



UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1990

THESE N° 16

ETUDE COMPARATIVE DE LA SENSIBILITE IN VITRO DE CHAMPIGNONS
D'INTERET MEDICAL A DIVERS MEDICAMENTS ANTIFONGIQUES

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
présentée et soutenue publiquement le 21 mai 1990

par

Claudette BONNET épouse de WEYER
née le 7 décembre 1962 à Guéret (Creuse)

EXAMINATEURS DE LA THESE :

M. le Professeur NICOLAS Président
M. DREYFUSS, Maître de Conférences Juge
Melle le Docteur DARDE, MCU - PH Juge

ETUDE COMPARATIVE DE LA SENSIBILITE IN VITRO DE CHAMPIGNONS
D'INTERET MEDICAL A DIVERS MEDICAMENTS ANTIFONGIQUES

1
UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN de la FACULTE : Monsieur le Pofesseur RABY
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er Assesneur)
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2ème
assesneur)

- PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotchnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie Fondamentale
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virolo- gie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUD Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

- SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINIS-
TRATIFS

CELS René

A Jean-Luc et Hugo,
avec tout mon Amour

A Michèle et François,
pour leur aide précieuse dans l'exécution de ce travail

A Monsieur le Professeur NICOLAS,

qui nous fait l'honneur d'accepter la présidence de cette
thèse

Nous vous prions de croire en notre profonde reconnaissance.

A Monsieur DREYFUSS,

qui a bien voulu participer et juger ce travail

Nous vous exprimons ici nos remerciements et notre profonde
gratitude.

A Mademoiselle DARDE,

qui a bien voulu siéger à ce jury et prendre le temps
d'examiner ce travail.

INTRODUCTION

La pathologie fongique a subi une évolution notable au cours des trois dernières décennies. Un des faits marquants est l'augmentation des mycoses viscérales et septicémiques. Elles sont pour la plupart opportunistes: survenant sur un terrain affaibli, iatrogènes: rançon des thérapeutiques modernes et nosocomiales.

Parallèlement la gravité de cette pathologie s'est accrue avec une plus lourde mortalité. Le syndrome d'immunodéficience acquise est venu allonger la liste des nombreux facteurs favorisant les mycoses.

Les mycoses superficielles ont également une incidence en augmentation. Elles sont localisées aux téguments, aux ongles, aux cheveux et aux muqueuses génitales et digestives. Ces infections peuvent constituer le point de départ d'une septicémie par envahissement systémique. Les agents des mycoses superficielles ont vu leur rôle fluctuer en fonction de paramètres tels que : le niveau de vie, l'hygiène collective et les migrations de populations.

Nous nous sommes intéressées, au laboratoire de parasitologie de Limoges, à l'étude d'antifongiques destinés au traitement de mycoses locales, même si certains de ces produits sont également des antifongiques systémiques (Miconazole, Kétonazole). L'arsenal thérapeutique est plus riche vis à vis de ces mycoses superficielles que celui dont on dispose pour le traitement des mycoses profondes. Plusieurs dérivés imidazolés et la Ciclopiroxolamine, qui est une pyridone substituée, ont récemment été mis sur le marché.

Il nous est apparu légitime face à l'afflux de nouvelles molécules d'évaluer et comparer leur efficacité thérapeutique sur quelques champignons pathogènes.

Notre travail a consisté à évaluer et à comparer la sensibilité in vitro de plusieurs souches fongiques reconnues pathogènes pour l'homme, vis à vis de plusieurs antifongiques proposés en thérapeutique courante.

Le principe de l'étude repose sur la mise en évidence de la sensibilité qualitative et des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des produits étudiés en milieu gélosé et liquide.

1. METHODOLOGIE :

Nous avons adopté dans tous nos essais, une méthode évaluée par les travaux antérieurs de Bernadaud (6). Nous avons ainsi déterminé les CMI (concentrations minimales inhibitrices) exactes des produits étudiés en milieu liquide et, dans certains cas, leur CMI approchées et les diamètres d'inhibition en milieu solide.

1.1. Matériel :

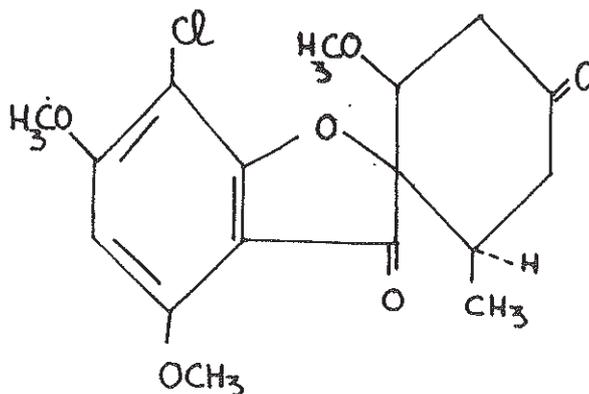
1.1.1. Les antifongiques :

Nous avons choisi d'étudier onze antifongiques dont certains ont été récemment mis sur le marché pharmaceutique français. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude de molécules destinées au traitement de mycoses locales par voie topique ou muqueuse, même si certaines sont également utilisées par voie générale.

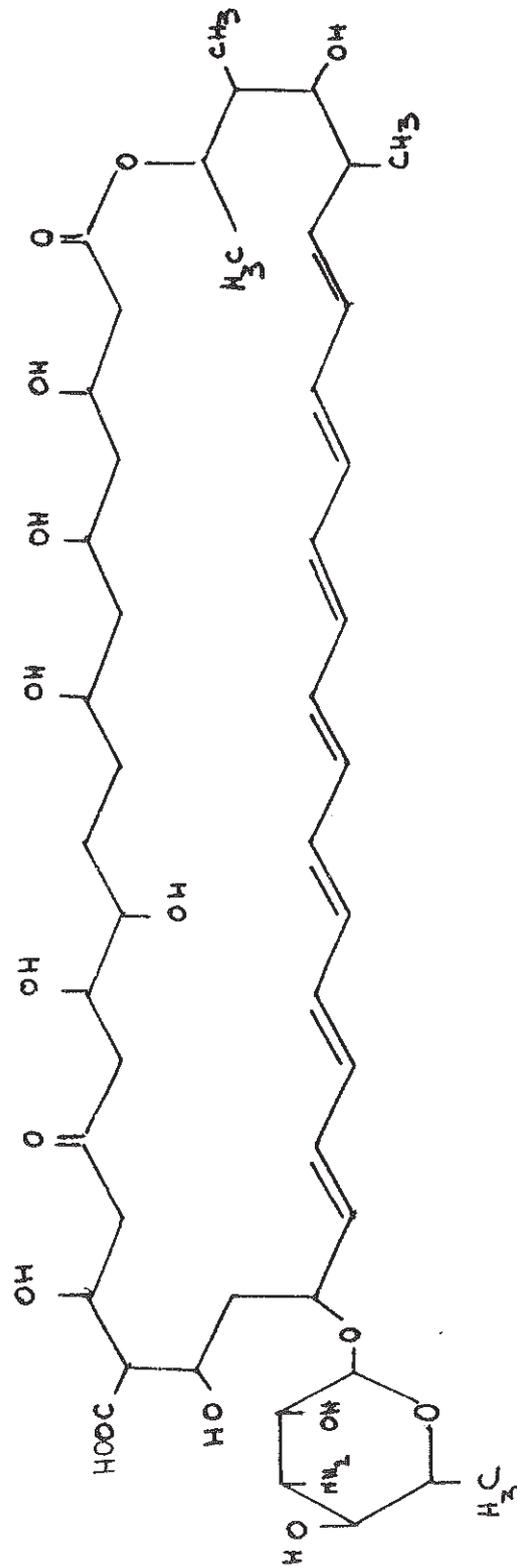
Les médicaments étudiés sont :

a) Les antibiotiques antifongiques :

- Griséofulvine (Clin midy)

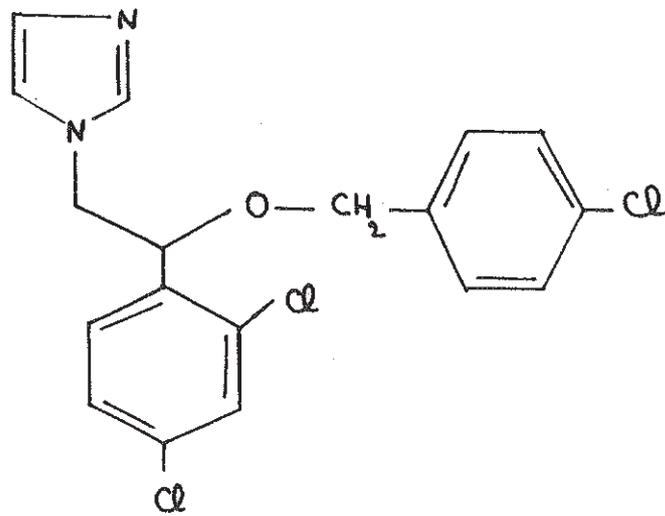


- Polyène : la Nystatine (Squibb)

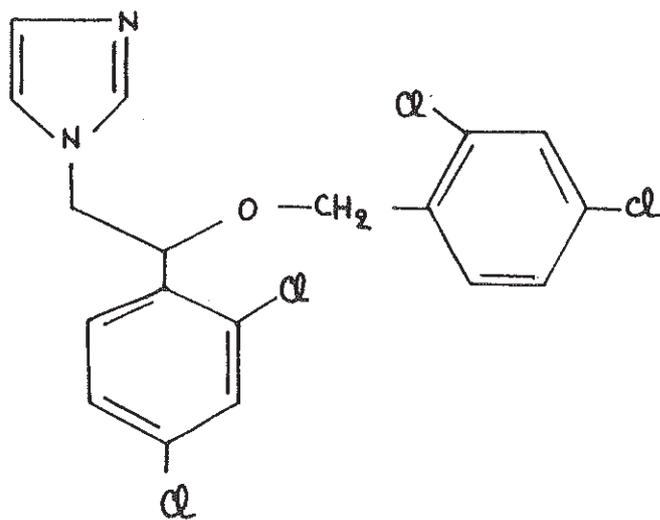


b) Des antifongiques imidazolés :

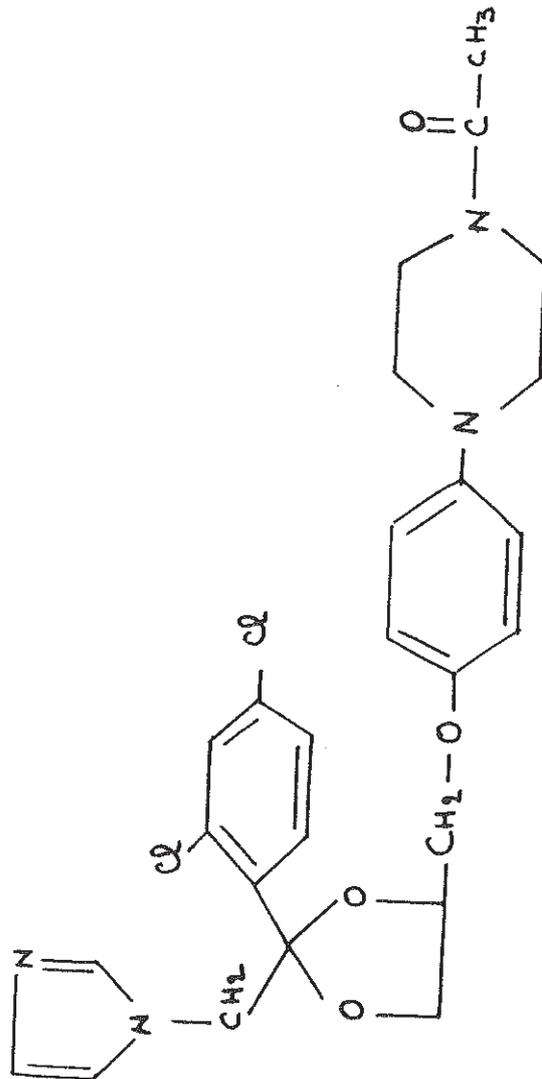
- Econazole (Cilag)



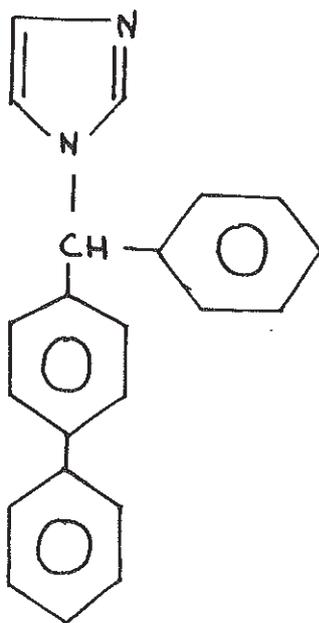
- Miconazole (Janssen)



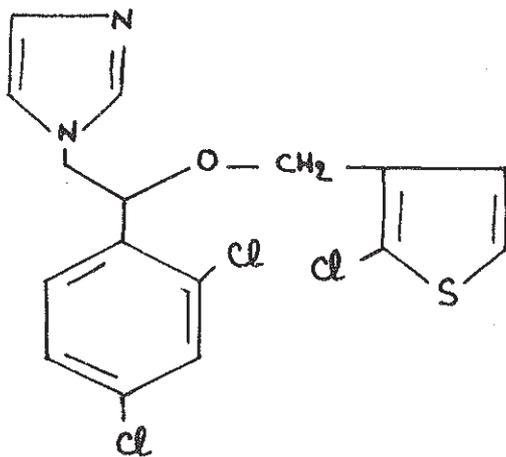
- Kétoconazole (Janssen)



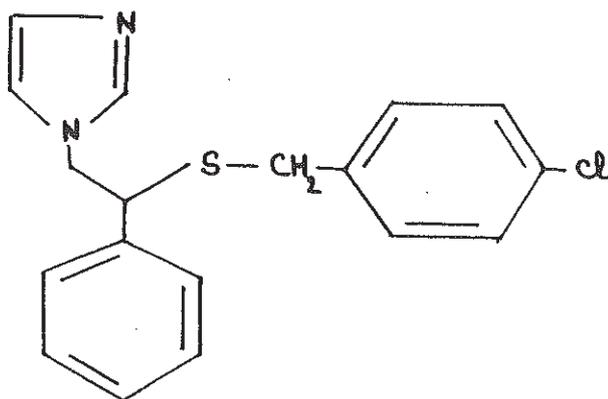
- Bifonazole (Médicia)



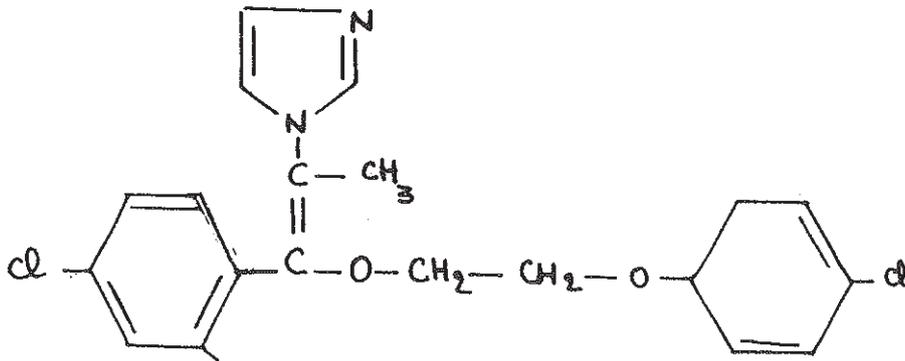
- Tioconazole (Pfizer)



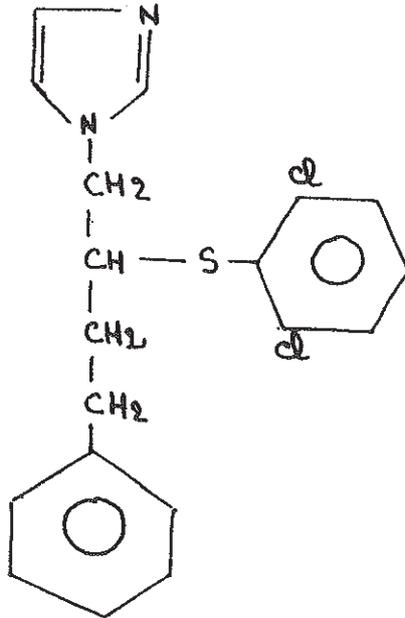
- Sulconazole (Syntex)



- Omoconazole (Clin Midy)

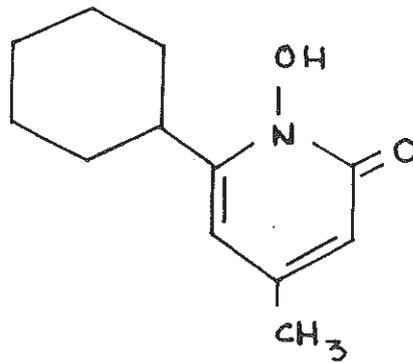


- Butoconazole (Syntex)



c) Antifongique non antibiotique non imidazolé :

- La Ciclopiroxolamine (Fabre)



. H₂NCH₂CH₂OH

1.1.2. Solvants de dilution :

Nous avons utilisé les solvants préconisés par les laboratoires.

- Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Acétone
- Methanol
- Eau distillée stérile (eau ppi)

(L'absence d'effet antifongique éventuel du solvant a été vérifiée)

1.1.3. Milieux d'expérimentation :

- Détermination des CMI exactes :

Ces CMI sont déterminées en milieu liquide.

Nous avons utilisé le milieu YNB (Yeast nitrogen base) DIFCO glucosé à 2%.

Composition du milieu : 6,7 g de YNB (DIFCO)
 1,5 g d'asparagine
 qsp 100 ml d'eau distillée

Ce milieu est préparé concentré dix fois. Il est stérilisé par filtration et stocké à l'abri de la lumière à + 4°C. Au moment de l'utilisation il est dilué au 1/10ème et glucosé à 2% avec une solution glucosée stérile à 20%.

- Détermination des CMI approchées et des diamètres d'inhibition en milieu solide :

Ces valeurs ont été déterminées sur milieu gélosé.

Trois milieux différents ont dû être utilisés compte tenu des

différences de capacité de migration des produits dans la gélose

Ce sont les milieux :

- . sabouraud chloramphénicol gélosé (Institut Pasteur)
- . casitone (Institut Pasteur - Composition annexe n° 1) pH=6,6
- . semi-synthétique (Institut Pasteur - Composition annexe n°2)
pH=5,6.

Afin de traiter tous les produits dans les mêmes conditions, chaque fois que cela était possible nous avons utilisé le milieu casitone pour les levures et Sabouraud-chloramphénicol gélosé pour les dermatophytes.

- Milieu utilisé pour l'entretien des souches :

. Levures : Elles sont cultivées sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol gélosé.

. Dermatophytes : Ils sont cultivés sur milieu malt gélosé et Sabouraud-Chloramphénicol liquide.

1.1.4. Espèces étudiées :

Tous les antifongiques sont étudiés sur plusieurs souches de levures et de dermatophytes. Les espèces fongiques ont été choisies pour leur pathogénicité pour l'Homme, tant au niveau cutané qu'au niveau muqueux, et pour leur fréquence en pratique courante.

a) Levures ;

Tous les produits sont évalués sur trois espèces de levures différentes, choisies en raison de leur fréquence en pathologie :

Ce sont *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Torulopsis glabrata**.

* *C. formata* dans la nouvelle nomenclature - Pour des raisons pratiques, nous préférons garder la dénomination *T. glabrata*.

Les souches utilisées sont:

- Pour *C. albicans* (CA) : CA 39
 - CA 41
 - CA 43
 - CA 46
 - CA 47
 - CA 48
 - CA 50
 - CA ATCC 2091
- Pour *C. tropicalis* (CT) : CT 8
 - CT 9
 - CT 10
 - CT 11
 - CT 12
- Pour *T. glabrata* (TG) : TG 5
 - TG 6
 - TG 7
 - TG 8
 - TG 9

Toutes ces souches sont d'origine humaine à l'exception de CA ATCC2091 qui est une souche de collection. Ainsi leur pathogénicité est vérifiée contrairement à ce que l'on peut observer avec la plupart des souches de collection.

b) Dermatophytes.

Plusieurs espèces de dermatophytes responsables de mycoses cutanées sont étudiées. Il s'agit de *Trichophyton rubrum*,

Trichophyton interdigitale, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis, Microsporum langeronii et Epidermomyces floccosus. Ces souches proviennent toutes de prélèvements biologiques. Les souches utilisées sont :

- Pour T. rubrum : Tr 38
- Tr 39
- Tr 42
- Tr 45
- Tr 46
- Tr 50
- Tr 52

et T. rubrum souche africaine (Tr af) : Tr af 1

Tr af 2

- Pour T. interdigitale (T. i) : Ti 14
- Ti 17
- Ti 18
- Ti 19
- Ti 20
- Ti 24
- Ti 29
- Pour T. mentagrophytes (Tm) : Tm 3
- Tm 4
- Pour M. canis (M. c) : M c 1
- M c 8
- M c 9
- M c 10
- M c 11
- M c 12
- Pour M. langeronii (Ml) : Ml 1

- Pour <i>E. floccosus</i> (Ef) :	Ef 4
	Ef 7
	Ef 8
	Ef 9
	Ef 10
	Ef 11
	Ef 12
	Ef 14

Dans la mesure du possible, nous avons utilisé pour chaque espèce les mêmes souches pour tous les essais. Il est ainsi arrivé que certaines de ces souches meurent durant cette période. Nous avons dû alors les remplacer pour continuer la réalisation de nos travaux.

1.1.5. L'inoculum :

a) Levures :

L'inoculum est constitué par une suspension de levures dans de l'eau ppi. Cette suspension contient 10^4 à 10^5 blastospores par millilitre. Ces levures proviennent d'une culture de 48 heures à 37°C sur milieu de Sabouraud-Chloramphenicol gélosé.

b) Dermatophytes :

L'inoculum est constitué par une culture de 5 jours à 25°C sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol liquide, additionné de 10 ml de Tween et de billes de verre, le tout sous agitation (13).

Les essais réalisés sur une espèce donnée sont effectués le même jour avec le même inoculum.

1.2. Protocole opératoire

1.2.1. Les levures

a) CMI précises en milieu liquide

La méthode utilisée est celle étudiée par Bernardaud (6). Il s'agit d'une microméthode en milieu liquide (YNB glucosé à 2%).

Pour effectuer ces manipulations nous utilisons des microplaques stériles. Tout au long du protocole nous travaillons dans des conditions stériles, c'est-à-dire :

- devant la flamme
- sous hôte à flux laminaire
- avec un matériel stérile.

Les différentes étapes sont les suivantes :

- Repiquage des souches :

Les souches sont repiquées 48 heures plus tôt sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol gélosé et placées dans l'étuve à 37°C.

- Préparation des solutions d'antifongiques :

Pour chaque produit nous avons préparé 10 ml de solution à la concentration de 1 mg.ml^{-1} .

Avec les imidazolés (Econazole, Miconazole, Kétoconazole, Bifonazole, Tioconazole, Sulconazole, Omoconazole, Butoconazole) et la Nystatine, le solvant est constitué par le mélange DMSO/Eau ppi (50 : 50).

Avec la Griséofulvine le solvant est constitué par le mélange Acétone/Eau ppi (50 : 50).

La Ciclopiroxolamine est mise en solution dans un solvant constitué du mélange méthanol-eau ppi (75 : 25).

(Ces solutions mères à 1 mg.ml^{-1} ont été utilisées pour tous les essais

effectués).

- Remplissage des microplaques (cf paragraphe 13) :

On utilise une microplaque pour chaque souche. Chaque rangée de cupules correspond à un antifongique et chaque colonne à une dilution d'antifongique.

Dans chaque cupule on dépose 40 μ l de milieu YNB glucosé à 2% avec une pipette automatique multicanaux. On ajoute ensuite dans la première cupule de chaque rangée la solution d'antifongique correspondant et l'on effectue des dilutions permettant d'obtenir les concentrations finales suivantes :

100 mg.ml⁻¹ - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,12 - 1,56 - 0,78 - 0,39
- 0,19 - 0,09.

Par conséquent, dans la première cupule de chaque rangée, on ajoute aux 40 μ l de milieu YNB, 40 de solution d'antifongique à 1 mg.ml⁻¹. On mélange et l'on reprend 40 μ l que l'on mélange aux 40 μ l de YNB de la cupule suivante, etc ...

Ceci jusqu'à la dernière cupule dont on rejette les 40 μ l excédentaires.

Ensuite on ajoute dans chaque cupule de la microplaque 160 μ l d'une solution d'inoculum constituée de la façon suivante :

Une öse de levures est placée dans 20 ml d'eau distillée stérile et l'on redilue cette solution au 1/10ème dans de l'eau distillée stérile. (On vérifie la concentration de l'inoculum 10⁴ - 10⁵ Blastospores/ml)

- Témoins :

Une cupule de la microplaque sert de témoin.

Elle est remplie avec : - 40 μ l de milieu YNB glucosé à 2%
- 40 μ l de solvant (DMSO, Acétone
ou méthanol)

- 160 μ l d'inoculum.

- Incubation :

Les microplaques sont fermées et placées 48 heures à l'étuve à 37°C.

- Lecture des résultats :

Les CMI sont déterminées par observation de visu à la loupe binoculaire. Pour chaque antifongique la CMI correspond à la concentration de la 1ère cupule présentant une inhibition de la croissance fongique. Chacune de ces cupules est ensuiteensemencée sur milieu de Sabouraud-Chloramphenicol gélosé afin de déterminer avec précision la concentration fongicide.

b) Antifongigramme en milieu gélosé selon la méthode des puits.

Il s'agit d'essais qualitatifs. Nous avons utilisé le milieu casitone pour tous les produits sauf un, la Ciclopiroxolamine qui ne diffuse pas dans cette gélose. Cette molécule a été étudiée sur milieu semi-synthétique (IPP).

- Inoculum :

C'est une suspension obtenue en mettant en suspension une ose de culture de levures dans 10 ml d'eau distillée stérile.

- Protocole :

Dans des boîtes de pétri carrées (12 cm x 12), 30 ml de milieu Casitone ou semi-synthétique en surfusion sont mélangés à 2 ml de la suspension de levures.

Chaque boîte de pétri correspond à une souche. Dans la gélose solidifiée on effectue à l'emporte-pièce des puits de 3 mm de diamètre. (Chaque boîte permet d'étudier 8 antifongiques). Chaque puits est rempli avec 15 μ l d'une dilution d'antifongique. Pour chaque produit on étudie 3 dilutions : 100 μ g.ml - 10 μ g.ml et 1 μ g.ml ou 1000 μ g.ml, 100 μ g.ml et 10 μ g.ml .

- Témoin :

Le puits témoin est rempli avec 15 μ l de solvant.

- Incubation :

Les boîtes de pétri sont incubées 48 heures dans une étuve à 37°C.

- Lecture des résultats :

Nous faisons une lecture après 24 et 48 heures d'incubation. Pour chaque puits on mesure le diamètre des zones d'inhibition de la croissance fongique.

c) Antifongigramme en milieu gélosé selon la méthode des disques

Nous avons exécuté cette technique pour 3 antifongiques seulement (Nystatine, Miconazole, Econazole) dont les disques sont disponibles dans le commerce. Comme précédemment nous travaillons sur milieu casitone. Ce milieu est coulé en surfusion dans des boîtes de pétri. L'ensemencement est fait par inondation en plaçant dans le fond de la gélose 2ml d'une suspension de levures obtenue en mettant en suspension une òse de culture dans 10 ml d'eau distillée stérile.

On utilise une boîte de pétri par souche. Les disques sont placés sur la gélose solidifiée à distance convenable les uns des autres, à l'aide d'une pince.

- Incubation :

Les boîtes sont incubées 48 heures dans une étuve à 37°C.

- Lecture des résultats :

Les résultats sont exprimés qualitativement par le diamètre d'inhibition de la croissance fongique sur ce milieu. La lecture se fait après 24 à 48 heures d'incubation.

1.2.2. Dermatophytes :

a) CMI précises en milieu liquide

Nous utilisons exactement la même technique que celle ayant servi à la détermination des CMI précises sur les levures (1.2.1. a/). Les modifications du protocole concernent le repiquage des souches, l'inoculum, le temps d'incubation.

- Repiquage des souches :

Les souches sont repiquées 5 jours plus tôt. On place un morceau de culture de dermatophyte entretenue sur milieu au malt gélosé dans 50 ml de milieu Sabouraud-Chloramphenicol liquide additionné de 10 ml de Tween et de billes de verre. Ces cultures restent 5 jours sous agitation à 25°C. On obtient une suspension contenant des spores et des filaments.

- Inoculum :

Il est constitué de 160 μ l de la suspension précédente.

- Incubation:

L'incubation dure 5 jours à 25°C.

- Lecture des résultats :

Elle se fait par observation de visu à J4 et J5 à la loupe binoculaire des cupules présentant une inhibition de la croissance fongique. La CMI correspond à la 1ère dilution dans laquelle on constate cette inhibition.

b) CMI approchées en milieu solide

Pour chaque souche de dermatophyte on prend 3 boîtes de pétri de 5 cm de diamètre. Dans chacune on introduit 1 ml d'une dilution d'antifongique de raison 10. Dans une boîte de pétri on dépose 1 ml de solution à 100 μ g.ml⁻¹ dans une autre la solution à 10 μ g.ml⁻¹

et dans la dernière elle est à $1 \mu\text{g.ml}^{-4}$

Les solutions sont préparées à partir des solutions mères à 1mg.ml^{-4} avec de l'eau distillée stérile. On coule ensuite dans chaque boîte de pétri 10 ml de milieu Sabouraud-Chloramphenicol en surfusion.

- Inoculum :

On ensemence le centre de la gélose avec un fragment de culture de dermatophyte prélevé sur une culture de 5 jours sur milieu au malt.

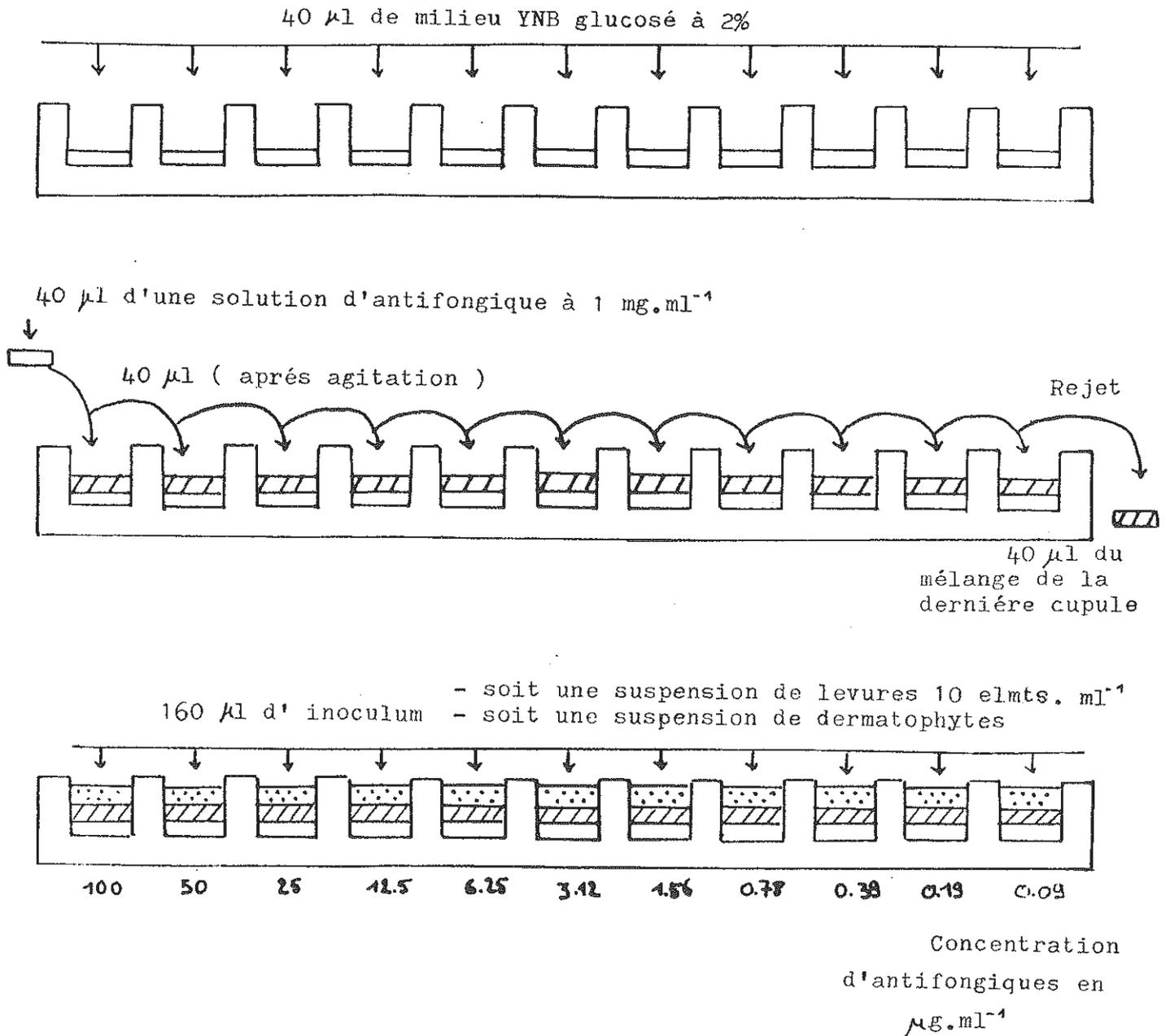
- Incubation:

Elle dure 5 jours à 25°C .

- Lecture des résultats :

Elle se fait à J4 et J5. On note la concentration qui inhibe la croissance fongique.

1.3. Résumé schématique de la détermination des CMI en milieu liquide pour les levures et les dermatophytes



Incubation : 48 heures à 37°C pour les levures
5 jours à 25°C pour les dermatophytes.

Lecture des CMI à la loupe binoculaire.

2. Résultats

2.1. CMI et diamètres d'inhibition

a) Levures :

Tableaux n° 1 à 3

b) Dermatophytes :

Tableaux n° 4 à 9.

N.B. Dans tous les cas l'effet antifongique des solvants est nul ou négligeable.

ANTIFONGIQUES	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	ANTIFONGIGRAMME par la méthode des puits					ANTIFONGIGRAMME par la méthode des disques
		1000 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		
GRISEOFULVINE	>100	R	R	R			
NYSTATINE	6,25-50	24-28	8-19	R		18-23	
ECONAZOLE	3,12-6,25	22-36	16-30	10-20		19-32	
MICONAZOLE	0,39-1,56	18-32	8-20	8-16		9-26	
KETOCONAZOLE	100	12-32	10-28	6-24			
BIFONAZOLE	12,5-100	10-24	6-8	R			
TIOCONAZOLE	6,25-25	28-34	14-28	12-30			
SULCONAZOLE	3,12-12,5		17-30	17-25	0-22		
OMOCONAZOLE	12,5-25		11-23	14-20	0-20		
BUTOCONAZOLE	0,38-1,25		25-37	20-30	15-25		
CICLOPIROXOLAMINE	0,78-6,25	25-33	11-19	R			

TABLEAU N°1 : Candida albicans (8 souches)

ANTIFONGIQUES	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	ANTIFONGIGRAMME par la méthode des puits				ANTIFONGIGRAMME par la méthode des disques
		1000 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	
GRISEOFULVINE	>100	R	R	R		
NYSTATINE	1,56-6,25	22-30	12-14	R		19-22
ECONAZOLE	0,19-1,56	22-34	18-28	12-22	0-7	21-35
MICONAZOLE	0,04-0,78	18-28	16-22	8-16		18-26
KETOCONAZOLE	25-100	28-42	22-32	14-22		
BIFONAZOLE	12,5-25	14-27	8-14	R		
TIOCONAZOLE	1,56-6,25	30-43	20-30	14-22		
SULCONAZOLE	0,78-12,5		18-20	11-16	1-15	
OMOCONAZOLE	3,12-6,25		12-22	7-15	0-10	
BUTOCONAZOLE	0,04-1,25		23-37	19-34	15-17	
CICLOPIROXOLAMINE	1,56-6,25	28-31	13-18	R		

TABLEAU N°2 : Candida tropicalis (5 souches)

ANTIFONGIQUES	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	ANTIFONGIGRAMME par la méthode des puits				ANTIFONGIGRAMME par la méthode des disques
		1000 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	100 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	10 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	1 ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	
GRISEOFULVINE	>100	R	R	R		
NYSTATINE	6,25-12,5	23-30	10-14	R		21-22
ECONAZOLE	0,39-0,78	30-34	24-30	16-26	0-10	26-32
MICONAZOLE	0,19-0,39	21-30	18-22	10-16		22-26
KETOCONAZOLE	25	22-28	15-20	R		
BIFONAZOLE	12,5-25	20-28	10-18	8-14		
TIOCONAZOLE	1,56-3,12	32-36	24-30	8-18		
SULCONAZOLE	3,12-25		23-34	15-20	0-14	
OMOCONAZOLE	0,78-12,5		15-32	11-18	0-12	
BUTOCONAZOLE	0,04-1,25		27-38	20-27	12-15	
CICLOPIROXOLAMINE	1,56-3,12	28-32	12-19	R		

TABLEAU N°3 : Torulopsis glabrata (5 souches)

<i>ANTIFONGIQUES</i>	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI approchées en milieu solide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
GRISEOFULVINE	0,39-100	100
NYSTATINE	0,78-50	100
ECONAZOLE	0,09-12,5	10
MICONAZOLE	0,78-100	10
KETOCONAZOLE	0,78->100	100
BIFONAZOLE	0,78->100	100
TIOCONAZOLE	0,09-50	10
SULCONAZOLE	3,12-6,25	
OMOCONAZOLE	3,12-100	
**BUTOCONAZOLE	0,63-5	
CICLOPIROXOLAMINE	6,25-25	<1 *

TABLEAU N°4 : *Trichophyton rubrum* (5 souches)* 2 souches à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

** 8 souches

<i>ANTIFONGIQUES</i>	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI approchées en milieu solide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
GRISEOFULVINE	0,78-100	>100
NYSTATINE	1,56-100	>100
ECONAZOLE	0,39-25	10
MICONAZOLE	0,39-25	100
KETOCONAZOLE	25-100	>100
BIFONAZOLE	3,12-50	>100
TIOCONAZOLE	0,39-100	100
SULCONAZOLE	0,19-6,25	
OMOCONAZOLE	0,19-12,5	
*BUTOCONAZOLE	0,32-5	
CICLOPIROXOLAMINE	25-50	

TABLEAU N°5 : Trichophyton interdigitale (3 souches)

* 8 souches

<i>ANTIFONGIQUES</i>	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI approchées en milieu solide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
GRISEOFULVINE	3,12	
NYSTATINE	6,25	
ECONAZOLE	6,25	
MICONAZOLE	1,56	
KETOCONAZOLE	25	
BIFONAZOLE	100	
TIOCONAZOLE	1,56	
SULCONAZOLE	>100	
OMOCONAZOLE	>100	
BUTOCONAZOLE		
CICLOPIROXOLAMINE	25	100

TABLEAU N°6 : Trichophyton mentagrophytes (1 souche)

<i>ANTIFONGIQUES</i>	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI approchées en milieu solide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
GRISEOFULVINE	3,12-50	100
NYSTATINE	3,12-50	100
ECONAZOLE	0,09-12,5	10
MICONAZOLE	0,39-50	100
KETOCONAZOLE	0,39-50	1000
BIFONAZOLE	0,39-25	100
TIOCONAZOLE	6,25-50	1000
SULCONAZOLE	0,78-25	
OMOCONAZOLE	3,12-50	
* BUTOCONAZOLE	0,32-5	
CICLOPIROXOLAMINE	25-50	100

TABLEAU N°7 : *Microsporium canis* (5 souches)

* 3 souches

<i>ANTIFONGIQUES</i>	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI approchées en milieu solide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
GRISEOFULVINE	6,25	
NYSTATINE	6,25	
ECONAZOLE	12,5	
MICONAZOLE	25	
KETOCONAZOLE	6,25	
BIFONAZOLE	50	
TIOCONAZOLE	6,25	
SULCONAZOLE		
OMOCONAZOLE		
BUTOCONAZOLE		
CICLOPIROXOLAMINE	12,5	100

TABLEAU N°8 : *Microsporium langeronii* (1 souche)

<i>ANTIFONGIQUES</i>	CMI en milieu liquide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	CMI approchées en milieu solide ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
GRISEOFULVINE	0,39-12,5	100
NYSTATINE	0,78-12,5	10
ECONAZOLE	0,09-25	<1
MICONAZOLE	0,78-50	100
KETOCONAZOLE	0,39-12,5	>100
BIFONAZOLE	0,39-50	10
TIOCONAZOLE	0,39-50	100
SULCONAZOLE	0,19-3,12	
OMOCONAZOLE	0,19-3,12	
BUTOCONAZOLE	0,08-0,63	
CICLOPIROXOLAMINE	12,5-50	<1

TABLEAU N°9 : *Epidermomyces floccosus* (5 souches)

2.2. Fréquence des CMI en milieu liquide par espèce et par antifongique

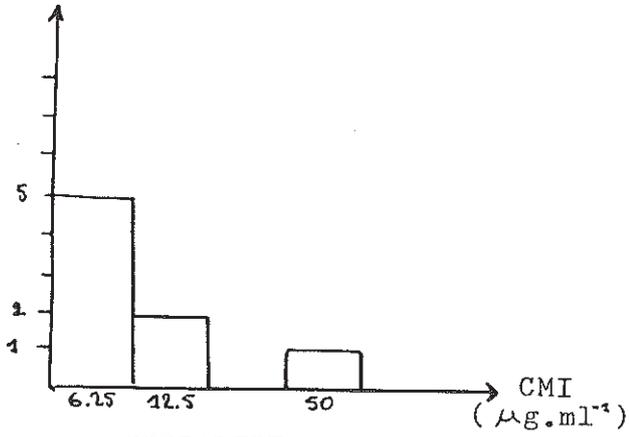
a) Levures:

graphiques n° 1 à 3

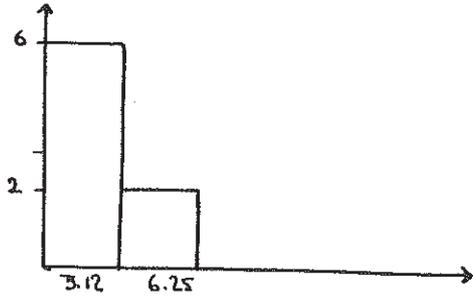
b) Dermatophytes:

graphiques n° 4 à 7

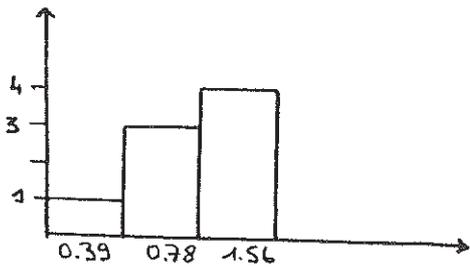
Nombre de souches



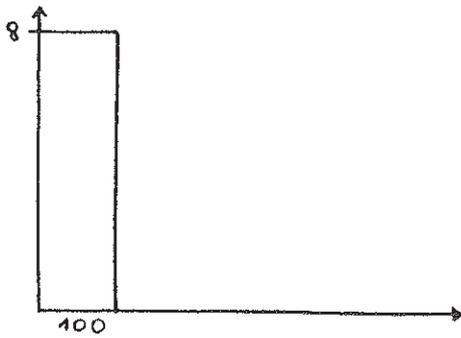
NYSTATINE



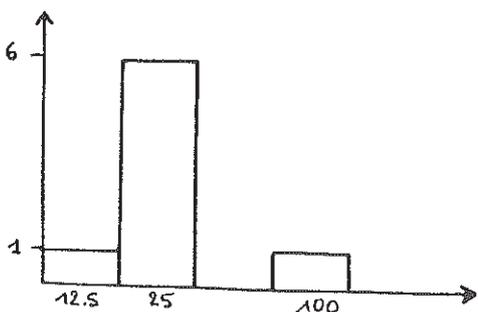
ECONAZOLE



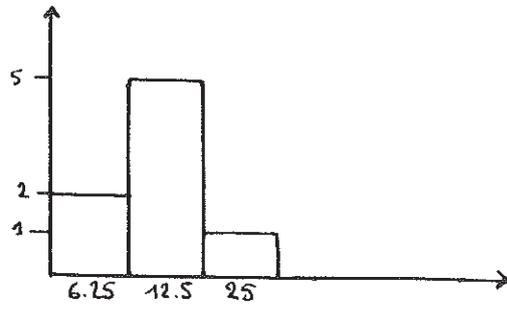
MICONAZOLE



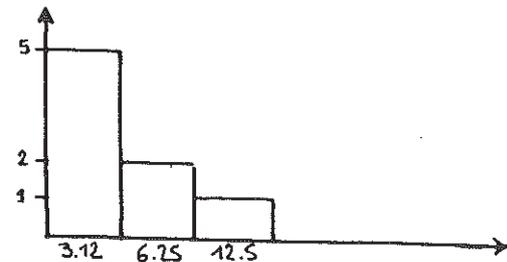
KETOCONAZOLE



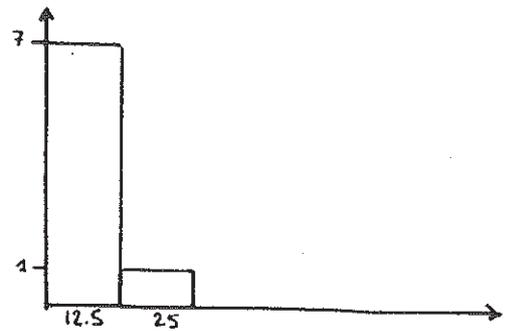
BIFONAZOLE



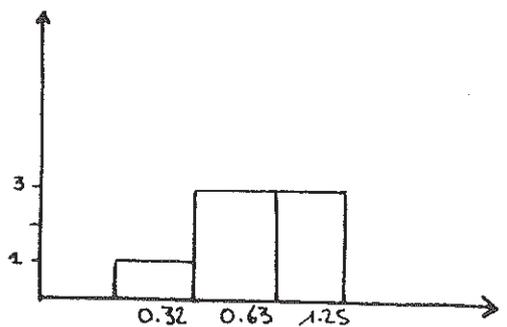
TIOCONAZOLE



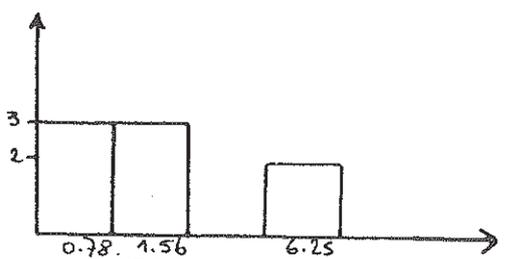
SUCCONAZOLE



OMOCONAZOLE



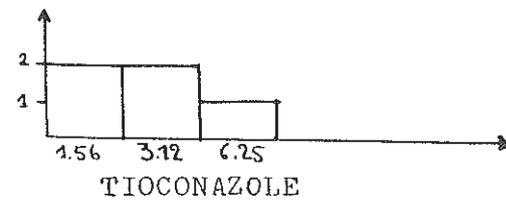
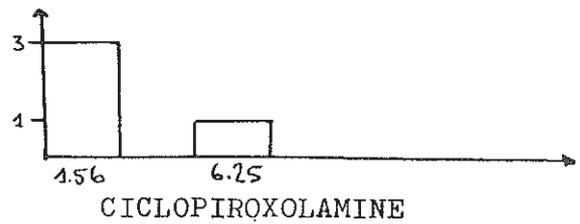
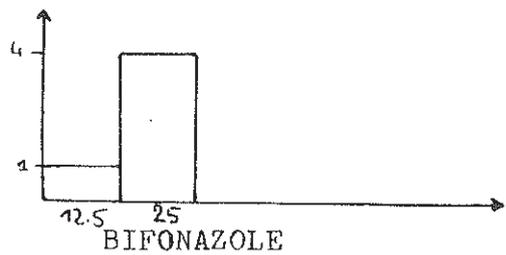
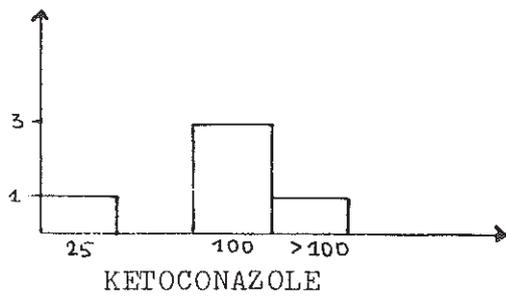
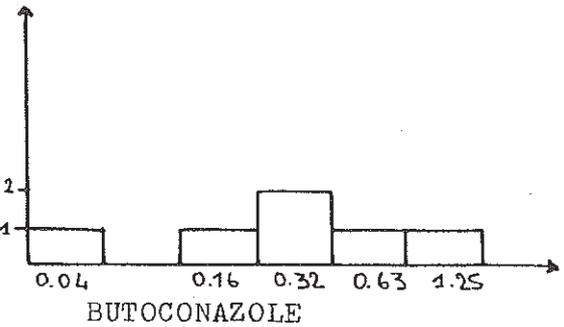
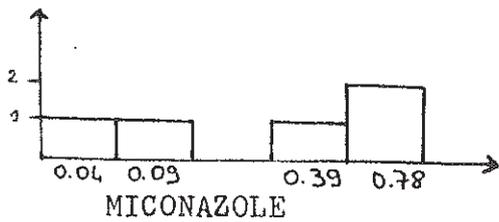
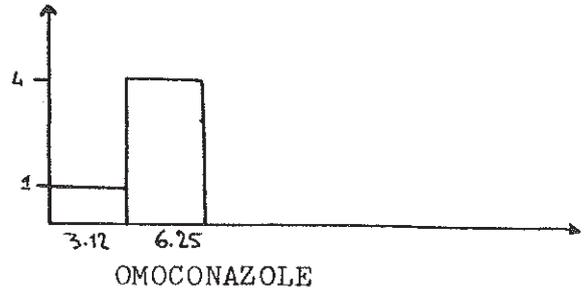
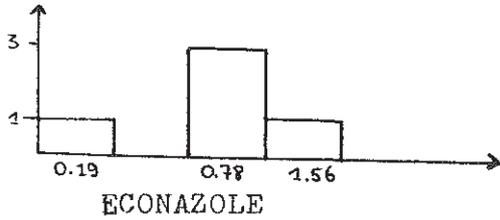
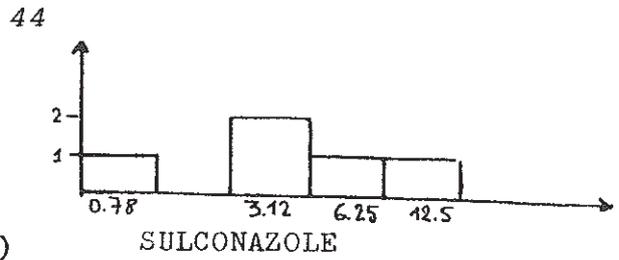
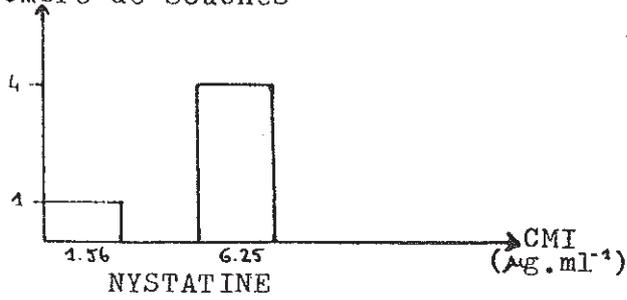
BUTOCONAZOLE



CICLOPIROXOLAMINE

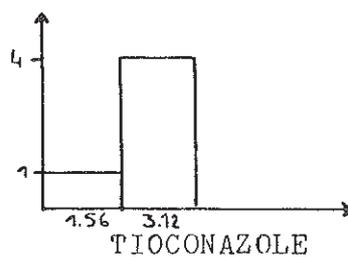
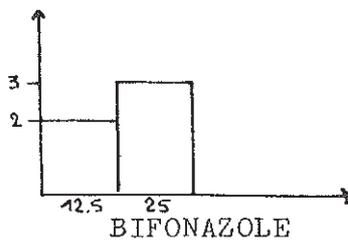
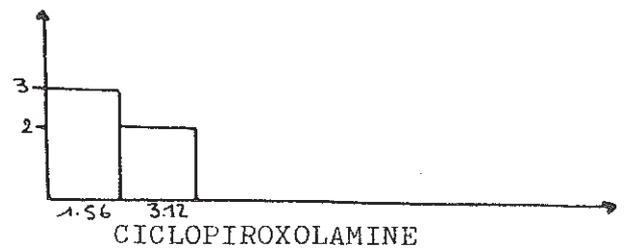
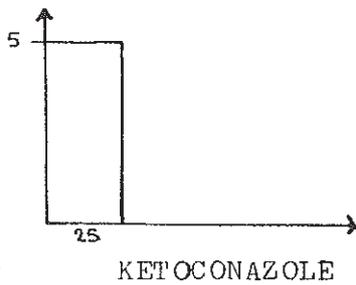
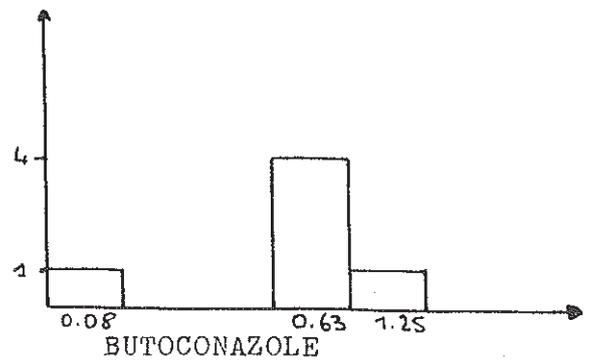
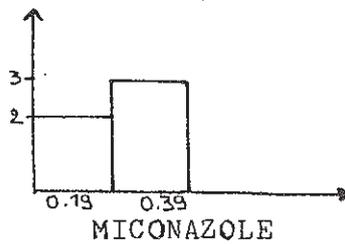
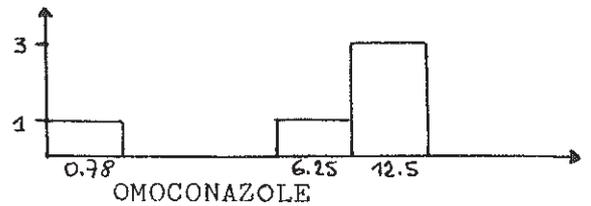
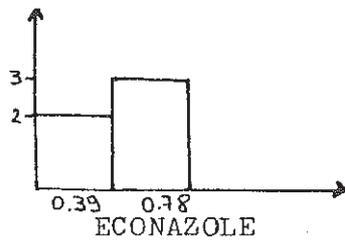
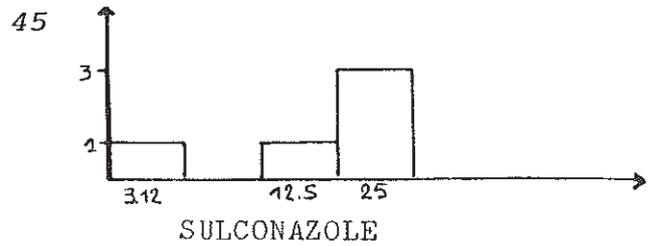
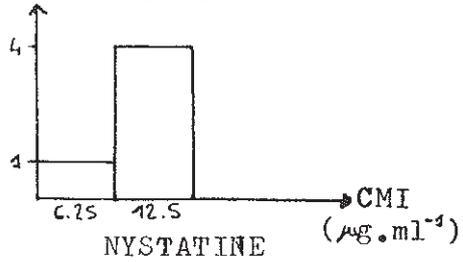
Graphique n 1 : C. albicans (8 souches)

Nombre de souches



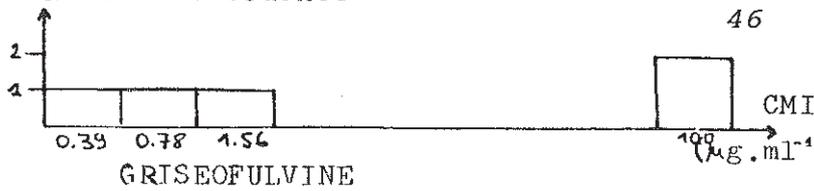
Graphique n° 2 : *C.tropicalis* (5 souches)

Nombre de souches



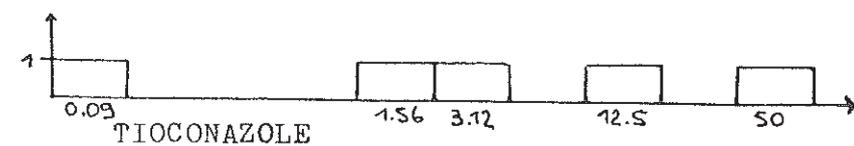
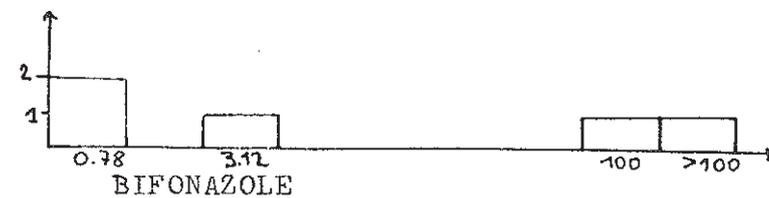
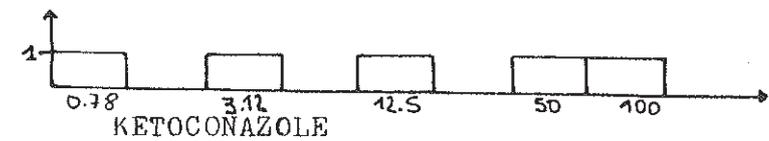
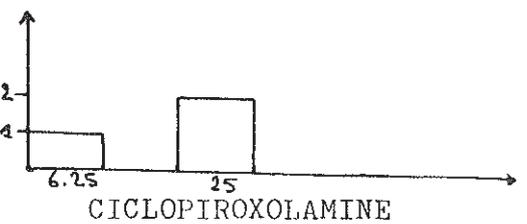
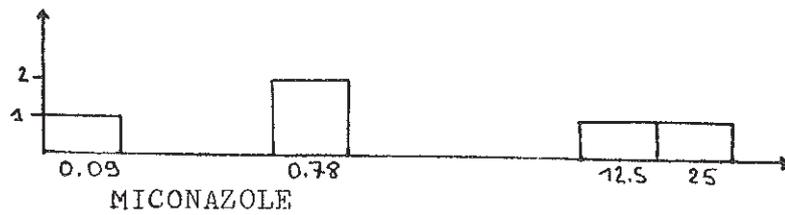
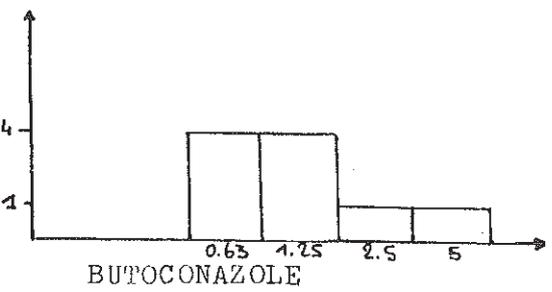
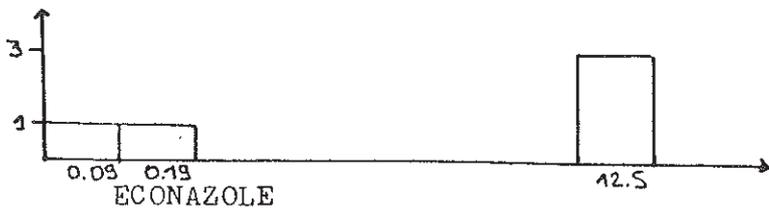
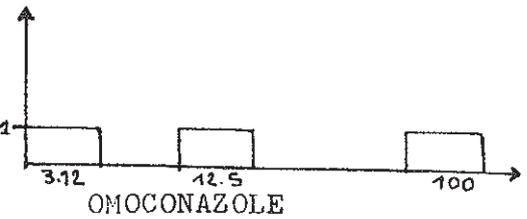
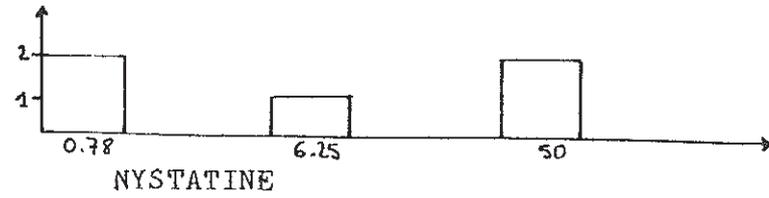
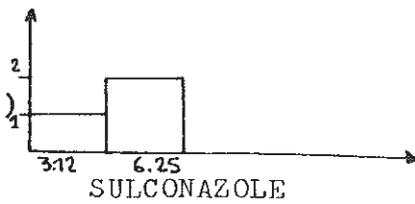
Graphique n°3 : *T.glabrata* (5 souches).

Nombre de souches



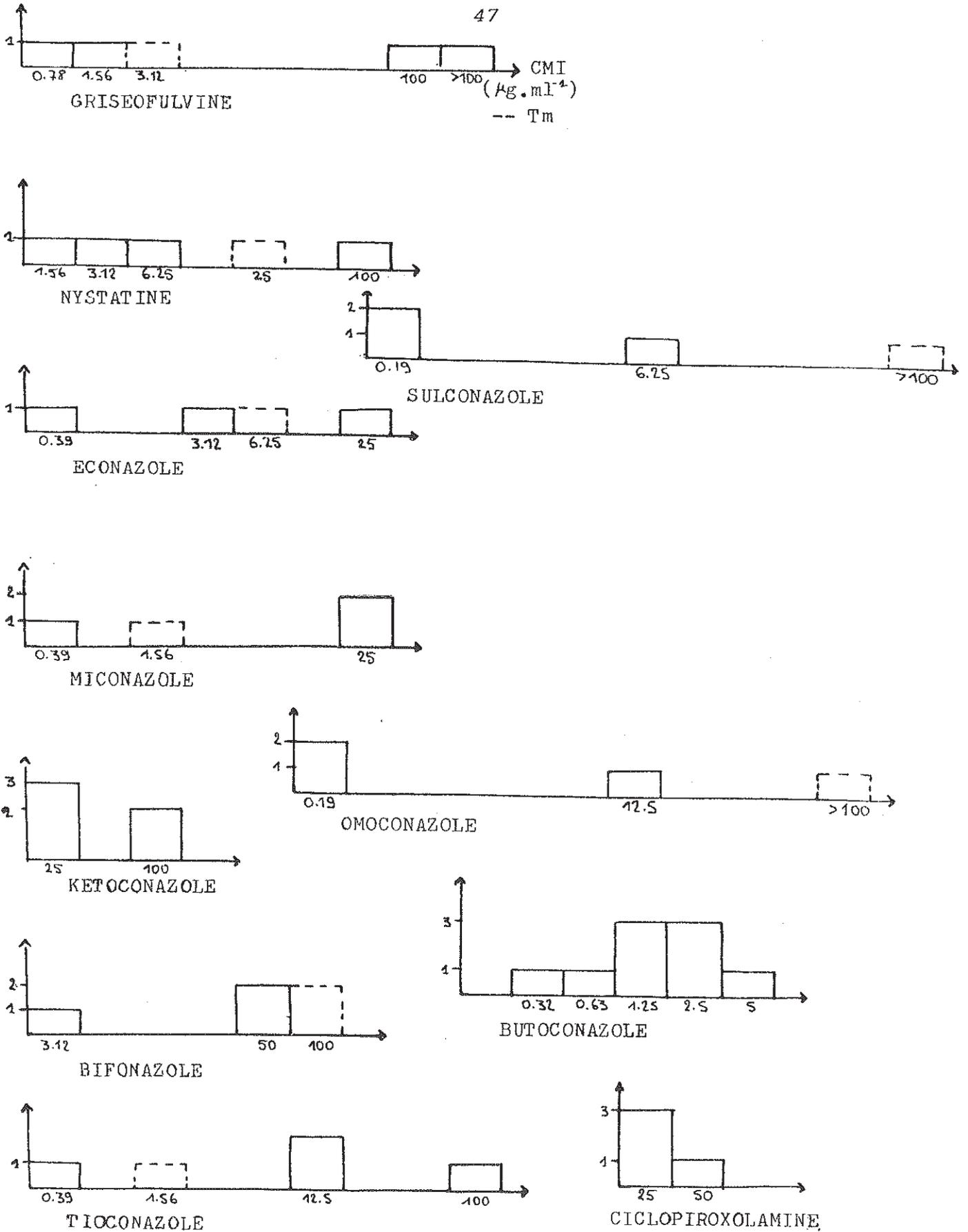
46

CMI 2
(µg.ml⁻¹)

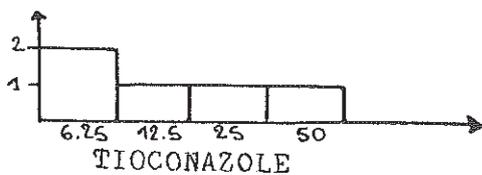
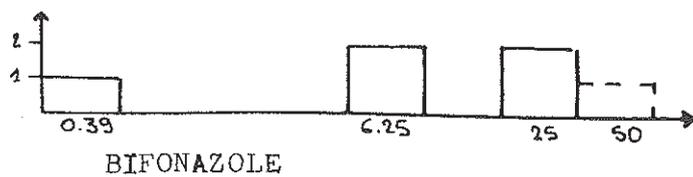
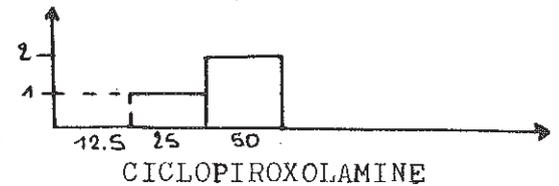
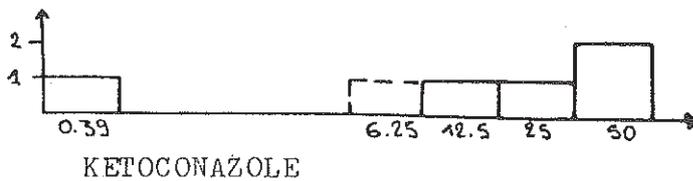
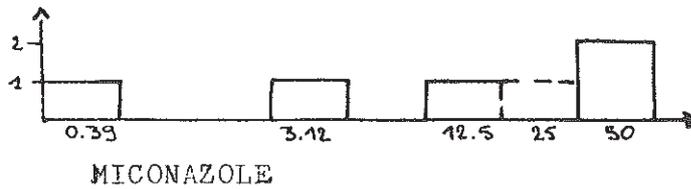
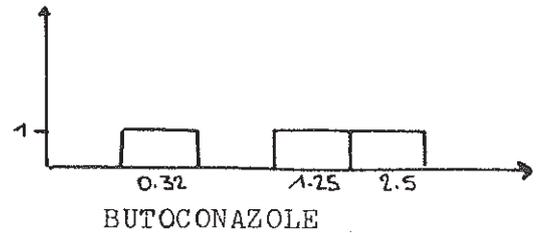
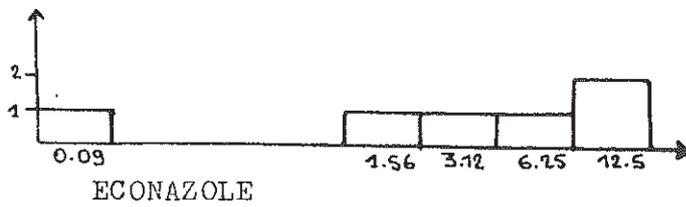
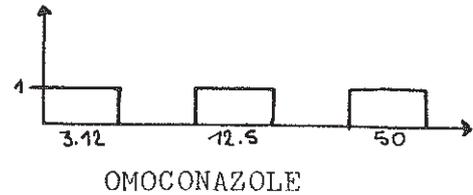
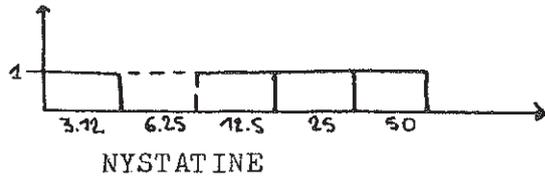
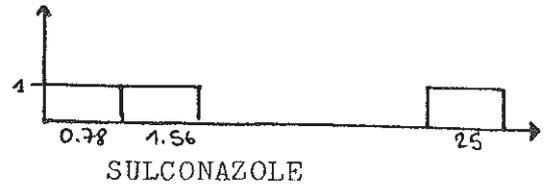
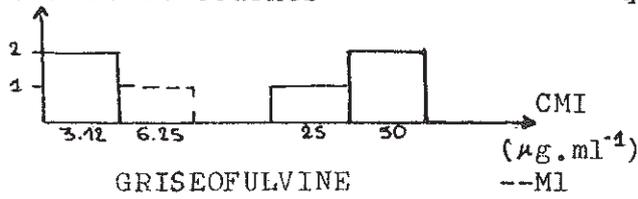


Graphique n°4 : Trichophyton rubrum (5 souches)

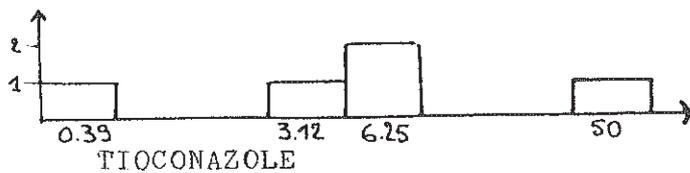
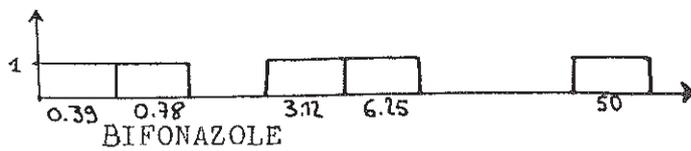
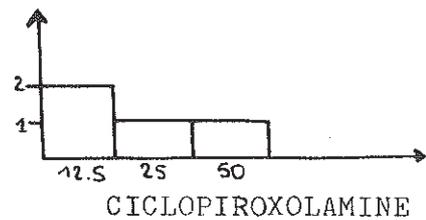
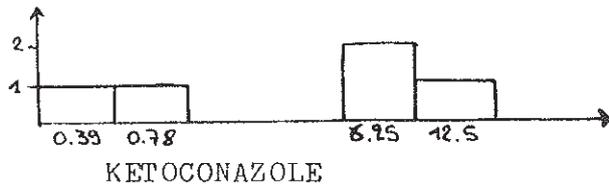
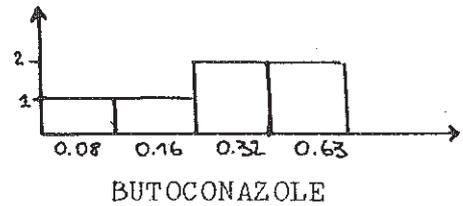
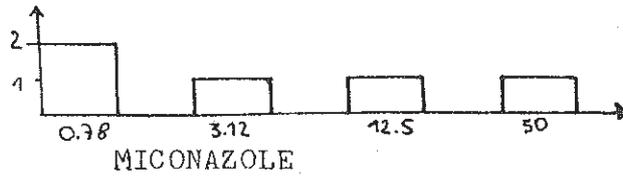
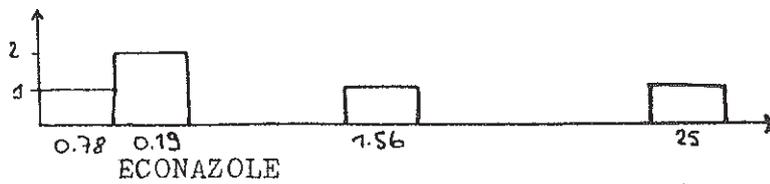
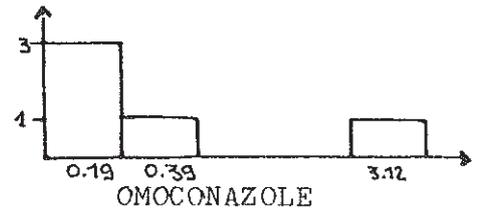
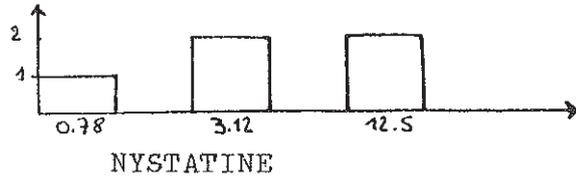
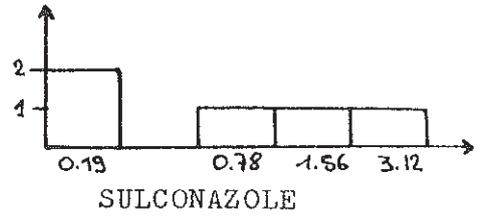
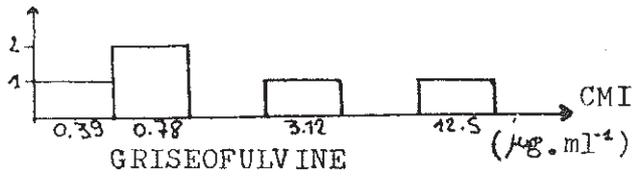
Nombre de souches



Graphique n°5 : T. interdigitale (3 souches) et
T. mentagrophytes (1 souche)



Graphique n°6 : *M.canis* (5 souches) et
M. langeronii (1 souche)



Graphique n°7 : E.floccosus (5 souches)

2.3. Commentaires

2.3.1. Levures

a) *Candida albicans*

C'est avec le Miconazole et le Butoconazole que l'on obtient les CMI les plus basses avec les intervalles de valeurs les plus étroits. De plus la fréquence des CMI de ces 2 produits est homogène.

Le Butoconazole a les diamètres d'inhibition les plus grands alors que ceux du Miconazole sont nettement plus petits, inférieurs même à ceux des autres imidazolés.

La Griséofulvine est sans effet sur les levures. Nous le constatons ici sur les 3 espèces.

La Nystatine est active mais à des CMI relativement élevées.

Dans l'ensemble, ce sont les imidazolés et la Ciclopiroxolamine qui obtiennent les meilleurs résultats, notamment le Butoconazole, le Miconazole et la Ciclopiroxolamine. Les CMI du Kétoconazole sur *C. albicans* sont élevées, mais les mauvais résultats in vitro de ce produit sont connus et il ne faut donc pas se hâter de conclure.

b) *Candida tropicalis*

Les CMI les plus basses sont obtenues avec les imidazolés surtout le Miconazole et le Butoconazole puis l'Econazole. Il faut faire les mêmes restrictions en ce qui concerne les diamètres d'inhibition observés avec le Miconazole. Ici aussi c'est le Butoconazole qui a les diamètres d'inhibition les plus grands, suivi de près par le Tioconazole et le Kétoconazole.

Comme pour *C. albicans*, le Kétoconazole et le Bifonazole ont des CMI élevées.

Pour *C. tropicalis* les CMI de la Ciclopiroxolamine bien qu'étant faibles, sont supérieures à celles des meilleurs imidazolés. Elles sont comparables à celles de l'Econazole, du Tioconazole et même de la Nystatine qui donne de meilleurs résultats qu'avec *C. albicans*.

c) *Torulopsis glabrata*

La sensibilité des souches de *T. glabrata* évaluées est comparable à celle de *C. tropicalis* pour tous les produits sauf la Nystatine dont l'efficacité est moindre.

Là encore, comme pour les 2 autres espèces de levures, on remarque que le Kétoconazole et le Bifonazole ont des CMI très élevées.

Ce sont le Butoconazole, le Miconazole et l'Econazole qui, ici aussi, ont les valeurs des CMI les plus faibles avec des fourchettes extrêmement étroites, notamment pour le Miconazole et l'Econazole.

Si l'on observe pour ces trois produits quelle est la CMI la plus fréquente, on constate que le Miconazole arrive en premier (il a la CMI la plus fréquente, la plus basse des trois soit $0,39 \mu\text{g.ml}^{-4}$) suivi par le Butoconazole ($0,63 \mu\text{g.ml}^{-4}$) et l'Econazole ($0,73 \mu\text{g.ml}^{-4}$). En fait, on peut considérer que ces 3 produits ont des résultats équivalents, l'écart d'une ou deux dilutions étant non significatif.

L'intervalle des résultats obtenus avec l'Omoconazole est très étendu, la CMI la plus fréquente pour chacun d'eux est la plus élevée. Par contre, on remarque encore une fois une assez grande homogénéité de leurs résultats ; en effet pour ces 2 produits,

3 souches sur 5 ont la même CMI.

Comme avec *C. albicans* et *C. tropicalis* le Butoconazole donne les diamètres d'inhibition les plus grands, donc les meilleurs. Une fois encore ceux du Miconazole sont faibles surtout par rapport aux CMI obtenues. Ceci résulte certainement d'un phénomène de diffusibilité du produit dans la gélose.

Le Tioconazole, le Sulconazole, l'Omoconazole, dont les CMI sont plus élevées que celles du Miconazole ont de meilleurs résultats en ce qui concerne les diamètres d'inhibition. Il en est de même pour la Ciclopiroxolamine.

2.3.2. Dermatophytes

a) *Trichophyton rubrum*

Les CMI obtenues en milieu liquide s'étendent sur des intervalles assez larges. Ce phénomène est lié à de grandes différences de sensibilité entre les souches étudiées. Toutefois, deux des imidazolés étudiés donnent des résultats plus stables que les autres. Ce sont le sulconazole (mais ses CMI sont relativement élevés: 3,12 à 6,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) et le Butoconazole. Pour ce dernier, les CMI les plus fréquentes sont basses: 0,63 à 1,25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Ce sont l'Econazole, le Miconazole et le Tioconazole qui donnent les CMI les plus basses (0,09 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

Il est à noter que pour l'Econazole, la CMI la plus fréquente est également la plus élevée (12,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), alors que pour le Miconazole c'est 0,78 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ qui est la valeur la plus souvent trouvée.

L'étalement des résultats du Tioconazole présente une certaine stabilité. Aucune CMI ne domine par sa fréquence.

Ces produits sont suivis par la Griséofulvine, le Kétoconazole et le Bifonazole dont les CMI les plus basses sont assez favorables (0,39 à 0,78 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) mais dont les intervalles de valeurs sont plus grands, puisque les CMI vont jusqu'à 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ et même au delà (Bifonazole). Le Sulconazole, l'Onoconazole et la Ciclopiroxolamine obtiennent de moins bons résultats (3,2 ou 6,25 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

Les CMI du Sulconazole et de la Ciclopiroxolamine sont plus homogènes que celles de l'Omoconazole dont l'éventail des résultats est assez large.

b) Trichophyton interdigitale et mentagrophytes

Les CMI obtenues sont comprises dans des intervalles comparables à ceux de T.rubrum, avec d'une façon générale, une sensibilité plus faible de ces deux espèces (T.rubrum et interdigitale) aux antifongiques.

Les CMI obtenues avec T.Mentagrophytes sont en général assez élevées. Le meilleur résultat est 1,56 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ pour le Miconazole et le Tioconazole.

L'Omoconazole et le Sulconazole donnent sur cette espèce de très mauvais résultats ($>100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

Il serait intéressant d'évaluer la sensibilité d'autres souches de cette espèce.

L'Omoconazole et le Sulconazole ont les valeurs extrêmes les plus basses sur T. interdigitale. La CMI la plus basse la plus fréquemment obtenue est 0,19 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

Ces deux molécules obtiennent des résultats comparables qui sont répartis sur des intervalles assez larges mais moins que ceux des autres produits.

L'Econazole, le Miconazole et le Tioconazole viennent ensuite. Comme précédemment, les résultats de ces trois produits sont très proches.

c) *Microsporum canis* et *Microsporum langeronii*

Les CMI obtenues avec les souches de *M.canis* étudiées sont globalement basses avec des valeurs remarquables pour l'Econazole, le Miconazole, le Kétoconazole, le Bifonazole, le Sulconazole, le Butoconazole.

Il est à noter ici les bons résultats du Kétoconazole et du Bifonazole, alors qu'ils étaient médiocres avec les espèces précédentes.

Parmi les produits donnant les meilleurs résultats, le Butoconazole est celui qui a l'intervalle de valeurs le plus étroit. L'intervalle des CMI des autres molécules reste étendu. L'Omoconazole, le Tioconazole, la Griséofulvine ainsi que la Nystatine donnent de moins bons résultats avec des intervalles très larges.

Avec l'unique souche de *M.Langeronii* étudiée, les CMI obtenues sont assez élevées (pas une valeur n'est inférieure à $6,25 \mu\text{g.ml}^{-4}$). Bien qu'il soit hâtif de conclure sur ce genre résultats, cette espèce strictement anthropophile et très contagieuse semble moins sensible aux antifongiques que les espèces zoophiles.

d) *Epidermomyces floccosus*

L'ensemble des produits étudiés donnent de très bons résultats sur les souches d'*E.floccosus*. Seule la Ciclopiroxolamine a des résultats moins favorables.

Sa CMI la plus basse est $12,5 \mu\text{g.ml}^{-4}$ donc nettement supérieure à celle de tous les autres produits (et même à celle de la Nystatine qui n'est pas définie comme étant active sur les dermatophytes).

Parmi les CMI les plus basses relevées, c'est une fois de plus le Butoconazole et l'Econazole qui donnent les meilleurs résultats: respectivement 0,08 et 0,09 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Par contre l'intervalle des valeurs de l'Econazole est très large puisqu'il va jusqu'à 25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, alors que celui du Butoconazole est étroit (0,08 à 2,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$).

L'intervalle des CMI du Kétoconazole est moins large que celui de l'Econazole et ses résultats sont meilleurs que ceux du Miconazole. Ici le Miconazole est moins actif que sur les espèces de dermatophytes.

Si l'on s'intéresse à la fréquence des CMI, c'est le Sulconazole, l'Omoconazole, et l'Econazole qui ont les meilleurs résultats avec comme CMI la plus fréquente 0,19 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, donc une très faible dilution.

On constate que pour un même produit les CMI approchées déterminées sur milieu solide sont sensiblement les mêmes quelle que soit l'espèce étudiée. Elles confirment à chaque fois la valeur des CMI déterminées sur milieu liquide.

L'Econazole obtient une CMI approchée de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour toutes les espèces sauf *E.flocossus* avec laquelle la CMI est inférieure à 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Ce sont des résultats très favorables.

On peut dire que la détermination des CMI approchées semble confirmer les essais en milieu liquide, mais on ne peut rien généraliser, ce travail n'ayant pas été effectué pour toutes les molécules étudiées.

3. Discussion

3.1. Discussion sur les methodes d'essai des antifongiques in vitro

3.1.1. Difficultés liées à l'absence de standardisation et à des méthodes dérivées de la bactériologie

L'évaluation de la sensibilité des champignons pathogènes aux antifongiques, telle qu'elle dégage de la littérature, conduit à des résultats très divergents. Ces discordances tiennent en grande partie à l'absence de standardisation internationale des essais sur les antifongiques in vitro (9,12,21,56).

Afin d'effectuer un travail comparatif rigoureux nous nous sommes fixés comme but l'évaluation dans des conditions comparables et reproductibles des CMI de différents antifongiques vis à vis de différentes espèces de levures et de dermatophytes (Etude complétées dans certains cas par la détermination des diamètres d'inhibition sur milieu solide : Casitone ou Semi-synthétique). En utilisant la même méthode pour tous les antifongiques, nous savons très bien que chaque produit n'est pas étudié dans des conditions optimales d'efficacité, mais c'est la solution la moins mauvaise pour comparer équitablement ces produits. L'absence de standardisation des essais in vitro sur les antifongiques rend extrêmement difficile les études comparatives (12). Elle est responsable de résultats à la fois non reproductibles et discordants, ce qui a une double incidence (56).

- Au niveau du malade (on a une mauvaise appréciation des posologies d'antifongiques prescrits).

- Au niveau de l'appréciation des qualités respectives des antifongiques à la disposition des thérapeutes.

Afin d'éviter les deux pièges que nous venons de mentionner nous avons tenté d'évaluer les CMI des antifongiques dans des conditions à la fois identiques et reproductibles.

Notre étude, comme de nombreuses autres, met en évidence la nécessité de définir une méthode standardisée pour étudier in vitro les antifongiques (23,24). En effet chaque auteur ayant sa propre méthode, les résultats bibliographiques divergent souvent, d'où la difficulté de conclure à la fois sur l'action des différents produits et également sur l'intérêt des études in vitro.

De nombreux auteurs définissent la méthode qu'ils utilisent comme étant une méthode standardisée (25). En réalité, jusqu'à présent, aucune des méthodes préconisées n'était spécifique des organismes fongiques et tenait compte des particularités physiologiques et morphologiques des champignons pathogènes.

Les méthodes actuelles sont mieux adaptées à la bactériologie qu'aux organismes pluricellulaires dont l'aspect saprophytique et parasitaire est différent (21,42).

La conception, comme l'explique B.Dupont (21) de la triade classique de l'infection : Parasite, Hôte, Antifongique, est d'une importance particulière dans la chimiothérapie des mycoses. La constitution anatomique et la physiologie des champignons sont bien particulières, différentes entre autre de celles des bactéries. De ce fait, la plupart des antibactériens ne sont pas des antifongiques. La composition de la paroi cellulaire et de la membrane cytoplasmique joue un rôle considérable dans la perméabilité de la cellule. Toute substance susceptible d'agir sur ces cellules fongiques doit d'abord traverser ces enveloppes

formées de chitine (absente chez les bactéries), de polyosides (glucannes, mannanes) liés à des protéines, à des phospholipides et de stérols (absents chez les bactéries) (21).

Donc comment concevoir que l'on étudie les antifongiques avec des méthodes dérivées directement de la bactériologie?

Il existe une proposition d'une méthode standardisée adaptée à la mycologie. C'est une méthode utilisant le milieu Mycototal (4). Selon ses auteurs, cette méthode est :

- utilisable en routine
- homogène (même milieu, même inoculum pour tous les antifongiques)

- standardisée : la concentration finale de l'antifongique est parfaitement définie et reproductible. Les résultats sont fiables, peu sensibles à l'effet inoculum, facile à interpréter. De plus, il existe une concordance entre les résultats in vitro et l'activité in vivo des produits (4).

En ce qui concerne la méthode de diffusion en gélose, le problème est différent, car elle a été standardisée par un groupe de la société française de mycologie médicale (28) ;

Deux milieux ont été préconisés :

- le milieu semi-synthétique pour la 5 Fluorocytosine et les autres antifongiques de routine.

- un milieu complexe Casitone pour les polyènes et les imidazolés qui, sur ce milieu, présentent des zones d'inhibition plus nettes que sur le milieu semi-synthétique.

Mais la détermination des diamètres d'inhibition est moins intéressante car nettement moins précise que la détermination des CMI des antifongiques.

Pour les dermatophytes l'absence de standardisation des études

in vitro des antifongiques est encore plus préjudiciable que pour les levures (12). En effet, de par leur morphologie les dermatophytes sont très difficiles à manipuler.

L'inoculum est pratiquement impossible à quantifier rigoureusement car il est constitué de plusieurs formes du champignon (filaments et spores).

D'autre part notre expérience de l'étude in vitro des antifongiques sur les dermatophytes est peu importante. Les travaux antérieurs sont relativement peu nombreux, nettement moins que ceux effectués sur les levures (12).

Ceci s'explique : les dermatophytes n'étant responsables que de mycoses cutanées, l'intérêt thérapeutique de cette étude est moindre par rapport aux études faites sur les organismes comme les levures qui peuvent entraîner des affections systémiques gravissimes. Malgré tout, l'importante fréquence des mycoses cutanées dues aux dermatophytes a incité certains auteurs à étudier l'action des antifongiques sur ces espèces de champignons et notamment à voir si les antifongiques ont une action équivalente sur les spores et sur les mycéliums. Il ressort de ces études que les CMI obtenues sur des mycéliums ou sur des microconidies sont les mêmes. Donc l'action des antifongiques sur les dermatophytes est la même quelle que soit la phase de développement du parasite. Ceci conforte notre étude qui s'est effectuée sur un mélange de ces deux formes du dermatophyte.

Desvignes et Coll. (13) se sont posés la même question: l'action des antifongiques est-elle la même quelle que soit la morphologie du dermatophyte?

Ils ont utilisé pour leur étude la méthode de culture que nous avons reprise ici, c'est à dire l'action dispersante de Tween 80

et de billes de verre. Cette méthode permet d'obtenir une suspension homogène de dermatophytes (et non pas une suspension de conidies), ce qui peut être préparé avec une plus grande variété de souches. Cette méthode (13) montre que le comportement de suspensions homogènes de dermatophytes sur lesquelles on fait agir différents antifongiques a été le même que celui de suspensions de conidies.

Ces résultats mettent en évidence l'intérêt d'utiliser cette méthode de culture pour les dermatophytes. En effet, l'obtention de suspensions homogènes est plus facile et les antifongiques ont la même action sur les suspensions de conidies ou sur les suspensions homogènes de dermatophytes. Les résultats des travaux effectués avec la même méthode, à la fois sur les levures et les dermatophytes, mettent en évidence les difficultés qui existent à manipuler des dermatophytes, difficultés encore plus importantes que pour manipuler les levures. En effet si les résultats sont très souvent assimilables aux nôtres pour les levures, ils divergent nettement plus souvent pour les dermatophytes.

La grande difficulté de manipulation des champignons dimorphiques met encore une fois en évidence la nécessité de définir une méthodologie bien adaptée à la morphologie et à la physiologie des champignons, et de la standardiser.

Pour obtenir un meilleur contrôle de l'activité fongicide, Plempel et Coll. (42) proposent une méthode de culture adaptée strictement aux organismes fongiques: c'est une culture sur membrane de cellophane. Les champignons: dermatophytes, levures, moisissures, poussent sur membrane de cellophane stérile, en boîte de Petri, sur gélose de Kimmig durant 24 à 48 heures. Ensuite on transfère les cultures sur un milieu enrichi en antifongique.

La croissance saprophytique et parasitaire des champignons est différente, ceci aussi bien pour les levures que pour les dermatophytes. Or les méthodes actuelles ne tiennent pas compte de cette différence: sous forme parasitaire, les dermatophytes ne forment pas de macroconidies, microconidies et de mycélium aériens. Par contre, ils fabriquent des enzymes kératolytiques et des peptidases endogènes. Ces enzymes sont peu ou pas produites en phase saprophytique.

Plempel et Coll (42) proposent de cultiver les dermatophytes sur un milieu contenant sueur, peau et cheveux comme source d'azote. Alors le champignon présente une culture de type parasitaire, avec une composition en stérols de la membrane différente du mode saprophytique. De telles cultures réagissent mieux aux antifongiques actifs sur la synthèse de l'ergostérol (comme les imidazolés) que les cultures saprophytiques.

On retrouve la même différence pour les levures qui ont une croissance hyphale pendant leur stade parasitaire. Le mycélium de *C. albicans* est plus sensible aux inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol que les cellules bourgeonnantes (42). Odds et Coll (39) ont utilisé le procédé de culture sur membrane de cellophane sur milieu de Kimmig (42) pour étudier l'action du Bifonazole sur les dermatophytes. Ils obtiennent les mêmes valeurs de CMI que dans nos essais. D'ailleurs d'autres études ont montré que le choix du milieu n'influence pas le comportement des champignons dermatophytes (52) et les résultats de ces études s'intègrent également aux nôtres.

3.1.2 Particularités liées à la nature des antifongiques

La difficulté qui se pose lorsque l'on veut comparer l'activité de différents antifongiques in vitro est que chaque produit exige des conditions qui lui sont propres pour avoir une efficacité maximum (23). Or les études comparées supposent de traiter de la même façon toutes les molécules. Nous savons qu'ainsi nous serons certainement dans des conditions plus favorables pour certains antifongiques et moins favorables pour d'autres.

Mais un travail comparatif serait impossible en mettant chaque produit dans des conditions optimales d'efficacité. Cela nécessiterait un protocole d'étude différent pour chaque antifongique. De nombreux facteurs affectent avec une importance variable la détermination des CMI des antifongiques. Parmi les plus significatifs, on retient essentiellement: la nature et/ou la composition du milieu de culture, la nature des antifongiques, la densité de l'inoculum, la nature des souches étudiées, le type de lecture finale (35,38,56).

A l'intérieur de chaque classe d'antifongiques, les difficultés rencontrées lors d'études in vitro sont différentes. C'est ce que nous allons développer maintenant.

a/les polyènes et autres antibiotiques antifongiques.

Les polyènes sont faciles à étudier. Peu de facteurs influencent les CMI et les diamètres d'inhibition de ces produits. Ces derniers se caractérisent par des limites nettes (21). La plupart des milieux conviennent bien à leur étude (semi-synthétique, casitone). S'il existe un effet inhibiteur, il est peu important (21,28).

Comme les polyènes, la Griséofulvine, antibiotique obtenu à partir d'une souche de penicillium ne pose pas de difficultés particulières de méthodologie pour son étude in vitro.

b/Les imidazolés:

L'importance des conditions expérimentales dans la détermination de l'activité antifongique des dérivés imidazolés n'est plus à démontrer.

Différents facteurs doivent être contrôlés. En effet pour toute la classe des imidazolés, de nombreux paramètres influencent les CMI dont: la nature du milieu, son pH, la taille de l'inoculum ainsi que le temps et la température d'incubation, et le critère retenu comme point final (12,19,21,25,35,52,56,58).

- Nature du milieu de détermination des CMI:

Le choix du milieu utilisé pour déterminer les CMI des antifongiques imidazolés est un problème très délicat. Nous ne possédons pas encore de milieu idéal pour ce type d'étude.

Selon Bernardaud (6), c'est avec le milieu YNB tel qu'il est décrit par Shadomy (54) que l'on obtient la méthode la plus fiable et la plus sensible.

Ce milieu YNB glucosé à 2% permet une lecture plus rapide (le temps d'attente est diminué de 10 heures) (6). De plus ce milieu permet d'étudier sans effet inhibiteur tous les antifongiques, il devient alors possible d'éviter l'effet inoculum et d'accroître la précision de la lecture visuelle (56).

D'autres milieux, comme le milieu YMA, sont défavorables pour certains antifongiques dont les imidazolés (56).

Tous les auteurs ne sont pas en accord avec le choix du milieu YNB pour étudier les imidazolés.

Selon Mosse et Coll (38), le milieu YNB se montre le plus défavorable, suivi par le milieu de Kimmig et le milieu semi-synthétique. A travers ces travaux, ce sont les milieux de Sabouraud et Casitone qui permettent la meilleure expression de l'activité de ces produits.

Mallié et Coll (35) préfèrent au milieu YNB le milieu Casitone, qu'ils considèrent également comme plus favorable que le milieu de Sabouraud et semi-synthétique pour la mesure de l'activité des antifongiques imidazolés.

Clisold et Coll (11) ont choisi pour l'étude du Tioconazole le milieu Diagnostic sensitivity test (OXOID). D'autres travaux (32,36) ont également abouti au choix de ce milieu pour obtenir les CMI les plus basses avec le Tioconazole et le Miconazole. Regli et Coll (46) ont tenté d'améliorer l'interprétation des études sur les imidazolés en incorporant au milieu de culture un antibactérien (Polymixine ou tétracycline). Il ressort de cette étude que l'incorporation de polymixine ou tétracycline ne semble pas possible pour deux raisons : les résultats sont variables selon les souches et les espèces d'une part et, d'autre part, l'action antifongique de ces antibiotiques n'est pas négligeable.

Regli et Coll ne préconisent pas, quant à eux, l'utilisation du milieu Casitone pour la détermination des CMI en milieu solide, étant donné la faible reproductibilité des résultats (47,49). Par contre, nous avons choisi le milieu Casitone pour déterminer les diamètres d'inhibition des antifongiques imidazolés et Polyènes (Avec la Ciclopiroxolamine nous avons dû utiliser le milieu semi-synthétique car elle ne diffuse pas dans le milieu Casitone). Le milieu Casitone présente l'avantage d'éviter le halo d'inhibition qui se forme avec les imidazolés et rend la lecture des résultats

difficile (28,48).

Comme on peut le constater ici, rares sont les auteurs qui, ayant travaillé sur les antifongiques imidazolés, sont en accord sur le choix du milieu à utiliser. Il arrive même fréquemment que les avis soient contradictoires et que le milieu considéré comme le plus favorable par un auteur soit à rejeter pour un autre.

Malgré cela on trouve dans la littérature un certain nombre de travaux qui comme les nôtres ont été effectués sur milieu YNB glucosé.

Donaden et Coll (17) ont utilisé le milieu YNB glucosé pour déterminer les CMI et les diamètres d'inhibition des antifongiques.

Odds et Coll (39) ont également déterminé les CMI d'antifongiques imidazolés sur YNB glucosé.

Raether et Coll (45) ont travaillé avec le milieu YNB glucosé et neopeptone dextrose. Ils ont obtenu des CMI comparables sur ces deux milieux et proches des nôtres.

- pH du milieu

Des travaux antérieurs ont précisé le pH du milieu le plus favorable à la mise en évidence de l'activité de la plupart des imidazolés. Ce pH doit être légèrement acide (35,38,52). Il se rapproche donc des pH cutanés et vaginaux rencontrés dans les conditions naturelles d'utilisation topique. C'est le cas du pH des milieux que nous avons utilisé dans notre étude. Le pH du milieu YNB glucosé est de 6,3 et celui du milieu Casitone est de 6,6.

En réalité chaque antifongique imidazolé possède pour son milieu un pH qui lui est le plus favorable. En général les imidazolés ont une activité optimale à un pH légèrement acide, compris entre 5,5 (pour l'Omoconazole) et 6,5 (pour le Bifonazole) (38,52). Une

seule molécule fait exception, il s'agit du Kétoconazole dont le pH d'activité maximale est de 7,4 (35,38). Ceci peut en partie expliquer certaines CMI élevées de ce produit.

-Taille de l'inoculum:

Lors de l'étude de l'activité in vitro des imidazolés, la valeur de l'inoculum a une grande importance. Selon Plempel (42) un inoculum de 10^3 à 10^4 éléments.ml⁻¹ donne des résultats satisfaisants pour les levures. Ceci est favorable à nos travaux puisque notre inoculum est de 10^4 à 10^5 levures.ml⁻¹.

Le choix de cette taille d'inoculum est confirmé par un grand nombre de travaux (17,21,39) effectués sur les imidazolés.

Pour les dermatophytes, l'effet de l'inoculum est également très important (42). Dans le cas de ces champignons, l'inoculum est difficile à quantifier car il est constitué à la fois de cellules jeunes et de filaments (22). Ceci pourrait avoir peu d'importance; en effet les dermatophytes sont responsables de mycoses cutanées. Or les applications locales d'antifongiques apportent toujours une quantité de produit très supérieure aux valeurs des CMI.

-Cas du Kétoconazole:

Le Kétoconazole est un imidazolé qui mérite quelques commentaires sur son étude in vitro.

En effet, in vitro le Kétoconazole a des exigences différentes de l'ensemble des molécules imidazolés. La caractéristique de ce produit est qu'il donne de mauvais résultats in vitro. Nous pouvons le constater à travers notre étude.

Si l'on compare les CMI du Kétoconazole aux CMI des autres imidazolés, elles sont en général beaucoup plus élevées. Malgré cela, ce produit donne d'excellents résultats in vivo (7,19,30).

Ceci est dû au fait que le Kétoconazole a des exigences particulières in vitro, différentes de celles des autres imidazolés, notamment en ce qui concerne le milieu d'étude et son pH (29,5). Ceci le rend difficile à étudier.

- pH du milieu

Comme on l'a vu précédemment, les imidazolés ont une activité optimale à un pH légèrement acide (5,5 à 6,5). Le Kétoconazole est lui plus actif à pH physiologique c'est-à-dire à pH = 7,4. Plus le pH diminue, moins il est actif. Ceci a été mis en évidence dans de nombreux travaux portant soit sur l'ensemble des imidazolés, soit sur le Kétoconazole lui-même (12,35,38).

Dans notre étude, nous avons traité tous les produits dans les mêmes conditions, donc le pH d'étude du Kétoconazole fût légèrement acide.

Ceci peut expliquer les valeurs des CMI que nous avons déterminées pour ce produit. Malgré tout, nous le verrons plus loin, il est arrivé que nos CMI soient équivalentes à celles de certains auteurs ayant travaillé dans des conditions d'efficacité optimales pour le Kétoconazole.

- Milieu d'étude

Comme pour les autres imidazolés nous avons déterminé les CMI du Kétoconazole sur milieu YNB glucosé et ses diamètres d'inhibition sur milieu Casitone gélosé. De nombreux auteurs considèrent que ce ne sont pas les milieux les plus favorables pour mettre en évidence l'efficacité optimale de cet antifongique (2,27).

Des études consacrées au Kétoconazole ont déterminé que les milieux les plus propices et dont les résultats s'intègrent le mieux à ceux observés in vivo sont : le bouillon de Sabouraud enrichi de 10% de sérum de bovins (29), le BHI (Brain heart

infusion) (29), l'ENEM (Eagle's minimum essential medium) enrichi de 10% de serum (8,29), le milieu SAAMF (Synthetic amino-acid fungal) (51).

Il faut remarquer que si nous n'avons pas utilisé les milieux les plus propices préconisés par ces travaux (8,29,50), nos résultats se comparent néanmoins parfaitement à ceux de ces études. Blanchard et Coll (7) préconisent l'addition de polymixine B au milieu d'étude YNB ou Casitone, pour étudier l'activité du Kétoconazole. Mais c'est une méthode délicate. Si l'addition de Polymixine B peut parfois faciliter l'interprétation et la lecture des CMI du Kétoconazole, selon ces auteurs les variations de l'effet synergique de ces deux produits n'autorisent pas l'utilisation systématique de cette association. Par contre, des travaux de Doern et Coll (16) il, ressort que plusieurs milieux ont une action équivalente, notamment sur le Kétoconazole, et que le milieu YNB est un bon milieu pour déterminer les CMI des anti-fongiques, même celles du Kétoconazole. D'autres auteurs (17) ont également choisi de déterminer les CMI et diamètres d'inhibition du Kétoconazole sur YNB glucosé.

On constate que les méthodes d'étude in vitro du Kétoconazole permettant de mettre en évidence la bonne efficacité de ce produit, sont très controversées, notamment pour ce qui est du choix du milieu d'étude et de son pH.

Si tous les auteurs sont d'accord pour dire que le pH de 7,4 est celui qui convient le mieux au Kétoconazole, le choix du milieu reste délicat. Malgré cela, un certain nombre d'auteurs (16,17) ne conteste pas l'utilisation du milieu YNB glucosé pour la détermination des CMI du Kétoconazole.

c) La Ciclopiroxolamine

La Ciclopiroxolamine n'appartient ni à la classe des polyènes, ni à celle des imidazolés, les conditions expérimentales d'étude in vitro de ce produit sont très importantes (14,15,31).

Des travaux de Dittmar et Coll (14,15,31) il ressort que la ciclopiroxolamine a une activité in vitro qui dépend essentiellement du milieu nutritif. Ce produit ne semble pas affecté par le pH du milieu ou la taille de l'inoculum.

Selon les mêmes auteurs, les milieux qui doivent être retenus (et qui n'ont pas été choisis dans notre étude), pour étudier in vitro la Ciclopiroxolamine dans les meilleures conditions sont :

- Le milieu Sabouraud dextrose + néopeptone sélectionné pour la détermination des CMI en milieu liquide. Ce milieu est celui qui donne les CMI les plus basses à la Ciclopiroxolamine. Par contre, il est d'une importance primordiale qu'il soit extrêmement pur (15,31). La présence de sels de Fer dans le milieu provoque une inactivation de cette molécule. Il est donc nécessaire de vérifier l'absence d'éléments pouvant entraîner une inactivation de cet antifongique. La présence de protéines peut également être responsable d'une diminution modérée de l'activité.

- Pour la méthode de diffusion en gélose, c'est le milieu de Mueller-Hinton qui convient le mieux (15), alors que nous avons utilisé le milieu semi-synthétique (la Ciclopiroxolamine ne diffuse pas dans le milieu Casitone). Il est à noter que nous avons obtenu de meilleurs résultats que les auteurs précédents. Cela met encore une fois en évidence la difficulté de choisir une méthode pour faire une étude comparative de l'activité des antifongiques in vitro.

En ce qui concerne la Ciclopiroxolamine, l'activité de ce pro-

duit in vitro varie essentiellement en fonction du choix du milieu. Il est à retenir que ce milieu doit être très pur et que de nombreux éléments peuvent jouer comme inactivateurs de cet antifongique (14,15,31). Citons pour exemple le milieu Sabouraud dextrose du commerce, qui donne des résultats de CMI 4 fois supérieurs à ceux obtenus avec le milieu sélectionné par Dittmar et Coll (15).

3.2. Discussion sur les résultats

Si l'on observe l'ensemble de nos résultats, on peut constater qu'ils sont relativement variables selon les espèces, mais aussi selon les souches. Cela a été confirmé par d'autres essais in vitro (46).

Afin de juger de l'intérêt de notre travail, nous avons comparé, produit par produit, nos résultats avec ceux de la littérature.

3.2.1. Les antibiotiques antifongiques

a) La Griséofulvine

La Griséofulvine est un antifongique actif uniquement sur les dermatophytes. Dans notre étude, nous l'avons tout de même fait agir sur les levures et nous avons pu vérifier à chaque fois son inactivité.

Les valeurs des CMI de la Griséofulvine avec les différentes espèces de dermatophytes étudiées s'intègrent aux valeurs trouvées dans la littérature (2,21), compte tenu des différences de méthodologie employées.

Sans les travaux de Basile et Coll (2), le milieu qui a servi

à la détermination des CMI est le BHI (Brain Heart infusion agar) pH = 7,4. Malgré cela, nos résultats et ceux de ces auteurs concordent parfaitement. Rappelons que les antibiotiques sont peu (voire pas) sensibles à la méthodologie utilisée lors d'essais in vitro.

Certaines espèces, dont nos CMI, s'intègrent à celles de la littérature, ont des fourchettes de valeurs plus étendues que celles annoncées par Dupont (21). Ces intervalles vont jusqu'à 50 ou 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ pour *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *M. canis*. Ceci est dû à la grande variabilité de sensibilité individuelle entre les différentes souches d'une même espèce. Ainsi, à l'intérieur d'une espèce très sensible à la Griséofulvine comme *T. rubrum* (2), on peut isoler des souches qui réagissent très peu à l'action de cet antifongique.

b) Polyènes : la Nystatine

Les CMI que nous obtenons pour la Nystatine s'intègrent à celles obtenues par d'autres auteurs (10,21,45). Ceci, que ce soit pour les levures uniquement (21) ou pour l'action sur les levures et les dermatophytes (10,45). Raether et Coll (45) ont travaillé parallèlement sur milieu YNB et sur néopeptone dextrose bouillon. Dans les deux cas les CMI qu'il a obtenues sont identiques et assimilables aux nôtres.

D'autres auteurs ne sont pas en accord avec nos travaux. Selon Lombardi et Coll (33), les Polyènes et la 5 fluorocytosine ont une efficacité supérieure à celle des imidazolés sur les levures.

Or, à travers nos résultats, on constate que les imidazolés ont: soit une meilleure efficacité, soit une efficacité équivalente à la Nystatine sur les levures. A travers nos résultats on peut même dire que dans l'ensemble l'action in vitro de la Nystatine sur les

levures est inférieure à celle des imidazolés et de la Ciclopiroxolamine, parfois équivalente, mais rarement supérieure, si ce n'est par rapport au Bifonazole et au Kétoconazole (dont on connaît les difficultés de l'étude in vitro et les mauvais résultats dans de telles études).

3.2.2. Les imidazolés

a/L'Econazole

Les résultats de notre étude, en ce qui concerne l'Econazole, s'intègrent parfaitement à la plupart des résultats recueillis dans la littérature. (10,40,41,45,47,48,49,53,57). Ceci, que ces études aient été effectuées sur les levures ou sur les dermatophytes (10,45,47,48,49,53,57).

Par contre les travaux de Guinet et Coll(24) sur *T. Glabrata* ne correspondent pas aux nôtres. Selon ces auteurs, *T. Glabrata* est nettement plus résistant aux imidazolés dont l'Econazole, que les autres espèces de levures. Or, d'après nos résultats, les 3 espèces de levures : *C.albicans*, *C.tropicalis* et *T.glabrata* présentent une bonne sensibilité aux imidazolés. Pour ce qui est de l'Econazole, la sensibilité de *T.glabrata* semble même meilleure que celle de *C.tropicalis*. Il est à noter que ces auteurs n'ont pas travaillé dans les mêmes conditions que nous, en effet leur milieu d'expérimentation était le milieu semi-synthétique.

Dans les travaux effectués sur les imidazolés, dont l'Econazole, rencontrés dans la littérature, on constate que certains auteurs ont utilisé les mêmes milieux d'étude que nous : YNB (45) ou Casitone (47,48,49). D'autres auteurs ont utilisé des milieux différents, par exemple le milieu Sabouraud dextrose OXOID

(53,57), et obtenu des résultats ne divergeants pas des nôtres.

b) Miconazole

Les résultats que nous obtenons avec le Miconazole sont comparables à un grand nombre de résultats recueillis dans la littérature (10,26,40,41,45,47,48,49,53,55,57).

Certains auteurs obtiennent des résultats comparables aux nôtres en utilisant les mêmes milieux que nous : Y N B (26,45) ou Casitone (47,48,49). D'autres auteurs obtiennent des valeurs de CMI assimilables aux nôtres avec d'autres milieux que ceux que nous avons choisis. Il s'agit des milieux : Sabouraud glucosé (55), Sabouraud dextrose OXOID (53,57), néopeptone dextrose bouillon (45). On trouve également dans la littérature des travaux dont les résultats sont comparables aux nôtres pour certaines espèces de champignons, meilleurs pour certains autres, et moins bons pour d'autres encore. C'est le cas des travaux effectués sur SDA (Diagnostic sensitivity test) (32), dont les CMI s'intègrent aux nôtres pour *T.glabrata*, *T.rubrum* et *M. canis*, sont moins bonnes que les nôtres pour *C.albicans* et meilleurs pour *T.mentagrophytes*. D'autres études effectuées sur SDA obtiennent des valeurs de CMI moins favorables au Miconazole que les nôtres, que ce soit sur les levures ou sur les Dermatophytes (11). D'autres auteurs encore ont obtenu des CMI plus favorables au Miconazole que les nôtres. Ces travaux ont été réalisés sur différents milieux : ce peut être le milieu Eagle's (additionné d'acides aminés et de serum foetal de veau) (8), ou le milieu de Kimmig (43).

c) Kétoconazole

Malgré les difficultés d'étude du Kétoconazole nos résultats

s'intègrent à la plupart des valeurs de la littérature (29,30,40,41,45,53,57).

Une étude faite sur deux milieux différents dont le milieu YNB a obtenu les mêmes valeurs de CMI dans les deux cas, ceci aussi bien sur les levures que sur les dermatophytes (45).

De plus, ces résultats s'intègrent parfaitement aux nôtres.

D'autres travaux ayant été faits sur milieu enrichi de serum de bovins comme Van Cutsen le préconise (29) et à pH neutre (pH donnant au Kétoconazole son activité optimum), obtiennent également des résultats assimilables à ceux de notre étude (29,30,40,41). Par contre, un certain nombre d'auteurs ont travaillé sur le Kétoconazole en utilisant des méthodes plus adaptées aux caractéristiques de cet imidazolé, et ont obtenu des CMI nettement inférieures à celles de notre étude comparative.

Ainsi Blanchard et Coll (7) obtiennent des valeurs de CMI meilleures que les nôtres pour le Kétoconazole en travaillant sur un milieu (Casitone ou YNB) additionné de Polymixine B. Mais c'est une méthode difficile à manipuler (le Kétoconazole et la Polymixine B ayant un effet synergique) et qui ne peut être utilisée de façon systématique.

Borgers et Coll (8), comme le préconise Van Cutsen (29) ont effectué leur étude sur le milieu minimum essentiel Eagle additionné d'acides aminés et de serum foetal de bovin. Ils ont obtenu des CMI beaucoup plus basses que les nôtres avec le Kétoconazole. Rogers et Coll (50) ont travaillé sur milieu SAAMF (Synthétique Amino Acid Fungal) et obtenu des CMI beaucoup plus basses que les nôtres et très favorables au Kétoconazole (0,008 à 0,031 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de CMI sur *C. albicans*).

d) Bifonazole

Un certain nombre d'auteurs, bien qu'utilisant des méthodologies différentes, obtiennent pour le Bifonazole des valeurs de CMI s'intégrant à celles de notre étude (37,39,44,53).

Comme nous, Odds et Coll (39) ont effectué leurs travaux sur les levures avec le milieu YNB glucosé. Par contre, pour les dermatophytes, ils ont préféré le milieu de Kimmig et une culture sur membrane de cellophane.

Selon Shadomy et Coll (52), c'est sur milieu de Kimmig que l'on obtient les CMI les plus basses du Bifonazole. Or les CMI de cette étude, aussi bien pour les levures que pour les dermatophytes s'intègrent parfaitement aux nôtres qui ont été déterminées sur milieu YNB glucosé.

D'après les travaux de Plempel et Coll (44), le milieu YNB est celui qui donne les plus mauvais résultats avec les levures et est inutilisable avec les dermatophytes. Selon Plempel et Coll, c'est le milieu de Kimmig qui convient le mieux. Or les résultats obtenus sur ce milieu s'intègrent parfaitement aux nôtres.

On trouve dans la littérature des travaux (43,58) plus favorables au Bifonazole que notre étude. Plempel et Coll (43), comme Yamagushi et Coll (58), ont obtenu des CMI plus basses que les nôtres avec des méthodes de travail différentes.

e) Tioconazole

Les résultats que nous obtenons avec le Tioconazole s'intègrent parfaitement à la plupart des résultats de la littérature (3,11,32,40,41,45,53,57).

Raether et Coll (45) ont travaillé sur levures et dermatophytes en comparant le milieu YNB et néopeptone dextrose bouillon. Ils

ont obtenu les mêmes résultats sur ces deux milieux et ces résultats sont équivalents aux nôtres.

Clisold et Coll (11), comme Jevons et Coll (32) et Mariott et Coll (36) ont travaillé sur milieu SDA (Diagnostic sensitivity test). Clisold et Coll ainsi que Mariott et Coll obtiennent des valeurs de CMI comparables aux nôtres, malgré la différence de milieu, aussi bien sur les levures que sur les dermatophytes. Par contre Jevons et Coll obtiennent des résultats comparables aux nôtres sur *C.albicans*, *T.rubrum* et *T.mentagrophytes* mais leur CMI sont beaucoup plus basses, et donc plus favorables au Tioconazole, pour *M.canis* et *T.glabrata*.

f) Sulconazole

Les bons résultats que nous trouvons pour les CMI de cet imidazolé sont confirmés par la littérature concernant cette molécule (18,33,34,56).

g) Omoconazole

Les CMI de l'Omoconazole, déterminées dans notre étude, sont confirmées par les résultats de la littérature (33,38,56).

Mosse et Coll (38) ont travaillé sur plusieurs milieux, dont le milieu YNB qu'ils considèrent comme le moins favorable à l'Omoconazole. Malgré cela les CMI obtenues sur YNB sont basses et il y a convergence entre nos résultats et ceux de ces auteurs.

h) Butoconazole

On constate une corrélation entre les valeurs des CMI du Butoconazole de notre étude et celles relevées dans la littérature (20,51,56).

Dans tous les cas les valeurs des CMI de ce produit sont excellentes, à la fois basses et stables, quelle que soit l'espèce et les souches.

3.2.3. Antifongique non antibiotique non imidazolé : la Ciclopiroxolamine

Dans la littérature, un certain nombre de travaux sur la Ciclopiroxolamine obtiennent des valeurs de CMI concordant avec nos résultats (1,15,39,45).

Comme nous, Raether et Coll (45) ont travaillé sur milieu YNB. Ils ont complété cette étude par des expériences sur néopeptone dextrose bouillon. Dans les deux cas leurs résultats sont équivalents et comparables aux nôtres.

Dittmar et Coll (15) préconisent le milieu Sabouraud dextrose + néopeptone sélectionné pour étudier la Ciclopiroxolamine. Les résultats de ces auteurs sont assimilables aux nôtres en ce qui concerne les levures, par contre, pour les dermatophytes, Dittmar et Coll obtiennent des CMI nettement plus favorables à cette molécule.

On constate exactement le même phénomène dans les travaux de Jue et Coll (31) effectués sur Sabouraud dextrose-peptone de boeuf et dans d'autres essais sur milieu Sabouraud dont les résultats sont plus favorables à la Ciclopiroxolamine pour deux espèces de dermatophytes (*M. canis* et *E. floccosus*) et sont comparables aux

nôtres pour les autres espèces de champignons.

3.3. Intérêt des essais in vitro : Valeur prévisionnelle de l'efficacité in vivo des antifongiques

L'intérêt des essais in vitro est de savoir si l'on peut extrapoler leurs résultats à l'activité in vivo des antifongiques.

En effet, peut-on déduire des essais in vitro quelle sera l'activité d'un antifongique in vivo ?

Il n'y a pas selon Dupont (19) de corrélation stricte entre les résultats in vitro et in vivo. L'Azolé avec le plus large diamètre d'inhibition sur un antibiogramme n'est pas ipso facto le plus efficace chez l'animal ou le malade.

Les CMI in vitro ne seraient pas des bases correctes pour prédire les résultats sur les patients et ceci quelle que soit la classe d'antifongiques étudiée (9,42). Les méthodes actuelles d'étude in vitro ont pu laisser penser qu'un produit était résistant alors qu'en employant une méthode correcte ces produits sont actifs (9,42). Le meilleur exemple que nous connaissons pour illustrer cela est celui du Kétoconazole. Il présente fréquemment une excellente activité in vivo, en contradiction avec ses résultats in vitro qui sont le plus souvent très mauvais (7,19,30). (le Kétoconazole nécessitant des conditions particulières pour être au maximum de son efficacité in vitro). Ces données sont confirmées par les études cliniques du produit (30).

Pour les imidazolés en particulier, les résultats obtenus in vitro ne sont pas toujours extrapolables in vivo. Dupont (21) précise que l'efficacité des imidazolés en pathologie est surtout établie par l'expérience clinique. Les différences de sensibilité

notées parfois in vitro ne permettent pas de hiérarchiser les produits quant à leur activité in vivo. En outre, des différences de quelques microgrammes in vitro ont peu de signification lorsque l'application locale sur les lésions apporte quelques milligrammes de produit actif.

D'autres études mettent l'accent sur la difficulté d'interpréter les essais in vitro et d'étendre ces résultats aux données cliniques, d'autant plus qu'il n'existe pas de méthode standardisée (9,12).

Ce problème est encore plus difficile pour les dermatophytes.

Par contre, il arrive qu'il y ait corrélation entre les performances obtenues in vitro par un produit et ses résultats in vivo. C'est le cas par exemple pour le Sulconazole (18) ou le Butoconazole.

Conclusion

L'objectif de notre étude était d'évaluer et comparer la sensibilité in vitro de champignons pathogènes pour l'Homme, vis à vis de divers antifongiques utilisés en thérapeutique.

A propos de l'efficacité des molécules il ressort que :

- les imidazolés et la Ciclopiroxolamine ont un large spectre. Ils sont actifs à la fois sur les levures et les dermatophytes.
 - les polyènes ne sont actifs que sur les levures.
 - la Griséofulvine est active sur les dermatophytes uniquement.
- Ces résultats étaient déjà connus, nous les avons confirmés.

Nous avons voulu comparer ces produits afin de voir s'il était possible de faire une classification hiérarchique des antifongiques étudiés, dont nous avons retenu comme indication uniquement le traitement des mycoses superficielles. Aucune de ces molécules n'apparaît comme étant beaucoup plus active que les autres in vitro, mais tous ces produits sont actifs à la fois sur les levures et les dermatophytes, pour les produits à large spectre qui nous intéressent plus particulièrement. Cependant, une molécule semble très intéressante, il s'agit du Butoconazole. Sur toutes les espèces étudiées elle obtient des CMI basses et réparties sur des intervalles de valeurs étroits. Ceci laisse supposer qu'il est actif à de faibles concentrations et que toutes les souches ont une bonne sensibilité vis à vis de cet antifongique.

Ce n'est pas le cas pour les autres molécules dont la sensibilité varie énormément en fonction des souches. Nos travaux et nos résultats mettent en évidence, comme la plupart des essais in vitro sur les antifongiques, la nécessité de mettre au point une méthode standardisée, adaptée à la morphologie et la physiologie des champignons pour évaluer ces molécules.

Sachant très bien que tous les produits ne sont pas dans des conditions d'efficacité optimale, comment ne pas supposer que les bons résultats du Butoconazole sont liés au fait que les conditions opératoires expérimentales adoptées correspondent à l'activité antifongique optimale de ce produit.

La question qui se pose maintenant est de savoir si l'on peut extrapoler nos résultats à la pathologie in vivo, ce qui justifie l'intérêt de ces essais.

Nous l'avons vu précédemment, la concordance efficacité in vitro et in vivo n'est pas rigoureusement établie. D'ailleurs de mauvais résultats in vitro ne signifient pas nécessairement une inefficacité in vivo. De plus, les essais in vitro ne tiennent pas compte d'un certain nombre de facteurs qui interviennent lors du choix thérapeutique : forme galénique, observance du traitement, confort du malade, tolérance du produit, sensibilité individuelle.

Par contre, on peut supposer qu'une molécule active in vitro a de fortes chances de l'être in vivo, mais la réciproque n'est pas toujours vérifiée.

En ce qui concerne les produits d'usage topique, les très fortes concentrations obtenues in situ par les applications locales, ne permettent pas non plus de faire une différence d'efficacité clinique en se basant sur les CMI in vitro. Les CMI correspondent à quelques microgrammes de produit alors que les applications

locales apportent quelques milligrammes de principe actif.

De notre étude, il ressort que nous possédons un arsenal d'antifongiques utilisables par voie topique qui présentent une bonne efficacité sur les champignons pathogènes fréquemment rencontrés in vivo. Il nous est cependant impossible, dans l'état actuel de nos connaissances, de les hiérarchiser.

PLAN

<u>Introduction</u>	6
<u>1. Méthodologie</u>	8
<u>1.1. Matériel</u>	8
<u>1.1.1. Les antifongiques</u>	8
a) les antibiotiques antifongiques	8
b) les antifongiques imidazolés	10
c) Antifongique non antibiotique non imi- dazolé	18
<u>1.1.2. Solvants de dilution</u>	19
<u>1.1.3. Milieux d'expérimentation</u>	19
<u>1.1.4. Espèces étudiées</u>	20
a) Levures	20
b) Dermatophytes	21
<u>1.1.5. L'Inoculum</u>	23
a) Levures	23
b) Dermatophytes	23
<u>1.2. Protocole opératoire</u>	24
<u>1.2.1. Levures</u>	24
a) CMI précises en milieu liquide	24
b) Antifongigramme en milieu gélosé selon la méthode des puits	26
c) Antifongigramme en milieu gélosé selon la méthode des disques	27
<u>1.2.2. Dermatophytes</u>	28

a) CMI précises sur milieu liquide	28
b) CMI approchées en milieu solide	28
<u>1.3. Résumé schématique de la détermination des CMI en milieu liquide sur les levures et les dermatophytes</u>	30
<u>2. Résultats</u>	32
<u>2.1. CMI et diamètres d'inhibition</u>	32
a) Levures	32
b) Dermatophytes	32
<u>2.2. Fréquence des CMI</u>	42
a) Levures	42
b) Dermatophytes	42
<u>2.3. Commentaires</u>	50
<u>2.3.1. Levures</u>	50
a) C.albicans	50
b) C.tropicalis	50
c) T. glabrata	51
<u>2.3.2. Dermatophytes</u>	52
a) T. rubrum	52
b) T. interdigitale et mentagrophytes	53
c) M. canis et langeronii	54
d) E. floccosus	54

<u>3. Discussion</u>	56
<u>3.1. Discussion sur les méthodes d'essai in vitro des antifongiques</u>	56
<u>3.1.1. Difficultés liées à l'absence de standardisation et à des méthodes dérivées de la bactériologie</u>	56
<u>3.1.2. Particularités liées à la nature des antifongiques</u>	62
a) Polyènes et autres antibiotiques antifongiques	62
b) Les imidazolés	63
c) La Ciclopiroxolamine	63
<u>3.2. Discussion des résultats</u>	70
<u>3.2.1. Les antibiotiques antifongiques</u>	70
a) La Griséofulvine	70
b) Polyène : la Nystatine	71
<u>3.2.2. Les imidazolés</u>	72
a) L'Econazole	72
b) le Miconazole	73
c) le Kétoconazole	73
d) le Bifonazole	75
e) le Tioconazole	75
f) le Sulconazole	76
g) l'Omoconazole	76

h) le Butoconazole	77
<u>3.2.3. Antifongique non antibiotique non imidazolé : la Cicloprixolamine</u>	77
<u>3.3. Intérêt des essais in vitro : valeur prévisionnelle de l'efficacité in vivo des anti- fongiques</u>	78
<u>Conclusion</u>	80

ANNEXESAnnexe n° 1 : Composition du milieu Casitone

Casitone DIFCO	9g
extrait de levure	5g
Citrate trisodique	10g
Phosphate monosodique	1g
Glucose	10g
Gélose	20g
eau distillée	qsp 1000ml

Annexe n° 2 : Composition du milieu semi-synthétique

Asparagine	1,5g
L.histidine	10mg
d.1. Methionine	20 mg
d.1. Tryptophane	20 mg
Sulfate d'ammonium	3,5 g
Glucose purifié	10 g
Phosphate de potassium	1g
Sulfate de Magnésium	0,5 g
Chlorure de sodium	0,1 g
Vitamine :	
Biotine	10
Thiamine	
Pantothenate de Ca	10
Pyridoxine	
Acide Nicotinique	
Inositol	10
Solution d'oligoéléments (sol. de Berthelot)	10gout-
tes	
Gélose	20 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

BIBLIOGRAPHIE

1/ Abstract Dermato Supplément au n° 23 - Avril 1987

Mycoster (Ciclopiroxolamine) : traitement des Mycoses Cutanées

2/ BASILE A.M, CONTET-AUDONNEAU N, PERCEBOIS G

Trichophyton rubrum : étude de la sensibilité à la Griséofulvine, au Kétoconazole, et à l'Itraconazole

Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. 1987 16 (1) 383-386

3/ BEGGS W.H

Fungicidal activity to Tioconazole in relation to growth phase of candida abicans and Candida parapsilosis

Antimicrob. Agents. Chemother. 1984 25 (5) 699-701

4/ BEHRING

Mycototal l'antibiogramme apprivoisé

Documentation laboratoires Behring

5/ BERG. D, REGEL E, HARENBERG H.E. and PLEMPEL.M

Bifonazole et Clotrimazole. Their mode of action and the possible reason for the fungicidal behaviour of Bifonazole

Arzneim-Forsch./ Drug ves., 1984 34 (1) Nr 2 139-146

6/ BERNARDAUD S.

Choix d'une microméthode pour l'évaluation de l'activité antifongique

Application à l'étude des metabolites des actinomycétales;

Thèse de Doctorat en pharmacie, Université de Limoges, 1986

7/ BLANCHARD A, MARY C, GULICI M, REGLI P

Incidence de l'addition de Polymixine B sur la détermination des CMI du Kétoconazole vis à vis du Candida albicans

Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1987 16 (1) 387-390

8/ BORGERS M, Van den BOSSCHE H, DE BRABANDER M, VAN CUTSEN J

Promotion of pseudomycelium formation of Candida albicans in culture ; a morphological study of the effects of Miconazole and Kétoconazole

Postgraduate medical journal., 1979 55 687-691

9/ BROWN Jr D, MILAN H.D, HENZEL R, LEPAGE M.E, LING LING TSAO R.N., JSU M.S, WALKER M.S, ADAMSON Ph, DROEGMULLER H.D.

Butoconazole vaginal cream in the treatment of vulvovaginal Candidiasis. Comparison with Miconazole Nitrate and Placebo

The journal of reproductive medecine., 1986 31 (11) 1045-1048

10/ CILAG-CHIMIE

Epidemiologie des dermatomycoses. Econazole

documentation scientifique laboratoires Cilag-Chimie

11/ CLISSOLD S.P. , HEEL R.C.

Tioconazole a Review of its antimicrobial activity and therapeutic use in superficial mycoses

Drugs., 1986 31 29-51

12/ DRUTZ D.J

In vitro antifungal susceptibility testing and Measurement of levels of antifungal agents in body fluids

Reviews of infections diseases., 1987 9 (2) 392-397

13/ DESVIGNES A, LELUAN G, DUPEYRON C

Mise au point d'une méthode de détermination des activités antifongiques in vitro vis à vis d'une souche de dermatophytes
Annales pharmaceutiques françaises., 1979 37 (3-4) 139-142

14/ DITTMAR W.von, GRAU W, RAETHER W, SCHRINNER E,
und WAGNER W.H

Mikrobiologische Laboruntersuchungen mit Ciclopiroxolamin
Arzneim-Forsch/Drug res., 1981 31 (11) Nr 8a 1317-1322

15/ DITTMAR W. and COHANS G

HOE 296, a new antimycotic compound with a broad antimicrobial spectrum

Arzneim-Forsch/Drug res., 1976 23 Nr5 670-674

16/ DOERN G, TUBERT T, CHAPIN K, RINALDIN

Effect of medium composition on results of macrobroth dilution antifungal susceptibility testing of yeast

Journal of Clinical Microbiology., 1986 24 (4) 507-514

17/ DONADEN-GLEZ-COVIELLA J, HERRUZO-CABRERA R, GARCI-CABALLERO J,
CARRASCO de la PENA JL, DEL REY-CALERO J

Action de divers antifongiques et antiseptiques sur Candida albicans (isolés des malades de N.S.I) étude de la corrélation CMI-diamètre d'inhibition

Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. , 1984 13 (2) 425-430

18/ Sulconazole a new antifungal for the skin

Drug ther bull 1986, 26,24 (17) 67-68

19/ DUPONT B

Les antimycosiques en 1988

Médecine et Maladies infectieuses., 1988 18 (5) 274-281

20/ GARCIA S, LATGE JP, PRACCHIA JV

Action in vitro du Butoconazole sur les Candida

Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1988

21/ DUPONT B, DROUHET E

Antifongiques

Encycl Med Chir., 1987 25013 n° 10,10 1-14

22/ GOUDARD M, CORDIER C, REGLI P

Sensibilité des fusarium aux antifongiques. Essais in vitro

Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1988 17 (1) 199-202

23/ GRILLOT R, POLAK A, GAYRAL JP, AMBROISE-THOMAS P,

Etude in vitro des antifongiques : Microméthode de détermination des concentrations minimales inhibitrices

Rev. Inst. Pasteur Lyon., 1980 13 (2) 22-23

24/ GUINET.R

Sensibilité comparée des levures aux antifongiques en microméthode standardisée

Pathol. Biol. , 1986 34 (5) 536-539

25/ HALLER I

Zum wirkungstyp von imidazol-antimykotika
Konsequenzen für die Empfindichkeitsbestimmung
Mykosen., 1979 22 (12) 423-430

26/ HOEPRICH P.D, HUSTON A.C

Effect of culture média on the antifungal activity of Miconazole and Amphotericin B memyl ester

J. Infect. Dis., 1976 134 (4) 336-341

27/ HOEPRICH P.D and MERRY J.M

Influence of culture medium of susceptibility testing with BAY n. 7133 and Kétoconazole.

J. Clin. Microbiol., 1986 24 (2) 269-271

28/ Institut Pasteur Production : Division Diagnostic

La mycologie médicale : Prélèvement, isolement, identification, antibiogramme, serologie.

Documentation scientifique

29/ JANSSEN

Ketoderm : Kétoconazole 2% crème : Dossier d'information scientifique

30/ JANSSEN

Nizoral : Kétoconazole

Documentation scientifique

31/ JUE S.G., DANSON G.W., BROGDEN R.N

Ciclopirox olamine 1% cream? A preliminary review of its antimicrobial activity and therapeutic use.

Drugs, 1985 29 330-341

32/ JEVONS S, GYMER E.M, BRAMMER K.W, COX D.A, and LEEMING M.R.G.

Antifungal activity of Tioconazole (UK.20.349)

a new imidazole derivative

Antimicrobial agents and chemotherapy., 1979 597-602

33/ LOMBARDI G, CAVANNA C, GRAMEGNA G, SCEVOLA D, and MICHELONE
G

Routine application of the evaluation of yearts susceptibility to the main antimycotic Drugs

Microbiologica., 1987 10 189-196

34/ Mac VIE D.H, LITTLE WOOD S, ALLEN B.R, POLLOCK A.C, WOODS P,
and MILNE I.J.R

Sulconazole versus clotrimazole in the treatment of dermatophytosis

Clinical and experimental Dermatology, 1986 11 613-618

35/ MALLIE M, JOUVERT S, BASTIDE M, MONTES B, LEBECQUE JC., BASTIDE JM.

Activité comparée de 8 composés imidazolés sur C.albicans ;
Pouvoir fongistatique et cytologie en microscopie electronique à balayage

Path. Biol., 1988 36 (5) 575-580

36/ MARIOTT MS, BRAMMER KW, FACCINI J, FAULKNER JK, JEVONS S, MONRO AM, NACHBAUR J, PERRAUD J, TARBIT MH.

Tioconazole, a new broad-spectrum antifungal agents: Pre-clinical studies
related to vaginal candidiasis.

Gynak. Rdsch. , 1983 23 suppl 1 1-11

37/ Medicia

Amycor : Bifonazole

brochure d'information scientifique

38/ MOSSE M, ALRIC MP, BERCEAUX M, FOURCINE N, SACHI A,

Etude comparative de l'activité fongistatique in vitro de l'Omoconazole et de six autres imidazolés sur les levures

Path. Biol., 1986 34 (5 Bis) 684-687

39/ ODDS FC, WEBSTER CE, ABBOTT AB,

Antifungal relative inhibition factors : BAYS 1-9139,

bifonazole, butoconazole, isoconazole, itiaconazole (R51211), oxiconazole, Ro 14-47671002, sulconazole, terconazole ant vibunazole (BAYn-7133) compared in vitro with nine established antifungal agents.

Journal of antimicrobial chemotherapy., 1984 14 105-114

40/ PFIZER

Gyno-Trosyd. 300 : Tioconazole. Etude pharmacologique et
clinique

documentation scientifique

41/ PFIZER

Les mycoses superficielles par P. BOURREE

Documentation scientifique

42/ PLEMPPEL M, BERG D, BÜCHEL KH, and ABBINK D

Test methods for antifungal agents. A critical review

Mykosen., 1987 30 (1) 28-37

43/ PLEMPPEL M, BERG D, RITTER W

Bifonazole, a new topical azole antimycotic with specific
properties

R.J. HAY (Ed) 1986. Advances in topical antifungal therapy

44/ PLEMPPEL M, REGEL E, BÜCHEL KH

Antimycotic efficacy of bifonazole in vitro and in vivo

Arzneim-Forsch / Drug res., 1983 33 (1) Nr4 517-524

45/ RAETHER W, UPHOFF M, STAUDT G

Comparison of two different techniques in primary mycologi-
cal screening : standard serial dilution test and microtitation
test

Mykosen., 1983 27 1 14-28

46/ REGLI, FERRARI, BUFFARD

Antibiogramme antifongique : essai d'amélioration de l'interprétation des effets des dérivés imidazolés sur les levures par incorporation de polymixine B et de tetracycline aux milieux de cultures.

Bull. Soc. Mycol. Med., 1987 16 (1) 399-402

47/ REGLI, FERRARI, GOUDARD, BUFFARD

Intérêt du milieu Casitone pour l'étude de la sensibilité in vitro des champignons levuriformes aux antifongiques dérivés de l'imidazole.

Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1982 11 (2) 359-361

48/ REGLI, FERRARI, GOUDARD, BUFFARD

Comparaison de l'activité in vitro de l'isoconazole et des dérivés imidazolés sur les champignons levuriformes.

Bull. Soc. Fr. Med., 1981 10 131-135

49/ REGLI, FERRARI, GOUDARD, BUFFARD

Comparaison de la sensibilité in vitro aux dérivés imidazolés des champignons levuriformes et de *C. albicans*.

Bull. Soc. Fr. Med., 1982 10 (1) 133-136

50/ ROGERS. ET. and Gagliani J

Activity of Fluconazole (UK 49-858) and Kétoconazole against *C. albicans* in vitro and in vivo

Antimicrobial agents and Chemotherapy., 1986 30 (3) 418-422

51/ TATUM MD, EGGLESTON M

Butoconazole nitrate

Infect control hosp. Epidemiol., 1988 9 (3) 122-124

52/ SHADONY S, DIXON DM, MAY R

A comparison of bifonazole (BAY H 4502) with coltrimazole in vitro

Sabouraudia., 1982 20 313-323

53/ SCOTT EM, GORMAN SP, WRIGHT LR

The effect of imidazoles on germination of arthrospores and microconidia of Trichophyton Mentagrophytes

Journal of antimicrobial chemotherpay., 1984 13 101-110

54/ SHADONY S

In vitro studies with 5 fluorocytosine

Appl. Microbid. , 1969 17 (6) 871-877

55/ SONJA DE NOLLIN and BORGERS M

An ultrastructure and Cytochemical study of Candida albicans after in vitro treatment with imidazoles

Mykosen., 1976 9 317-328

56/ VERNES A

Sensibilité de Candida albicans aux antifongiques

Médecine et Maladies infectieuses., 1980 10 (4) 222-225

57/ WRIGHT LR, SCOTT EM, GORMAN SP

The sensitivity of Trichophyton mentagrophytes to imidazoles determined by in vitro tests

Journal of antimicrobial Chemotherapy., 1983 12 317-327

58/ YAMAGUCHI H, HIRATANI T, PLEMPPEL M

In vitro studies of a new imidazole antimycotic, Bifonazole in comparison with Clotrimazole and Miconazole

Arzneim-Forsch /Drug res., 1983 33 (1) 546-551

RESUME

Nous avons comparé l'activité in vitro des principales molécules destinées au traitement des mycoses superficielles sur les espèces de champignons pathogènes (levures et dermatophytes) les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine.

Pour cela nous avons déterminé les CMI en milieu liquide des différents produits sur plusieurs souches de chaque espèce.

A travers nos résultats aucune molécule ne semble réellement plus active que les autres, mais toutes ont une réelle efficacité in vitro sur les espèces de Champignons évaluées.

MÔTS CLEFS

- . Antifongiques
- . Dermatophytes
- . Etude comparative
- . Levures
- . Sensibilité in vitro