

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Mouloud MAMMERI
Faculté de Médecine
Tizi-Ouzou



Département de Pharmacie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

Thème

**Caractérisation physico-chimique et essais de sensibilité du
fluconazole sur différentes espèces fongiques**

Présenté et soutenu publiquement
Le : 10 Juillet 2019

En vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie

Réalisé par :

M^{lle} BERRICHI Samia

M^{lle} CHENDRI Mahdia

M^r BOUIZERI Anis

Encadrés par :

D^r. ABDERRAHIM Wissem

Co-promoteur :

Professeur Mamou Marzouk

Membres du jury :

D^r SEKLAOUI.N

D^r AMIRAT.K

D^r BENSISAID.H

D^r ABDERRAHIM.W

P^r MAMOU.M

MAHU

MAHU

MAHU

MAHU

MCA

UMMTO

UMMTO

UMMTO

UMMTO

UMMTO

Présidente de jury

Examinatrice

Examinateur

Promotrice

Co-promoteur

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A mes chers parents : BOUIZERJ Ahmed et YAHIAOUI Ouerdia pour tout ce que vous m'avez appris, à ma mère, pour sa présence, ses sacrifices, pour avoir toujours cru en moi, à mon père, pour l'amour que tu as consenti pour mon bien être et ma réussite, que ce travail témoigne mon respect et un grand amour pour vous merci pour votre confiance.

A mes chers adorables frères et sœurs : Omar, Brahim, Sabah, Farida et Fedjria vous êtes les plus beaux cadeaux de ma vie merci pour votre soutien.

Je dédie spécialement ce travail à mes chères collègues : Dr BERRICHI Samia et Dr CHENDRI Mahdia

Les lignes refusent toute expression de peur de ne pas pouvoir vous exprimer ma profonde gratitude, c'est grâce à vous, votre patience et votre talent qu'on a pu réaliser ce chef-d'œuvre.

Que dieu tout-puissant vous protège et vous procure santé et réussite

A mes chers amis : Docteur BOUKEROUJI Hamza, Docteur SADEG Yanis, Docteur Bouksil Dyhia et Sofiane à nos souvenirs, nos bonheurs et malheurs partagés, nos rires et larmes que notre amitié dure toujours, à tous merci.

Anis.

Je dédie ce travail :

A mes chers parents ;

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être ; je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

A mes frères Abd El Hakim, Youssef, Islem et à ma sœur Khadidja je vous aime, que Dieu vous protège.

A mon fiancé, je te remercie énormément pour ton soutien et ta patience.

A ma chère amie Zahra, je te souhaite tout le bonheur du monde.

Samia.

Je dédie ce travail ;

A mes très chers père et mère,

Qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes sœurs Salima, Sara et Meriem ainsi mes frères Sadek et Aboubeker, pour votre affection, disponibilité et pour votre soutien sans égal dans les moments les plus difficiles de ma vie.

A mes nièces Rihem, Asma, Radja et Hanane mon secret de bonheur,

A mes neveux Aymen et Ibrahim que dieu vous bénie,

A mes précieux amis Nachida, Lyes, Amel, Manel pour leurs aides et encouragement dans les moments difficiles

A tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment.

Mahdia.

Remerciements

Nous tenons à remercier le Dieu tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté et la patience pour réaliser ce travail. A lui seul la gloire.

À notre maîtresse et Promotrice Dr ABDEKRACHIM Wissem

Nos sincères remerciements et notre profond respect pour votre encadrement ainsi que votre disponibilité et grande gentillesse. Merci également pour vos précieux conseils et vos encouragements qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous tenons à témoigner toute notre reconnaissance pour votre aide dans la réalisation de ce travail.

À notre cher maître et copromoteur Professeur MAMOU Merzouk :

Nous tenons à remercier votre personne, vous nous avez guidé dans notre travail et vous nous avez aidé à trouver les solutions pour avancer

Merci pour votre supervision éclairée tout au long de la rédaction de notre mémoire.

Aux résidents Dr Bourkhal, Dr Akli, Dr djerdi, Dr hadji, Dr Chayek :

On vous remercie énormément pour votre présence, votre aide et le temps que vous avez consacré. Vous étiez un grand soutien dans l'élaboration de ce mémoire.

À notre maîtresse et présidente de jury :

Docteur SEKLAOUJ Nacira Maître assistante en parasitologie-mycologie médicale au niveau du CHU Ftizi ouzou Nous vous remercions de l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider notre jury. Nous vous remercions aussi de votre enseignement de votre souci envers les étudiants. Veuillez trouver ici, docteur, l'expression de nos sincères remerciements

Aux examinateurs : Dr Amirat et Dr Bensisaid :

Nos vifs remerciements vont également aux examinateur pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et l'enrichir par vos propositions.

LISTE DES ABREVIATIONS

µm : micromètre

µL : microlitre

5-FC: 5-fluorocytosine

ABC: ATP-binding cassette

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique

ADN : acide désoxyribonucléique

API : aspergilloses pulmonaires invasives

ARN : Acide ribonucléique

BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive

°C : degré Celsius

CDR : candida drug resistance

Chr5 : isochromosome 5

CHU : centre hospitalo-universitaire

CI : candidoses invasives

CLSI: clinical and Laboratory Standard Institute

cm : centimètre

CMF : concentration minimale fongicide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMIs : concentrations minimales inhibitrices

CYP450 : cytochrome P450

CYP51A : gène code pour lanosterol-14-ademethylase chez le genre *Aspergillus*

Cyto3A4 : cytochrome3A4

ERG11 : gène code pour lanosterol-14-a-demethylase des levures

FLC : fluconazole

g : gramme

KBr : bromure du potassium

KHCO₃ : bicarbonate de potassium

HPLC : High pressure liquid chromatography

HClO₄ : acide perchlorique

IC : immunocompétent

ID : immunodéprimé

IR : infrarouge

KOH : potasse à l'eau

L3-L4 : vertèbres lombaires 3 et 4

L4-L5 : vertèbres lombaires 4 et 5

LCR : liquide céphalo-rachidien

MF : Mac Farland

MFS: major facilitator superfamily

mg : milligramme

MGG : May-Grünwald Giemsa

mL : millilitre

mm : millimètre

NCCLS : National Comite for Clinical Laboratory Standards

OMS : organisation mondiale de la santé (OMS)

PA : principe actif

pb : picobarn (unité de mesure d'ADN)

PNN : polynucléaires neutrophiles

R : résistante

S : sensible

SAC : sabouraud/Chloramphénicol/Actidione

SC : sabouraud/Chloramphénicol

SDD : sensible dose dépendant

SM : solution mère

SNC : système neurologique central

T- : témoin négatif

TDM : tomodensitométrie

TR 34/Leu98His : TR34/leucine98histidine

TR46 Tyr121phe/Thr289Ala :TR46tyrosine121phenylalanine/therosine289alanine

Veq : volume du point d'équivalence

VIH : virus d'immunodéficience humaine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Principales espèces de <i>Candida</i> impliquées en pathologie humaine.....	05
Tableau II : Récapitulatif des mécanismes d'action des antifongiques et leurs cibles.....	27
Tableau III : Modalités des prélèvements.....	55
Tableau IV : Identification des champignons levuriformes.....	59
Tableau V : Identification des dermatophytes.....	62
Tableau VI : Identifications des champignons du genre <i>Aspergillus</i>	64
Tableau VII : Corrélation entre sensibilité du germe et taille du halo d'inhibition.....	70
Tableau VIII : Corrélation entre la sensibilité de l'espèce fongique et la CMI.....	72
Tableau IX : Souches fongiques isolées au niveau du laboratoire de parasitologie-mycologie médicales de CHU Tizi-Ouzou.....	73
Tableau X : Classification des souches fongiques selon leurs sensibilités vis à vis du Fluconazole.....	76
Tableau XI : Diamètres des zones d'inhibition provoqués par le fluconazole testé sur différentes levures.....	76
Tableau XII : Résultats des CMIs pour les espèces fongiques testées.....	77
Tableau XIII : Récapitulatif des résultats des CMIs pour les souches sensibles au fluconazole.....	80
Tableau XIV : Classification des espèces fongiques testées selon leur degré de sensibilité par ordre décroissant.....	84
Tableau XV : Corrélation entre la sensibilité des souches fongiques et les valeurs des CMIs.....	85

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : intertrigo interdigital candidosique.....	07
Figure 02 : Périonyxis et onyxis candidosique.....	07
Figure 03 : Lésions papillomateuses et verruqueuses de la candidose mucocutanée chronique.....	08
Figure 04 : Cryptococcose atteinte cérébrale.....	11
Figure 05 : Cryptococcose lésion cutanée.....	11
Figure 06 : Pityriasis versicolor.....	12
Figure 07 : Dermatite séborrhéique du cuir chevelu et des sourcils.....	12
Figure 08 : Lésions cutanées métastatiques chez un patient leucémique atteint de Trichosporonose disséminée.....	14
Figure 09 : Dermatophytie de la peau glabre : lésion circinée caractéristique avec bordure vésiculeuse active.....	17
Figure 10 : Intertrigo des espaces interdigitaux.....	17
Figure 11 : Teigne microsporique.....	18
Figure 12 : teigne trichophytique.....	18
Figure 13 : teigne inflammatoire.....	18
Figure 14 : teigne favique.....	19
Figure 15 : Cibles des différentes molécules antifongiques.....	27
Figure 16 : Schéma représentatif de la voie de biosynthèse du l'ergostérol et du site d'action du Fluconazole.....	29
Figure 17 : Relation structure –activité (fluconazole).....	30
Figure 18 : Représentation du mécanisme de la surproduction de la cible chez le genre <i>Candida</i> (Sensible/résistante).....	33
Figure 19 : Représentation du mécanisme d'altération de cible chez le genre <i>Candida</i> (sensible/résistante).....	33
Figure 20 : l'expression des pompes à efflux (type MFS, CDR) sur la membrane cellulaire du <i>Candida</i> (sensible/ résistante).....	34
Figure 21 : représentation schématique de la déviation de la voie de biosynthèse en présence d'une perte de fonctionnalité de la C5 désaturase chez le genre <i>Candida</i>	34

Figure 22 : Représentation schématique de l'organisation de l'isochromosome i (5L) chez <i>Candida</i>	35
Figure 23 : schémas représentatif de l'implication du biofilm dans la résistance à l'antifongique.....	35
Figure 24 : les mécanismes de résistance du genre <i>Aspergillus</i>	36
Figure 25 : système de la spectrophotométrie Infrarouge (Perkin Elmer, Spectrum Two FT-IR spectrometer).....	42
Figure 26 : Préparation des pastilles du principe actif de FLC	44
Figure 27 : titrage volumétrique.....	47
Figure 28 : spectre infrarouge du fluconazole matière première.....	48
Figure 29 : spectre de référence du fluconazole (pharmacopée japonaise).....	48
Figure 30 : Différents matériels utilisés lors du prélèvement.....	51
Figure 31 : potasse à 10 % +noir chlorazole +eau physiologique stérile+ encre de chine...	51
Figure 32 : lame et lamelle.....	52
Figure 33 : Microscope optique.....	52
Figure 34 : étuve à 27C° et à 37°.....	52
Figure 35 : Milieux d'isolement+ Anse de platine.....	52
Figure 36 : Sérum humain+ Tube sec+ Micropipette +Bleu de coton.....	53
Figure 37 : lampe de Wood.....	53
Figure 38 : Examen direct du scotch test cutanée montrant des levures en grappe de raisins (Cas de Pityriasis versicolor).....	57
Figure 39 : examen microscopique après coloration de Gram montrant des levures bourgeonnantes avec bourgeons multilatéraux et pseudofilaments mycélien	57
Figure 40 : filaments mycéliens. (Prélèvement d'ongles).....	57
Figure 41 : parasitisme pileaire (teigne Endo-ecthotrix).....	58
Figure 42 : levures capsulés du <i>Cryptococcus</i>	58
Figure 43 : Différentes étapes de la mise en culture.....	58
Figure 44 : différentes étapes de la réalisation du test de Blastèse.....	60
Figure 45 : résultat du test de blastèse (<i>Candida albicans</i>).....	61
Figure 46 : Galerie biochimique (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	61

Figure 47 : préparation des milieux de culture.....	67
Figure 48 : suspensions fongiques d'une turbidité de 0.5 MF comparées à un témoin négatif.....	67
Figure 49 : Ensemencement par les suspensions fongiques.....	68
Figure 50 : dépôts des disques sur les boites préalablement ensemencées.....	68
Figure 51 : incubation des boites ensemencées.....	69
Figure 52 : différentes dilutions préparées à partir de la matière première du fluconazole....	71
Figure 53 : dépôt des disques pour la détermination des CMI.....	71
Figure 54 : Résultats du test de sensibilité de souches fongiques au fluconazole par la méthode de l'antifongigramme (souches sensibles).....	74
Figure 55 : Résultats du test de sensibilité de souches fongiques au fluconazole par la méthode de l'antifongigramme (souches résistantes).....	75
Figure 56 : Détermination de la CMI de <i>C. albicans</i> (crachat).....	78
Figure 57 : Détermination de la CMI de <i>C.albicans</i> (intertrigo).....	78
Figure 58 : Détermination de la CMI de <i>C.albicans</i> (buccal).....	79
Figure 59 : Détermination de la CMI de <i>C.neoformans</i>	79
Figure 60 : Détermination CMI de <i>C.kefyr</i>	80
Figure 61 : résultat de la CMF pour <i>C.albicans</i> (buccal).....	81
Figure 62 : résultat de la CMF pour <i>C.albicans</i> (intertrigo).....	81
Figure 63 : résultat de la CMF pour <i>C.albicans</i> (Crachat).....	81
Figure 64 : résultat de la CMF <i>Candida kefyr</i>	81
Figure 65 : résultat de la CMF pour <i>Cryptococcus néoformans</i>	81

LISTES DES ANNEXES

Annexe I : procédure de control physicochimique du fluconazole matière première selon la pharmacopée européenne.

Annexe II : composition et préparation des réactifs.

Annexe III : Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) 6ème édition 2011.

Annexe IV : casitone/ Gélose BIORADV4 18/05/11.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ANNEXES

INTRODUCTION.....01

OBJECTIFS.....02

Revue de la littérature

CHAPITRE I : généralités sur les mycoses.

I. Définition.....05

II. Agents responsables06

1. Filamenteux.....06

2. levuriformes.....06

III. Levuroses

1. Candidoses.....06

2. Cryptococcoses.....11

3. Malassezioses.....13

4. Trichosporonoses.....15

5. Rhodotoruloses.....16

6. Geotrichoses.....16

IV. Mycoses à champignons filamenteux

1. Dermatophytoses.....17

2. Aspergilloses.....17

V. Démarches diagnostiques

1. Définition générale.....24

2. Rôle du laboratoire.....25

VI. traitement antifongique28

Chapitre II : Le fluconazole

I. Le fluconazole.....	31
II. Mécanisme d'action du fluconazole.....	31
III. Les propriétés pharmacocinétiques.....	32
IV. Interactions médicamenteuses.....	33
V. Fluconazole, grossesse et allaitement	34
VI. Le spectre d'activité du fluconazole.....	34
VII. La résistance au fluconazole chez les espèces fongiques.....	35
1. La résistance naturelle	35
2. La résistance acquise	35
VIII. Mesures prophylactiques contre l'émergence de la résistance	40

Chapitre III : Caractérisation physico-chimique

I. Caractères organoleptiques.....	42
II. Identification du principe actif.....	42
III. Dosage du principe actif.....	42
IV. Recherche des impuretés.....	43
V. Techniques utilisés pour la caractérisation physicochimique	43
1. Spectrophotométrie infrarouge	43
2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	43
3. Potentiométrie	43
4. Méthodes volumétriques	43

Partie pratique

Objectifs

Chapitre I : caractérisation physicochimique

I. Matériels.....	48
II. Méthode.....	49
1. Aspect	49
2. Identification par infrarouge	50

3. Perte à la dessiccation.....	50
4. Dosage volumétrique.....	50
Résultats	53
Discussion	53
Conclusion	55

Chapitre II : essais d'efficacité du fluconazole sur différentes espèces fongiques

I. Isolement des souches.....	58
1. Matériels.....	58
2. Méthodologie.....	60
II. évaluation de l'activité antifongique du fluconazole en milieu solide	
1. Evaluation qualitative de l'activité antifongique du fluconazole.....	74
2. Evaluation quantitative de l'activité antifongique du fluconazole.....	78
RESULTATS.....	82
DISCUSSION.....	92
CONCLUSION.....	97

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

INTRODUCTION

INTRODUCTION

De nos jours un thème d'actualité est celui des infections fongiques qui constituent un véritable problème de santé publique tant par leur fréquence que par leur difficulté de diagnostic qui est souvent tardif.

Ces infections fongiques peuvent être superficielles ou profondes. Dans la plupart des cas, les infections localisées fréquentes mais bénignes, sont causées par des champignons microscopiques : levures, dermatophytes et moisissures qui sont à l'origine de diverses entités touchant la peau, les phanères et les muqueuses, on parle de mycoses superficielles paradoxalement, les traitements utilisés peuvent être locaux ou systémiques. Quant aux mycoses profondes, qui sont graves mais peu fréquentes, elles surviennent chez des personnes présentant un certain nombre de facteurs de risque notamment l'immunodépression, troubles métaboliques...etc. et leur traitement fait appel à des médicaments administrés par voie parentérale. [1]

Le bouleversement dans l'émergence et la réémergence des espèces fongiques a fait que les molécules antifongiques ont largement évolué dans le temps. Au cours des dernières années, le nombre de champignons incriminés en pathologie humaine est passé de moins d'une trentaine d'espèces dans les années 50 à plus de 400 aujourd'hui.[1]

En guise d'exemple de molécules antifongiques à large spectre d'activité, on a choisi le Fluconazole qui a été mis en œuvre depuis 1990.

En revanche, on observe aussi une recrudescence d'échec thérapeutique aux antifongiques d'où l'intérêt de la réalisation de l'antifongogramme qui est l'élément clé de révélation d'une éventuelle sensibilité ou résistance d'une souche fongique.

Notre travail s'articule sur deux axes :

- ✓ Le premier qui représente une revue de la littérature ; on a d'abord commencé par un rappel sur les principales espèces responsables des mycoses superficielles et profondes en mettant l'accent sur l'aspect clinique des lésions qu'elles entraînent dans le premier chapitre, ceci nous a mené à présenter aussi les différentes techniques du diagnostic des mycoses. Le fluconazole est ensuite abordé dans le deuxième chapitre en citant ces principaux caractères pharmacologiques et son spectre d'activité sur les différentes espèces fongiques. et dans le dernier chapitre on a parlé brièvement sur les techniques et méthodes utilisées pour la caractérisation physico-chimique d'une matière première.

- ✓ Le second porte sur notre étude qui a consisté à étudier les caractères physicochimiques de la matière première du principe actif fluconazole, isoler et identifier des différentes espèces fongiques ainsi que évaluer l'activité antifongique du fluconazole par la réalisation des tests de sensibilités sur les espèces déjà isolées

Revue de la littérature

CHAPITRE I

Généralités sur les mycoses

I Définition

Les mycoses sont des infections provoquées par des champignons microscopiques dénommés mycètes, susceptibles de vivre en parasite ou en saprophyte chez l'homme.

D'après leur localisation les mycoses peuvent se regrouper en trois catégories :

- Les mycoses superficielles : sont des maladies infectieuses très fréquentes de la peau, des phanères et des muqueuses, dues à des levures (représentées par le genre *Candida*, *Malassezia*, *Trichosporon*.....), des Dermatophytes et rarement des moisissures.(2)
- Les mycoses sous cutanées : sont des infections dues à des champignons saprophytes ubiquitaires qui affectent la peau et le tissu sous cutané, leur inoculation se fait le plus souvent par implantation traumatique et leur évolution est subaiguë ou chronique.

Exemple : les sporotrichoses. [2]

- Les mycoses profondes : la majorité de ces infections se produisent chez des sujets aux défenses immunologiques diminuées ou qui présentent des facteurs de risques favorisants, dues le plus souvent à des champignons communément saprophytes non pathogènes mais opportunistes représentées essentiellement par les genres *Candida*, *Aspergillus* et *Cryptococcus*. [3]

II Agents responsables des mycoses

Les mycètes, véritables eucaryotes, constituent un règne (fungi) distinct de celui des plantes et du règne animal.

On évalue à environ 1200000 le nombre d'espèces dont seulement quelques centaines sont connues comme potentiellement pathogènes chez l'homme.

Les mycètes vivent en commensaux chez l'homme sans occasionner de lésions (par exemple *Candida* sp). Ils vivent parfois en parasites d'où le terme de mycoses pour désigner les lésions qu'ils occasionnent. L'état de commensalisme et de parasitisme est réversible selon l'état des défenses du patient.

D'un point de vue pratique, selon leur aspect morphologique, on distingue trois types de mycètes :

II.1 Filamenteux

Ils se développent sur leur substrat nutritif par un système de filaments plus ou moins ramifiés, dénommé thalle ou mycélium. Constitué de filaments (ou hyphes) cloisonnés ou non. Parmi ces mycètes filamenteux impliqués en pathologie on différencie :

- Les dermatophytes : champignons kératinophiles adaptés à la peau et aux phanères de l'homme ou de l'animal, et provoquent des lésions quel que soit l'état immunitaire du patient.
- Les moisissures : issues du sol (telluriques) au comportement opportuniste (par exemple *Aspergillus*) : leur développement chez l'homme est permis par l'affaiblissement de ses défenses immunitaires.

II.2 Levuriformes

Dans ce cas, le thalle se réduit à un état unicellulaire, l'aspect classique est celui d'une levure de forme ronde ou ovale, de petite taille, qui se produit par bourgeonnement. Certaines levures comme celle appartenant au genre *Candida*, peuvent donner naissance par bourgeonnement successifs à un pseudomycélium ou même à des filaments mycéliens vrais. Parmi les levures il convient de citer les *Candida*, les *Malassezia*, les *Cryptococcus* et les *Trichosporon*. [4]

III.3 Dimorphiques

Les champignons dimorphiques se présentent dans l'environnement (sol, etc...) sous une forme filamenteuse, produisant des spores. Dans les tissus parasités chez l'homme ou l'animal, on les retrouve sous forme de levure. [5]

III Levuroses

III.1 Candidoses

III.1.1 Définition

Les *Candida* sont des levures, micro-organismes commensaux, endo ou exogènes et dont le pouvoir pathogène ne s'exprime qu'en présence de facteurs favorisants. Le spectre de

symptômes varie considérablement de la candidose cutanée très fréquente en médecine générale à la candidose disséminée rencontrée chez les patients hospitalisés accumulant de nombreux facteurs de risque, et dont le pronostic est particulièrement sombre.[5]

III.1.2 Agents causals

Le genre *Candida* compte actuellement environ 200 espèces, dont seulement 12 sont impliquées en pathologie humaine. Il s'agit de levures non pigmentées, non capsulées à bourgeonnement multilatéral, productrice (*Candida albicans*) ou non (*Candida glabrata*) de filaments, et donnant des colonies blanches crémeuses en culture[5].

Tableau I : Principales espèces de *Candida* impliquées en pathologie humaine.

Espèce	tube digestif	sphère génital	peau	produits laitiers	fruits / céréales
<i>C.albicans</i>	++++	+++	jamais		
<i>C.glabrata</i>	++++	+++			
<i>C.parapsilosis</i>	+		+++		
<i>C.famata</i>	+/-		+++		
<i>C.krusei</i>					+++
<i>C.kefyr</i>				+++	
<i>C.tropicalis</i>					+++

III.1.3 Facteurs favorisants

- Pour les formes superficielles : il s'agit de facteurs locaux ; macération (contacts répétés avec l'eau, occlusion, transpiration...), pH acide, irritations (prothèses dentaires, mucite post-radique), humidité ; mais les facteurs généraux doivent aussi être pris en considération : diabète, grossesse, surcharge pondérale, âges extrêmes, certaines atteintes de l'immunité cellulaire en particulier au cours du sida, corticothérapie et antibiothérapie à large spectre.
- Pour les infections invasives: ils sont plus nombreux et varient selon le terrain (immunodéprimés, chirurgie abdominale lourde, dispositif médical invasif, toxicomanes par voie intraveineuse).[6]

III.1.4 Mode de contamination :

- La voie exogène : contamination du nouveau-né par la mère atteinte de vaginite candidosique, candidoses sexuellement transmissibles des adultes.
- La voie endogène à partir d'une porte d'entrée digestive ou génitale. Exceptionnellement, *Candida albicans* provoque des septicémies ou des lésions viscérales profondes dans un contexte d'immunosuppression ou chez les patients en aplasie médullaire.[6]

III.1.5 Physiopathologie

➤ Candidoses superficielles

L'adhérence aux cellules épithéliales, la multiplication des levures et leur filamentation sont à l'origine des lésions cutanéomuqueuses inflammatoires.

➤ Candidoses profondes

La présence de levures dans le tube digestif, en particulier *Candida albicans*, est un phénomène physiologique, les étapes conduisant à l'infection passent par une phase de colonisation, celle-ci est la conséquence de modifications écologiques qui entraînent la multiplication des *Candida* spp.

Les traitements anticancéreux (cytolytiques) et les interventions sur le tube digestif altèrent la muqueuse, favorisant le passage des levures.

Les levures disséminent par voie sanguine, adhèrent au tissu et filamentent (pour les espèces qui filamentent), conduisant à des lésions multiples.[5]

III.1.6 Clinique

III.1.6.1 Candidoses superficielles

➤ L'intertrigo candidosique

Il se présente comme un érythème recouvert d'un enduit blanchâtre. Les lésions au niveau des plis sont ici prurigineuses et très érythémateuses. On retrouve souvent des papules ou des pustules en association (figure 1).

On distingue classiquement deux types d'intertrigos :

- L'intertrigo des grands plis qui touche les plis axillaires, inguinaux et sous mammaires.

L'érythème fessier du nourrisson également appelé dermite du siège qui est la dermatose la plus répandue chez ce dernier est souvent compliqué par *C.albicans*.

- l'intertrigo des petits plis ou interdigital qui atteint rarement les espaces interdigito plantaires et beaucoup plus fréquemment les espaces interdigito palmaires[7].



Figure 1 : intertrigo interdigital candidosique.

(Disponible sur : http://campus.cerimes.fr/dermatologie/enseignement/dermato_10/site/html/1_2.html)

➤ Onychomycoses à Candida

Elles sont plus fréquentes au niveau des doigts qu'au niveau des orteils, avec une prédominance féminine, car les femmes sont plus exposées aux facteurs de risques locaux : contacts prolongés et répétés avec l'eau et les produits d'entretien et les produits de pâtisseries (sucre...).

Candida albicans est l'espèce la plus souvent incriminée.

La contamination résulte d'une auto inoculation à partir d'un foyer digestif ou génital. Elle se débute par une tuméfaction tendue érythémateuse, douloureuse, entourant la tablette unguéale, l'atteinte de l'ongle est secondaire, l'évolution peut aboutir à une onycholyse totale (Périonyxis) (figure 2)[5].



Figure 2 : Périonyxis et onychis candidosique.

(Disponible sur : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/poly-parasitologie/>.)

III.1.6.2 Candidoses des muqueuses

➤ Atteinte du tube digestif

Bouche : stomatite candidosique, touche la langue et la face interne des joues, la muqueuse est érythémateuse, sèche et vernissée avec des dépôts blanchâtres (appelée aussi « muguet buccal »).

Œsophage : œsophagite candidosique, chez les patients immunodéprimés le plus souvent, dysphagie et douleurs retrosternales.

Anus : anite candidosique : prurit et brûlures anales, parfois érythème et fissures de l'anus [8].

➤ Candidoses génitales

Candidoses vulvo-vaginale : touche la femme en période d'activité génitale, elle est due à *Candida albicans* (80%) et *Candida glabrata* (20%). Elles sont hormono-dépendantes (surviennent dans la seconde partie du cycle menstruel et pendant le troisième trimestre de la grossesse).

Elles se manifestent par un prurit, brûlures et leucorrhées. L'évolution est favorable dans 90% des cas.

Balanite : chez l'homme la candidose génitale se traduit par une balanite qui représente une infection sexuellement transmissible, les formes sévères doivent faire rechercher un diabète[8].

III.1.6.3 Candidoses cutanéomuqueuses chroniques

C'est une affection rare, qui touche principalement les jeunes enfants, avec une atteinte à *Candida albicans* persistante ou récidivante de la peau, des ongles et des muqueuses (figure 3).[5]



Figure 3 : Lésions papillomateuses et verruqueuses de la candidose mucocutanée chronique.[9]

III.1.6.4 Candidoses invasives

Les candidoses invasives (CI), dont la fréquence a augmenté ces dernières années, englobent les candidémies et les affections viscérales profondes résultant d'une dissémination hématogène ou plus exceptionnellement de l'inoculation directe du *Candida* spp dans un site stérile. Tous les organes profonds peuvent être atteints. Elles surviennent en général dans un contexte nosocomial, chez des patients hospitalisés cumulant de nombreux facteurs de risque.

Les candidoses invasives sont associées à un taux de mortalité élevé, de l'ordre de 25 % à 40 % et elles situent au 4^{ème} rang des infections nosocomiales.[9]

III.2 Cryptococcoses

III.2.1 Définition

La cryptococcose est une affection fongique cosmopolite grave, due à une levure encapsulée du genre *Cryptococcus*. Elle affecte généralement les sujets ayant un déficit de l'immunité cellulaire sévère et en particulier, les patients vivant avec le VIH. Sa gravité est liée à son tropisme pour le système nerveux central, responsable de la méningo-encéphalite cryptococcique.

III.2.2 Agents causal

La plus part des infections cryptococcique humaines sont causées par l'une des deux espèces :

- *Cryptococcus neoformans* : dont il existe deux variétés *Cryptococcus neoformans* variété *grubii* (sérotypé A), et *Cryptococcus neoformans* variété *neoformans* (sérotypé D)
- *Cryptococcus gatii* dont il existe deux sérotypé B et C.

Il s'agit d'une levure ronde, entourée d'une capsule muccopolysaccharidique, sans mycélium, saprophyte, retrouvée dans le milieu extérieur. Chez l'homme elle a un comportement opportuniste (chez l'immunodéprimé).

III.2.3 Contamination

La contamination se fait par inhalation de poussière de fientes de pigeon ou de chauve-souris, contenant le champignon (primo infection pulmonaire) ; et rarement par inoculation cutanée.

III.2.4 Physiopathologie

Ce champignon à un neurotropisme et détermine des lésions inflammatoires diffuses (méningo-encéphalite) et/ou granulomatoses (cryptococcome).

Il diffuse très largement (septicémie) chez les patients très immunodéprimés (peau, œil, etc...).

III.2.5 Clinique

III.2.5.1 Atteinte pulmonaire

La primo infection pulmonaire est asymptomatique et guérit spontanément.

Elle peut se présenter comme une pneumopathie interstitielle avec des signes non spécifiques : toux, douleurs thoraciques, fièvre et dyspnée. Comme il peut exister des formes cliniques avec détresse respiratoire.

III.2.5.2 Atteinte neuroméningée

La méningo-encéphalite est diagnostiquée dans plus de 75% et plus fréquemment chez les patients infectés par le VIH.

Les manifestations cliniques ne sont pas spécifiques, souvent trompeuses et leur expressions s'étend de la simple fièvre au long cours à la méningite fulminante.

Le début est insidieux et progressif, durant de plusieurs semaines à plusieurs mois, associant des céphalées persistantes, des modifications du caractère, avec parfois de paralysie de nerfs crâniens.

Un syndrome méningé plus franc s'installe ensuite, avec des céphalées persistantes, des vomissements et une raideur de la nuque, le tout dans un contexte fébrile (figure 4).

III.2.5.3 Atteinte cutanée

La peau constitue le site métastatique préférentiel après le SNC. L'atteinte cutanée survient dans 5 à 10% des cas. La lésion initiale est une papule qui grossit en pustule et finit par s'ulcérer. Ces lésions siègent au niveau du visage et des extrémités (figure 5).

III.2.5.4 Atteinte disséminée

Au cours des formes disséminées tous les organes peuvent être atteints et les hémocultures sont positives ; citons l'œil, l'os, le cœur, les reins, la prostate, le foie et les surrénales. [10;11]

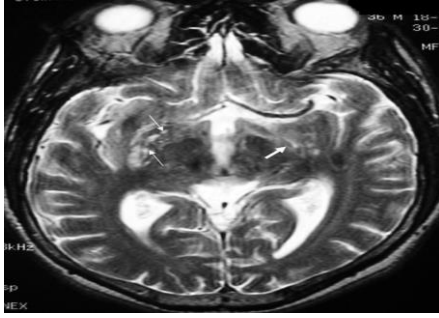


Figure 4 : Cryptococcose atteinte cérébrale.



Figure 5 : Cryptococcose lésion cutanée

(disponibles sur : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/cryptococcose/site/html/cours>) .

III.3 Malassézioses (pityrospores)

III.3.1 Définition

Les infections cutanées à *Malassezia* (Malassézioses ou pityrospores) sont des affections fréquentes sans caractères de gravité, mais récidivantes. Elles sont dues à des levures commensales de la peau appartenant au genre *Malassezia*.

III.3.2 Agents causals

Ce sont des levures basidiomycètes, lipophiles et kératinophiles, commensales de la peau. Actuellement 16 espèces de répartitions géographiques variables sont décrites, dont les plus fréquentes sont *Malassezia furfur* ; *Malassezia pachydermatis* ; *Malassezia globosa* et *Malassezia sympodialis*.

III.3.3 Physiopathologie

Levures opportunistes, elles se prolifèrent dans l'épiderme en produisant du mycélium, en présence de facteurs favorisant comme l'excès de sébum, la chaleur, la sudation ; mais aussi la grossesse, l'immunodépression ou l'usage de traitements immunosuppresseurs (corticoïdes par exemple) ; des facteurs génétiques ont également été incriminés.

III.3.4 Clinique

Plusieurs entités cliniques peuvent être associées à *malassezia* :

III.3.4.1 Pityriasis versicolor

Cette affection, très fréquente dans les deux sexes, prédomine chez les jeunes adultes, est due principalement à *Malassezia furfur*, elle se caractérise par une légère desquamation, parfois prurigineuse et par la présence des taches hypo ou hyper pigmentées.

Les lésions prédominent sur le thorax et le cou, mais peuvent s'étendre à tout le corps (sauf les paumes des mains et les plantes des pieds). (Figure 6)



Figure 6: Pityriasis versicolor. [9]

III.3.4.2 Dermite séborrhéique

Dermatose caractérisée par des lésions érythémato-squameuses, elle atteint surtout le sillon nasogénien, les ailes du nez, la racine du cuir chevelu, les sourcils mais aussi le tronc et le cuir chevelu sous formes de pellicules.



Figure 7 : Dermite séborrhéique du cuir chevelu et des sourcils.

(Disponible sur : <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/malassezia/site/html/3.html>)

III.3.4.3 La folliculite du tronc à Malassezia

Elle se présente sous l'aspect de plusieurs petites papules folliculaires, souvent prurigineuses, le siège habituel est le tronc avec une association possible de la face du thorax.

III.3.4.4 Pityriasis capitis

Correspond à l'état pelliculaire du cuir chevelu, il est favorisé par le stress et la séborrhée, le prurit est fréquent.

III.3.4.5 Les fongémies à *Malassezia*

Les *Malassezia* peuvent être exceptionnellement isolés dans des hémocultures, les patients à risques sont les immunodéprimés, les nouveau-nés et surtout les patients ayant une alimentation parentérale, notamment riches en lipides[11, 12, 13].

III.4 Trichosporonoses

III.4.1 Définition

Les Trichosporonoses sont des mycoses superficielles ou profondes, dues au parasitisme des espèces du genre *Trichosporon*, ces infections sont majoritairement d'ordre endogène, c'est-à-dire issues des souches commensales de la peau et des muqueuses.

III.4.2 Agents causals

Les *Trichosporon spp* sont des levures cosmopolites, appartenant au phylum basidiomycota, isolées du sol, des plantes et de l'eau, et font partie également de la flore cutanée normale de l'homme. Plusieurs espèces sont impliquées en pathologie humaines, dont les plus fréquentes sont : *Trichosporon asahii* ; *Trichosporon inkin* ; *Trichosporon cutaneum* et *Trichosporon ovoïdes*. Ces espèces deviennent pathogènes surtout en cas de mauvaises hygiènes, en présence d'humidité des cheveux, de chaleur et d'immunodépression.

III.4.3 Clinique

III.4.3.1 La Piedra blanche

C'est une infection bénigne des cheveux et des poils. Cliniquement elle se caractérise par la présence de nodules blanchâtres non coulissants et durs, disposés en chapelet le long des tiges pilaires, leur donnant ainsi un aspect pierreux d'où son nom. Ces nodules peuvent s'observer au niveau des cheveux, de la barbe, de la moustache, des poils axillaires et des poils pubiens. La piedra blanche des cheveux habituellement due à *Trichosporon ovoïde* est devenue rare dans les pays dont les conditions d'hygiène sont correctes. Cependant la piedra blanche des poils pubiens due à *Trichosporon inkin* est encore fréquemment rencontrée.

III.4.3.2 Trichosporonoses profondes

Ce sont des infections opportunistes qui surviennent chez les patients d'hématologie atteints de leucémie aigüe, profondément neutropéniques. Des cas ont été également rapportés chez les transplantés d'organes.

Trichosporon asahii est l'espèce la plus fréquemment en cause.

Les Trichosporonoses disséminées se manifestent par une fièvre résistante aux antibiotiques, associées à des lésions cutanées métastatiques (nodules purpuriques avec ulcération centrale)(figure 8).

Les Trichosporonoses localisées ont été décrites avec atteinte pulmonaire, plus rarement péritonéale, oculaire, cardiaque et cérébrale.[14]



Figure 8 : Lésions cutanées métastatiques chez un patient leucémique atteint de Trichosporonose disséminée.[14]

III.5 Rhodotoruloses

III.5.1 Agents causals

La *rhodotorula* est un genre de levures unicellulaires, appartenant à la division basidiomycota, produisant un pigment caroténoïde, qui donne aux colonies crèmeuses un aspect caractéristique.

Très répandus dans le milieu extérieur (sol, eau et plantes), isolées également chez l'homme (Peau, lumière intestinale).

III.5.2 Pouvoir pathogène

Seules *Rhodotorula mucilaginosa* et *Rhodotorula glutinis* sont reconnues comme opportunistes pathogènes chez l'homme.

En présence de facteurs favorisants (l'utilisation de cathéters veineux, notamment à long terme, la présence de VIH ou d'hémopathie maligne), ces levures peuvent causer des lésions localisées chez des sujets immunodéprimés comme chez les immunocompétents (endocardite, kératite, dermatite ou rarement méningite), ainsi que des fongémies chez les sujets immunodéprimés ou les patients en soins intensifs.[15]

III.6 Géotrichoses

III.6.1 Agents causals

Les géotrichoses sont des infections opportunistes dues à des levures filamenteuses du genre *Géotrichum*. Ces champignons cosmopolites et ubiquitaires sont très répandus dans la nature, saprophytes des plantes et de certains produits animaux comme le laitage.

Trois espèces sont impliquées en pathologie humaine, *Géotrichum candidum* commensal du tube digestif, *Géotrichum capitatum* et *Géotrichum clavatum* commensal du tube digestif et des voies aériennes.

III.6.2 Pouvoir pathogène

Le rôle pathogène de *Géotrichum* spp dans la survenue d'infections superficielles est encore très mal défini.

Dans le cadre des géotrichoses profondes on distingue :

- Les géotrichoses localisées (endocardites, méningites...) par inoculation à partir d'une source extérieure, généralement après un traumatisme.
- Les géotrichoses disséminées à *Géotrichum* spp sont observées chez les patients profondément immunodéprimés (hautement neutropéniques), avec des métastases secondaires (hépatique splénique, cérébrale), la mortalité est élevée (environ 60% des cas). [16,17]

IV Mycoses à champignons filamenteux

IV.1 Les Dermatophytoses

IV.1.1 Définition

Les Dermatophytoses représentent les mycoses cutanées les plus fréquentes, causées par des champignons microscopiques, filamenteux qui se reproduisent par spores, appartenant aux genres, *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton*. Une de leur principale caractéristique est leur kératinophilie, qui explique l'atteinte préférentielle de la couche cornée de l'épiderme ou la kératine des phanères (cheveux, poils, ongles).[18]

IV.1.2 Origine et modalités de contamination

Trois types de dermatophytes sont à l'origine de dermatophytoses :

- Les dermatophytes anthropophiles : la transmission directe ou indirecte se faisant toujours d'homme à homme. Ce sont : *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *T. rosaceum*, *T. tonsurans*, *T. soudanensae* et *T. schoenleinii*, ainsi qu'*Epidermophyton floccosum* et *Microsporum audouinii*.
- Les dermatophytes zoophiles : transmis à l'homme par les animaux. Ce sont : *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton ochraceum*.
- Les dermatophytes géophiles : transmis à l'homme par le sol, représentés principalement par *Microsporum gypseum*. [19]

IV.1.3 Physiopathologie

-Le dermatophyte pénètre dans l'épiderme à la faveur d'une excoriation cutanée parfois minime. De là, le champignon émet des filaments qui progressent de façon centrifuge dans l'épiderme et créent une lésion arrondie d'aspect érythémato-squameux avec bordure nette, nommé epidermatophytie circinée.

Les poils et les cheveux peuvent être attaqués par un dermatophyte, l'envahissement se faisant à partir de l'ostium folliculaire avec une propagation du mycélium descendant vers le bulbe.

Les cheveux envahis se cassent facilement, ce qui entraîne la chute des cheveux (teignes ou *tinea capitis*).

-Pour les ongles (onychomycose ou *tinea unguium*), le champignon pénètre le plus souvent par la partie distale et progresse vers la matrice par la tablette inférieure ; parfois, l'attaque se limite au niveau de la tablette superficielle de l'ongle (leuconychie).

IV.1.4 Manifestations clinique

IV.1.4.1 Epidermatophytie circinée

Anciennement « herpes circiné », il s'agit d'une affection fréquente, pouvant survenir à tout âge ; et peut se situer à n'importe quel point du corps (plis et zones pileuses exclus). Elle se présente sous forme de lésion circulaire de quelques millimètres à quelques centimètres de diamètre, avec une bordure nette très évocatrice, prurigineuse ou non qui va se propager progressivement de manière centrifuge (figure 9).

Ces lésions peuvent être isolées ou multiples en fonction de l'agent infectant. [20]



Figure 9 : Dermatophytie de la peau glabre : lésion circonscrite caractéristique avec bordure vésiculeuse active.[18]

IV.1.4.2 Les intertrigos

Les lésions siègent au niveau des plis, elles sont dues à *T. rubrum*, *T. interdigitale* et *E. floccosum*.

- au niveau des pieds et des espaces inter-orteils on utilise volontiers le terme de « pied d'athlète » (*Tinea pedis*) pour définir ces lésions, pouvant simuler un eczéma, c'est une affection très fréquente rencontrée surtout chez les sportifs (figure 10).
 - Au niveau des plis inguinaux ou cruraux (*Tinea cruris*) l'intertrigo, anciennement « eczéma marginé de Hébra », révèle en périphérie de la lésion une bordure inflammatoire nettement marquée, à ce niveau le prurit est habituellement habituel.
- [21]



Figure 10 : Intertrigo des espaces interdigitaux.
(Disponible sur : <http://www.mycology.adelaide.edu.au/>)

IV.1.4.3 Atteinte des cheveux ou de poils

❖ Les teignes tendantes

Elles touchent principalement l'enfant d'âge scolaire entre 4 et 10 ans, surtout les garçons où la guérison à la puberté est classique (figures 11-12).

On individualise deux formes cliniques :

- Les teignes tondantes sèches à grandes plaques d'alopécie, dues aux dermatophytes appartenant à des *Microsporum* (teignes microsporiques)
- Les teignes tondantes à petite plaques d'alopécie, elles sont en revanche dues à des trichophytons anthropophiles, on observe une cassure totale du cheveu.



Figure 11 : Teigne microsporique. [1]



Figure 12 : teigne trichophytique. [1]

❖ Les teignes suppurées

Sont dues surtout aux dermatophytes zoophiles (surtout *T.mentagrophytes*, *T.verrucosum*) ou tellurique (*M.gypseum*) se voient surtout chez l'enfant. Chez l'adulte le cuir chevelu est très rarement atteint, En revanche, les lésions au niveau de la barbe appelées sycosis et de la moustache sont habituelles.

Elles se présentent comme des placards ronds, très inflammatoires, l'évolution est spontanément régressive en quelques mois (figure 13).



Figure 13 : teigne inflammatoire.[1]

❖ La teigne favique

La teigne favique à *Trichophyton schoenleinii* est caractérisée au début par la formation d'une petite croûte jaunâtre friable, centrée par un cheveu « le godet favique », les godets peuvent ensuite fusionner donnant des éléments de plus grande taille : les croûtes faviques.

Dans le favus, contrairement aux autres teignes, il n'y a pas de guérison spontanée à la puberté, et l'alopecie cicatricielle qui en résulte est définitive (figure14). [22]



Figure 14 : Teigne favique.

(Disponible sur : <https://docplayer.fr/90099989-These-pour-le-diplome-d-etat-de-docteur-en-pharmacie.html>)

IV.1.4.4 Atteinte des ongles : onyxis

Les ongles des pieds sont les plus atteints par les dermatophytes. L'aspect le plus fréquemment rencontré est l'onychomycose disto-latérale, c'est-à-dire une atteinte du bord libre de l'ongle sous forme d'une lésion blanchâtre ou jaunâtre qui s'étend vers la matrice.

Les autres aspects cliniques sont les leuconychies superficielles, l'onychomycose proximale et l'onychomyco-dystrophie totale[21].

IV.2 Aspergilloses

IV.2.1 Définition

Les aspergilloses sont des affections fongiques provoquées par des champignons filamenteux, cosmopolites ubiquitaires et opportunistes. Et dont la physiopathologie et l'expression clinique sont principalement conditionnées par la réponse du système immunitaire de l'hôte au champignon ainsi par l'intensité des facteurs favorisants.

IV.2.2 Agents causals

Les *Aspergillus* sont des moisissures à filaments cloisonnés hyalins, près de 300 espèces composant ce genre, parmi lesquelles *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus souvent impliquée en pathologie humaine (80 % des cas).

D'autres espèces sont moins fréquemment observées comme : *A.flavus*, *A.nidulans*, *A.niger* et *A.versicolor*.

IV.2.3 Mode de contamination

La principale voie de pénétration dans l'organisme étant respiratoire (par inhalation de spores) ; l'appareil broncho-pulmonaire ainsi que les sinus sont les premiers atteints et concernés par la maladie respiratoire.

La contamination directe par dépôt de spores sur des plaies ou brûlures cutanées peut aboutir à des infections locales.

IV.2.4 Pouvoir pathogène

Ces champignons sont peu virulents mais extrêmement opportunistes, donc des caractères biologiques vont être à l'origine de leur pouvoir pathogène citons :

- La petite taille de spores ;
- La thermo tolérance ;
- Le tropisme vasculaire ;
- La sécrétion des toxines nécrosantes responsables de microlésions ;
- La production de mycotoxines responsables de manifestations allergiques ;
- La filamentation.

IV.2.5 Facteurs favorisants

- Facteurs locaux : perte de l'intégrité de l'épithélium cutané ou muqueux, notamment l'altération du tapis mucociliaire, cavité perforées.
- Facteurs généraux : agranulocytose, neutropénie, diminution de la capacité de phagocytose des macrophages alvéolaires et des PNN, primitives ou résultant d'immunosuppression iatrogène (immunosuppresseurs, corticoïdes...).[23]

IV.2.6 Clinique

IV.2.6.1 Aspergilloses de la voie respiratoire

➤ Aspergillome

L'aspergillome correspond à une prolifération de spores aspergillaires organisée en un feutrage dense au sein d'une cavité préformée (tuberculose, sarcoïdose, BPCO...) pulmonaire, bronchique ou pleurale.

L'aspergillome se présente typiquement comme une masse intracavitaire, mobile, des sommets surmontés d'un croissant gazeux périphérique c'est le « grelot aspergillaire ».

L'aspergillome reste le plus souvent asymptomatique, c'est la sévérité de la maladie sous-jacente qui fait le pronostic ; une hémoptysie massive, une mauvaise fonction respiratoire, et des aspergillomes multiples menacent le pronostic vital. [24]

➤ Aspergillose pulmonaire invasive

C'est la forme la plus grave, elle est responsable d'une morbidité importante chez certains patients immunodéprimés.

Les signes cliniques sont aspécifiques, d'une fièvre persistante chez un patient neutropénique depuis plus de 10 jours à une toux avec épisodes d'hémoptysies.

La TDM thoracique des lésions à type de nodule avec ou sans halo de verre dépoli, croissant gazeux, condensation ou micronodules centro lobulaires témoignant d'une atteinte des voies aériennes.

Une surinfection broncho-pulmonaire peut conduire à une nécrose parenchymateuse locale et donner un tableau d'aspergillose chronique nécrosante. [25]

➤ Aspergilloses immuno-allergiques

❖ Aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques

L'ABPA entre dans le groupe des affections secondaires à des réactions d'hypersensibilité envers la moisissure *Aspergillus fumigatus*, elle survient essentiellement chez l'asthmatique et les patients atteints de mucoviscidose.

L'évolution naturelle de cette pathologie comporte des exacerbations pouvant menacer le pronostic vital des patients, qui dépend directement du traitement précoce afin d'éviter la survenue de séquelles.[26]

❖ **Asthme aspergillaire**

Il s'agit d'un asthme sévère (sans infection fongique pulmonaire), symptomatique malgré de fortes doses de corticoïdes inhalés ou de bronchodilatateurs de longue durée d'action, avec une hyper sensibilité immédiate aspergillaire. [27]

❖ **Alvéolite aspergillaire**

Il s'agit d'une pneumopathie d'hypersensibilité spécifique à aspergillus, survient quelques heures après une exposition aux antigènes aspergillaires. Si l'exposition est répétée le risque est l'évolution vers une fibrose pulmonaire irréversible.[28]

IV.2.6.2 Aspergilloses extra-respiratoires

➤ **Formes superficielles**

- Les otomycoses, fréquemment dues à *A.niger* sont favorisées par des lésions préexistantes du conduit auditifs externe et par l'usage des corticoïdes locaux.
- Les aspergilloses oculaires sont le plus souvent primaire post traumatique il s'agit principalement de kératite ou de chorioretinite.
- Les aspergilloses cutanées sont rencontrées chez les grands brûlés, la peau peut être également le siège de métastases septiques au cours de l'aspergillose invasive.

➤ **Formes profondes**

Peuvent être soit localisées, soit disséminées ; d'origine exogène (poste chirurgicale) ou endogène (diffusion au cours d'une API).[24]

V Démarche diagnostique en mycologie

V.1 Définition générale

Le diagnostic mycologique demeure l'outil indispensable pour confirmer une infirmer une mycose ; c'est-à-dire la mise en évidence de l'agent pathogène responsable. Il est la conclusion d'un cheminement intellectuel qui conditionne la combinaison de 3 éléments :

- La bonne qualité du prélèvement.
- Expertise du spécialiste (biologiste, médecin, mycologue....).
- Le diagnostic doit être effectué à distance de toute application d'un antifongique (local ou général)[28].

V.2 Rôle du laboratoire dans le diagnostic des mycoses

Le laboratoire joue un rôle important dans la démarche diagnostic des infections fongiques qu'elles soient superficielles ou profondes.

V.2.1 Fiche de renseignement :

La fiche de renseignement doit comporter :

- L'identité du patient (nom, prénom et l'âge)
- Profession ;
- Notion de voyages antérieurs ;
- Contacts avec des animaux ;
- Statut immunitaire (IC, ID)
- Signes cliniques, paracliniques, biologiques, radiologiques ;
- Traitements ultérieurs ;
- Antécédents médicaux.

V.2.2 Prélèvement

La technique du prélèvement dépend de la présentation clinique de la lésion et du champignon recherché en tenant compte de son mode de pénétration ; les produits biologiques prélevés sont :

- Les mucosités (écouvillonnage de muqueuses) ;
- Le suintement des intertrigos, pus des pré-onyxis (écouvillonnage) ;
- Les squames (curette ou vaccinostyle) ;
- Cheveux, poils et duvet (pince à épiler, vaccinostyle) ;
- Ongles (découper la tablette unguéale jusqu'à la jonction ongle malade-ongle sain, ensuite gratter l'hyperkératose du lit de l'ongle à ce niveau (curette, ciseaux)) ;

- Pityriasis versicolor (faire un scotch test);
- LCR (ponction lombaire) ;
- Fragment tissulaire (biopsie, pièces opératoires).

V.2.3 Examen direct

Il est indispensable, il permet de rendre un résultat rapide au clinicien et donc la prise en charge.[29]

➤ **Etat frais** : l'état frais est une réalisation très simple sur les liquides biologiques, les échantillons de cheveux, squames ; il est indispensable, la lecture se fait entre lame et lamelle. Les éléments fongiques recherchés sont les blastopores, les pseudo-filaments et les filaments mycéliens.

▪ Etat frais simple (sans réactif) :

Pour les prélèvements liquides (muqueuse digestive, vaginale, crachat...) la lecture se fait à faible grossissement(objectif×10×40) voire à fort grossissement (10×100).

▪ Etat frais avec réactifs

-KOH (éclaircissant) et le Noir chlorazol (colorants) ces deux réactifs utilisés pour les prélèvements solides (squames, cheveux ou poils) ils améliorent la sensibilité de l'examen direct.

-Encre de chine : indispensable et obligatoire pour LCR. Elle permet de mettre en évidence la capsule des Cryptocoques (celle-ci apparaît blanche sur fond noir de la préparation).

- Bleu coton : colore les éléments fongiques en bleu, peut servir à l'examen microscopique des cultures.

-MGG : donne de bons résultats ; le cytoplasme des éléments fongiques est coloré en violet, la paroi reste blanche.

V.2.4 Mise en culture

Un examen direct négatif n'exclut pas la présence d'une mycose, d'où la nécessité de l'isolement et la culture des champignons, elle est réalisée de façon systématique en complétant l'examen direct. Elle permet la croissance plus ou moins sélective et l'isolement des colonies de levures ou de champignons filamenteux.

Le milieu Sabouraud est le milieu universel, le plus simple et qui convient pratiquement à tous les champignons responsables de mycoses.

Le milieu Sabouraud –chloramphénicol est utilisé pour inhiber la pousse des bactéries qui gênent l'isolement et l'identification.

Le milieu Sabouraud –chloramphénicol –actidione : l'actidione ou cycloheximide est un inhibiteur des moisissures saprophytes.

Dans quelques cas précis, on utilise d'autres milieux en complément du milieu Sabouraud :

Milieu Sabouraud +l'huile d'olive pour l'isolement de *Malassezia furfur*.

Les cultures sont incubées à 27C° pour les prélèvements superficiels et à 37C° pour les prélèvements profonds.

Les cultures doivent être examinées aux moins deux fois par semaine et il faut attendre une durée d'incubation de 4 semaines (certains dermatophytes prennent plus du temps pour pousser) avant de rendre un résultat négatif. [30]

V.2.5 Identification

L'identification du champignon incriminé dans la pathologie se fait en première intention par une simple déduction sur le milieu d'isolement et peut donc orienter le diagnostic vers une levure ou un champignon filamenteux.

L'identification repose sur certains nombre de critères :

- La vitesse de pousse (la positivité de la culture) qui varie selon le champignon : de 48h jusqu'aux 2à 3 semaines pour les levures et de 1 à4 semaines pour les dermatophytes ;
- Caractères microscopiques et macroscopiques des colonies ;
- Pousse sur l'actidione ;
- La température optimale de croissance ;
- Identification par l'étude des caractères physiologiques :

Différentes galeries d'identification sont commercialisées ; ces tests permettent de mettre en évidence la capacité que possède une levure placée en aérobiose (assimilation) =

Auxanogramme ou en anaérobiose (fermentation) = Zymogramme à utiliser le carbone de tel ou tel glucide pour sa croissance exemple **API Candida**®[31]

- Facteurs de risques et scores prédictifs :

Pour identifier les patients de réanimation à haut risque d'infection fongiques invasives à *Candida* et établir un diagnostic plus précoce, plusieurs méthodes ont été développées ; par exemple l'utilisation de score ou d'index ;

➤ **Index candida :**

La colonisation à *Candida* est un facteur de risque de candidose invasive, mais n'est pas synonyme d'infection. Les patients sont prélevés régulièrement pour rechercher la présence de *Candida* sur différents sites et l'index est défini par le rapport du nombre de sites colonisés sur le nombre de sites explorés (urines, prélèvement bronchique, liquide gastrique,...). Un rapport supérieur à 0,5 est considéré comme significatif

➤ **Le score candida**

Le score candida se calcule en additionnant les points associés aux facteurs de risques suivants :

- Nutrition parentérale totale : 1
- Colonisation multiple à *Candida* : 1
- Sepsis sévère : 2
- Chirurgie à l'admission : 1

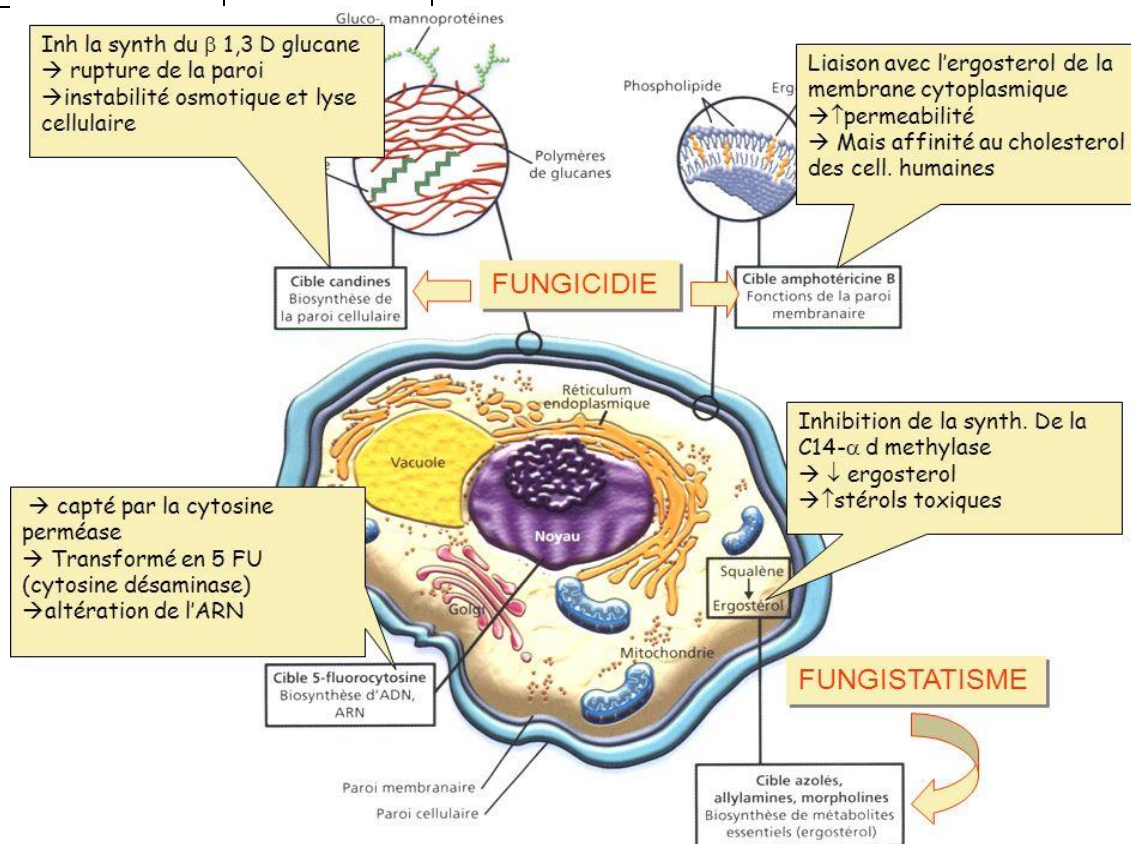
Un score supérieur à 2,5 a une sensibilité de 81 % et une spécificité de 74 % pour la survenue d'une infection invasive à *Candida*. [32]

VI Traitement antifongiques [33,34]

Les antifongiques sont des substances capables d'inhiber spécifiquement les différents champignons isolés en mycologie médicale. Ils se répartissent en deux catégories : les antifongiques naturels et les antifongiques de synthèse qui, eux-mêmes, se décomposent en antifongiques locaux et systémiques (tableau II).

Tableau II : Récapitulatif des mécanismes d'action des antifongiques et leurs cibles.

Antifongique	Cible	Mécanisme
Polyènes (amphotéricine B, Nystatine)	Polyènes de la paroi Fongique	Augmentation de la perméabilité membranaire par formation de complexes insolubles avec l'ergostérol, induisant la mort cellulaire par déplétion intracellulaire en potassium
Griséofulvine	Division nucléaire	Blocage du déroulement des mitoses des cellules fongiques en métaphase (interférence probable avec la synthèse des microtubules), de la synthèse des acides nucléiques et une inhibition de la synthèse des composants de la paroi (chitine).
5-fluorocytosine	Synthèse des acides Nucléiques	Perturbation de la synthèse protéique par substitution de la 5FC à l'uracile dans l'ARN fongique. Inhibition de la thymidylate synthétase générant une altération de la synthèse de l'ADN fongique.
Allylamines (terbinafine)	Epoxydase	Inhibition d'une enzyme entrant dans la synthèse de l'ergostérol.
Azolés	Cytochrome P450	Inhibition de la 14 α -déméthylase (CYP51), enzyme du cytochrome P450 des cellules fongiques impliquée dans la synthèse de l'ergostérol. Fragilisation de la membrane fongique par accumulation d'ergostérols toxiques.
Echinocandines (caspofungine)	Paroi fongique	Inhibition de la β (1-3)D glucanesynthétase, impliquée dans la synthèse du β (1-3)D glucane, élément majeur de la paroi d'un grand nombre de champignons.

**Figure 15:** Cibles de différentes molécules antifongiques.(Disponible sur : https://images.slideplayer.fr/33/10299753/slides/slide_10.jpg)

CHAPITRE II

Le Fluconazole

I. Le fluconazole

Le fluconazole fait partie d'un groupe de médicaments désignés sous le nom d'antifongique, apparenté à la famille des triazolés. Il devient utilisable en clinique depuis 1990[35].

II. Mécanisme d'action du fluconazole

Les membranes plasmiques des champignons sont principalement composées d'ergostérol, sa biosynthèse comporte des étapes spécifiques, qui sont donc des cibles de choix pour la conception de molécules antifongiques. [36]

Le fluconazole est un fongistatique, il a pour cible cette voie. Il inhibe spécifiquement lanostérol-14 α -déméthylase à cytochrome P450 dépendante, l'enzyme clé de la biosynthèse de l'ergostérol, codée par le gène ERG11 pour les levures et Cyp51 pour les filamenteux.

L'inhibition se fait par la liaison covalente de l'atome d'azote libre du cycle triazolé de fluconazole à l'atome de fer de l'hème de l'enzyme. Cette liaison irréversible empêche l'activation de l'oxygène et par conséquent la déméthylation du lanostérol, et entraîne une accumulation des dérivés toxiques de 14- α -méthyl-stérols, associée à une déplétion en ergostérol normal et une augmentation de la perméabilité membranaire et donc l'arrêt de la croissance cellulaire. [37, 38]

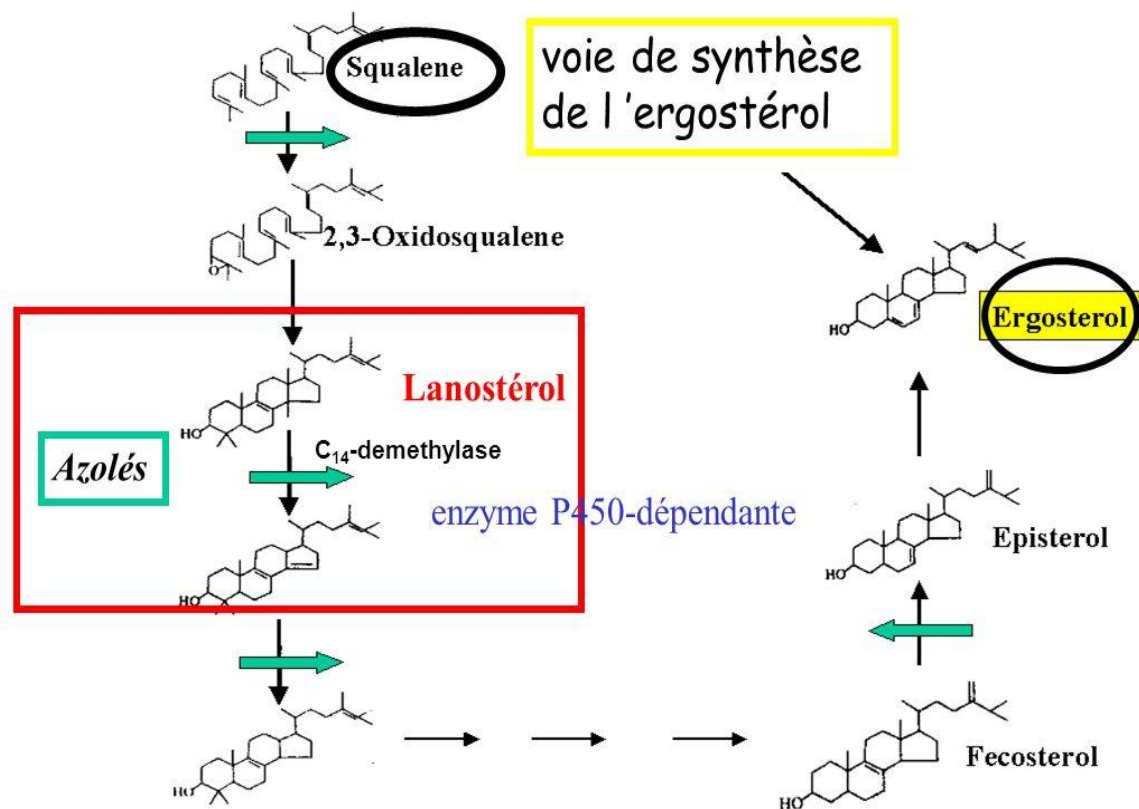


Figure16 : schéma représentatif de la voie de biosynthèse de l'ergostérol et du site d'action du Fluconazole.[38]

III. Les propriétés pharmacocinétiques

- Le fluconazole est un antimycosique utilisé par voie systémique. Ses propriétés pharmacocinétiques ne sont pas affectées par la voie d'administration, intraveineuse ou orale.
- C'est une molécule polaire et hydrosoluble et représente une biodisponibilité équivalente pour les formes orales ou intraveineuses. [39]

III.1 Absorption :

- Après administration orale, le fluconazole est bien absorbé et la biodisponibilité systémique représente plus de 90 % des taux atteints après l'administration intraveineuse.

- Presque tout le médicament administré passe dans la circulation sanguine, il n'y a pas effet de premier passage hépatique. De plus, il n'est pas nécessaire de modifier la posologie quand on passe de la voie orale à la voie intraveineuse et vice versa. [36]

III.2 Distribution :

- Le volume de distribution apparent de fluconazole est proche du volume d'eau corporelle totale et sa liaison aux protéines plasmatiques est faible (11-12 %).
- Le fluconazole pénètre bien dans tous les liquides corporels (LCR, salive, l'expectoration, les sécrétions vaginales, le lait maternel). Il atteint facilement les ongles et les cheveux. [40]

III.3 Biotransformation et élimination :

- Le fluconazole n'est que faiblement métabolisé, environ 80 % de la dose administrée étant éliminés dans l'urine sous forme inchangée.
- La demi-vie d'élimination plasmatique du fluconazole est d'environ 30 heures. [41]

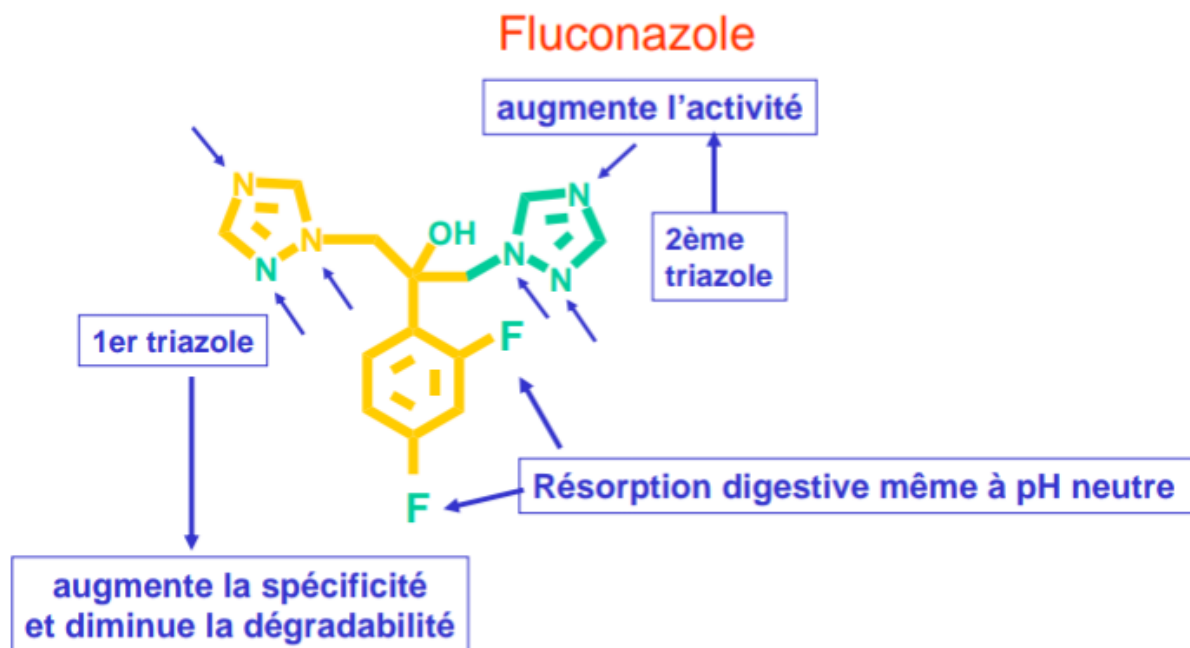


Figure17 : relation structure –activité (fluconazole). [37]

IV. Interactions médicamenteuses :

-Le fluconazole n'est pas encore un antifongique parfait puisque il présente des interactions médicamenteuses non anodines. Il est connu pour son effet inhibiteur des isoenzymes. Par conséquent, ces associations doivent être administrées avec prudence et le patient doit être étroitement surveillé. [42]

- Les interactions les plus importantes d'un point de vue clinique sont les médicaments susceptibles d'allonger le QT (cisapride, astemizole, pimozide, halofantrine, terfénadine, quinidine et érythromycine), les anti-infectieux de type inhibiteurs de protéases, les alcaloïdes de l'ergot de seigle, les immunosuppresseurs et les statines. Les puissants inducteurs enzymatiques de cyto3A4 comme la rifampicine, la carbamazépine, le millepertuis et la phénytoïne doivent être évités dans la mesure du possible.[43]

V. Fluconazole, grossesse et l'allaitement

- l'administration de fluconazole chez les femmes au cours du premier trimestre peut augmenter le risque d'avortement spontané, des d'anomalies congénitales multiples.
- Le traitement prolongé avec le fluconazole doit être réservée, au cours de la grossesse, aux cas mettant potentiellement en jeu le pronostic vital. En cas échéant la dose maximale est 150mg en prise unique.
- L'allaitement est déconseillé après administration répétée ou de fortes doses de fluconazole. [44, 45]

VI. Le spectre d'activité du fluconazole :

-Le fluconazole semble plus efficace in vivo qu'in vitro contre la plupart des champignons qu'il ait été administré par la voie orale ou intraveineuse. Il s'est montré efficace contre les espèces fongiques du genre *Cryptococcus* et du genre de *Candida* (dont *C. albicans*, *C. paprasilosis*, *C. tropicalis*, *C.kefyr*), alors que *C.glabrata* présente une sensibilité dose dépendante, tandis que *C.krusei* est naturellement résistante. Pour cette raison il est prescrit pour le traitement ou la prévention des mycoses induites par ces espèces. [36, 38]

-Le fluconazole s'est également révélé moins efficace sur les dermatophytes(le genre *Microsporum* et *Trichophyton*) et les moisissures du genre *Aspergillus*.[40, 46]

VII. La résistance au fluconazole chez les espèces fongiques :

En Mycologie médicale et vétérinaire, on distingue deux types de résistance, la résistance intrinsèque, naturellement présente chez toutes les souches, et la résistance acquise qui résulte de modifications génétiques constitutionnelles, sous l'effet de l'application ou l'exposition répétée d'un antifongique (médication ou l'environnement) .Elle peut potentiellement être observée chez n'importe quelle espèce fongique et vis-à-vis de n'importe quelle molécule antifongique. [47]

VII.1 La résistance naturelle : *C.krusei*

Cette levure est connue pour une résistance intrinsèque au fluconazole, tant in vitro qu'in vivo. Elle est résistante à l'inhibition 16 à 46 fois plus qu'une souche sensible. Sa résistance au fluconazole est due à une différence qualitative de la 14 α déméthylase, ce qui la rend moins sensible à l'activité antifongique de fluconazole. Cependant, la surproduction de l'enzyme cible, l'accumulation de fluconazole, la surexpression des pompes à efflux ne sont pas des mécanismes incriminés dans la résistance de *C.krusei* au fluconazole.[48, 49]

VII.2 La résistance acquise :

-*Candida* sp : la résistance au fluconazole a été développée chez les espèces de *C.albicans*, et non *albicans* (*C.glabrata*, *C.tropicalis*, *C.paprasilosis*), en représentant des CMI élevées au fluconazole. Les mécanismes de résistance développés pour ces levures peuvent se produire seuls ou simultanément dans un seul isolat et peuvent également engendrer des effets additifs ou conduire à une résistance croisée entre les médicaments azolés.

VII.2.1 La surexpression de cible :

Dans cette situation, le fluconazole n'est pas en quantité suffisante pour inhiber totalement la conversion du lanostérol en stérol 14- α déméthylé, ce qui dilue son activité et entraîne une résistance. [37]

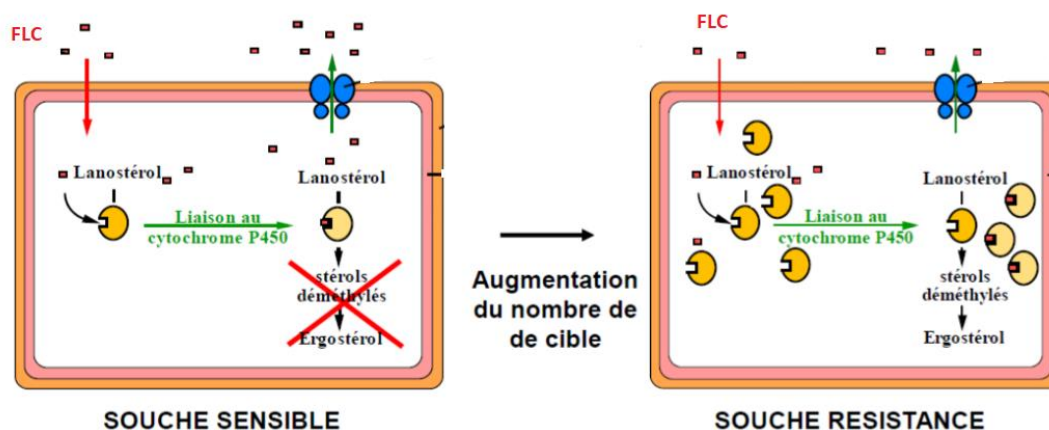


Figure18 : représentation du mécanisme de la surproduction de la cible chez *Candida* sp

(Sensible/ résistante). [37]

VII.2.2 L'altération de cible

Elle rend la liaison du fluconazole à sa cible moins efficace et par conséquent la diminution de l'affinité. [50]

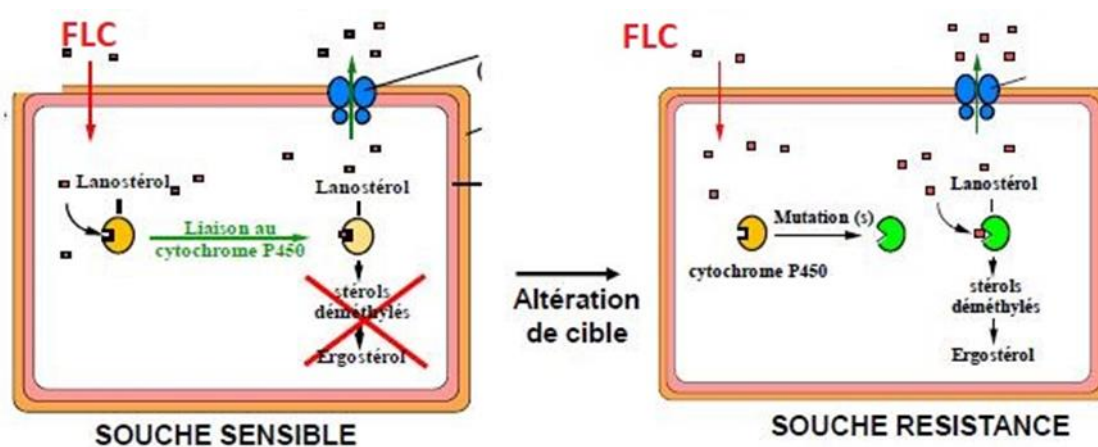


Figure19 : représentation du mécanisme d'altération de cible chez *Candida* sp

(sensible/résistante). [50]

VII.2 .3 L'efflux accru de drogue

C'est le mécanisme le plus fréquemment impliqué, il se traduit par une incapacité du médicament à s'accumuler dans les milieux intracellulaires, et donc l'absence de l'effet de fluconazole sur sa cible, ce qui entraînant une résistance.[51, 52]

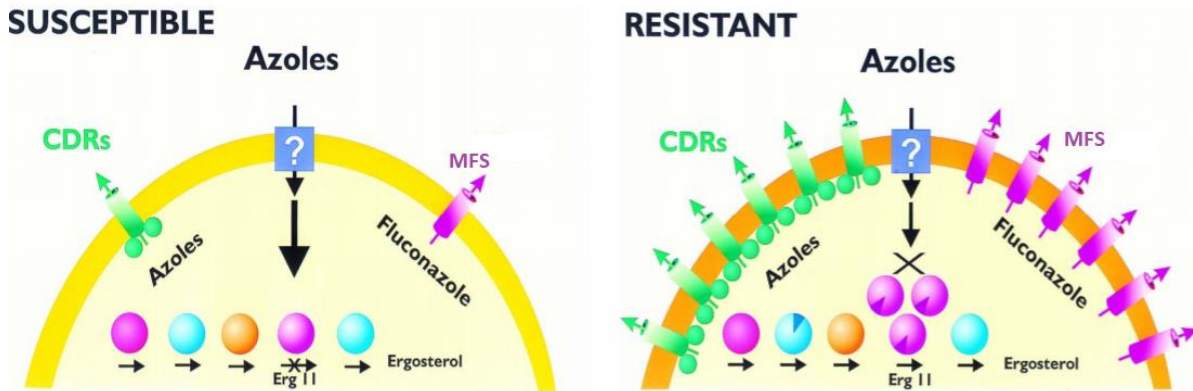


Figure20 : l'expression des pompes à efflux (type MFS, CDR) sur la membrane cellulaire des deux souches du *Candida* sp (sensible/ résistante). [53]

VII.2 .4 L'altérations dans la biosynthèse des stérols :

La dérivation des voies de la biosynthèse des stérols peuvent également se développer et entraîner une résistance au fluconazole. [38]

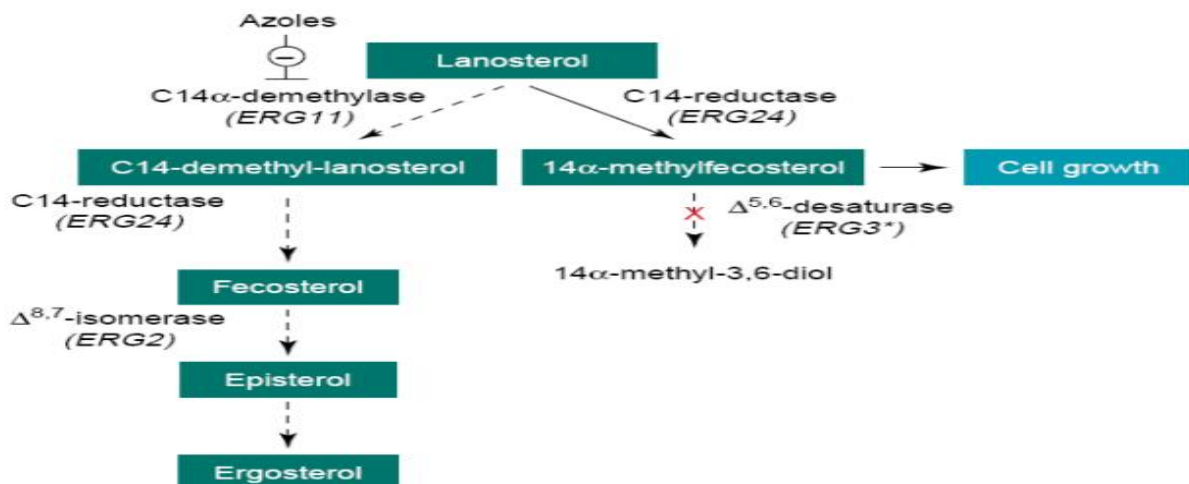


Figure21 : représentation schématique de la déviation de la voie de biosynthèse en présence d'une perte de fonctionnalité de la C5 désaturase chez *Candida* sp. [38]

VII.2 .5 Aneuploïdie et autres anomalies chromosomiques

Des mécanismes supplémentaires de résistance au fluconazole impliquant le gain de l'isochromosome chr5. [54]

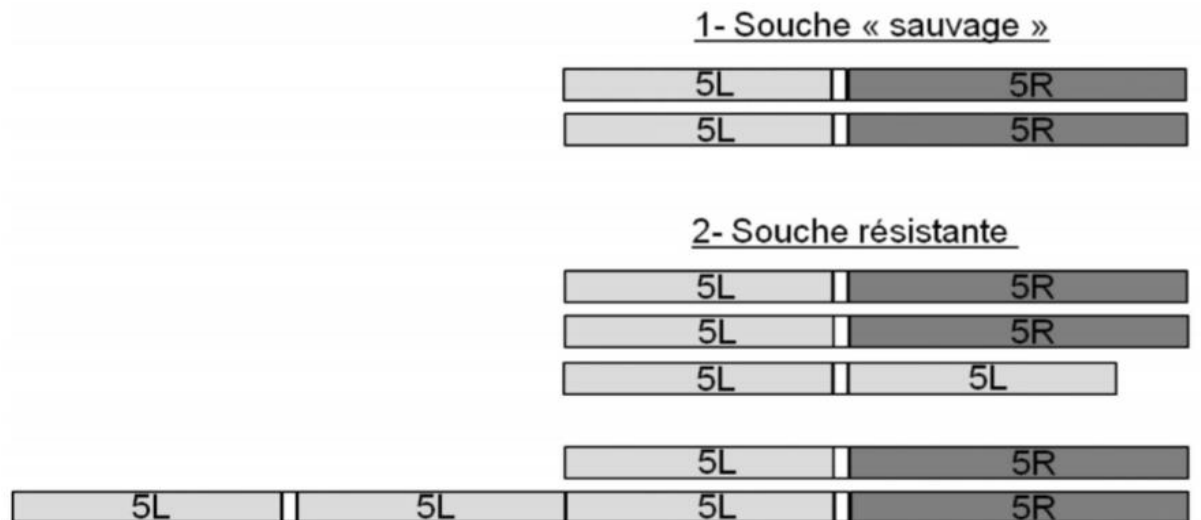


Figure22 : représentation schématique de l'organisation de l'isochromosome i (5L) chez *C.albicans*. [55]

VII.2 .6.La formation de biofilm :

La résistance mécanique aux antifongiques par la synthèse de biofilms est une autre source émergente de la résistance. Le biofilm réduit efficacement la concentration du médicament par formation d'une matrice de B-glucane qui freine la diffusion de l'antifongique propre à l'espèce *Candida* .[56]

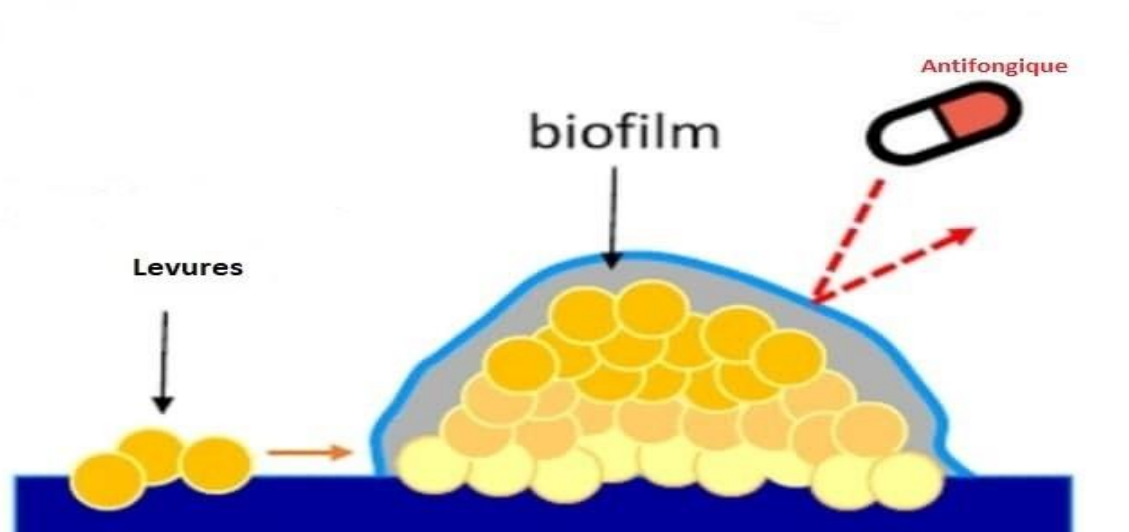


Figure23 : représentation de l'implication du biofilm à la résistance à l'antifongique.[57]

-*Aspergillus fumigatus* :

L'émergence de la résistance d'*A.fumigatus* aux antifongiques est clairement identifiée vis-à-vis le fluconazole. Le traitement au long cours par des azolés exerce une pression de sélection qui aboutit à l'émergence d'isolats résistants chez les patients. En revanche, il existe une autre voie d'acquisition de la résistance, est la pression de sélection exercée par des composés de structure triazolée (teboconazole, epoxiconazole, bromuconazole) utilisés comme fongicides en agriculture. Ces fongicides ont le même mécanisme d'action de fluconazole. Ce sont des inhibiteurs de lanostérol-14 α -déméthylase, ce qui confère une résistance croisée fongicides /azolés. [58]

Cette résistance est associée à :

- Une altération de la cible CYP51A, c'est le mécanisme le plus courant.
- Une apparition de souche résistante TR 34/Leu98His, caractérisée par une diminution de l'affinité et associée à une surexpression du gène CYP51A.
- La duplication en tandem de 46pb dans le promoteur aboutit à une souche résistante du type TR46 Tyr121phe/Thr289Ala. [59]

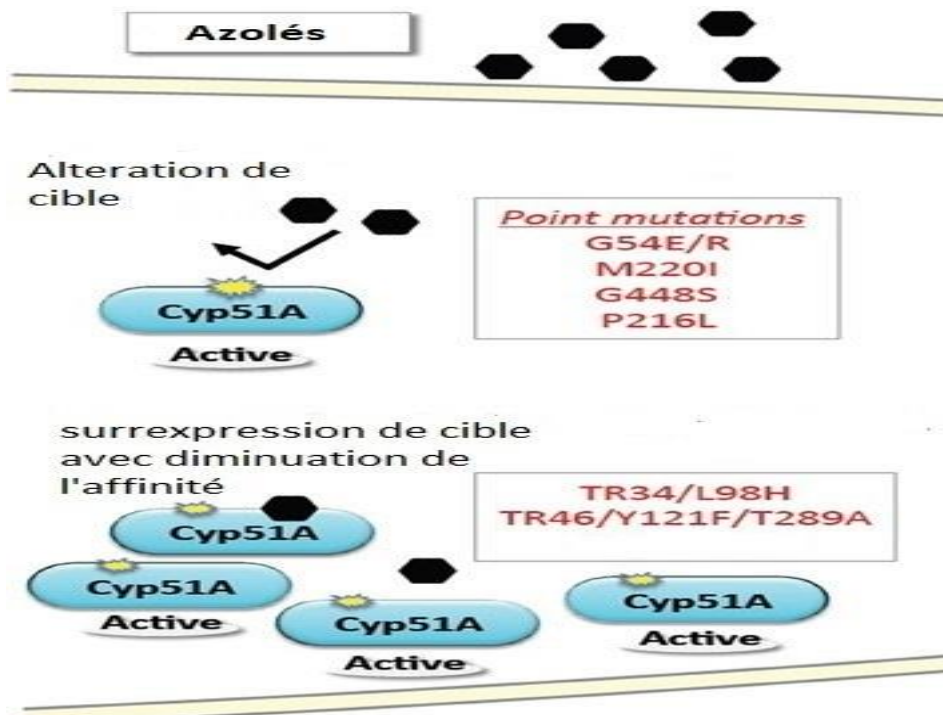


Figure24 : les mécanismes de résistance du genre *Aspergillus*. [60]

-Les dermatophytes :

Les dermatophytes comme *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, et *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum* sont fréquemment associées à des rechutes après l'interruption du traitement antifongique. La résistance des dermatophytes aux agents inhibiteurs est généralement provient de l'utilisation chroniques de ces agents. Elle implique la modification de l'enzyme cible, la surexpression de transporteurs ABC et de protéines liées au stress. [60, 61]

VIII Recommandation contre l'émergence de la résistance

Suivre les tendances en matière de résistance aux antifongiques dans le cadre du programme sur les infections émergentes en menant une surveillance multicentrique, des recommandations mondiales ont été mise en point :

- Résumer les schémas thérapeutiques des antifongiques dans différents établissements sanitaires afin d'optimiser une meilleure utilisation appropriée des antifongiques (prescription, durée, dose ...etc.).
- le médecin, le pharmacien, autres personnels hospitaliers ainsi que les patients peuvent participer à ce programme de lutte contre l'émergence de la résistance aux antifongiques par le respect des mesures d'hygiène hospitalière dans le but de prévention des infections nosocomiales.
- Utiliser le séquençage génétique et développer de nouveaux tests de laboratoire pour identifier et comprendre les mutations spécifiques associées à la résistance aux antifongiques.[63]

CHAPITRE III

La caractérisation physico- chimique

Le control qualité d'un produit pharmaceutique permet de vérifier la conformité de ce dernier par rapport à des spécifications ou exigences préétablies.

Afin d'assurer le contrôle physicochimique de la matière première, particulièrement d'un principe actif, plusieurs essais sont exigés par la pharmacopée européenne.

Les essais physicochimiques sont multiples en raison de l'hétérogénéité des produits pharmaceutiques. A l'issu de ceux-ci, on doit :

- Connaitre les caractères organoleptiques ;
- Identifier la molécule présente dans le produit ;
- Déterminer le dosage de cette molécule ;

I. Caractères organoleptiques

Tout contrôle de matière première doit débiter par une reconnaissance de la substance, c'est –à-dire par l'observation de ses caractères organoleptiques, il s'agit d'une première approche qui peut être très pertinente en cas d'erreur de produit ou d'anomalie grossière, le contrôle organoleptique est un examen macroscopique concernant essentiellement l'aspect et la couleur.

L'aspect : sera déterminé en examinant l'homogénéité de la poudre et son état de cristallisation.

La couleur : cet examen est nécessaire, en effet certain produits altérés peuvent être de couleur différente. [64]

II Identification du principe actif

Le but de ce test est de s'assurer que la matière première contient la substance active spécifiée par le fabricant. L'identification se fait par des méthodes spécifiques au PA à identifier.[65]

III. Dosage du principe actif

Le test du dosage du PA permet de s'assurer que sa concentration (teneur) se trouve dans les limites exigées par les pharmacopées. [66]

IV. Recherche des impuretés

Cet essai consiste à rechercher les substances apparentées et les produits de dégradation du PA ainsi que les différents types d'impuretés pouvant contaminer le médicament.

Substances apparentées au PA : proviennent respectivement des étapes de synthèse du PA, ils sont considérés comme des impuretés qui peuvent avoir des effets toxiques sur le patient.[67]

V. Techniques utilisées pour la caractérisation physicochimique

V.1. La spectrophotométrie infrarouge

L'infrarouge analytique regroupe plusieurs méthodes d'identification et de dosage basées sur l'absorption et la réflexion, par l'échantillon, des radiations électromagnétiques comprises entre 1 et 50mm. Cette bande spectrale est divisée en proche infrarouge (de 1 à 2,5 um) et en moyen infrarouge (de 2,5 à 50 um). Ce dernier est le plus utilisé pour récolter des informations structurales des composés analysés. De ce fait, il est utilisé pour l'identification des molécules organiques dont il permet de garder une empreinte digitale. Les vibrations des liaisons chimiques, spécifiques des groupements chimiques, permettent l'obtention de spectres portant l'information voulue sur la composition des substances chimiques analysées.[64]

V.2. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) est une technique de séparation analytique des molécules présentes dans un mélange, elle permet la séparation d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.[65]

V.3. Potentiométrie

Au cours d'un titrage potentiométrique le point de fin de titrage est déterminé suivant la variation de la différence de potentiel mesurée entre 2 électrodes (une électrode indicatrice et une électrode de référence ou 2 électrodes indicatrices) plongeant dans la solution à examiner, en fonction de la quantité de réactif titrant ajoutée.

La mesure du potentiel est habituellement effectuée en maintenant le courant nul ou pratiquement nul.[68]

V.4. Méthodes volumétriques

Bien qu'elles soient des techniques de paille, elle reste d'un usage courant pour le dosage des principes actifs pharmaceutiques. Ces méthodes reposent sur des mécanismes réactionnels très variés, les réactions les plus couramment rencontrées sont les équilibres acido-basiques en milieux aqueux et non aqueux et ce, en raison de la nature acide ou basique d'un grand nombre de principes actifs (exemple des alcaloïdes correspondants aux bases organiques dosées par des solutions d'acides). [68]

PARTIE PRATIQUE

Objectifs de l'étude

Objectifs principaux

- Control qualité d'une matière première pharmaceutique (fluconazole) ;
- Statuer sur la conformité du fluconazole en vue de son utilisation dans les études de sensibilité ;
- Réaliser des essais de sensibilité de différentes espèces fongiques diagnostiquées au niveau du laboratoire de Parasitologie-Mycologie médicales du CHU de Tizi-Ouzou unité NEDDIR Mohammed, vis-à-vis du fluconazole.

Objectifs secondaires

- Identification d'une matière première ;
- Réalisation d'un dosage acido-basique en milieu anhydre et son application au control qualité d'une substance ;
- Utilisation d'une monographie de la pharmacopée européenne et évaluation de la qualité de la matière
- Isolements et identification des espèces fongiques.

Type d'étude :

Il s'agit d'une étude prospective à visée la caractérisation physicochimique et essais d'efficacité sur différentes espèces fongiques.

Lieu de l'étude :

Cette étude a été réalisée au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie médicales du CHU TIZI-OUZOU, ainsi qu'au niveau de laboratoire de chimie analytique de la faculté de médecine et service de toxicologie du CHU Tizi Ouzou.

Durée de l'étude :

Durant la période de 7 mois allant du mois de décembre 2018 au mois de juin 2019.

Population étudiée :

Patients adressés au niveau de laboratoire de Parasitologie-Mycologie.

- Critères d'inclusion :

Patients présentant des lésions susceptibles d'être diagnostiquées comme étant des mycoses et qui ne sont pas sous traitement.

- Critères de non inclusion :
Patients ayant pris un traitement antifongique.

CHAPITRE I

Caractérisation

Physico-chimique du

fluconazole

La caractérisation physicochimique la matière première du fluconazole a pour objet de démontrer sa conformité par rapport aux critères d'acceptation définis dans la pharmacopée européenne en vue de son utilisation ultérieure dans les essais de sensibilités aux différentes souches fongiques.

La présente partie concerne l'identification de la matière première par spectrophotométrie d'absorption moléculaire dans l'infrarouge et le dosage de la substance active par protométrie en milieu non aqueux.

I. Matériel et méthodes

La caractérisation physico-chimique de la matière première de fluconazole a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie analytique du département de pharmacie de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou ainsi qu'au niveau du service de toxicologie du CHU Tizi Ouzou.

I.1. Matériel

I.1.1. Equipement :

A. Spectrophotomètre infrarouge : L'identification du principe actif de Fluconazole a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge de marque Perkin Elmer connecté à un système informatique pour l'acquisition des données.

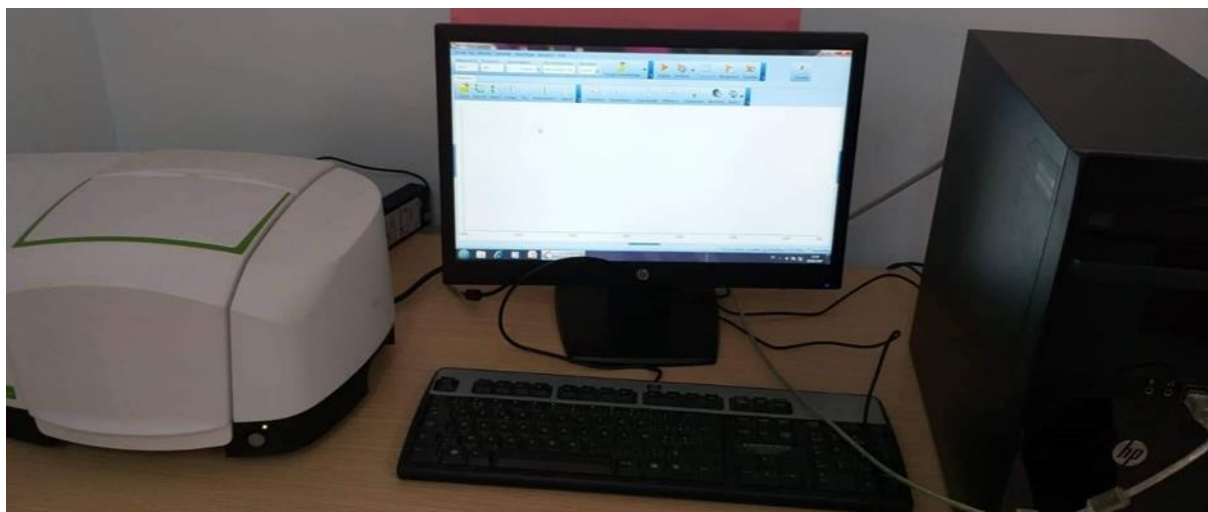


Figure 25 : Spectrophotomètre Infrarouge (Perkin Elmer, Spectrum Two FT-IR spectrometer)

- B. Balance de précision de marque KERN : Précision = 10⁻⁵ g**
- C. Etuve Memmert**
- D. Purificateur d'eau pure et ultra pure – Humain corporation.**

I.1.2. Verrerie et consommable du laboratoire

- Fioles jaugées de 100, 250 et 1000 mL.
- Bêchers
- Erlen meyer de 300 mL
- Spatule
- Eprouvette graduée en verre de 10 mL
- Burette en verre graduée de 25ml (précision = 0,1 ml)
- Pipette jaugée de 5ml

I.1.3. Réactifs et produits chimiques

- Matière première : fluconazole
- Bromure de potassium
- Eau purifié
- Acide acétique glacial
- Anhydride acétique
- Acide perchlorique
- Violet cristal : indicateur coloré

I.2 Méthodes

I.2.1 Aspect

L'aspect de la poudre de fluconazole est estimé visuellement en comparaison aux spécifications décrites dans la monographie du fluconazole inscrite à la pharmacopée européenne 10^{ème} édition définit comme suit ;

« Poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, hygroscopique »

I.2. 2 Identification par IR

La méthode de préparation de la pastille en vue de l'identification par spectrophotométrie infrarouge est décrite dans la pharmacopée européenne. Une masse d'environ 10 mg de la matière première du fluconazole est bien mélangée avec 300 – 400 mg du KBr. Après un fine broyage, la poudre est placée dans le dispositif de préparation de la pastille.

La pastille est ensuite placée dans un port échantillon (coupelle) pour la mesure, un spectre IR du fluconazole est enregistré par le system d'acquisition des données.



Figure 26 : Préparation des pastilles du principe actif fluconazole (A : KBr, B : moule, C : PA de FLC, D, E : mortier et pilon)

I.2.3. Perte à la dessiccation :

Le test de perte à la dessiccation consiste à dessécher une prise d'essai connue de la matière première à 105° C jusqu'à l'obtention d'une masse constante.

Le % de perte à la dessiccation est donné par la formule suivante ;

$$\% \text{ Perte à la dessiccation} = \frac{\text{Masse évaporée (en mg)}}{\text{Masse de la matière première (en mg)}} \times 100$$

Norme : la perte à la dessiccation doit être < 0,5%

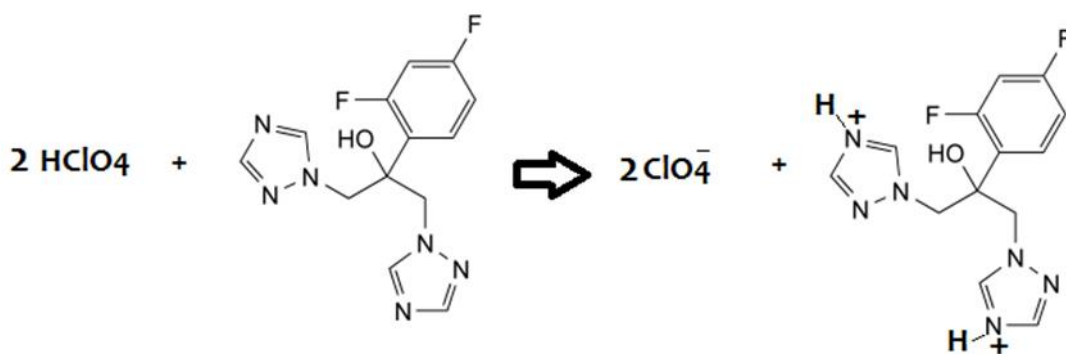
I.2.4. Dosage volumétrique : Détermination de la pureté du fluconazole

I.2.4.1. Principe du dosage

Le dosage du fluconazole est fait par une méthode acido-basique en milieu non aqueux, la détermination du point d'équivalence préconisée est la potentiométrie. En raison de la non disponibilité de l'automate convié à cet effet, une méthode par les indicateurs colorés (violet cristallisé) est adaptée.

I.2.4.2. Réactions mises en jeu

S'agissant d'une réaction de neutralisation acido-basique, le fluconazole reçoit par son doublet libre de l'azote accepte le proton libéré par l'acide e perchlorique.



I.2.4.3. Formule de calcul de la teneur

A partir de la correspondance fournie par la pharmacopée européenne, une formule de calcul de la teneur en principe actif est établie comme suit ;

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 15,32 mg de C₁₃H₁₂F₂N₆O

V ml d'acide perchlorique C M correspond à 153,2 C*V mg de C₁₃H₁₂F₂N₆O

$$Teneur (\%) = \frac{153,2 \times C \times V}{Pe(100 - H)} \times 10^4$$

Avec :

- C : Concentration de la solution titrée de l'acide perchlorique en mole/litre.
- V : Volume d'acide perchlorique consommé dans le dosage en ml.

- Pe : Prise d'essai du fluconazole matière première en mg.
- H : Perte à la dessiccation de la matière première en %.

Norme : la teneur doit être comprise entre 99,0% et 101,0%

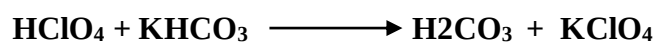
I.2.4.4. Préparation des solutions :

Solution d'acide perchlorique 0,1 M : préparée à partir d'une solution commerciale portant les indications suivantes : Pureté massique 70 - 72% (moyenne de 71%), densité = 1,7 et masse molaire 100,46 g/mole.

Un volume de 8,5 ml de la solution commerciale est dilué dans 900 ml et 30 ml d'anhydride acétique ayant pour rôle d'éliminer par hydrolyse les traces d'eau après ajout au trait de jauge on laisse reposer pendant 24Heures et on détermine le titre par un étalon basique en volumétrie.

Détermination du titre de la solution d'acide perchlorique 0,1 M : le titre de la solution d'acide perchlorique est déterminé par rapport au bicarbonate de potassium (KHCO₃) par une méthode acido-basique en milieu non aqueux.

La réaction mise en jeu est définie comme suit ;



La détermination du point d'équivalence se fait par méthode des indicateurs colorés. Le violet cristal en milieu acétique vire du violet au vert.

I.2.4.5. Protocole du dosage :

Une prise de 125 mg est introduite dans un erlen meyer puis solubilisée par 60 ml d'acide acétique. Le dosage se fait par la solution titrée d'acide perchlorique mis dans la burette en présence de 2-3 gouttes de la solution de violet cristal. Au virage de l'indicateur coloré du violet au vert, on note le volume du point d'équivalence (Veq). La figure ci-dessous illustre le montage de la technique.



Figure 27 : titrage volumétrique

II. Résultats et discussion

II 1. Aspect :

Résultats : la poudre objet d'étude se présente sous forme d'une poudre blanche cristalline.

Discussion : Cet aspect est conforme à celui décrit par la pharmacopée européenne.

II.2. Identification par spectrométrie infrarouge

Résultats : Les spectres infrarouges obtenus pour l'échantillon est présenté dans la figure 29 ci-dessous, ce spectre est comparé au spectre de référence fourni par la pharmacopée japonaise en vigueur (XVIIème édition)

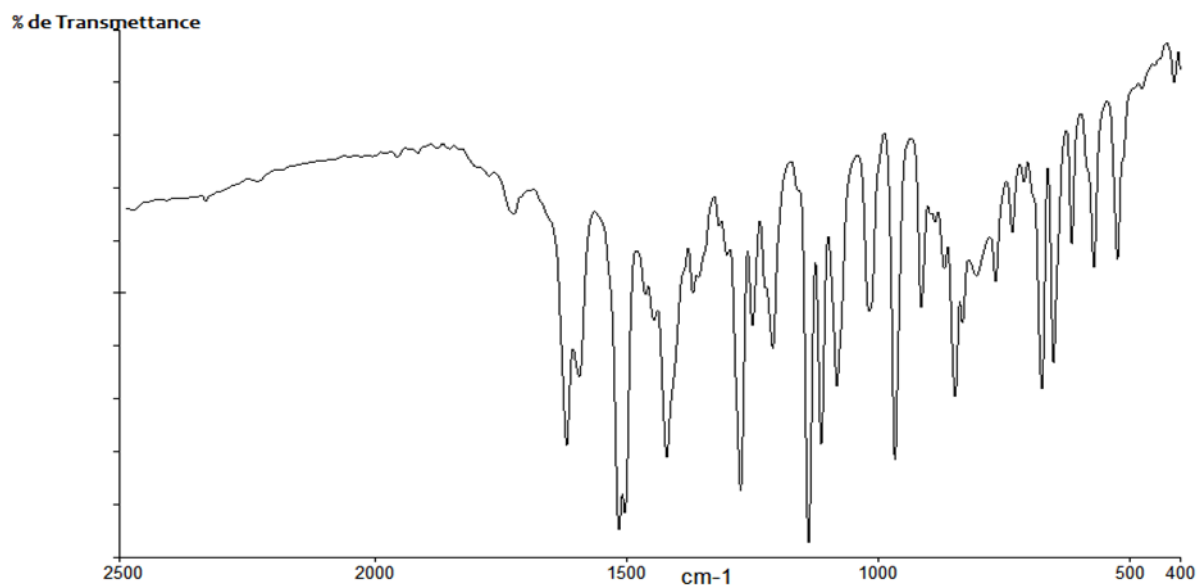


figure 28 : Spectre infrarouge du fluconazole matière première

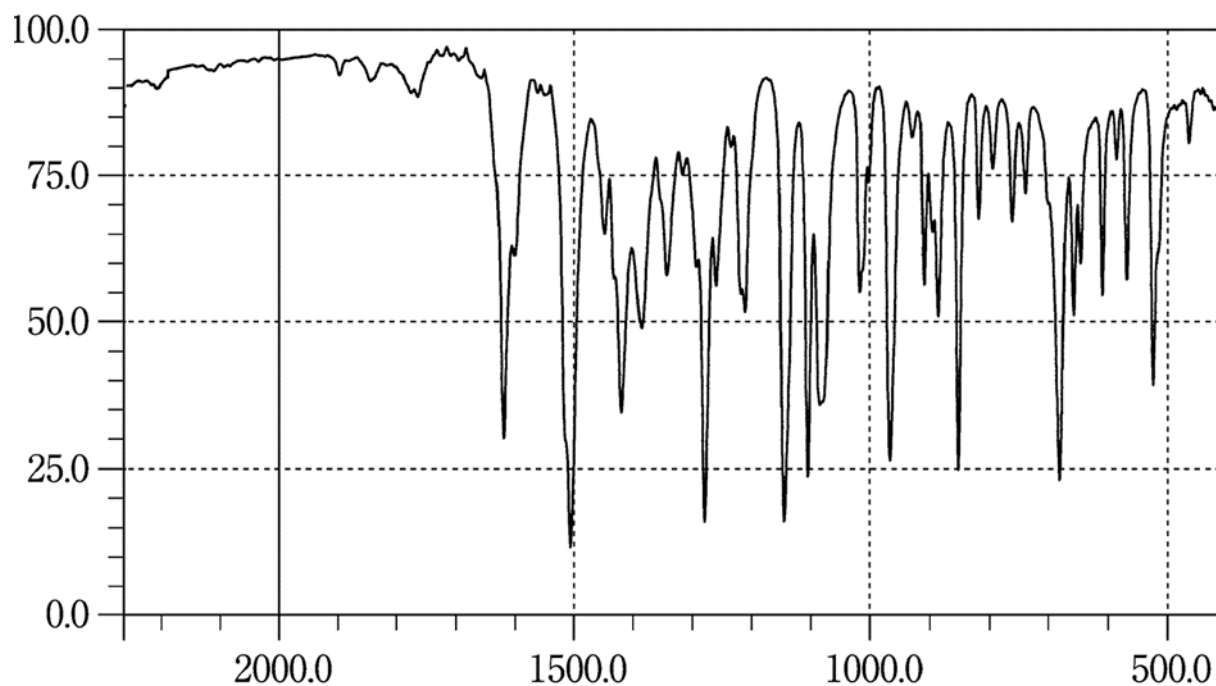


Figure 29 : Spectre de références du Fluconazole (pharmacopée japonaise)

Discussion : les bandes d'absorption observées dans les spectres de références sont de même observées dans le spectre du principe actif objet d'étude. Les deux spectres ont la même allure notamment la présence de bandes fines entre 1500 et 500 cm-1 correspondant au cycle aromatique.

II.3. Perte à la dessiccation

– Résultats

La masse de ma matière première pesée (disponible) = 273 mg

La masse après le test = 264,8 mg

La perte à la dessiccation = $100 \times (273 - 264,8) / 273 = 3,0\%$

– Discussion

La valeur de la perte à la dessiccation est supérieure à la norme fixée par la pharmacopée européenne du fait que la matière première a été conservée dans le réfrigérateur en contact de l'humidité, cette valeur sera prise en compte lors du calcul de la teneur de la matière première.

II.4. Détermination de la pureté du fluconazole matière première

II.4.1. Vérification du titre de la solution de l'acide perchlorique

- Concentration de la solution de KHCO_3 = 2g/200 ml soit 0,1 Mole/litre
- Volume de KHCO_3 (dans l'érlen meyer) = 10 ml
- Volume de l'acide perchlorique (chute de burette) = 10,5 ml

$$C_{\text{HClO}_4} = \frac{0,1 \times 10}{10,5} = 0,095 \text{ mole/litre}$$

II.4.2. Dosage du fluconazole

Concentration de la solution d'acide perchlorique = 0,095 mole/litre

Prise d'essai du fluconazole = 125 mg.

Volume de l'acide perchlorique (chute de burette) = 8,4 ml

Perte à la dessiccation = 3,0%

$$\text{Teneur (\%)} = \frac{153,2 \times 0,095 \times 8,4}{Pe(100 - 3)} \times 10^4 = 100,8\%$$

Discussion

La teneur calculée est comprise dans l'intervalle de conformité de 99,0% - 101,0%.

III. Conclusion

Au terme de cette partie relative à la caractérisation physicochimique de la matière première fluconazole et en vue des résultats conformes obtenus pour l'identification par spectrophotométrie infrarouge et la teneur en substance active, nous concluons à la conformité de cette matière première de point de vue physicochimique. Cette conformité est un pré-requis aux essais ultérieurs de sensibilité des différentes souches fongiques vis-à-vis du fluconazole.

Notre matière première sera utilisée dans la seconde partie de notre travail en toute confiance.

CHAPITRE II

**Essais de sensibilité du
fluconazole sur différentes
espèces fongiques**

Matériels et méthodes

I. Isolement des souches fongiques

I.1 Matériels

I .1.1 Matériels de prélèvement



Figure 30 : Différents matériels utilisés lors du prélèvement.

- | | |
|---------------------|------------------|
| 1. Vaccinostyle | 5. Ciseau ; |
| 2. Coupe ongle ; | 6. Boîte pétri ; |
| 3. Curette ; | 7. Cellophane ; |
| 4. Pince à épiler ; | 8. Ecouvillon. |

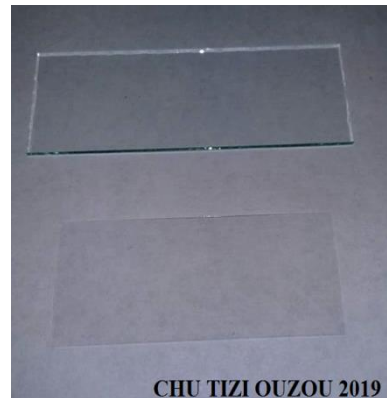
I .1.2 Matériels de lecture

❖ Réactifs et colorants



Figure 31 : potasse à 10 % +noir chlorazole+eau physiologique stérile+ encre de chine.

❖ Instruments

**Figure 32 :** Microscope optique**Figure 33 :** lame et lamelle.**I .1.3 Matériels de culture****Figure 34 :** étuve à 27C° et à 37°**Figure 35 :** Milieux d'isolement+ Anse de platine.

1. Milieu Sabouraud/Chloramphénicol(SC).
2. Milieu Sabouraud/Chloramphénicol/Actidione (SAC).
3. Anse de platine.

I .1.4 Matériel d'identification



Figure 36 : Sérum humain+ Tube sec+ Micropipette +Bleu de coton.



Figure 37 : lampe de Wood.

I.2 Méthodologie

Un examen mycologique devrait être pratiqué chaque fois que le diagnostic d'une mycose est évoqué. Pour chaque prélèvement effectué, un examen direct et une culture sont réalisés d'une manière systématique.

I.2 .1 Le prélèvement

La qualité du prélèvement conditionne le résultat du diagnostic.

Les modalités du prélèvement dépendent de la localisation des lésions (peau, ongle, muqueuses, liquides biologiques...).

Les prélèvements doivent être acheminés le plus rapidement possible au laboratoire sinon effectués de préférence au laboratoire ou conservés au réfrigérateur à +4°C.

Les prélèvements doivent être réalisés avant toute toilette corporelle (prélèvements cutanés surtout) ou traitement spécifique sinon après une fenêtre thérapeutique de 15 jours pour les antifongiques topiques(local) et de 2-3 mois pour les antifongiques systémique, vernis ou une solution filmogène. [70]

Tableau III :Modalités de prélèvement :

Lésions cutanées		
Lésions squameuses	Lésions suintantes	Suspect du Pityriasis versicolor
 CHU TIZI OUZOU 2019 utiliser une curette ou un vaccinostyle. Racler fortement les squames à la périphérie des lésions.	 CHU TIZI OUZOU 2019 grattage en bordure de lésion, ou frotter avec un écouvillon.	 CHU TIZI OUZOU 2019 faire un scotch test cutané.
Teignes du cuir chevelu		
 CHU TIZI OUZOU 2019 Utiliser une pince à épiler ainsi qu'une curette s'il y a des croûtes ou squames épaisses.	 CHU TIZI OUZOU 2019 L'examen préalable des lésions à la lumière de Wood est indispensable.	
Lésions unguéales		
 CHU TIZI OUZOU 2019	 CHU TIZI OUZOU 2019	Il est préférable de couper avec un ciseau toute la partie de l'ongle atteint jusqu'à la limite avec la partie saine, puis on racle la table interne avec une curette ou un vaccinostyle pour récupérer la poudre ou l'îlot blanchâtre sur la surface.

Plis	Muqueuses
 CHU TIZI OUZOU 2019 Ecouvillonner au fond de la lésion	 CHU TIZI OUZOU 2019 Utiliser un écouvillon stérile. Bien frotter les lésions apparentes.
Crachat	Liquides céphalo-rachidien (LCR)
Les crachats seront récoltés dans un récipient stérile après rinçage de la bouche avec un antiseptique.  CHU TIZI OUZOU 2019	Prélever dans un récipient stérile. Pour LCR, la ponction doit être réalisée dans des conditions d'asepsie rigoureuse, à l'aide d'une aiguille, entre les vertèbres L4-L5 ou L5-S1  CHU TIZI OUZOU 2019

I.2 .2 Examen direct

Prélèvements kératinisés (poils, cheveux, squames d'ongles) :

Déposer le produit sur lame, ajouter 2 à 3 gouttes d'éclaircissant (potasse KOH à 10%) et/ou du colorant (noir chlorazole), puis recouvrir par une lamelle et chauffer doucement à la veilleuse du Bec Bunsen.

La kératine se dissocie permettant de visualiser les éléments fongiques ; passer à l'observation au microscope optique à l'objectif $\times 10$ puis $\times 40$.

Ecouvillonnage :

Placer l'écouvillon préalablement humidifié dans un tube d'eau physiologique stérile, après agitation, déposer une gutte entre lame et lamelle, puis passer à l'observation au microscope optique à l'objectif $\times 10$ puis $\times 40$.

Scotch test :

Coller le ruban adhésif sur une lame, puis observer au microscope optique à l'objectif $\times 10$ puis $\times 40$.

LCR :

Déposer une goutte du culot de centrifugation sur une lame et rajouter une goutte d'encre de chine diluée au 1/3 ou au 1/5, puis recouvrir par une lamelle et passer à l'observation au microscope optique à l'objectif $\times 10$ puis $\times 40$.

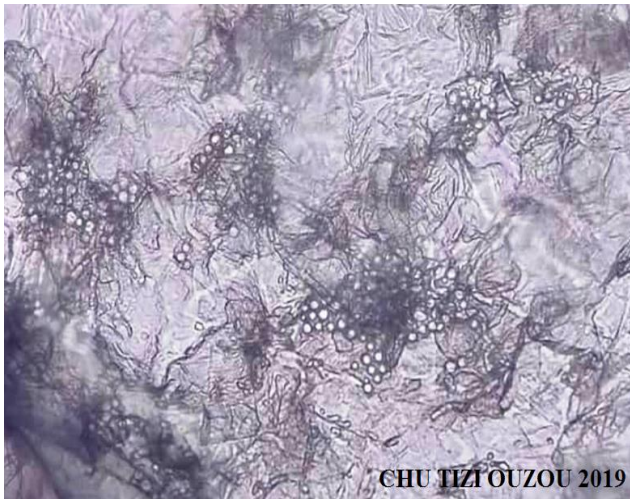
Résultats de l'examen direct

Figure 38 : examen direct du scotch test cutanée montrant des levures en grappe de raisin (cas pityriasis versicolor)



Figure 39 : examen microscopique après coloration de Gram montrant levures bourgeonnantes avec bourgeons multilatéraux et pseudofilaments mycéliens (prélèvement du crachat)



Figure 40 : examen direct montrant de levures capsulées du *Cryptococcus neoformans* à partir du LCR

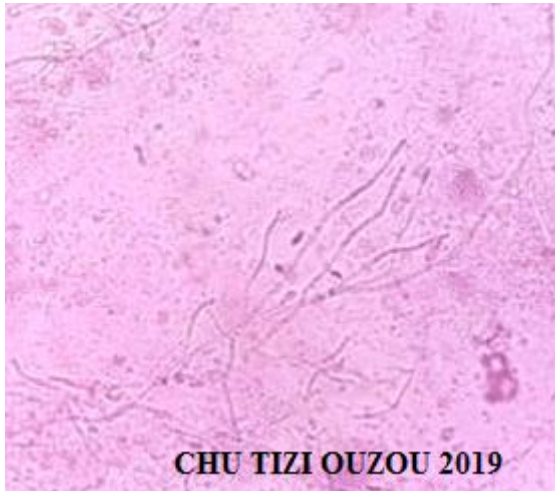


Figure41 : filaments myceliens
(Prélèvement d'ongles)

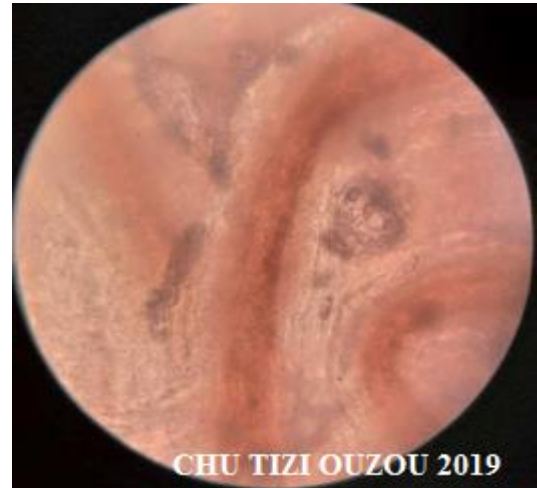


Figure42 : parasitisme pileux
(teigne Endoecthotrix)

I.2 .3 Mise en culture

Elle s'effectue sur deux milieux d'isolement :

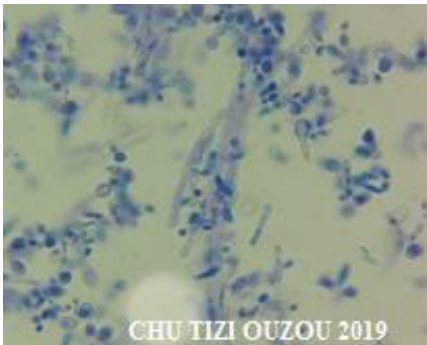
- Sabouraud généralement additionné d'antibiotique (chloramphénicol) pour limiter la pousse rapide des bactéries
- Sabouraud additionné de cycloheximide (actidione) qui est un antifongique capable d'inhiber la pousse des moisissures saprophytes (inhibe la pousse des levures du genre *Cryptococcus* et certaines espèces de *Candida*)
- Il faut ensemencher en abondance en stries et stérilement devant le bec Bunsen.
- Incuber à l'étuve :
 - A 37 C° pour les prélèvements profonds.
 - A 27 C° pour les prélèvements superficiels.



Figure 43 : Différentes étapes de la mise en culture.

I.2 Identification

Tableau IV : Identification des champignons levuriformes.

Espèce	Durée de pousse	Macroscopie	Microscopie
<i>Candida sp</i>	24 à 48 heures	Colonies blanches, crémeuses, lisses et bombés 	Levures rondes ou ovales, de 4-8 μm, Plus ou moins bourgeonnantes. 
<i>Cryptococcus sp</i>	2 à 5 jours	Colonies muqueuses, coulantes, à bord régulier, blanchâtre devenant ocre en une semaine. 	Levures rondes ou ovales (4 μm) à bourgeonnement multipolaire, capsulées ; Absence de mycélium. 
<i>Trichosporon sp</i>	24 à 48 heures	Colonies crémeuses, cérébriformes, glabres, de couleur jaune-chamois. 	Levures ovalaires à bourgeonnement multipolaire, non capsulées ; présence de filaments arthrospores. 

<i>Rhodotorula</i> <i>sp</i>	24 à 48 heures	Colonies crémeuses, pigmentées en rose à rouge orangé. 	Levures rondes ou ovales à bourgeonnement multipolaire ; Absence de mycélium et capsule 
---------------------------------	-------------------	---	---

▪ **Identification de *Candida albicans* par Test de Blastèse ou de filamentation**

- Réaliser une suspension de levures d'opacité à peine visible dans 1 ml de sérum frais, humain ou animal.
- Agiter.
- Incuber 3 heures à 37°C (maximum 4 heures).
- Observer à l'état frais entre lame et lamelle.

Si la levure est *Candida albicans*, on observe l'émission d'un tube germinatif à partir de blastopore.

Le tube germinatif est fin, flexueux et ne présente pas une constriction à sa base.



Figure 44 : différentes étapes de la réalisation du test de Blastèse.

- **Résultat du test de blastèse**



Figure 45 : résultat du test de blastèse (*Candida albicans*).

- **Pour *Candida kefyr* :**

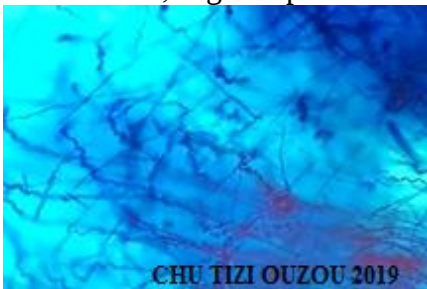
L'identification a été faite par la galerie biochimique.

- **Identification du *Cryptococcus neoformans* par galerie biochimique**



Figure 46 : Galerie biochimique (*Cryptococcus neoformans*)

Tableau V: Identification des dermatophytes

Espèce	Temps de pousse	Macroscopie	Microscopie
<i>Trichophyton rubrum</i>	6 à 7 jours	Colonie duveteuse Recto : blanc Verso : pigment brun ou jaune. 	Microconidies : plus ou moins nombreuses, piriformes et disposées en acladium . Macroconidies : absentes 
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	5 à 6 jours	Colonie poudreuse Recto : blanc à crème. Verso : jaune, rouge ou brun. 	Microconidies : nombreuses, rondes Macroconidies : en massues, à paroi lisse et mince et contiennent de 5-6 logettes.  Ornementations particulières : vrilles, organes pectinés. 

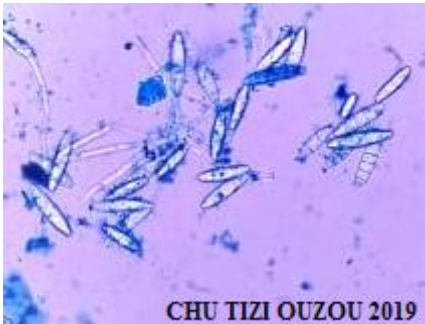
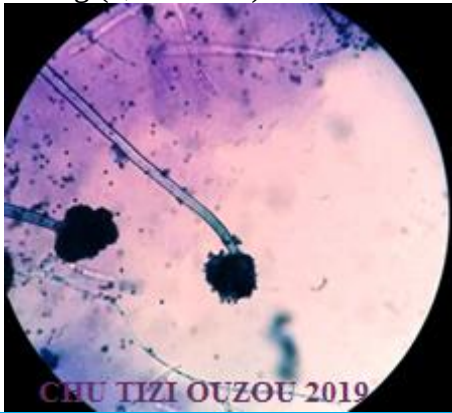
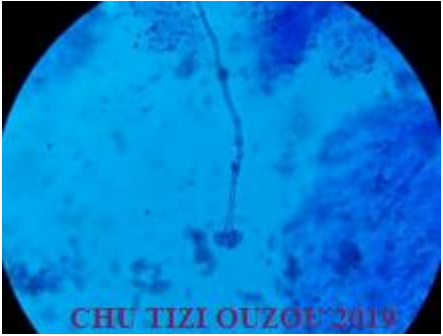
<i>Microsporum canis</i>	5 à 6 jours	Colonie duveteuse, étoilée Recto : blanc Verso : pigment jaune orangé. 	Microconidies : piriformes, peuvent être présentes. Macroconidies: de grandes tailles, renflées au centre, pointues aux 2 extrémités, parois épaisses, en quenouille échinulées, contiennent 6-12 logettes 
<i>Microsporum gypseum</i>	5 à 6 jours	Recto : Plâtreuse, beige puis chamois Verso : Chamois foncé 	Macroconidies : En "cocon", nombreuses, échinulées Microconidies : Rares, piriformes ne contiennent pas plus de 9 logettes. 

Tableau VI : Identifications des champignons du genre *Aspergillus*

Espèce	Temps de pousse	Macroscopie	Microscopie
<i>Aspergillus niger</i>	4 à 5 jours.	Colonies d'abord blanches, puis jaunes et enfin granuleuses noires. 	Tête aspergillaire : Bisériée radiée, noire à maturité Vésicule : globuleuse (45 à 75 µm) Conidies : Globuleuses, brunes, échinulées, souvent disposées en chaîne (3,5 à 5 µm de diamètre) Conidiophore : Lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure, très long (1,5 à 3 mm) 
<i>Aspergillus flavus</i>	4 à 5 jours.	Colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaunes, puis vert-jaune 	Tête aspergillaire : unisériée ou bisériée, petite en colonne ou grande et radiée, (300 à 400 µm de long) Vésicule : sphérique (25 à 45 µm) Conidies : globuleuses, vert pâle, échinulées (3,5 à 4,5 µm de diamètre) Conidiophore : Long (1 à 2,5 mm), hyalin, verruqueux avec des aspérités. 

<i>Aspergillus versicolor</i>	4 à 5 jours.	Colonies ocre puis de couleur variée (rose,jaune,ocre,vert...) 	Tête aspergillaire : bisériée, radiée Vésicule : ovale (12 à 16µm) Conidies : (2 à 3.5µm globuleuses, échinulées) Conidiophore : long (500à 700µm) lisse, jaunâtre 
-------------------------------	--------------	---	---

II. Evaluation de l'activité antifongique du fluconazole en milieu solide

L'organisation mondiale de la santé (OMS) préconise/ recommande d'adopter la méthode des disques du NCCLS (National Comite for Clinical Laboratory Standards). Cette méthode s'effectue en deux étapes : qualitative et quantitative.

Dans un 1er temps, la technique de contact direct par diffusion en milieu gélosé (Antifongigramme), permet de prévoir l'efficacité in vitro du fluconazole testé. Elle servira ainsi à la présélection des souches sensibles à son pouvoir antifongique.

Ensuite, les CMI seront déterminées par la méthode de dilution en milieu solide puis des subcultures permettent d'évaluer la CMF.

II.1 Evaluation qualitative de l'activité antifongique du fluconazole

- **Préparation de la solution mère du fluconazole**

À l'aide d'une balance précise, on pèse une masse de 51,2 mg du standard de fluconazole et on l'introduit dans une fiole de 10ml stérilisée (dans une étuve à flux laminaire à 180°C pendant 30minutes). On dilue dans un petit volume d'eau distillée stérile, puis on continue jusqu'au tri de jauge avec le même solvant pour obtenir une solution de concentration de 5120 µg/ml (annexe III).

- **Milieu pour l'antifongigramme :**

On évalue l'activité antifongique du fluconazole sur le milieu gélose CASITONE®(référence BIORAD ; Annexe IV). On liquéfie ce dernier au bain marie à une température de 95°C, puis on coule à chaque fois le contenu du tube casitone (15mL) dans des boites de Pétri (de 9cm de diamètre) tout en veillant à manipuler obligatoirement dans la zone stérile entre deux becs Bunsen, et on laisse refroidir et solidifier avant d'être utilisé.



Figure 47 : préparation des milieux de culture.

- **Préparation de l'inoculum fongique**

À partir de la culture jeune des champignons à tester, on racle quelques colonies fongiques bien isolées à l'aide d'une pipette pasteur flambée et on décharge dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile pour avoir une suspension fongique d'une turbidité de 0,5 MF.

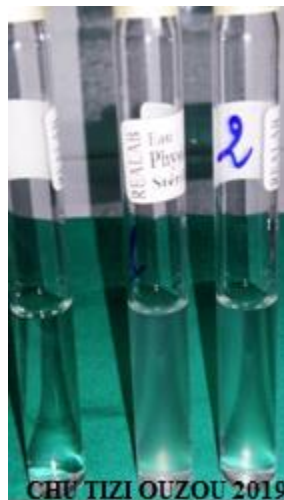


Figure 48 : suspensions fongiques d'une turbidité de 0.5 MF comparées à un témoin négatif.

- **Ensemencement**

On trempe un écouvillon stérile dans l'inoculum fongique préparé et on l'essor en le pressant fermement sur la paroi interne de tube, afin de décharger au maximum, puis on frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface de gélose casitone de haut en bas, en stries serrées, puis on refait la même opération deux fois en tournant la boîte d'angle 60°, après chaque application, de sorte à avoir une culture homogène en nappe.



Figure 49 : Ensemencement par les suspensions fongiques.

▪ **Dépôt des disques**

A l'aide d'une pince stérilisée au bec Bunsen, on dépose des disques sur la surface des géloses préalablementensemencé par les suspensions fongiques. Pour chaque boîte de Pétri on dépose 3 disques espacés entre eux au moins 24mm centre à centre :

- Un disque test du fluconazole commercial de 25 μ g ;
- Un disque qu'on imprègne de 10 μ L de la solution mère du fluconazole prélevé à l'aide d'une micropipette ;
- Un disque qu'on imprègne de 10 μ L d'eau purifiée stérile comme témoin négatif (T-)

Remarque : il est impératif d'utiliser des embouts stériles lorsqu'on prélève à l'aide de la micropipette pour éviter tout risque de contamination.



Figure 50 : dépôts des disques sur les boîtes préalablementensemencées.

▪ Incubation

On laisse les boîtes à température ambiante, couvercle vers le haut, pendant quelques minutes jusqu'à l'absorption des disques. Puis, on renverse les boîtes et on les incube dans l'étuve pendant 18 à 24 heures pour débiter à lecture.



Figure 51: incubation des boîtes ensemencées.

▪ Lecture des boîtes et mesure des diamètres des zones d'inhibitions

La sensibilité au fluconazole (l'antifongique) est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.

A l'aide d'un pied à coulisse, on mesure les diamètres des zones d'inhibitions autour des disques imprégnés de solution mère du fluconazole pour toutes les souches testées et le résultat sera exprimé en mm. Pour cette technique (antifongigramme), la sensibilité des champignons testé pour 0,5 μ L de fluconazole peut être évaluée selon le diamètre d'inhibition obtenu en se référant au tableau suivant.

Les espèces fongiques sont classées dans la catégorie sensible(S) ou résistante (R) ou sensible dose dépendant (SDD) en se référant au tableau suivant (VII).

Le tableau donne les critères de catégorisation clinique pour le CLSI et *Candida* spp et *Cryptococcus neoformans*. La catégorisation clinique n'est pas définie pour les champignons filamenteux ou dimorphiques.

Tableau VII : Corrélation entre sensibilité du germe et taille du halo d'inhibition. [69]

Taille du halo d'inhibition (mm)	Conclusion
≤ 14	Résistant
15-18	Sensible dose dépendant
≥ 19	Sensible

A. Evaluation quantitative de l'activité antimycosique du fluconazole :

Cette évaluation consiste à déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en utilisant la technique de dilution en milieux solide.

Elle est réalisée uniquement pour les espèces fongiques ayant montré une sensibilité lors la première étape.

A.1 Détermination de la CMI

➤ Préparation des différentes dilutions de fluconazole

Pour cette opération, on procède aux dilutions semi-logarithmiques à raison de 2 (de demi en demi). À partir de la solution mère préparée précédemment, on réalise ces dilutions. À l'aide d'une pipette jaugée stérile de 5 mL, on prélève un volume de 5 mL de la solution mère qu'on introduit dans un tube à essais stérile, puis on ajoute 5 mL d'eau distillée stérile pour avoir la première dilution de 2560 µg/mL. On homogénéise la solution et on ferme hermétiquement. On procède de la même manière afin de réaliser les autres dilutions : 1280 µg/mL, 640 µg/mL, 320 µg/mL, 160 µg/mL, 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL, 2,5 µg/mL, 1,25 µg/mL.

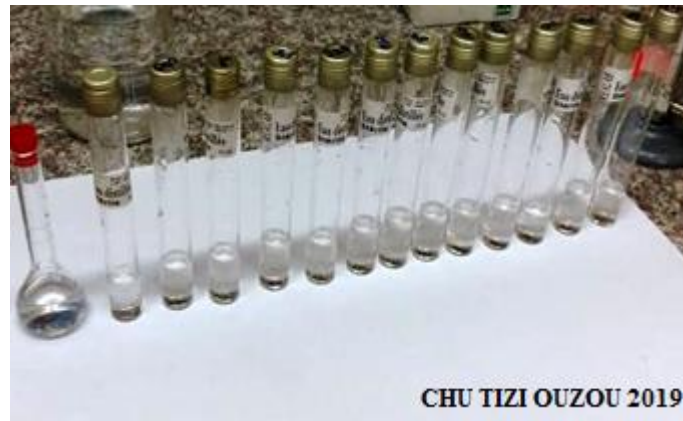


Figure 52 : différentes dilutions préparées à partir de la matière première du fluconazole.

➤ **Préparation des différents milieux**

On incorpore 2mL de chaque dilution et y compris la solution mère avec 18mL de la gélose **CASITONE**® liquéfiée (fondue puis refroidie à 45°C) dans une boîte de Pétri. On homogénéise le mélange et on laisse pour refroidir et solidifier. On prépare également une boîte contenant 18mL de **CASITONE**® avec 2mL d'eau distillée stérile, elle sert de témoin négatif. On obtient les concentrations suivantes : 512ug/mL, 256ug/mL, 128ug/mL, 64ug/mL, 32ug/mL, 16ug/mL, 8ug/mL, 4ug/mL, 2ug/mL, 1ug/mL, 0,5ug/mL, 0,25mg/mL, 0,125ug/mL.

➤ **Dépôt des disques**

Après la solidification des milieux, on dépose des disques stériles de 6mm de diamètre imprégnés de 5ul de chaque suspension fongique, prélevé par une micropipette, dans chaque boîte y compris la boîte du témoin négatif. On incube les boîtes dans l'étuve 37°C pendant 18 à 24 heures. (Annexe 3)



Figure 53 : dépôt des disques pour la détermination des CMI.

➤ **Lecture**

La CMI correspond à la plus petite concentration inhibant toute croissance visible à l'œil nu.

Les espèces fongiques sont classées dans la catégorie sensible(S) ou résistante (R) ou sensible dose dépendant (SDD) en se référant au tableau suivant.

Tableau VIII : corrélation entre la sensibilité de l'espèce fongique et la CMI.

Valeur de la CMI (ug/ mL)	Conclusion
≥ 64	Résistant
16 – 32	Sensible dose dépendant
≤ 8	Sensible

A.2. Détermination de la CMF

Afin d'apprécier la nature de l'activité antifongique du fluconazole ; s'agit-il d'une activité fongistatique ou fongicide ?

Pour chaque espèce fongique, on transfère les disques de chacune des dilutions précédentes, qui n'ont pas montré de croissance visible (c'est-à-dire celles qui sont supérieures ou égales à la CMI), sur des boîtes contenant 20mL de la gélose CASITONE[®] sans fluconazole.

Les boîtes sont incubées à 37 C° pendant 18 à 24 heures, et la CMF correspondra à la plus petite concentration dont aucune croissance ne sera visible à l'œil nu. (La plus faible concentration tuant 99,99 du micro-organisme en culture sur ce milieu).

RESULTATS

RESULTATS

Dans ce chapitre on va exposer les différents résultats obtenus suite à l'évaluation de l'activité antifongique du fluconazole

1. Evaluation qualitative de l'activité antifongique de fluconazole

1.1. Isolement des souches fongiques

On a isolé 15 souches fongiques (levuriformes et filamenteux) sur lesquelles on a procédé à l'évaluation de l'activité antifongique du fluconazole (tableau).

Tableau IX: souches fongiques isolées au niveau de laboratoire de parasitologie-mycologie médicale de CHU Tizi-Ouzou :

Levures	Champignon filamenteux	
	Dermatophytes	Aspergillus
- <i>Candida albicans</i> (4 souches provenant de localisations différentes « buccal, crachat, ongles des mains et plis inguinaux »).	- <i>Trichophyton rubrum</i>	- <i>Aspergillus niger</i>
- <i>Candida kefyr</i>	- <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	- <i>Aspergillus flavus</i>
- <i>Cryptococcus neoformans</i>	- <i>Microsporum canis</i>	- <i>Aspergillus versicolor</i>
- <i>Trichosporon sp</i>	- <i>Microsporum gypseum</i>	
- <i>Rhodotorula sp</i>		

RESULTATS

1.2 Mesure des diamètres des zones d'inhibition

Les résultats de l'antifongigramme se manifestent sous forme d'halo d'inhibition qu'on a mesuré à l'aide du pied à coulisse.

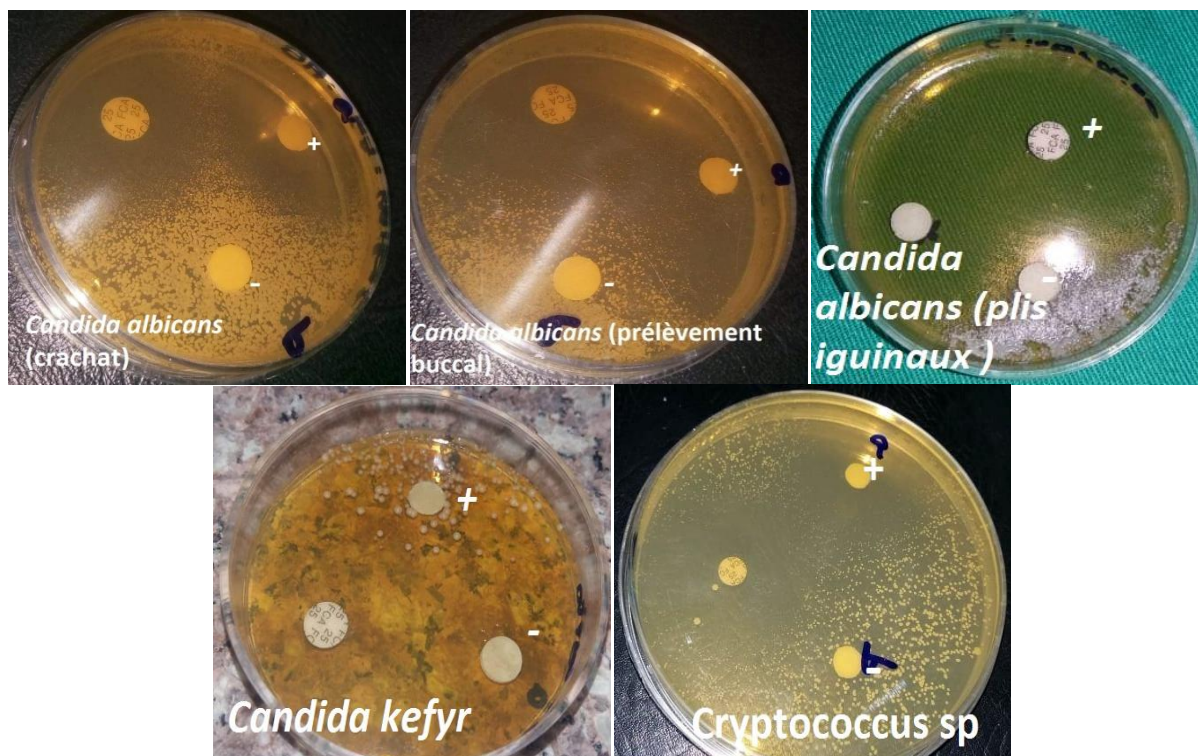


Figure 54 : Résultats du test de sensibilité de souches fongiques au fluconazole par la méthode de l'antifongigramme (souches sensibles) CHU Tizi ousou 2019.

RESULTATS

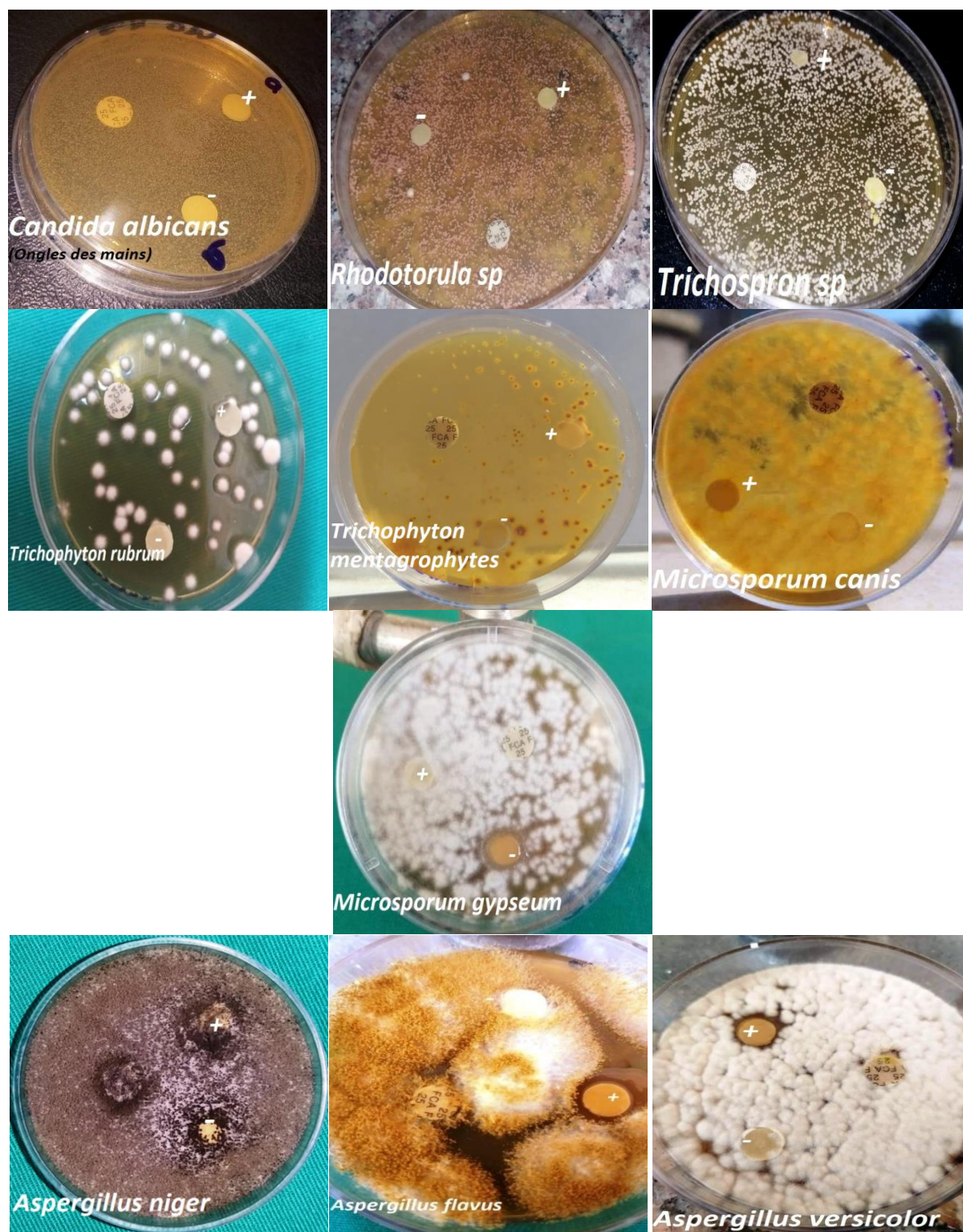


Figure 55 : Résultats du test de sensibilité de souches fongiques au fluconazole par la méthode de l'antifongigramme (souches résistantes) CHU Tizi ouzou 2019.

RESULTATS

Les résultats de l'antifongigramme sont présentés dans les tableaux suivants.

Tableau X : Classification des souches fongiques selon leurs sensibilités/résistance vis à vis du fluconazole.

Souches sensibles	Souches résistantes
<i>Candida albicans</i> (crachat)	<i>Candida albicans</i> (ongles des mains)
<i>Candida albicans</i> (buccal)	<i>Rhodotorula sp</i>
<i>Candida albicans</i> (intertrigo)	<i>Trichosporon sp</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
	<i>Microsporum canis</i>
	<i>Microsporum gypseum</i>
	<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus flavus</i>
	<i>Aspergillus versicolor</i>

Tableau XI: Diamètres des zones d'inhibition provoqués par le fluconazole testée sur différentes levures.

La souche fongique		La taille d'halo d'inhibition
<i>Candida albicans</i>	Crachat	Disque de la solution mère : 29mm Disque commercial : 32mm
	Buccal	Disque de la solution mère : 32mm Disque commercial : 32 mm
	Intertrigo	Disque de la solution mère : 34mm Disque commercial : 39mm
<i>Candida kefyr</i>		Disque de la solution mère : 22mm Disque commercial : 26mm
<i>Cryptococcus neoformans</i>		Disque de la solution mère : 34mm Disque commercial : 40mm

RESULTATS

1.3. Evaluation quantitative de l'activité antifongique de fluconazole :

- Lecture des CMI

La CMI du fluconazole, pour une espèce fongique donnée, correspond à la plus petite concentration inhibant toute croissance visible à l'œil nu et donc dans notre cas à la plus petite dilution ne montrant pas de croissance visible au tour du disque imbibé de suspension fongique après incubation.

Tableau XII : Résultats des CMI pour les espèces fongiques testées.

Les dilutions (ug/mL)		SM : 512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	Témoin négatif
Les souches fongiques testées															
Candida albicans	Crachat	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Buccal	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Intertrigo	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
C.neoformans		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Candida kefyr		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+

+ : présence d'une pousse.

- : absence de pousse.

Pour C.albicans (crachat, intertrigo) on observe une pousse fongique dans la boîte témoin, la dilution 8ug/mL, 4ug/mL, 2ug/mL, 1ug/mL, 0,5ug/mL, 0,25ug/mL, 0,125ug/mL, cependant rien n'est remarqué au tour des disques des dilutions allant de 512ug/mL au 16ug/mL. La CMI est donc égale à 16ug/mL.

RESULTATS

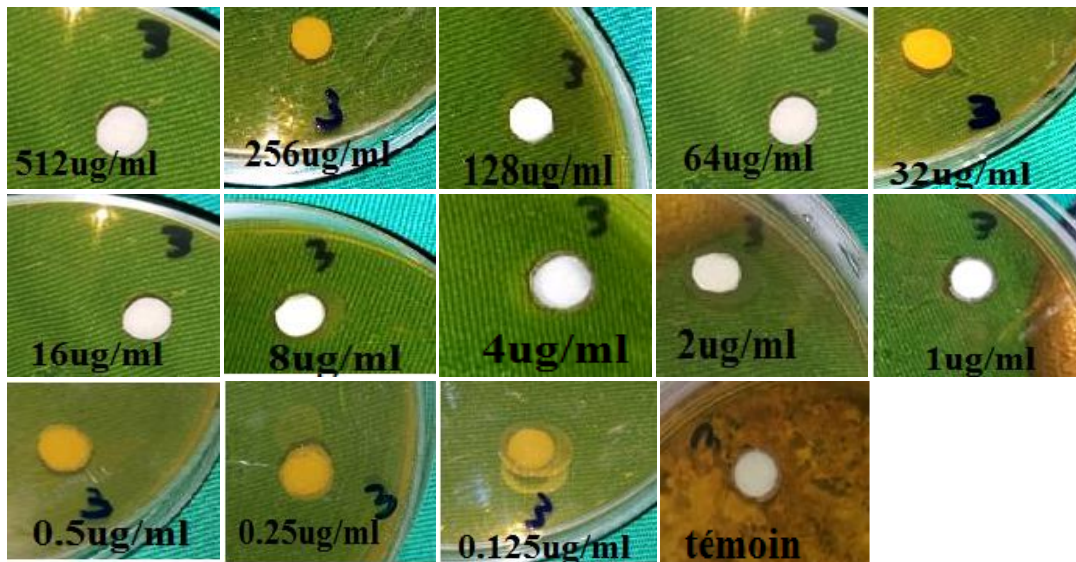


Figure 56 : Détermination de la CMI de *C. albicans* (crachat) CHU Tizi ousou 2019.

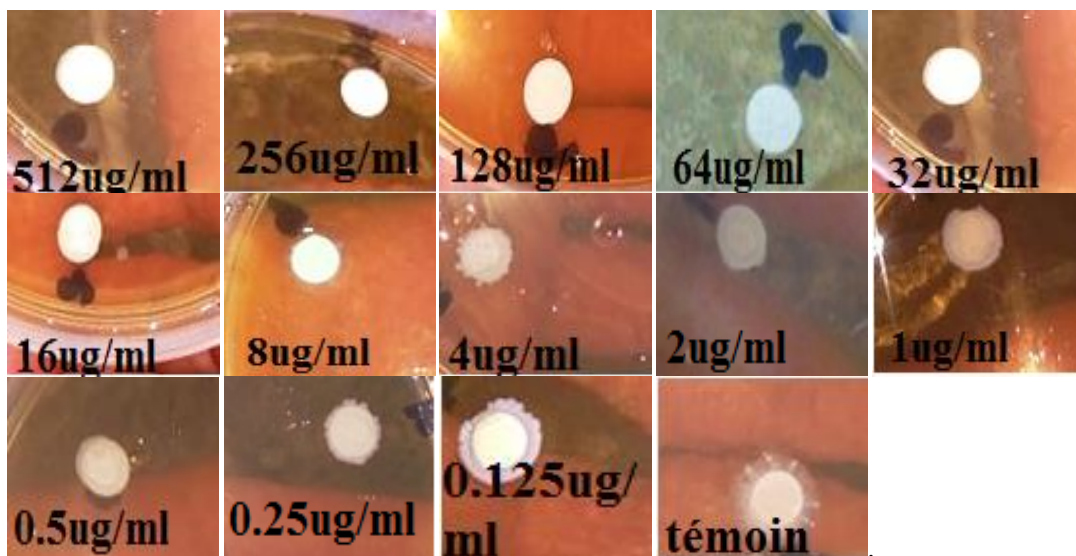


Figure 57 : Détermination de la CMI de *C. albicans* (intertrigo) CHU Tizi ousou 2019.

Pour *C. albicans* (buccal), il y a une culture fongique au tour des disques placés dans la boîte témoin et dans les dilutions allant de 2ug/mL à 0,125ug/mL et absence de culture dans les dilutions 512ug/mL, 256ug/mL, 128ug/mL, 64ug/mL, 32ug/mL, 16ug/mL, 8ug/mL, 4ug/mL. Sa CMI est donc de l'ordre de 4ug/mL.

RESULTATS

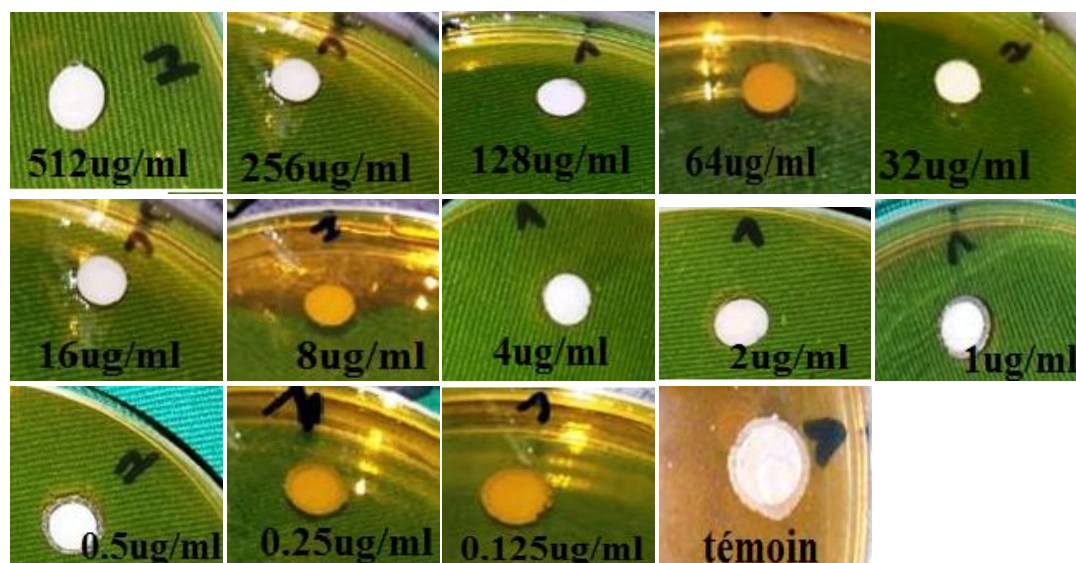


Figure 58 : Détermination de la CMI de *C.albicans* (buccal) CHU Tizi ouzou 2019.

C.neoformans et *C.kefyr* ont poussé au tour des disques de la boîte témoin et des dilutions allant de 4ug/mL au 0,125ug/mL, mais il n'y a aucune croissance visible autour des disques des dilutions 512ug/mL, 256ug/mL, 128ug/mL, 64ug/mL, 32ug/mL, 16ug/mL, 8ug/mL. Sa CMI est donc égale 8ug/mL.

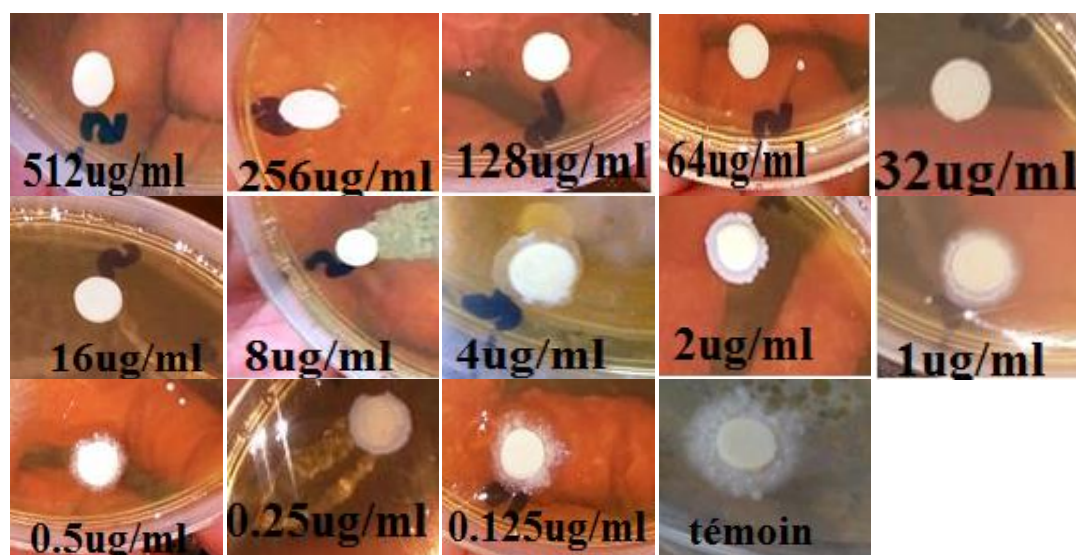


Figure 59 : Détermination de la CMI de *C.neoformans* CHU Tizi ouzou 2019.

RESULTATS

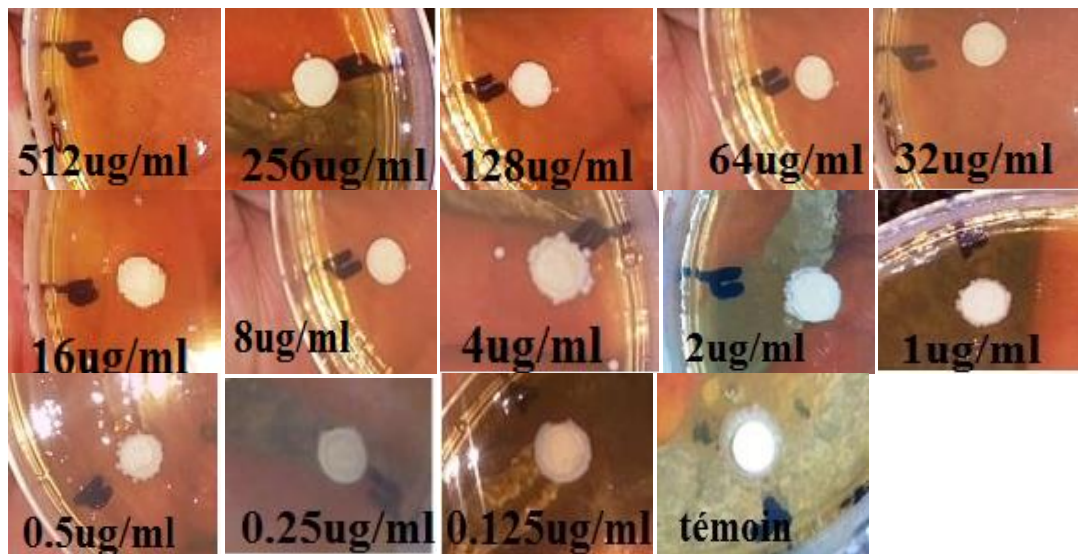


Figure 60 : Détermination CMI de *C.kefyr* CHU Tizi ousou 2019.

Tableau XIII : récapitulatif des résultats des CMI pour les souches sensibles au fluconazole.

Souches fongiques Testées	Dilution correspondantes à la CMI
<i>Candida albicans</i> (crachat)	16ug/mL
<i>Candida albicans</i> (intertrigo)	16ug/mL
<i>Candida albicans</i> (buccal)	4ug/mL
<i>Candida kefyr</i>	8ug/mL
<i>Cryptococcus neoformans</i>	8ug/mL

- Lecture des CMF :

Pour les trois espèces de *Candida albicans* (buccal, crachat et intertrigo), Toutes les dilutions supérieures ou égales à la CMI qui ont été transférées sur des boîtes sans fluconazole ont présenté, après incubation, une croissance visible à l'œil nu ; alors que pour *Cryptococcus neoformans* et *Candida kefyr* il n'y a pas eu de pousse sur les disques correspondant à la plus grande concentration (512 µg/mL).

RESULTATS



Figure 61 : résultat de la CMF pour *C. albicans* (buccal).



Figure 62 : résultat de la CMF pour *C. albicans* (intertrigo).

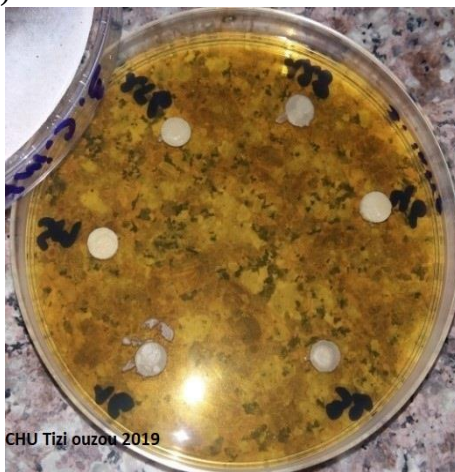


Figure 63 : résultat de la CMF pour *Candida albicans* (crachat)

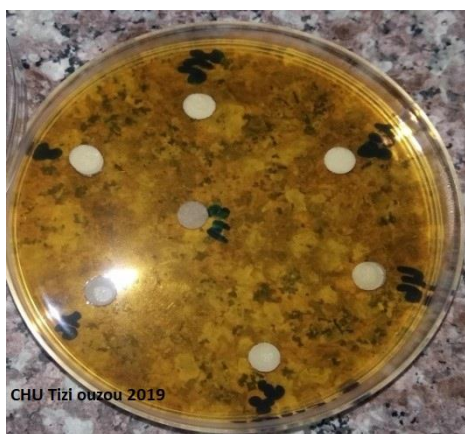


Figure 64 : résultat de la CMF
Candida kefyr



Figure 65 : résultat de la CMF pour
Cryptococcus neoformans

DISCUSSION

DISCUSSION

Evaluation qualitative de l'activité antifongique du fluconazole :

L'activité antifongique du fluconazole sur les 15 espèces testées est évaluée selon les diamètres des zones d'inhibition obtenues représentés dans le tableau suivant.

Tableau XIV : Classification des espèces fongiques testées selon leur degré de sensibilité par ordre décroissant.

La souche fongique testée		Diamètre des zones d'inhibition obtenues	Taille du halo	Conclusion
<i>C.neoformans</i>		34 mm	≥ 19	L'espèce est sensible au Flc
<i>C.albicans</i>	Intertrigo	34 mm	≥ 19	L'espèce est sensible au Flc
	Buccal	32mm	≥ 19	L'espèce est sensible au Flc
	Crachat	29 mm	≥ 19	L'espèce est sensible au Flc
<i>C.kefyr</i>		22 mm	≥ 19	L'espèce est sensible au Flc
<i>C.albicans</i> (ongles des mains)		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Rhodotorula sp</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Trichosporon sp</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Trichophyton rubrum</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Microsporum canis</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Microsporum gypseum</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Aspergillus niger</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Aspergillus flavus</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle
<i>Aspergillus versicolor</i>		6 mm	≤ 14	la sensibilité de l'espèce au Flc est nulle

DISCUSSION

L'activité antifongique du fluconazole varie selon la souche fongique testée, on se référant aux normes spécifiées par le NCCLS, on peut voir qu'il a montré un important effet inhibiteur sur les levures du genre *Cryptococcus* et *Candida* (*albicans*) ; un peu moins sur *Candida kefyr*.

On remarque que les diamètres des zones d'inhibitions des disques du fluconazole commercial sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par les disques imbibés par notre solution mère, et cela peut être expliqué par le fait que les conditions opératoires dans lesquelles sont préparés les disques (disque commerciales et nos disques) ne sont pas les mêmes, ainsi que les techniques maison élaborées par les laboratoires sont plus précises quand on travaille sur un petit échantillonnage

En revanche, aucune sensibilité vis-à-vis du fluconazole n'a été enregistrée pour la souche du *Candida albicans* provenant du prélèvement ongles des mains ainsi que les souches du genre *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Microsporum*, *Trichophyton* et *Aspergillus*. Ceci peut être expliqué par l'existence d'une variabilité interindividuelle, la présence d'une résistance innée ou acquise ou mutations génétiques, la prévenance de la souche hospitalisé /externe, la non observance du traitement et la longue durée du traitement.

Evaluation quantitative de l'activité antifongique du fluconazole (CMI et CMF)

L'activité antifongique du fluconazole sur les souches qui ont montré une sensibilité lors du premier test est évaluée quantitativement selon les valeurs des CMI obtenues.

En déduire, *Candida albicans* (prélèvement buccal), *Candida kefyr* et *Cryptococcus neoformans* sont des souches sensibles au fluconazole car leurs CMI sont inférieures à 8 ug/mL, tandis que les deux souches de *Candida albicans* provenant respectivement du crachat et des plis inguinaux sont sensibles doses dépendantes car leurs CMI sont comprises dans la fourchette [16-32ug/mL], et ceci en référant aux valeurs du NCCLS.

DISCUSSION

Après transfert des disques des dilutions correspondant aux concentrations supérieures ou égales à la CMI pour toutes les souches testées, on peut conclure après la pousse que le fluconazole à une activité fongistatique pour les espèces *C. albicans* (crachat, buccale, intertrigo) et une activité fongicide pour les espèces *Candida kefyr* et *Cryptococcus neoformans*.

Les résultats des CMI obtenues et les valeurs de références sont résumés dans le tableau XV.

Tableau XV : corrélation entre la sensibilité des souches fongiques et les valeurs des CMI.

Souches testées	CMI obtenues	Comparées aux valeurs de références (ug/ mL)	Conclusion
<i>Candida albicans</i> (buccal)	4 ug/mL	≤ 8	La souche est sensible.
<i>Candida kefyr</i>	8 ug/mL	≤ 8	La souche est sensible.
<i>Cryptococcus neoformans</i>	8 ug/mL	≤ 8	La souche est sensible.
<i>Candida albicans</i> (intertrigo)	16 ug/mL	16-32	La souche est sensible dose dépendante.
<i>Candida albicans</i> (crachat)	16 ug/mL	16-32	La souche est sensible dose dépendante.

CONCLUSION

CONCLUSION

Le développement de l'arsenal thérapeutique des antifongiques pour la médecine humaine n'a réellement débuté qu'à vers 1980.

Notre étude réalisée sur la sensibilité du fluconazole sur différentes espèces fongiques nous a permis de constater que l'essor des traitements des mycoses par les différentes molécules heurte à plusieurs difficultés :

- L'action fongistatique (le plus souvent) mettant en œuvre des traitements prolongés avec un grand risque de rechute chez les sujets ayant une défaillance immunitaire.
- La non standardisation des tests in vitro (antifongigramme) permettant ainsi d'apprécier la sensibilité des souches aux antifongiques et l'établissement des critères prédictifs de l'efficacité in vivo mais aussi la nécessité de recourir à des modèles expérimentaux animaux.
- La résistance des souches aux antifongiques étant un phénomène très complexe et multifactoriels : l'utilisation accrue, la prescription inappropriée et la non maintenance du traitement par les antifongiques, l'application intensive des fongicides en agriculture au cours des dernières années ont également ajoutée au développement de la résistance à ces médicaments ce qui a eu une influence négative sur l'efficacité chez l'homme.
- Nos objectifs désignés précédemment ont été atteints et nous avons conclu que la matière première du fluconazole est conforme aux exigences de la pharmacopée européenne et que l'activité antifongique du fluconazole varie selon la souche fongique testée, on peut avoir un effet important sur les levures du genre *Candida* et *Cryptococcus*.

En revanche, aucune sensibilité vis-à-vis fluconazole n'a été enregistrée pour les souches du genre *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Microsporium*, *Trichophyton* et *Aspergillus*.

Résolutions

En Algérie, peu d'études ont été rapportées sur l'évaluation de l'activité antifongique du fluconazole.

Pour cela, on peut proposer de faire une méthode de standardisation de l'antifongigramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) comme celui de l'antibiogramme, et aussi réaliser un guide national pour les antifongiques avec une contribution multidisciplinaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. AOUI H. Le profil épidémiologique et diagnostique des mycoses au CHU de rabat. [MAROC]; 2001.
2. El Euch D, Trojjet S, Mokni M, Feuilhade de Chauvin M. 36 - Mycoses superficielles. In: Mokni M, Dupin N, del Giudice P, éditeurs. Dermatologie infectieuse [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2014 [cité 12 janv 2019]. p. 185-98. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294732843000363>
3. Mokni M, Couppié P. Mycoses sous-cutanées. In: Dermatologie infectieuse [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 12 janv 2019]. p. 199-206. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9782294732843000375>
4. Lagrange PH, Hurtrel B. Mécanismes de défense dans les mycoses profondes. Médecine Mal Infect. 1 nov 1984;14(11):558-64.
5. Parasitoses_et_mycoses.pdf [Internet]. [cité 13 janv 2019]. Disponible sur: https://ia802601.us.archive.org/5/items/Collection_Abreges/Parasitoses_et_mycoses.
6. Develoux M, Bretagne S. Candidoses et levures diverses. EMC - Mal Infect. 1 sept 2005;2(3):119-39.
7. Item 87 – Infections cutanéomuqueuses bactériennes et mycosiques : Candida albicans. Ann Dermatol Vénéréologie. 1 oct 2012;139(11):A40-6.
8. CRABOS J. MYCOSES CUTANÉES À L'OFFICINE : ETUDE SUR DES POPULATIONS EN MILIEU CONFINÉ [Internet]. [France]: Université de Limoges; 2013. Disponible sur: <https://aurore.unilim.fr/theses/nxfile/default/f67453ff-8e90-4593-8188-cdd09f260b3d/blobholder:0/P20133361.pdf>
9. Sabbah L, éditeur. 125 - Candidoses. In: Méga Guide STAGES IFSI [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2015 [cité 10 avr 2019]. p. 405-7. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294745294001257>
10. Piérard GE, Piérard-Franchimont C. 2-3 - Mycoses. In: Saurat J-H, Lipsker D, Thomas L, Borradori L, Lachapelle J-M, éditeurs. Dermatologie et Infections Sexuellement Transmissibles (Sixième Édition) [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2017 [cité 6 févr 2019]. p. 134-46. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294746499000076>
11. Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al. Chapitre 46 - Candidoses. In: Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al., éditeurs. Parasitologie et Mycologie Médicales - Guide des Analyses et des Pratiques Diagnostiques [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2017 [cité 26 déc 2018]. p. 389-94. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978229475363300046X>
12. El Fane M, Badaoui L, Ouladlarsen A, Sodqi M, Marih L, Chakib A, et al. La cryptococcose au cours de l'infection à VIH. J Mycol Médicale. 1 déc 2015;25(4):257-62.

13. Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al. Chapitre 47 - Cryptococcoses. In: Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al., éditeurs. Parasitologie et Mycologie Médicales - Guide des Analyses et des Pratiques Diagnostiques [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2017 [cité 19 janv 2019]. p. 395-9. Disponible sur:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294753633000471>
14. Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al. Chapitre 48 - Malassezioses. In: Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al., éditeurs. Parasitologie et Mycologie Médicales - Guide des Analyses et des Pratiques Diagnostiques [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2017 [cité 6 févr 2019]. p. 401-4. Disponible sur:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294753633000483>
15. Lacroix C, Feuilhade de Chauvin M. Infections dues à *Trichosporon* spp. et à *Geotrichum* spp. EMC - Mal Infect. juin 2005;2(2):97-104.
16. Albertyn J, Pohl CH, Viljoen BC. *Rhodotorula*. In: Batt CA, Tortorello ML, éditeurs. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition) [Internet]. Oxford: Academic Press; 2014 [cité 26 févr 2019]. p. 291-5. Disponible sur:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300002895>
17. Jemli B, Battikh R, Msaddak F, Barguelli F, Gargouri S, Amor A, et al. Pneumopathie à *Geotrichum capitatum* chez une patiente neutropénique. Médecine Mal Infect. 1 déc 2003;33(12):654-6.
18. El-Hassani I, Deham H, Touaoussa A, Er-rami M. Infection pulmonaire à *Geotrichum capitatum* à propos d'un cas et revue de la littérature. J Mycol Médicale. 1 déc 2014;24(4):341-4.
19. Zagnoli A, Chevalier B, Sassolas B. Dermatophyties et dermatophytes. EMC - Pédiatrie. 1 févr 2005;2(1):96-115.
20. Sabbah L, éditeur. 124 - Dermatophyties. In: Méga Guide STAGES IFSI [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2015 [cité 15 mars 2019]. p. 402-4. Disponible sur:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294745294001245>
21. Denieul A, Faure S. Les dermatomycoses. Actual Pharm. 1 avr 2009;48(484):10-3.
22. Chabasse D, Guiguen C. Dermatophytes : difficultés d'interprétation et pièges du diagnostic mycologique. Rev Francoph Lab. 1 mars 2019;2019(510):26-35.
23. Chabasse D, Contet-Audonnet N. Les teignes du cuir chevelu. Rev Francoph Lab. 1 juill 2013;2013(454):49-57.
24. Bourée P, Paugam A. *Aspergillus* : un dangereux opportuniste. Option/Bio. 1 oct 2015;26(532):13-7.
25. Blandin S, David G. L'aspergillose en pratique pour le pneumologue. Rev Pneumol Clin. 1 août 2008;64(4):202-10.

26. Blanchard E, Gabriel F, Jeanne-Leroy C, Servant V, Dumas P-Y. Aspergillose pulmonaire invasive. *Rev Mal Respir*. 1 févr 2018;35(2):171-87.
27. Godet C, Couturaud F, Ragot S, Laurent F, Brun AL, Bergeron A, et al. Aspergillose bronchopulmonaire allergique : évaluation d'un traitement d'entretien par Ambisome® nébulisé. *Rev Mal Respir*. 1 mai 2017;34(5):581-7.
28. Goyard C, Godet C. Asthme et Aspergillus. *Rev Mal Respir Actual*. 1 mai 2015;7(2):80-2.
29. Couturaud F. Aspergillus et poumon. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 1 janv 2004;44(1):83-8.
30. Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al. Chapitre 3 - Mycologie : techniques élémentaires. In: Anofel, Botterel F, Dardé M-L, Debourgogne A, Delhaes L, Houzé S, et al., éditeurs. *Parasitologie et Mycologie Médicales - Guide des Analyses et des Pratiques Diagnostiques* [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2017 [cité 25 avr 2019]. p. 53-87. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9782294753633000033>
31. Chabasse D. Place du laboratoire dans le diagnostic mycologique d'une onychomycose. *Rev Francoph Lab*. 1 mai 2011;2011(432):43-50.
32. Chabasse D, Pihet M, Bouchara J-P. Les Moisissures Opportunistes : Émergence De Nouveaux Champignons Pathogènes En Médecine Revue Générale. *Rev Francoph Lab*. 1 mai 2005;2005(373):21-34.
33. David Schnell , Elie Azoulay. Le traitement des infections invasives à Candida a-t-il changé ? Réanimation médicale, Nouvel Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg,. mars 2013;
34. Faure S. Antifongiques systémiques. *Actual Pharm*. 1 mars 2009;48(483):49-52.
35. Denieul A, Faure S. Les traitements antifongiques. *Actual Pharm*. 1 avr 2009;48(484):14-8.
36. Eureka santé-Vidal-fluconazole
37. Patrick Vandeputte. Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez candida glabrata. Interactions entre organismes. Université d'Angers, 2008.
37. Anne Claire Nonnotte. Antifongiques azolés : Pharmacologie, Posté le Fév. 27, 2018 dans Médecine, Pharmacie
38. Unadkat JD, Gypta A. Le fluconazole - pubmed
39. Bongomin F, Oladele RO, Gago S, Moore CB, Richardson MD. A systemic review of fluconazole resistance in clinical isolates of Cryptococcus species _pubmed
40. Triflucan : monographie de produit, Pfizer.

- 41.K. Gupta, MD, FRCP(C), Richard K. Scher, MD, FACP, and Phoebe Rich, MD
Fluconazole for the treatment of onychomycosis : an updateAditya
- 42.Apofluconazole : monographie de produit, Capsule de 150 mg de fluconazole Apotex Inc.
- 43.Diflucan : monographie de produit, (fluconazole) Comprimés à 50 et à 100 mg ©Pfizer
Canada inc. 2018
- 44.Abdulaziz M.S, AlsaadabcYusuf C, KaplanadGReproductive Toxicology Volume 52,
April 2015, Exposure to fluconazole and risk of congenital malformations in the offspring : A
systematic review and meta-analysis
- 45.Berard A, Sheehy Q, Zhao JP, Gorgui J, Bermasky S, de Moura CS,
AbrahamowiczM.Association between use oral of fluconazole during pregnancy and risk of
spontaneous abortion and stillbirth _pubmed
- 46.Journal de MycologieMédicale, Volume 28, Issue 2, June 2018, In vitro susceptibility of
Candida spp. to fluconazole, itraconazole and voriconazole and the correlation between
triazoles susceptibility : Results from a five-year study
- 47.Jacquesguillot(1,2) et Eric dannaoui(3).La résistance aux antifongiques : importance en
médecine humaine et vétérinaire, par (communication présentée le 25 juin 2015)
- 48.Alison S. Orozco,¹ Lindsey M. Higginbotham,¹ Christopher A. Hitchcock,² Tanya
Parkinson. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei* -pubmed
- 49.Derek falconer,²ashraf s. Ibrahim,¹ mahmoud a. Ghannoum,^{1,3†} and scott g. Filler^{1,3}
Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*, American Society for Microbiology
- 50.Florent MORIO et Patrice LE PAPE.RÉSISTANCE DE CANDIDA SPP. AUX
ANTIFONGIQUES N° 16.
- 51.Bin W, Li-Hua H, Ji-xua Z.ERG11mutations associated with azole resistance in *Candida*
albicans isolates from vulvovaginal candidosis patients, Asian journal of tropical biomedicine
- 52.Sanglard D, Ischer F, CalabreseD ,Majcherczyk PA, BilleJ.The ATP binding cassette
transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical
isolates to azole antifungal agents _pubmed
- 53.Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, BilleJ.Mechanism of resistance to
azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific
multidrug transporters_pubmed
- 54.Ou TY, Chang FM, Cheno WN, Lara A, Chou ML, Lee KC, LeeWF, Lin CT. Fluconazole
induced rapid high-frequency MTL homozygosis with microbiological polymorphism in
Candida albicans pubmed

55. Popp C, Ramirez B, Schwanfelder S, Morschhauser J. Evolution of fluconazole resistant *Candida albicans* strains by drug-induced mating competence and parasexual recombination. pubmed
56. David S, Perlin L, Riina R, Rautemaa-Richardson A, Alastruey-Izquierdo F. Fungal infections 5 : The global problem of antifungal resistance : prevalence, mechanisms, and management
57. Antifungal drugs and resistance : Current concepts Pramod Kumar Nigam Department of Dermatology, STD & Leprosy, Pt. J. N. M. Medical College, Raipur-492001, (CG), India
58. H. Guegan J.-P. Gangneux A. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism
59. Journal de Mycologie Médicale Volume 25, Issue 4, December 2015, Résistance aux antifongiques azolés d'origine environnementale : quelles alternatives pour l'avenir ?
60. Rocchia S, Reboux G, Millon L. Antibiotiques Volume, June 2010, Résistance microbiologique des *Aspergillus* aux antifongiques : de l'identification au séquençage des mutations
61. Anita H, Katarzyna K, Ewa PN, Jacek B, Tomasz Mycopathologia 2013 : Increase in Resistance to Fluconazole and Itraconazole in *Trichophyton rubrum* Clinical Isolates by Sequential Passages In Vitro under Drug Pressure
62. Nilce M. Martinez-Rossi, Tamires A. Bitencourt, Nalu T. A. Peres, Elza A. S. Lang, Eriston V. Gomes, Natalia R. Quaresimin, Maíra P. Martins, Lucia Lopes, and Antonio Rossi. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs : Mechanisms and Prospectus- pubmed
63. Antifungal Resistance | Fungal Diseases | CDC [Internet]. 2019 [cité 6 juill 2019]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/fungal/antifungal-resistance.html>
64. pharmacopée européenne 6ème édition.
65. British pharmacopoeia 2009.
66. Contrôles de qualité pour matières premières et substances actives | UFAG Laboratoire AG; Disponible: <https://www.ufag-laboratoire.ch/fr/analyses-pharmaceutiques/contrôles-de-qualite-pour-matieres-premieres-et-substances-actives/>.
67. Abbas Djamil. SYNTHÈSE, ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE ET PREFORMULATION D'UN DÉRIVÉ PYRIDO [3,2-g] QUINOLÉINE TRIMÉTHYLE, en ligne]. Université de la méditerranée; 2010. Disponible: <https://www.theses.fr/2010AIX22962>.
68. HPLC Principe et appareillage - Les séries SMS, BSE et BGB. Disponible: <https://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spip.php?article475>.
69. M44 Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline.:36.

70. BENLARIBI I. diagnostic mycologique in institute national de formation superieure paramedicale de Canstantine;2018

Annexe I

Composition et préparation des réactifs :

- **Violet cristal:**

C₂₅H₃₀ClN₃. (Mr 408,0). 1022900. [548-62-9]. Schultz No. 78.

Colour Index No. 42555.

Chlorure d'hexaméthylpararosanilinium.

Poudre vert foncé ou cristaux, solubles dans l'eau et dans l'alcool.

Solution de violet cristallisé. 1022901. Dissolvez 0,5 g de violet cristallisé R dans de l'acide acétique anhydre R et complétez à 100 ml avec le même solvant. Essai de sensibilité. A 50 ml d'acide acétique anhydre R, ajoutez 0,1 ml de solution de violet cristallisé. La solution est bleu pourpre. Ajoutez 0,1 ml d'acide perchlorique 0,1 M ; la solution vire au bleu-vert

- Potasse à l'eau :

Hydroxyde de potassium	20 mg
Eau distillée	80 mL

- **Noir chlorazole :**

Dissoudre 5 g d'hydroxyde de potassium (KOH) dans 90 mL d'eau distillée.

Parallèlement, dissoudre 100 mg de noir chlorazole E (sigma) dans 10 mL de diméthylesulfoxyde. Verser la solution de noir chlorazole dans la solution d'hydroxyde de potassium.

- Bleu coton ou lactophénol :

Phénol	20 mL
Acide lactique	20 mL
Glycérine	40 g
Bleu coton (bleu de méthyle)	0,5 g
Eau distillée	20 mL

Annexe II

<u>Laboratoire de Chimie Analytique</u> PROCEDURE Matière première	PROCEDURE N° :CQ.MP.0004	REVISION N° 00
	PROCEDURE D'ANALYSE PHYSICOCIMIQUE DE FLUCONAZOLEMatiere PREMIERE	DATE D'EFFET 2018 /2019
		DATE DE PROCHAINE REVISION

OBJECTIF

Cette procédure a pour but de décrire les méthodes de contrôle physico- chimique de fluconazole matière première.

DOMAINE D'APPLICATION

Cette procédure est spécifique au fluconazole matière première de la pharmacopée européenne en vigueur.

RESPONSABILITES

- Etudiants en 6^{ème} année pharmacie
- Responsable du laboratoire de Chimie Analytique

DEFINITIONS – MOTS CLES

2-(2,4-Difluorophényl)-1,3-bis(1H-1, 2,4-triazol-1-yl) propan-2-ol.

Teneur : 99,0 pour cent à 101,0 pour cent (substance desséchée).

APPLICATION (Rubriques de la pharmacopée européenne)

1. Caractères

Aspect : poudre cristalline, blanche ou sensiblement blanche, Hygroscopique.

Solubilité : peu soluble dans l'eau, facilement soluble dans le méthanol, soluble dans l'acétone.

Le fluconazole présente le phénomène du polymorphisme (5.9).

Identification :

Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge :

Triturer 1-2 mg de substance à examiner avec 300-400mg, sauf indication contraire, de bromure de potassium ou de chlorure de potassium finement pulvérisé et desséché. Ces quantités suffisent généralement pour préparer une pastille d'un diamètre de 10-15 mm et obtenir un spectre d'intensité

satisfaisante. Broyer soigneusement le mélange, l'étendre uniformément dans une matrice spéciale et le soumettre à une pression d'environ 800Mpa (8t-cm-2).

Comparaison : fluconazole SCR.

Préparer la substance à examiner et la substance de référence de la même façon et enregistrer les spectres entre 4000-650cm⁻¹ (2,5-15, µm) dans les mêmes conditions opératoires. Les minimums de transmission (maximum d'absorption) du spectre obtenu avec la substance à examiner correspondent en position et en dimensions relatives à ceux du spectre avec la substance de référence(SCR).

Si les spectres obtenus à l'état solide présentent des différences, dissolvez séparément la substance à examiner et la substance de référence dans un volume minimal de chlorure de méthylène R, évaporez à siccité au bain-marie et enregistrez de nouveaux spectres à partir des résidus.

Essais

Aspect de la solution :

La solution est limpide (2.2.1) et incolore (2.2.2, Procédé II).

Dissolvez 1,0 g de fluconazole dans du méthanol R et complétez à 20 ml avec le même solvant.

Substances apparentées : chromatographie liquide

Solution à examiner : Dissolvez 0,100 g de fluconazole dans la phase mobile, traitez aux ultrasons si nécessaire et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (a) : Prélevez 5,0 ml de solution à examiner et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 1,0 ml de cette solution et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (b) : Dissolvez 5 mg de fluconazole pour identification des pics SCR (contenant l'impureté A) dans la phase mobile, traitez aux ultrasons si nécessaire et complétez

à 10 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (c) : Dissolvez 3,0 mg d'impureté B de fluconazole SCR dans la phase mobile, traitez aux ultrasons si nécessaire et complétez à 100,0 ml avec la phase mobile.

Solution témoin (d). Dissolvez 2,0 mg d'impureté C de fluconazole SCR dans la phase mobile et complétez à 20,0 ml avec la phase mobile. Prélevez 1,0 ml de cette solution, ajoutez 1,0 ml de solution à examiner et complétez à 10,0 ml avec la phase mobile.

Colonne :

— dimensions : l = 0,15 m, Ø = 4,6 mm,

— phase stationnaire : gel de silice octadécylsilylé pour chromatographie R1 (5 µm),

— température : 40 °C.

Phase mobile : acétonitrile R, solution de formiate d'ammonium R à 0,63 g/l (14:86 V/V).

Débit : 1,0 ml/min.

Détection : spectrophotomètre à 260 nm.

Injection : 20 µl.

Enregistrement : 3,5 fois le temps de rétention du fluconazole.

Identification des impuretés : utilisez le chromatogramme fourni avec le fluconazole pour identification des pics SCR et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (b) pour identifier le pic dû à l'impureté A. Utilisez le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) pour identifier le pic dû à l'impureté B et le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) pour identifier le pic dû à l'impureté C.

Rétention relative par rapport au fluconazole (temps de rétention = environ 11 min) : impureté = environ 0,4 ;

impureté A = environ 0,5 ; impureté C = environ 0,8.

Conformité du système : solution témoin (d) :

— résolution : au minimum 3,0 entre les pics dus à l'impureté C et au fluconazole.

Limites :

— impureté A : au maximum 0,8 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,4 pour cent) ;

— impureté B : au maximum la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (c) (0,3 pour cent) ;

— impureté C : au maximum la surface du pic correspondant dans le chromatogramme obtenu avec la solution témoin (d) (0,1 pour cent) ;

— impuretés non spécifiées : pour chaque impureté, au maximum 0,2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,10 pour cent) ;

— total : au maximum 1,2 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,6 pour cent) ;

— limite d'exclusion : 0,1 fois la surface du pic principal du chromatogramme obtenu avec la solution témoin (a) (0,05 pour cent).

Perte à la dessiccation : au maximum 0,5 pour cent, déterminé à l'étuve à 105 °C sur 1,000 g de fluconazole.

Mode opératoire. Placez la quantité prescrite de la substance à examiner dans un flacon à tare, desséché lui-même au préalable dans les conditions précisées pour la substance à examiner. La dessiccation de la substance se fait jusqu'à masse constante ou pendant la durée prescrite à l'aide d'un des procédés décrits ci-dessous. Si la température de dessiccation est indiquée par une seule valeur plutôt qu'un intervalle, la dessiccation est effectuée à la température prescrite ± 2 °C.

Dosage :

Dissolvez 0,125 g de fluconazole dans 60 ml d'acide acétique anhydre R. Titrez par l'acide perchlorique 0,1 M.

Déterminez le point de fin de titrage par potentiométrie.

1 ml d'acide perchlorique 0,1 M correspond à 15,32 mg de $C_{13}H_{12}F_2N_6O$.

Conservation :

En récipient étanche.

5. Tableau des réactifs et consommables :

Réactif et consommables	Code	Quantité	Consommable/équipements
Matière première : fluconazole		1g	Spectrophotomètre infrarouge
Bromure de potassium		400mg	Balance de précision de marque KERN : Précision = 10 ⁻⁵ g
Eau purifié			Etuve Memmert
Acide acétique glacial			Purificateur d'eau pure et ultra pure – Humain corporation.
Anhydride acétique		60mL	
Acide perchlorique		10mL	Verrerie et consommable du laboratoire
Violet cristal : indicateur coloré			• Fioles jaugées de 100, 250 et 1000 mL. • Béchers • Erlen meyer de 300 mL • Spatule • Eprouvette graduée en verre de 10 mL • Burette en verre graduée de 25mL (précision = 0,1 mL) • Pipette jaugée de 5mL

ABREVIATIONS :

IR : infrarouge.

HPLC : chromatographie liquide à haute performance

R : réactif.

SCR : substance chimique de référence

REFERENCES

Pharmacopée Européenne 10^{ème} édition .

MOTIFS DE REVISION

Motif de la révision		
Localisation de la modification	Modification (préciser la raison si nécessaire)	VIIObservations
NA	Nouvelle procédure	NA

Annexe III

Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (médecine humaine et vétérinaire) 6ème édition 2011

- Préparation des boîtes de dilutions d'antibiotique :

- Peser 51,20 mg de poudre titrée d'antibiotique. Diluer dans le volume de solvant approprié pour obtenir une concentration stock de 5120 µg/ml (solution-mère).

- Procéder aux dilutions semi-logarithmiques de raison 2 (de demi en demi), dans le solvant approprié, jusqu'à la concentration finale de 1,25 µg/ml.

- Répartir 2 ml de chaque dilution d'antibiotique, dans la boîte correspondante en procédant de la plus faible concentration à la concentration la plus élevée. Ne pas changer de pipette.

- Compléter chaque boîte avec 18 ml de milieu Mueller-Hinton liquéfié et homogénéiser délicatement, sans faire de bulle, le contenu des boîtes par des mouvements circulaires. La dilution obtenue (1/10ème) dans chaque boîte aboutit à une concentration finale allant de 512 µg/ml à 0,125 µg/ml. La gamme de dilution peut être étendue selon les valeurs souhaitées.

- Préparer une boîte témoin sans antibiotique en remplaçant le volume d'antibiotique par le même volume d'eau physiologique stérile.

- Après solidification, sécher les boîtes, couvercle en place, pendant 30 mn.

- Préparation de l'inoculum bactérien :

- Préparer un inoculum standard à une turbidité de 0,5 MF, ce qui correspond à 1-2.10⁸ CFU/ml en moyenne. Utiliser l'eau physiologique (eau σ) à 0,9% pour la préparation de la suspension directe à partir d'une culture jeune de la bactérie à tester.

- Déposer sous forme de spots à la surface de la gélose, 10⁴ CFU/ml par spots de 5 à 8 mm

- Si on utilise un applicateur de 2µl par spot, diluer l'inoculum au 1/10ème en eau physiologique.

- Si on utilise un applicateur de 0,1 à 0,2µl par spot, ne pas diluer l'inoculum de départ (0,5 MF).

- Ensemencement :

- Tremper un écouvillon stérile dans l'inoculum.
- L'essorer en le pressant fermement (et en le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.
- Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Petri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

- Application des disques d'antibiotiques :

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotique sur une boîte de 90 mm.

- Conditions d'incubation :

Respecter la température, l'atmosphère et la durée d'incubation recommandées pour chaque bactérie

- Lecture :

-Mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.

-La CMI de l'antibiotique testé est lue à l'œil nu, boîte ouverte et bien éclairée.

-Noter la CMI (la plus faible concentration d'antibiotique inhibant toute croissance bactérienne visible).

- Ne pas prendre en considération 2 colonies ou un léger film

-Si on note plus de 2 colonies persistantes ou si l'on constate une réapparition de la culture au-delà de la CMI, vérifier la pureté de l'inoculum et refaire le test.

-Comparer les résultats obtenus, aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture correspondantes.

-Classer la bactérie dans l'une des catégories S, R ou I.

Annexe IV :



DOMAINE D'APPLICATION

Le milieu Casitone est utilisé pour l'étude de l'activité des antifongiques par la méthode des disques. Seule, la fluorocytosine doit être testée sur le milieu semi-synthétique pour antifongigramme.

PRESENTATION

- Prêt à l'emploi
15 ml x 25 tubes **code 355-5813**

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

- + 2 - 8 °C
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.

FORMULE THEORIQUE

Casitone	9 g
Extrait de levure	5 g
Citrate de sodium trisodique	10 g
Phosphate disodique	1 g
Phosphate monosodique	1 g
Glucose purifié au charbon	10 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C) final = 6,6 ± 0,2	

PROTOCOLE

Le volume de répartition est de 15 ml pour une boîte de 90 mm de diamètre.

Méthode: => Se reporter au chapitre "Antibiogramme".

PRECAUTION D'EMPLOI

- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

(Voir tableau ci-contre)

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

MICRO-ORGANISMES	diamètre d'inhibition en (mm) en 24-48H à 32 °C
Candida albicans SDP 3153A	Nystatine: 16-25 Ampho B: 17-22 Econazole: 23-33 Clotrimazole: 18-28 Miconazole: 18-25
Candida albicans SDP 41 R 5FC	Nystatine: 17-26 Ampho B: 17-22 Econazole: 25-35 Clotrimazole: 18-30 Miconazole: 20-30

MOTS CLES

Casitone / Disques / Antifongigramme / Fluorocytosine / Milieu.

BIBLIOGRAPHIE

• REGLI P., FERRARI H., GOUDARD M. et BUFFARD Y. (1982) : Intérêt du milieu Casitone pour l'étude de la sensibilité in vitro des champignons levuriformes aux antifongiques dérivés de l'imidazole, Bull. Soc. Franç. Mycol. Méd., 11 : 359-362.

• DROUHET E., et DUPOND B. (1978) : Antibiogramme des champignons aux antifongiques. Bull. Soc. Franç. Mycol. Méd.: 165-170.

Résumé

L'augmentation significative de la prévalence des infections fongiques lors des dernières années a profondément transformé l'attention portée aux antifongiques utilisés en thérapeutique antimycotique. Cette modification épidémiologique est la conséquence de facteurs de risque liés à la population comme les maladies métaboliques et l'immunodépression mais aussi à la résistance des souches aux molécules antifongiques, dans ce contexte il nous a semblé intéressant de mettre en expérience le fluconazole afin d'évaluer son profil de sensibilité et résistance sur différentes espèces fongiques. Dans ce contexte il nous a semblé intéressant de mettre en expérience le fluconazole afin d'évaluer son profil de sensibilité et résistance sur 15 espèces fongiques ; mais d'abord on a réalisé une caractérisation physicochimique de la matière première du principe actif fluconazole afin s'assurer de sa qualité pharmaceutique. Cinq espèces seulement ont montré une sensibilité vis-à-vis du fluconazole (appartenant au genre *Candida* et *Cryptococcus*) avec CMI entre 4 et 16 µg/ mL.

Mots clé :

Mycose- fluconazole- sensibilité- résistance.

Abstract:

The significant increase in the prevalence of fungal infections in recent years has transformed the attention paid to antifungals used in antimycotic therapy. This epidemiological modification is the consequence of population-related risk factors such as metabolic diseases and immunosuppression but also of the resistance of strains to antifungal molecules in this context, it seemed interesting to us to experiment with fluconazole in order to evaluate its sensitivity and resistance profile on different fungal species. In this context, it seemed interesting to us to experiment fluconazole in order to evaluate its sensitivity and resistance profile on 15 fungal species; but first we carried out a physicochemical characterization of the raw material of active principle fluconazole in order to ensure its pharmaceutical quality. Only five species showed sensitivity to fluconazole (belonging to the genera *Candida* and *Cryptococcus*) with MICs between 4 and 16 µg/ mL

Keywords:

Mycosis- fluconazole- sensitivity- resistance