.3.1 - Température

Nous avons étudié la température maximale qui n'a pas inhibé ou tué la croissance des germes pour l'obtention de zones d'inhibition claires nettes et facilement lisibles.

Les boîtes de Pétri déjà inoculées contenant différentes dilutions de l'antifongique à tester et de la référence sont incubées à différentes températures: 40, 39, 38, 37, 30°C.

II.3.3.2 - Charge fongique

Il s'agissait d'évaluer la concentration des champignons qu'il faut pour un volume de milieu donné pour effectuer un bon test de contrôle : 1 ml / 100 ml - 2 ml / 100 ml - 3 ml / 100 ml ; et de déterminer un niveau correct de la turbidité pour la préparation de la suspension fongique.

L'étude a été faite à 0,5 McF et à 1 McF

II.3.3.3 - Temps de contact de l'antifongique à tester et de la souche de référence

Il s'agissait de la détermination du temps d'incubation. L'étude est faite à 24h, 48h et à 72h.

II.3.3.4 - pH du milieu

Il s'agissait d'utiliser un milieu à pH acide et un milieu à pH presque neutre et de comparer les résultats.

II.3.3.5 - Evaluation de l'influence des cupules et des disques

Il s'agissait de comparer les diamètres obtenus avec les cupules et ceux obtenus avec les disques.

II.3.4 - Contrôle de qualité

II.3.4.1 - Etude de la répétabilité de la méthode

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

Il fallait aussi changer les souches ou quelques réactifs et étudier la concordance des résultats obtenus en répétant plusieurs fois la méthode.

II.3.4.2 - 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 SR devaient présenter les mêmes résultats. Cette étude est faite par différents manipulateurs dans le temps.

II.3.4.3 - Etude du temps de 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.

II.3.4.4 - Etude de la stabilité dans le temps

Il s'agissait de déterminer le temps au bout duquel les milieux et les tampons restaient efficaces et donnaient de bons résultats. Pour cela nous avons préparé 1 litre de milieu et 1 litre de tampon et nous en prenions pour chaque manipulation 100 ml de milieu et 100 ml de tampon.

II.3.4.5 - 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.

II.3.5 - Effet post antifongique

Effet Post antifongique : période pendant laquelle il existe une inhibition de la recroissance du champignon après exposition à l'antifongique. Nous avons constaté au cours de l'étude de l'influence de la température, une recroissance avec la nystatine ce qui nous a conduit à vouloir expliquer ce phénomène.

RESULTATS PHYSICO-CHIMIE

IDENTIFICATION DE L'AMPHOTERICINE B

Fungizone gélule 250 mg

Composition

- ⇒ Amphotéricine B micropulvérisée : quantité correspondant pour une gélule à 250 mg
- ⇒ Amidon de maïs
- ⇒ Polyvidone excipient
- ⇒ Stearate de magnésium
- ⇒ Lactose QSP 420 mg

Aspect :

Gélules propres lisses, brillantes, dures, à corps bleu et à tête verte contenant un granulé jaune peu foncé sans impuretés visibles.

Tableau I : Poids moyen - Uniformité du poids du contenu

Poids	Gélules pleines (mg)	Gélules vidées (mg)	Poids du contenu (mg)
G1	512,6	97,6	415
G2	515,1	95,4	419,7
G3	523,6	92,9	436,7
G4	521,1	97,3	423,8
G5	528,9	94,4	433,5
G6	518,2	98,3	419,9
G7	518,4	95,5	422,9
G8	532	96,4	435,6
G9	522,1	92,1	430
G10	524,2	92,9	431,3
G11	526	99	427,8
G12	530,5	93,9	436,6
G13	524	95,7	428,3
G14	518	95,1	423,2
G15	526,7	98,1	428,6
G16	520,7	96,4	424,3
G17	530,9	97,6	433,3
G18	527,3	97,2	430,1
G19	521,2	95,1	426,1
G20	527,6	96,9	430,1

Poids du contenu = poids gélule pleine - poids gélule vide

⇒ Pesée de 20 gélules pleines

$$P = 10,4120 \text{ g}$$

⇒ Pesée individuelle de chacune des 20 gélules

P (voir tableau I)

- Pesée gélule pleine
- Pesée gélule vide

⇒ Pesée de 20 gélules vides

$$P = 1,8981 \text{ g}$$

⇒ Calcul du poids moyen du contenu d'une gélule

$$P = \frac{P - P'}{20}$$

$$P = \frac{10,4120 \text{ g} - 1,8981 \text{ g}}{20}$$

Poids moyen = P = 425,6 mg

Temps du délitement :

A 37° le temps du délitement a été de 8 mn 45 s dans de l'eau.

Perte à la dessication

Dessicateur IR 60°

IR = Infra rouge

- Premier essai : 3,57
- Deuxième essai : 3,65
- Troisième essai : 3,69

L'appareil a donné un pourcentage de 3,63%

Identification de l'amphotéricine B

Spectre UV

- Le spectre du Fungizone gel (**Fig 1**) a présenté 3 maximums d'absorption

$\lambda = 370 \text{ nm}$ absorbance : **A** = 0,0973

$\lambda = 389 \text{ nm}$ absorbance: **A** = 0,1881

$\lambda = 413 \text{ nm}$ absorbance: **A** = 0,2063

$$\frac{\mathbf{A} (389 \text{ nm})}{\mathbf{A} (413 \text{ nm})} = \frac{0,1881}{0,2063} = 0,91$$

$$\frac{\mathbf{A} (370 \text{ nm})}{\mathbf{A} (389 \text{ nm})} = \frac{0,0973}{0,1881} = 0,51$$

Lotion 3% (pour 3 ml) Lot n° 9K 20849

Exp 04 /2001

Composition :

Amphotéricine B micropulvérisée équivalent en activité à 0,900g

Ethylmercurithiosalicylate de sodium

Oxyde de titane

Gamme Gwar

Propylène glycol

Alcool cétylique

Alcool stearylique

Esters monopalmittique de sorbitane

Parahydroxybenzoate de propyle

Parahydroxybenzoate de méthyle

Solution de demethylpolysiloxane

Esters monolaurique du sorbitane polyhydroxyméthylé 20

Eau distillée QSP 30 ml

Aspect :

Liquide muqueux opaque jaune moutarde, odeur pratiquement nulle.

Identification de l'amphotéricine B par réaction colorée

Avec l'acide phosphorique à 85%

Réaction positive : coloration bleue

Densité avec pycnomètre 25°

Tare = 21,7340 g

Pycnomètre + eau = 32,4585 g

Pycnomètre + lotion = 32,1458 g

Poids de l'eau = 10,7245 g

Identification de la Nystatine par HPLC ou par son spectre UV

⇒ Phase mobile : Méthanol -Eau -Diméthylformamide (70 - 20 - 10)

⇒ Détecteur UV : $\lambda = 254 \text{ nm}$

⇒ Colonne : C₁₈

Longueur = 25 cm

Diamètre = 4,6 cm

Spectre UV : Mycolog® pommade 10 000 000 UI

Nystatine® ovule à 100 000 UI

Mycostatine® comprimés 500 000 UI

Nystatine® standard

Leurs spectres UV sont représentés aux pages suivantes.

I – CONTROLE DE QUALITE DE LA METHODE

I.1 – ETUDE DE LA REPETABILITE ET OU DE LA REPRODUCTIBILITE

Concernant la gamme de dilution proposée par la pharmacopée américaine nous n'avons qu'un résultat positif pour un seul test ce qui ne nous a pas permis de nous prononcer sur la répétabilité. Les tests suivants n'ont pas donné de bons résultats :

Étalon : concentration 31,2 – 25 – 20 – 16 – 12,8 ($\mu\text{g} / \text{ml}$)

Diamètres obtenus 16,06 – 14,59 – 13,07 – 11,41 – 09,9 (mm)

Echantillon : Diamètre obtenu : 12,9 (mm)

C'est pourquoi nous avons adopté une nouvelle gamme d'étalonnage avec des concentrations supérieures : 1,6 – 1,28 – 1,024 – 0,819 (mg / ml) qui donnent des résultats acceptables.

La recherche s'est effectuée sur 14 manipulations avec Mycostatine® (comprimés) dosés à 500 mg sur les souches *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. elle a donné les résultats suivants :

Tab II : Résultats de 9 tests sur Mycostatine®

Candida albicans

Manipulations	Moyenne dose réelle (mg)	Activité %
2	495,75	99,15
3	495,62	99,13
4	495,77	99,16
5	496,01	99,2
6	496,76	99,34
7	496,62	99,33
8	496,77	99,36
9	496,77	99,36
10	496,78	99,36
Moyenne (m)	496,316	99,09

Ecart type : E =1,0053 Intervalle (m ±E) [495,31 – 497,32]

Saccharomyces cerevisiae

Moyenne Dose réelle : 496,57 mg

Ecart type E : 0,983

Activité = 99,18%

Avec la droite d'étalonnage nous avons retrouvé régulièrement l'amphotéricine B entre 1,05 à 1,2 mg / ml alors que la Nyttatine est entre 0,95 à 1,02 mg / ml. Aussi bien avec *C. albicans* qu'avec *Saccharomyces cerevisiae*

Nous avons eu également une équation différentielle qui a permis de retrouver la concentration à partir du diamètre obtenu (page suivante).

I.2 – ETUDE DU TEMPS DE REALISATION

Tab III : Temps de réalisation de chaque étape du test

	Pesée	Validation de la souche	Manipulation proprement dite
T₁	7 min	10 min	2 heures 45 min
T₂	9 min	10 min	3 heures
T₃	10 min	10 min	3 heures 30 min

Il a fallu 3 à 4 heures pour réaliser le test

I.3 – EVALUATION DE LA STABILITE DES PREPARATIONS

Milieu de culture utilisé AM₁₉

Le milieu rigoureusement préparé était stable et efficace pendant 3 – 4 mois.

Tampon utilisés

Le tampon 10 et le tampon 6, rigoureusement préparés et le pH étant ajusté, restaient stables et efficaces pendant 15 à 21 jours.

Si le pH n'était pas ajusté, les tampons restaient stables et efficaces pendant 4 à 7 jours.

L'eau distillée stérile était restée stable et efficace durant toute la durée de nos manipulations.

I.4 – COUT DE LA METHODE

De ce point de vue nous n'avons pas de chiffres en francs disponibles mais l'eau distillée stérile a parfaitement remplacée les tampons 10 et tampons 6 utilisés qui ont été plus coûteux et plus difficiles à réaliser. Le volume du milieu de culture utilisé pour l'inoculum a été diminué au 1/10^e.

L'étude a été faite sur 15 manipulations.

Nystatine ovule 100 000 UI *Saccharomyces cerevisiae*

Tampons	Dose moyenne réelle (mg)	Activité %
Tampon 6	92,69	92,68
Eau distillée stérile	92,71	92,69

Fungizone® gélules 200 mg

Tab IV : Comparaison des résultats des différents diluants

Tampons	Dose moyenne réelle (mg)	Activité %
Tampons 10	247,21	98,09
Eau distillée stérile	247,02	99

I.5 – EVALUATION DE L'EFFET POST ANTIFONGIQUE

Cet effet post antifongique est constaté avec l'Amphotéricine B ce qui n'a pas été le cas avec la Nystatine.

II – FACTEURS INFLUENÇANT L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE

II.1 – INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Les boîtes préalablement coulées avec le milieu inoculé, et chargées avec les solutions d'antifongiques et, celles des substances de référence sont incubées à différentes températures:

- A 40°C : absence de croissance des germes fongiques
- A 39°C : croissance pratiquement absente
- A 38°C : croissance moyenne hétérogène des champignons
- A 37°C : croissance homogène complète
- A 30°C : croissance homogène complète

Les boîtes incubées à 40° et 39°C pendant 24 h sont réincubées à 37°C pendant 24 h, nous avons noté un début de recroissance. Les germes observés au microscope avaient la même morphologie que ceux préalablement inoculés dans le milieu.

Au moment de la préparation de la suspension de germes préparée à 0,5 McF, nous avons noté, à 37-38°C une absence de croissance après incubation des boîtes, et entre 29 et 35°C on observe une bonne croissance.

II.2 – INFLUENCE DE LA CHARGE ANTIFONGIQUE

II.2.1 - Préparation de la suspension fongique

Une concentration correcte en agents fongiques de l'inoculum a permis d'effectuer un bon test de contrôle de qualité.

- Niveau 1 de l'échelle Mac Farland : nous avons noté une absence de zones d'inhibition pour les deux plus faibles concentrations de la gamme d'étalonnage et celle de la troisième concentration c'est à dire la médiane, sa zone d'inhibition n'était pas toujours nette.
- Niveau 0,5 Mac farland : nous avons noté une zone d'inhibition claire et nette pour toute la gamme d'étalonnage.

II.2.2 - préparation de l'inoculum

- 3 ml de suspension fongique pour 100 ml de milieu utilisé : nous avons obtenu une absence de zones d'inhibition pour les plus faibles concentrations de la gamme d'étalonnage et des zones d'inhibition de clarté moyenne pour les plus fortes concentrations. Nous avons noté aussi l'existence d'une forte densité fongique.
- 2 ml de l'inoculum pour 100 ml de milieu utilisé : nous avons observé des zones d'inhibition pour toute la gamme d'étalonnage mais qui sont difficilement lisibles avec le pied à coulisse du fait d'une clarté moyenne.
- 1 ml de l'inoculum pour 100 ml de milieu utilisé : nous avons observé des zones d'inhibition claires avec des contours nets et une densité fongique correcte et une meilleure lisibilité.

II.3 – TEMPS DE CONTACT ENTRE L'ANTIFONGIQUE ET LA SOUCHE DE REFERENCE

- à 24 h nous avons observé des zones d'inhibition dont l'exactitude des contours varie selon la concentration de l'antifongique et le maximum de ces diamètres n'était pas atteint avec une lisibilité moyenne.
- A 48 - 72 heures le maximum des diamètres des zones d'inhibition a été obtenue, nous avons une bonne lisibilité , l'antifongique introduit dans les cupules à totalement diffusé et a agit. Ceci est illustré par les tableaux suivants :

Fungizone 250 mg gellule

Candida albicans

Tab V : Etude du temps d'incubation (*Candida albicans*)

	Moyenne dose réelle	Activité
24 heures	242,68 mg	93 %
48 heures	246,77 mg	99,13 %

Mycostatine 500 mg comprimés

Saccharomyces cerevisiae

Tab VI: Etude du temps d'incubation (*Saccharomyces cerevisiae*)

	Moyenne dose réelle	Activité
24 heures	457,9 mg	91,58 %
48 heures	487,73 mg	97,55 %

II.4 - INFLUENCE DU pH DU MILIEU

L'influence du pH du milieu était difficile à déterminer, mais son action est restée significative. Elle est illustrée par les tableaux (VII - VIII). Ces résultats sont obtenus sur la base de 9 tests de contrôle.

Nystatine® ovules

Saccharomyces cerevisiae

Tab VII : Etude de l'influence du PH

	Moyenne dose réelle	Activité
pH = 4,0	90,61 mg	90,65 %
pH = 6,0	92,18 mg	92,23 %

Candida albicans

Tab VIII : Etude de l'influence du PH

	Moyenne dose réelle	Activité
pH = 4,0	89,99 mg	89,98 %
pH = 6,0	92,69 mg	92,68 %

II.5 - UTILISATION DES CUPULES ET DES DISQUES

Le manipulateur avait le choix d'utiliser des cupules (50 µl) ou des disques (15µl). Ces résultats sont obtenus à partir de 10 manipulations effectuées sur les produits suivants avec la souche *Candida albicans*.

Tab IX : Mycostatine® 500 mg comprimés

	Cupules	Disques
Moyenne dose réelle	496,316	494,2
Ecart type	1,05353	2,431
Activité	99,09 %	98,66 %

Tab X : Fungizone® 250 mg gellules

	Cupules	Disques
Moyenne dose réelle	246,77	245,045
Ecart type	0,873	2,012
Activité	99,13 %	98,43 %

Tab XI : Nystatine® 100 mg ovules

	Cupules	Disques
Moyenne dose réelle	92,69	91,02
Ecart type	0,982	2,548
Activité	92,68 %	91 %

II.6 - EFFET POST ANTIFONGIQUE

Au cours de l'étude de l'influence de la température , les boîtes qui étaient incubées à 39 - 40°C et qui n'avaient pas présentées une bonne croissance de germes, ont donné une recroissance des germes fongiques à 37°C. Au microscope nous avons observé les mêmes germes préalablement incubés. Ceci était observé avec la Nystatine®.

DISCUSSION

I - CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE

Selon la présentation du produit à tester, il faut exécuter différents tests.

Pour les formes solides (gélules ou comprimés) il faudrait vérifier l'aspect et contenu et de la gélule, son poids moyen, son uniformité de masse, son temps de désagrégation temps du délitement, sa perte à la dessiccation. Il faudrait identifier le principe actif en vérifiant son spectre UV en comparaison avec celui d'un étalon, identifier les maximums d'absorption et calculer les rapports d'absorbance et aussi si possible faire la chromatographie sur couche mince. **(12, 17, 36)**

Pour la forme liquide comme la lotion, il faudra contrôler l'aspect, la viscosité, la densité, vérifier le pH, la taille des particules, le volume utile identifier le principe actif par des réactions colorées spécifiques ou déterminer son spectre UV en le comparant avec celui d'une référence. **(12)**

Tous ces tests de contrôle qui était faisables au laboratoire ont été exécutés, et les résultats obtenus sont conformes par rapport aux spécifications techniques des dossiers analytiques de chaque produit testé qui nous ont été envoyés par S. RIOUT du laboratoire de Bristol Myers Squibb **(12,)**.

Concernant l'identification de la Nystatine nous avons une superposition des spectres de différentes présentations galéniques et du standard ce qui indique l'existence de la Nystatine dans les différents produits testés.

Ces tests permettent de nous renseigner sur certaines caractéristiques de ces produits comme la bonne libération du principe actif, le pourcentage d'humidité, la pureté du principe actif, la fixation éventuelle des posologies, les conditions

de conservation et de stockage et donc de l'effet thérapeutique qui peut en découler. (28, 30, 31, 36)

II - METHODE STANDARDISEE

Pour que la méthode soit considérée comme standardisée, il faudrait que toutes les étapes de la méthode soient étudiées avec un maximum de précision et qu'elles soient validées.

II.1 - Validation de la souche de référence

C'est une étape fondamentale du test, car une souche de référence non validée ne peut servir pour effectuer un test de contrôle de qualité. Pour les antifongiques, les levures sont généralement utilisées et notamment *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae*. (30, 31, 40)

Candida albicans et *Saccharomyces cerevisiae* présentent pratiquement le même aspect : des colonies blanches, crémeuses, lisses et peu brillantes. Ces souches présentent également la même odeur mais elle est plus accentuée chez *Saccharomyces cerevisiae* (odeur de savon bouilli).

L'examen microscopique précise les premières idées que nous avons eu sur l'identité de la souche et sur sa pureté

II.2 - Gamme d'étalonnage

Avec l'absence de répétabilité des résultats acceptables avec la gamme proposée par la pharmacopée américaine (30), nous avons adopté la gamme 1,6 - 1,28 - 1,024 - 0,891 - 0,6553 (mg / ml) qui a donné des résultats répétables et reproductibles. Il faut noter qu'on fixe généralement la gamme d'étalonnage à partir de la charge moyenne du principe actif et que l'on encadre à gauche et à droite de deux concentrations. Et pour que l'échantillon soit considéré comme un

bon produit, il faut que sa concentration soit située aux environs de la troisième concentration (1,024 mg/ml) **(30, 31, 40)**.

Mais il est préférable d'exprimer les résultats en pourcentage ce qui donnera une idée plus précise sur l'efficacité de l'antifongique en utilisant trois dilutions de la substance de référence et trois dilutions de l'antifongique à tester.

II.3 - Préparation de l'inoculum et ensemencement

En comparant nos résultats avec ceux de la pharmacopée américaine et les résultats du laboratoire Bristol **(40)**, nous recommandons de préparer l'inoculum à partir d'une suspension fongique de 0,5 Mac Farland.

Ceci permet d'obtenir une bonne densité fongique, une meilleure précision des zones d'inhibition, une lisibilité correcte des boîtes d'où une meilleure appréciation de l'efficacité de l'antifongique à tester.

La méthode exige également pour un test de contrôle efficace, d'inoculer 1 ml de suspension fongique préparée pour 100 ml de milieu de culture utilisé à une température adéquate (29° - 35°). **(30)**

Il est important de préciser que cette charge fongique agit directement sur l'activité de l'antifongique à tester surtout avec l'amphotéricine B. Plus la concentration fongique est importante plus les concentrations antifongiques inhibitrices sont élevées. La culture fongique s'arrête lorsqu'elle rencontre une concentration égale à sa CMI. La mesure du diamètre de la zone d'inhibition reflète la valeur de la CMI de l'antifongique. **(35, 37)**

En comparant nos résultats avec ceux du laboratoire de Bristol nous pouvons en déduire que l'amphotéricine B induit une fongicidie concentration dépendante **(23)**.

II.4 - pH DU MILIEU UTILISE

L'ajustement du pH du milieu utilisé après stérilisation à $6,0 \pm 1$ demeure très important car le pH influence fortement l'activité de l'antifongique à tester. (12, 17, 40)

Le pH acide diminue l'activité des polyènes (35) et favorise la croissance des champignons ce qui constitue un élément important pour la clinique surtout dans le traitement des candidoses vaginales.

Cependant il faut veiller à ne pas contaminer les milieux déjà stérilisés au cours de l'ajustement du pH.

II.5 - TEMPERATURE

C'est l'un des facteurs les plus importants à maîtriser, car elle peut rapidement fausser les résultats, elle agit à deux niveaux. En comparant nos résultats avec les autres disponibles (30, 41) nous déduisons que :

- Pendant l'inoculation du milieu de culture utilisé, la température adéquate se trouve entre 29 et 35° donc il faut disposer d'un bon bain-marie. Au delà de cette température, les champignons sont inhibés ou tués ce qui va se traduire par une absence de croissance ou de mauvaises zones d'inhibition car il faut noter aussi que l'activité des antifongiques est meilleure pendant que les champignons sont en phase de croissance exponentielle. (23)
- Pendant la période d'incubation : il est à noter qu'au delà de 37°, les souches de référence sont complètement inhibées et qu'il sera impossible de lire de bons résultats.

II.6 - TEMPS DE CONTACT ENTRE L'ANTIFONGIQUE A TESTER ET LA SOUCHE DE REFERENCE

A partir de nos résultats et en les comparant avec les autres résultats nous déduisons qu'il est plus recommandable d'incuber les boîtes inoculées et chargées d'antifongiques pendant 48 – 72h. Ceci permet d'avoir des zones d'inhibitions claires et nettes avec des contours précis et une bonne lisibilité.

Cela est d'autant plus important que la croissance des champignons est lente (par rapport aux bactéries) de même que le mécanisme d'action des antifongiques (**20, 23**). Nous pouvons en déduire, que plus ce temps est long et plus l'activité antifongique est meilleure. Ce facteur doit être pris en compte dans le traitement des mycoses surtout dans les mycoses cutanéomuqueuses.

II.7 – UTILISATION DES CUPULES

Il est plus recommandable d'utiliser les cupules que les disques. Cependant les cupules sont facilement contaminables, mais avec une asepsie rigoureuse nous pouvons contourner ce problème.

L'utilisation des disques reste peu recommandable (**23**) d'autant plus qu'elle présente des écarts types très élevés par rapport aux cupules. Du fait de l'épaisseur du papier et de son degré d'absorption, les disques peuvent influencer l'activité de l'antifongique à tester, c'est pourquoi nous n'avons pas eu une répétabilité régulière avec ces disques ce qui nous a poussé à les abandonner. Et au cours de la stérilisation des disques, le papier peut perdre une partie de ses propriétés d'absorption. (**40**)

II.8 – CONTROLE DE QUALITE

II.8.1 – Reproductibilité et/ou répétabilité

La méthode standardisée est répétable et reproductible a plus de 98 % en se basant sur nos résultats. Nous avons une répétition des résultats, obtenus avec différents produits testés qui présentent des écarts types très petits (<1).

Les mêmes résultats sont obtenus avec d'autres membres du personnel du laboratoire. La dose de principe actif indiquée dans les produits testés est pratiquement conforme avec les résultats obtenus, elle se retrouve dans la marge d'efficacité [80% - 125%]. **(30, 40)**

Pour les produits à base d'amphotéricine B on retrouve 97 à 99,6 % d'activité sur *Candida albicans* et ceux à base de Nystatine® nous avons 94 à 98 %.

A partir de la droite d'étalonnage obtenue, il suffit pour les futurs dosages de s'y référer pour déterminer la concentration de l'antifongique à tester, ou utiliser l'équation différentielle obtenue.

II.8.2 – Temps de réalisation

Le temps de réalisation de la méthode était important à savoir (3 à 4 heures) surtout pour les besoins du planning de contrôle de qualité pour la direction du laboratoire.

Le test de contrôle de qualité des antifongiques demande au moins 5 jours.

Avec cette méthode, le contrôle de qualité se fera par semaine ce qui est même recommandé par la National Comitee for Clinical Laboratory Standards.(NCCLS). (40)

II.8.3 – Coût de la méthode

Il est difficile d'apprécier le coût global de la méthode mais avec les substitutions apportées et des diminutions de volume de certains réactifs par rapport à la méthode proposée par la pharmacopée américaine, nous avons en même temps agit sur le coût financier de la méthode.

II.8.4 – Stabilité

La méthode est également liée à la stabilité des tampons, des milieux et autres constituants utilisés. Les milieux rigoureusement préparés restent efficaces et stables jusqu'au delà de 4 mois. Les éléments les plus instables étaient constitués par les tampons phosphates mais nous l'avons substitué par de l'eau distillée stérile qu'il faut préparer la veille de la manipulation, de même que pour l'eau physiologique stérile. Cela était important car la préparation des tampons phosphates était fastidieuses.

Il faut noter que les poudres d'amphotéricine B et de Nystatine peuvent être conservées 4°C (23) mais leurs solutions perdent leur stabilité lorsqu'elles sont conservées pour une utilisation ultérieure.

Ainsi pour des raisons de gestion de stock de réactifs, il vaut mieux peser des quantités exactes qu'il faut pour réaliser le test.

II.9 – Effet antifongique

Cet effet post antifongique est observé avec l'amphotéricine B ce qui n'est pas le cas de la Nystatine, ceci implique que l'amphotéricine B présente une action fongicide concentration dépendante. Cette action est d'autant plus importante que le temps de contact entre l'antifongique et la souche de référence est long et que l'antifongique, a une concentration plus élevée. Cet effet antifongique est directement lié à la concentration et au temps de contact de l'antifongique. (20, 23)

II.10 – SOURCES D'ERREURS DE LA METHODE

La méthode paraît simple ; la technique de diffusion est surtout soumise à de nombreux facteurs dont la variation peut compromettre la précision des résultats, il est important pour le manipulateur de connaître les sources d'erreurs techniques suivantes : (36, 40)

- Validation incorrecte de la souche de référence
- Préparation incorrecte du milieu de culture utilisé, précisément une mesure non respectée du pH après stérilisation.
- Utilisation de réactifs expirés
- Standardisation inadéquate de la densité de l'inoculum
- Respect du temps d'incubation pour la souche de référence de 48 h
- Préparation imprécise ou mauvaise maintenance des tubes de références standard pour la turbidité (tubes Mac Farland)
- Respect des températures indiquées au moment d'inoculer le milieu et pendant l'incubation

- Délai trop long entre l'ajustement de l'inoculum et l'ensemencement des boîtes de Pétri
- Délai trop long entre l'application des disques ou cupules et l'inoculation
- Préincubation à la température du laboratoire pendant 2 h à 4h
- Lecture des résultats au moins avant 24 h d'incubation
- Inattention dans la lecture des diamètres d'inhibition
- Erreur de transcription dans l'enregistrement des résultats
- La stabilité de l'antifongique à tester ainsi que sa diffusion dans le milieu utilisé.

CONCLUSION

Cette méthode de diffusion en milieu gélosé est reproductible et répétable stable et fiable et peut être robuste par rapport à des influences extérieures si on respecte rigoureusement les conditions décrites.

Les principaux facteurs qui peuvent influencer l'activité des antifongiques en particulier les polyènes ont été décrits : l'effet de la température, le pH du milieu de culture utilisé, la concentration des agents fongiques et le temps de contact entre l'antifongique à tester et la souche de référence choisie.

Une variation si minime soit elle d'un de ces facteurs peut compromettre 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 le démarche surtout concernant la stérilisation du matériel de travail et la validation de la souche de référence.

A partir de cette étude nous pouvons indiquer que le respect de la température d'incubation entre 35-37°C et de la température du milieu de culture utilisé pendant l'inoculation (29-35°C) ainsi que l'ajustement du pH du milieu de culture après sa stérilisation demeurent nécessaires pour effectuer un bon test de contrôle. En outre il faudra laisser un temps de contact entre l'antifongique à tester et la souche de référence sensible au moins pendant 48 heures, effectuer le test avec une suspension fongique ayant une turbidité comparable à 0,5 McF et utiliser 1,2 ml de cette suspension pour inoculer 100 ml de milieu.

Cette technique exigera aussi d'utiliser des cupules à la place des disques de papier.

Les tests microbiologiques d'activité sont sujettes à des variables inter-essai ainsi qu'intra-essai de sorte que deux ou plus d'essais sont exigés pour une estimation

sûre de l'activité de l'antifongique à doser. Si l'activité estimée 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 que celle provenant d'un seul large avec le même nombre total de boîtes.

La méthode de diffusion en milieu gélosé ainsi validée est performante et ne nécessite pas un investissement en matériel, cependant elle ne permet pas d'apprécier l'effet fongistatique et nécessite généralement des délais de réponses trop long, la spécificité de la technique est faible.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abele-Horn M, Kopp A, Sternberg U, Only A, Dauber A et al.

A randomized study comparing fluconazol with amphotericin B/ 5-flucytosin for the treatment of systematic candida infections in intensive care patients.
Infections 1996 ; 24 : 426-432

2. Adedoyin A, Bernardo JF, Swenson CE et al.

Pharmacokinetic profile of abelcet® : combined experience from phase 1 and phase 2 studies.

Antimicrob agents Chemother 1997; 41 : 2201-2208

3. Anaissie EJ, Bodey GP, Kantarjian H, David C, Barnett K, Bow

Fluconazole therapy for chronic desiminated candidiasis in patients with leukemia and prior amphotericine B therapy.

Am G med 1991 ; 91 : 142-250

4. Anaissie EJ, Darouiche RO, Abi Said D, Uzum O, Mera J, Gentry LO et al

Management of invasive candidal infection : result of a prospective, randomized, multicenter study of fluconazole versus amphotericin B and reveiw of the literature

Clin infect dis 1996 ; 23 : 964 - 972

5. Ayestaron A, Lopez RM, Montoro JB, Estibalez A, Pou L, Julia A et al

Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion of amphotericin B in a group of patients with neutrapenia

Antimicrob agents chemother 1996 ; 40 -612

- 6. Berenger J, Aly NM, Allenede MC, Lee J, Gareet K, Battaglia S et al**
Itraconazole of experimental pulmonary aspergillosis : comparaison with amphotericin B interaction witchcyclosporin A, and correlation between therapeutic reponse end itraconazole concentrations in plasma.
Antimicrob Agents chemother 1994 ; 38 : 1303 - 1308
- 7. Bergan T,**
Pharmakinetics of azol antifungil agents : distinguishing
- 8. Block ER, Bennet JE,**
Pharmacological studies with 5-flucytosin
Antimicrob agents chemother 1972 ; 476 - 482
- 9. Caillot D, Chavanet P, Cassanova O, Solary E, Zanetta G, Buisson M et al**
Clinical evolution of a new liquid based delivery system for intravenous administration of amphotericin B. Eur. J. Clin Microbial infect Dis 1992 ; 11 : 722 - 725
- 10. Clemons KV, Stevens DA**
Ambosom and Abelcet for treatment of systematic murin cryptocococcis.
Antimicrob Agents chemother 1998 ; 42 : 899 - 902
- 11. Denning D, Delfavero A, Gluckman E, Norfolk D, Ruhnke M, Yoren Set al**
UK 109 496 a novel wide spectrium triazole derivate for the treatment offungal infections : clinical efficacy in acute invasive aspergillosis
In : Abstracts of the 35th interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, 1995 (n°F 80)
- 12. Documentation médicale Bristol Myers dossier réservé aux pharmaciens hospitalier**

13.Dominguez JM, Kelly VA, Kinsmann OS, Mariots MS, Gomes De Las Heras F, Julio Martin J. Sordarin :

A new class of antifungals with selective inhibition of the protein synthetic elongation cycle in yeast.

Antimicrob Agent Chemother 1998 ; 42 : 2274 - 2278

14.Dromer F, Improvisi L, Dupont B

Les tests de sensibilités des levures aux antifongiques

Option Bio 1998 ; 199 (suppl) : 45 - 46

15.Espinel-Ingroff A, Barchisi F, Hazen KC, Martinez SuarezJV Scalise F.

Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance

Med Mycol 1998 ; 36 (suppl 1) : 58 - 78

16.Faevgemann J

Pharmacokinetics of terbinafine

Rev. Contemp Pharmacother 1997 ; 8 : 289 - 297

17.FUNGIZONE, Dossier réservé à l'usage des pharmaciens hospitaliers,
Service de documentation médicale du laboratoire de Bristol . Paris

18.Fung-Tonic JC, Huczko E, Minassian B, Bonner DP

In vitro activity of a new oral triazol BMS - 207 147 (ER-30 346)

Antimicrob Agents chemother 1998 42 : 313 - 518

19.Goak, Baradell LB

Unpadate of its pharmacodynamic and pharmacocinetics properties and therapeutic use in major superficial

20.Helen Koenig,

Guide de Mycologie Médicale

Ellipses (ed. Marketing S.A.) 1995 : 22 - 27, 33 - 49, 74 - 75, 252 - 265

21. Herbrecht R,

Safety of amphotericin B colloidal dispersion,

Eur J clin Microbiol infect Dis 1997 ; 16 : 74 - 80

22. Johnson ER, Ojwang JO, Szekely A, Wallace TL, Warnock DW

Comparaison of in vitro of antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations.

Antimicrob Agent chemother 1998 ; 42 : 1412 -1416

23. Lortholary O, Tod M, Dupont B

Antifongiques. Encycl. Med Chir (Elseviren, Paris)

Maladies infectieuses, 8- 004-M-o, 1999, 21p

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

Traitement des histoplasmoses et de la coccidiomycose.

Med Mal infect 1995 ; 25 (n° spécial) : 63 - 73

25. Le Moing V, Lortholary O, Casassus P, Guillerin L, Dupont B

Traitement des aspergilloses par l'itraconazol

26. Meyohas MC, Meynard JL, Poivot JL, Frotier J

Apport des azolés dans le traitement des cryptococcoses

Med Mal infect 1995 ; 25 : 58 - 62

27. Mozaffarian, Beman JW, Casadeval A

Enhancement of nitric oxide synthesis by macrophages, represents and additional mechanism of action of amphotéricine B

Antimicrob Agent chemother 1997 ; 41 : 1825 - 1829

28. Organisation mondiale de la santé, série de rapports techniques n° 210, deuxième rapport du comité d'experts des antibiotiques

Ed. OMS, ed. Genève, 1997 ; 106 - 138

29. Petit Jean O, Jacolot A, Todd M

Pharmacologie des antifongiques azolés systémiques.

Med. Mal infect 1995 ; 25 : 14 - 26

30. Pharmacopée Américaine : 1690 - 1697

1690 - 1697

31. Pharmacopée Européenne,

1999 ; 56 - 62, 113 - 278 - 279, 712

32. Phillips P, Shafran S, Garber G, Rotstein C, Small F, Fong et al

Multicenter randomized trial of fluconazole versus amphotéricine B for treatment of Candidiasis in non-neutropenic patients,

Eur J Clin Microbiol infect Dis 1997 ; 16 : 337 - 345

33. Prentice HG, Hann IM, Herbrecht R, Aoun M, Kvaloy, Catavsky Detal

Oropharyngeal Candidiasis in patients with AIDS : randomized comparaision of fluconazol versus nystatin oral suspension,

Clin infect Dis 1997 ; 24 : 1204 - 1207

34. Pujol I, Guarro J, Sala J, Riba MD

Effects of incubation temperature inoculum size, and time of reading on broth microdilution suceptibility test results for amphotéricin B againts Fusarium.

Antimicrobiol Agent chemother 1997 ; 41 : 808 - 811

35. Reeves DS 1978

Dosage microbiologique des antibiotiques

Laboratory methods in antimicrobial chemotherapy (chapitres 28 à 45) J. Phillips

36.B. Saner, R. Matush

High performance liquid chromatographic separations of nystatin and their influence on the antifungal activity

Journal of chromatography A, 672 (1994) 247 - 253

37.Jupeas Vessieres, A et Scavizzi M

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

Ed Techniques, Encycl. Med. Chic Paris France

Maladies infectieuses 8005 A 30, 9-1999 ; 11

38.Van Etien EWHenvelde froot Bakker-Woundenberg IA

Efficacies of amphotéricin B desoxycholate (Fungizone), liposomal amphotéricine B (Ambisome) and fluconazole in the treatment of systematic candidiasis in immunocompetent and Leukopenic

Antimicrob chemother 1993 ; 32 : 723 - 739

39.Edwinh, Lennette, Ballows A, William J,Hansler JR, HJ Shadomy

Manual of clinical Microbiology Fourth edition : 972 - 983

40.S Riout QC

Manager EU qualified Person BMS

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : GENERALITES	3
I - DEFINITION	5
II - HISTORIQUE (23)	5
III - CLASSIFICATION : PROPRIETES PHYSIOCHIMIQUES ET CIBLES	
CELLULAIRES	7
III.1 - POLYENES (20,23).....	7
III.1.1 - Amphotéricine B	7
III.1.1.1 - Propriétés Physico-chimiques	7
III.1.1.2 - Cibles cellulaires	8
III.1.2 - Nystatine	9
III.1.3 - Fluorocytosine (8).....	12
III.1.3.1 - Propriétés physico-chimiques	12
III.1.3.2 - Cibles cellulaires	12
III.1.4 - Antifongiques azolés (Imidazoles et triazoles)	14
III.1.4.1 - Propriétés physico-chimiques (29).....	14
III.1.4.2 - Cibles cellulaires (1, 23, 29)	14
III.1.5 - Griseofulvine	18
III.1.5.1 - propriétés physico-chimiques.....	18
III.1.5.2 - Cibles cellulaires	18
III.1.6 - Terbinafine (20)	18
III.1.6.1 - Propriétés physico-chimiques	18
III.1.6.2 - Cibles cellulaires	18
III.1.7 - Antifongiques utilisés par voie locale dans des mycoses superficielles.....	19
III.1.8 - Autres antifongiques	19
IV - PHARMACODYNAMIE	22
IV.1 - POLYENES ET LEURS FORMES LIPIDIQUES	22
IV.1.1 - Mode d'action	22
IV.1.2 - Effet postantifongique	23
IV.1.3 - Pénétration et activité intracellulaire	23
IV.1.4 - Influence d'une Neutropénie	23
IV.1.5 - Influence du vecteur lipidique sur l'efficacité	24
IV.2 - FLUCYTOSINE	24
IV.2.1 - Mode d'action	24
IV.2.2 - Effet postantifongique	24
IV.3 - ANTIFONGIQUES AZOLES	25
IV.3.1 - Mode d'action	25
IV.3.2 - Effet postantifongique	25
IV.3.3 - Pénétration et activité intracellulaire	26
IV.3.4 - Influence d'une neutropénie	26
V - PHARMACOCINETIQUE	27
V.1 - AMPHOTERICINE B	27
V.1.1 - Cinétique de l'amphotéricine B administrée sous forme de fungizone	27
V.1.2 - Cinétique de l'amphotéricine B administrée dans un excipient lipidique	28
V.2 - FLUCYTOSINE.....	30
V.3 - ANTIFONGIQUES AZOLES.....	31
V.4 - GRISEOFULVINE	31
V.5 - TERBINAFINE.....	32
VI - TEST DE SENSIBILITE IN VITRO ET RESISTANCE AUX ANTIFONGIQUES	32

VI.1 - TESTS DE SENSIBILITE IN VITRO.....	32
VI.1.1 - Polyènes.....	33
VI.1.2 - Flucytosine.....	33
VI.1.3 - Antifongiques azolés	34
VI.1.4 - Griseofulvine	35
VI.1.5 - Terbinafine.....	35
VI.2 - MECANISME DE RESISTANCE	35
VI.2.1 - Polyènes.....	36
VI.2.2 - 5 – Fluoro cytosine	36
VI.2.3 - Azolés	36
I – CARACTERES MORPHOLOGIQUES.....	39
I.1 – MODE DE REPRODUCTION VEGETATIVE (20).....	39
I.2 – CARACTERISTIQUE DES CELLULES VEGETATIVES(20)	39
I.2.1 – Morphologie des levures.....	39
I.2.1.1 – En milieu liquide.....	40
I.2.1.2 – En milieu solide	40
I.2.2 – Formation d’une vraie filamentation, de pseudo-filamentation :	40
I.2.3 – Arthrospores.....	41
I.2.4 – Chlamydo-spores et Balisto-spores	41
I.2.5 – Formation de tube de germination	41
I.3 – ULTRASTRUCTURE DE LA PAROI DES CLOISONS (20)	41
I.4 – REPRODUCTION SEXUEE (20)	42
II – CARACTERES PHYSIOLOGIQUES	43
II.1 – COMPOSES CARBONES	43
II.2 – COMPOSES AZOTES(20).....	43
II.3 – REDUCTION DU TETRAZOLIUM	44
II.4 – RESISTANCE A L’ACTIDIONE (CYCLOHEXIMIDE)	44
II.5 – ACTIVITE PHENOXYDASE.....	44
II.6 - CROISSANCE A 37°C	44
III – CARACTERES BIOCHIMIQUES (20).....	45
III.1 – COMPOSITION A BASE DE L’ADN DES LEVURES	45
III.2 – STRUCTURE DU COENZYME Q (20).....	45
III.3 – TEST AU BLEU DE DIAZONIUM (20).....	45
III.4 – CARYOTYPE DES LEVURES (20)	45
IV – IDENTIFICATION DES LEVURES (20).....	46
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	49
I – MATERIEL	49
I.1 – SOUCHES DE REFERENCE.....	49
I.2 – MATERIEL.....	49
II – METHODES	51
II.1 – METHODES PHYSICO-CHIMIQUES D’IDENTIFICATION DE DIFFERENTES FORMES D’ANTIFONGIQUES (POLYENES)	51
II.1.1 – IDENTIFICATION DE L’AMPHOTERICINE B (12, 17)	51
II.1.1.1 - Formes solides (gélules).....	51
II.1.1.2 - Forme liquide (lotion)	53
II.2 - Titrage microbiologique des antifongiques : Méthode de diffusion en milieu gélosé (proposée par la pharmacopée américaine USP) (30)	54
RESULTATS.....	59
II.3 – Etude détaillée de la méthode microbiologique standardisée.....	60
II.3.1 – Régénération des souches de référence	60
II.3.2 - Manipulation proprement dite	62
II.3.3 - Evaluation des facteurs influençant l’activité de l’antifongique.....	66
II.3.3.1 - Température	66
II.3.3.2 - Charge fongique	66
II.3.3.3 - Temps de contact de l’antifongique à tester et de la souche de référence.....	66

II.3.3.4 - pH du milieu.....	66
II.3.3.5 - Evaluation de l'influence des cupules et des disques.....	67
II.3.4 - Contrôle de qualité.....	67
II.3.4.1 - Etude de la répétabilité de la méthode.....	67
II.3.4.2 - Etude de la reproductibilité.....	67
II.3.4.3 - Etude du temps de réalisation.....	67
II.3.4.4 - Etude de la stabilité dans le temps.....	67
II.3.4.5 - Evaluation du coût de la méthode.....	68
II.3.5 - Effet post antifongique.....	68
RESULTATS PHYSICO-CHIMIE.....	69
I – CONTROLE DE QUALITE DE LA METHODE.....	76
I.1 – ETUDE DE LA REPETABILITE ET OU DE LA REPRODUCTIBILITE.....	76
I.2 – ETUDE DU TEMPS DE REALISATION.....	78
I.3 – EVALUATION DE LA STABILITE DES PREPARATIONS.....	78
I.4 – COUT DE LA METHODE.....	79
I.5 – EVALUATION DE L’EFFET POST ANTIFONGIQUE.....	79
II – FACTEURS INFUANÇANT L’ACTIVITE ANTIFONGIQUE.....	80
II.1 – INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.....	80
II.2 – INFLUENCE DE LA CHARGE ANTIFONGIQUE.....	81
II.2.1 - Préparation de la suspension fongique.....	81
II.2.2 - préparation de l'inoculum.....	81
II.3 – TEMPS DE CONTACT ENTRE L'ANTIFONGIQUE ET LA SOUCHE DE REFERENCE.....	82
II.4 - INFLUENCE DU pH DU MILIEU.....	83
II.5 - UTILISATION DES CUPULES ET DES DISQUES.....	84
II.6 - EFFET POST ANTIFONGIQUE.....	85
DISCUSSION.....	86
I - CONTROLE PHYSICO-CHIMIQUE.....	86
II - METHODE STANDARDISEE.....	87
II.1 - Validation de la souche de référence.....	87
II.2 - Gamme d'étalonnage.....	87
II.3 - Préparation de l'inoculum et ensemencement.....	88
II.4 - pH DU MILIEU UTILISE.....	89
II.5 - TEMPERATURE.....	89
II.6 - TEMPS DE CONTACT ENTRE L'ANTIFONGIQUE A TESTER ET LA SOUCHE DE REFERENCE.....	90
II.7 – UTILISATION DES CUPULES.....	90
II.8 – CONTROLE DE QUALITE.....	91
II.8.1 – Reproductibilité et/ou répétabilité.....	91
II.8.2 – Temps de réalisation.....	92
II.8.3 – Coût de la méthode.....	92
II.8.4 – Stabilité.....	92
II.9 – Effet antifongique.....	93
II.10 – SOURCES D’ERREURS DE LA METHODE.....	93
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	97

RESUME

Cette étude a permis de valider les différentes étapes de la méthode de diffusion en milieu gélosé pour le contrôle de qualité des antifongiques, après avoir identifié l'existence du principe actif de l'antifongique par des essais et contrôles physico-chimiques. L'essentiel de cette étude a été effectué sur les polyènes.

Ce travail a été effectué au Laboratoire National de Contrôle des Médicaments qui a pour mission d'assurer le contrôle technique des médicaments.

Cette technique consiste à comparer le diamètre d'inhibition obtenu de l'échantillon à doser, à la surface d'une gélose ensemencée avec une souche de référence sensible, aux diamètres de concentrations connues de l'antifongique à tester. La précision est satisfaisante, à condition que les tests des échantillons et ceux des concentrations de la gamme étalon soient répétés plusieurs fois.

Les souches de références indicatrices (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) ont été purifiées et validées avant leur utilisation. Cela a supposé une bonne connaissance des caractères morphologiques et physiologiques de ces souches. Cette étude a révélé que le temps de contact entre l'antifongique et la souche doit être fixé entre 48 et 72 heures à une température fixée entre 35 et 37°C. La température du milieu au cours de l'inoculation a été fixée entre 29 et 35°C.

L'activité de l'antifongique influencée par le pH du milieu a justifié son choix, son pH a été fixé à $6,0 \pm 1$. La densité de l'inoculum est arrêtée 0,5 McF et qu'il faut 1 à 2 ml de l'inoculum pour 100 ml de milieu. Tous ces facteurs ont permis d'avoir des zones d'inhibition claires avec des contours précis, une homogénéité de la croissance fongique et une bonne lisibilité ce qui se traduit par une précision et une répétabilité des résultats.

Thèse Mouhamadou SOW

24 Juillet 2000

DISCUSSION

RESULTATS