

00-05099

REPUBLIQUE DE COTE D'IVOIRE
UNION - DISCIPLINE - TRAVAIL.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET DE L'INNOVATION TECHNOLOGIQUE



FACULTE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES

ANNEE UNIVERSITAIRE 1996 - 1997

MEMOIRE

du

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES

DE BIOTECHNOLOGIE ET AMELIORATION DES PLANTES
(OPTION PHARMACOLOGIE DES SUBSTANCES
NATURELLES)

RECHERCHE D'UNE FORMULATION
GALENIQUE APPROPRIEE DE MISCA
CONTRE CINQ MYCOSES
SUPERFICIELLES EN COTE D'IVOIRE

Présenté par
Dr. Armand KOFFI

Pharmacien

Directeur de Mémoire
f. GUEDE GUINA

Professeur titulaire

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été réalisé sous la conduite de Monsieur FREDERIC GUEDE GUINA Professeur titulaire de Biochimie et de pharmacodynamie , directeur du laboratoire ANTIGENE , université de cocody , en collaboration avec Dr AKA BOUSSOU maître-assistant Dermatologue vénérologue au service de Dermatologie du Chu de Treichville.

Au Professeur **GUEDE-GUINA** ,

Votre intérêt exceptionnel pour l'amélioration des substances naturelles à activité thérapeutique ne peut que motiver davantage la jeune génération de chercheurs dont nous voulons faire partie.

Sous votre direction, nous croyons pouvoir avancer dans la recherche pour l'obtention de médicaments modernes à partir de nos substances naturelles présentant une activité thérapeutique .

Nous tenons à vous adresser nos vifs remerciements, notre sincère gratitude pour nous avoir acceptés promptement dans vos laboratoires , et à vous souhaiter plus de bonheur ainsi qu'à à votre épouse et à vos enfants .

Au Dr **AKA BOUSSOU** ,

Votre spontanéité et votre disponibilité totale ont été d'un grand apport et nous ont profondément marqués. Dès le premier contact, vous avez accepter sans arrières pensées de conduire l'étude clinique préliminaire.

Recevez nos sincères remerciements et notre profonde gratitude .

NOS REMERCIEMENTS

Au Professeur DIOPPOH KORE JACQUES , responsable du DEA de Biotechnologie et amélioration des productions végétales ;

Au Professeur YEBOUA AKA FRANCOIS coordinateur des enseignements du DEA ;

Au Professeur KANGAH , chef de service de Dermatologie au CHU de Treichville ;

Au Professeur YEBOUET , au service de Dermatologie au CHU de Treichville ;

Au Professeur BAMBA MORIFERE , chef de service du département de Galénique et Biopharmacie à la faculté de Pharmacie d'Abidjan ;

Au Dr COULIBALY SABALI , assistant au département de galénique pour ses conseils et ses encouragements ;

A monsieur KOFFI JULES , Fondateur du Lycée ALFRED NOBEL de Marcory , pour avoir permis l'accès à son établissement ;

A Mr BEUGRE Célestin, Directeur des études du Lycée A . N. de Marcory , pour sa parfaite collaboration ;

A Messieurs KRA Ados , N'GUESSAN David , BAHI Calixte, YEO Dodehe , pour leur aide et leur sympathie ;

A toute l'équipe du Laboratoire ANTIGENE du Département de Biochimie (FAST) ;

A tous nos malades et volontaires qui se sont prêtés sans crainte à cette étude ;

Permettez-nous de témoigner à vous tous qui avez participé de près ou de loin à l'élaboration de ce document , par votre apport technique ou par vos précieux conseils, notre profonde reconnaissance et nos vifs remerciements .

A MON EPOUSE , MERCI CHERIE

A MES FILLES , ce travail doit être pour vous un exemple de persévérance

A MON PERE , MA MERE , MES FRERES ET SOEURS , ce travail pour
vous faire honneur

A mon pasteur et à toute l'assemblée du Tabernacle " LA PIERRE DE
FAITE " sans votre soutien spirituel rien n'aurait été possible .

LE PRESENT TRAVAIL EST DEDIE
A MON SEIGNEUR ET MON SAUVEUR
LE SEIGNEUR JESUS-CHRIST ,
LE DIEU TOUT-POISSANT

LISTE DES ABREVIATIONS

% : pour cent
°C : degré celcius
pH : potentiel d'hydrogène

g : gramme
mg : milligramme

min. : minute

CMF : concentration minimale fongicide

HCL : acide chlorhydrique

qsp. : quantité suffisante pour

T. : tricophyton

SOMMAIRE

<u>PARTIE I</u>	<u>INTRODUCTION.....</u>	1
<u>PARTIE II</u>	<u>ETUDE EXPERIMENTALE.....</u>	10
	<u>I - MATERIELS</u>	
	I-1 Matériels de formulation	
	• Matériel biologique.....	10
	• Petit matériel	10
	I-2 Matériels du contrôle galénique.....	10
	I-3 Matériels d'étude de la tolérance cutanée....	10
	<u>II - METHODES</u>	
	II - 1 M. De formulation	
	• La préformulation.....	11
	• La formulation.....	13
	II - 2 M. Du contrôle galénique	
	• Essais d'homogénéité	13
	• Détermination de la consistance	13
	• Détermination du pH	13
	II - 3 M. D'étude de la tolérance cutanée	
	• Irritation cutanée.....	14
	• Allergie cutanée.....	15
	II - 4 M. De l'expertise clinique.....	15
<u>PARTIE III</u>	<u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	17
<u>PARTIE IV</u>	<u>DISCUSSION ET</u>	
	<u>CONCLUSION GENERALE</u>	26
	<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	27

SCIENCE (P.F.F) PHIF

INTRODUCTION

1. LES MYCOSES SUPERFICIELLES

1.1 Description (BOUCHET et coll.,1979)

Certains champignons déterminent chez l'homme et chez les animaux des affections parasitaires appelées mycoses.

Les mycoses superficielles sont localisées à la peau, aux phanères, et sur les muqueuses. Il en existe trois types : les dermatophytoses, les levuroses (candidoses) et le Pityriasis versicolor .

a. Les dermatophytoses (BOUCHET et coll.,1979)

Ce sont les mycoses superficielles à dermatophytes rencontrés chez l'homme et les animaux . Ces dermatophytes sont répartis en trois genres *Microsporum* , *Tricophyton* et *Epidermophyton* . Ils provoquent trois types d'affections différentes par leur localisation . Ce sont :

- . Les dermatophyties du cuir chevelu ou teignes ;
- . Les épidermophyties localisées au niveau de la peau glabre ;
- . L'onyxis dermatophytique de la région unguéale .

• **Les Dermatophytoses du cuir chevelu ou teignes** (selon LARIVIERE et coll. , 1987)

Les teignes correspondent à un parasitisme des cheveux et des poils, à l'exception des poils pubiens et axillaires qui ne sont jamais atteints .

On distingue trois types de teignes .

Les teignes tondantes : atteignent les enfants de 1 à 12 ans, et les garçons sont souvent plus atteints que les filles . Elles évoluent jusqu'à la puberté et guérissent spontanément.

Les teignes tondantes microsporiques (agent causal : *Microsporum*) déterminent de grandes plaques d'alopecie peu nombreuses de 2 à 5 cm de diamètre ; il y a en général une seule plaque à bords bien nets .

Les teignes tondantes tricophytiques (agent causal : *Tricophyton*) déterminent de nombreuses petites plaques d'alopecie de 1 à 2 mm, difficiles à repérer, peuvent confluer pour former de grandes plaques à contours polycycliques .

Les teignes suppuratives : atteignent les sujets de tous les âges et déterminent : soit le Kérior de Celse au niveau du cuir chevelu chez l'enfant et la femme adulte ;

soit un Sycosis au niveau de la barbe chez l'homme ;

soit une folliculite disséminée au niveau des poils du corps à l'exception des poils pubiens et axillaires .

Le kérion débute par une petite plaque teigneuse, squameuse, qui s'agrandit, puis gonfle, devient rouge, inflammatoire, souvent très prurigineuse et douloureuse ; il se forme un macaron surélevé à bords nets . Les cheveux et poils parasités sont éliminés avec le pus .

Dans la folliculite , les plaques sont de taille variable à contours irréguliers, le processus inflammatoire est le même, mais pas de macaron .

Les principaux agents sont des parasites zoophiles et la contamination est d'origine animale :

Tricophyton mentagrophytes existe chez les chevaux, les animaux de laboratoire (souris, cobaye, lapin) ;

T.ochraceum (*T.faviform*) existe chez les bovidés, en particulier les veaux .

· ***La teigne favique ou favus*** : favorisée par la promiscuité, la misère, les mauvaises conditions d'hygiène, est devenue rare dans les pays industrialisés, mais très fréquente en Afrique . Elle sévit aussi bien chez l'adulte que chez l'enfant .

La lésion caractéristique est le godet favique ou favus . Les filaments du champignon qui prolifèrent dans le follicule pileux, mêlés à la sérosité forment en séchant une croûte jaunâtre d'où sortent quelques cheveux ternes, grisâtres , non cassés. Les godets peuvent confluer pour constituer une « croûte favique » qui s'étend progressivement sur tout le cuir chevelu, la lésion dégage une odeur désagréable de « nid de souris » .

L'agent responsable *Tricophyton schönieinii* est an thropophile .

Le favus très contagieux provoque de petites épidémies familiales ; c'est une maladie à déclaration obligatoire nécessitant une éviction scolaire .

De tous les agents responsables des teignes, *Tricophyton Soudanense* est le premier responsable en Côte d'Ivoire (34,4 %) [1].

• Les Epidermophyties

Ce sont des lésions localisées à la peau glabre qui apparaissent chez l'adulte et chez l'enfant . Il s'agit :

de l'herpès circiné

des lésions des grands plis : eczéma marginé de hébra

des lésions des petits plis : plis interdigito-plantaires et palmaires et du tokeleau

L'herpès circiné

La lésion initiale punctiforme, vésiculaire, progresse en couches concentriques ; elle s'étend parfois sur plusieurs centimètres, forme un cercle

avec un bourrelet périphérique érythémato-vésiculeux-suameux tandis que le centre guérit .

L'herpès circiné est plus ou moins prurigineux .Tous les dermatophytes sont mis en cause . Les principaux agents sont *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *T. ochraceum* en milieu rural .

L'eczéma marginé de hébra

Il siège le plus souvent au pli inguino-crural, quelque fois au pli axillaire ou au pli interfessier. Il débute au fond du pli, s'étend sur l'abdomen, mais surtout sur la face interne des cuisses . La lésion limitée par un bourrelet circiné érythemato-vésiculeuse plus ou moins net, plus ou moins typique , est parfois très prurigineuse. Elle sévit surtout chez les hommes jeunes de 15 à 40 ans ; les femmes sont quatre fois moins atteintes .

Les principaux agents sont deux espèces anthropophiles : *T. Rubrum* (22,8 %) [1] et *Epidermophyton floccosum*.

Les plis interdigito-plantaires et palmaires

La lésion débute au fond du pli du troisième ou quatrième espace interdigital . Bénigne elle ne présente que quelques squames secs et peut passer inaperçue . Plus importante , elle présente au fond du pli une fissure rouge vive, suintante , tandis que les bords du pli de squames fines, d'aspect nacré : c'est « le pied d'athlète ». Les agents sont *T. Mentagrophytes* (19 %) et *T. Interdigitale* (61,8 %) [1].

Le tokeleau

Il se présente sous forme de lésions squameuses en cocarde, concentrique recouvrant le tronc et les membres .Agent causal : *T. Concentricum* . Mycose limitée à l'Asie du sud-est, l'Amérique centrale et le Brésil .

• Atteinte des ongles

L'onxyxis dermatophytique = onychomycose (BOUCHET et coll. , 1979 , JACQUEMIN et coll. ,1987 , PRIGENT et coll. .)

C'est l'atteinte en profondeur de la couche cornée de l'ongle et plus rarement de la main .Tous les dermatophytes sont susceptibles d'être isolés ; les principaux agents responsables sont : *T. Rubrum*, *T. Interdigitale*, *T. schönleinii*, *T. Violaceum*, *T. Soudanense* (le premier responsable en C.I) [1].

L'onychomycose est une persistante très longue à guérir , rare avant 15 ans et après 40 ans avec un maximum de fréquence entre 25 et 30 ans . (DUNAND et coll. , 1979)

Les Leuconychies (BADILLET et coll. ,1979)

Ce sont des taches blanches siégeant au centre de l'ongle ou plusieurs petites taches qui vont s'étendre jusqu'à une teinte jaunâtre .L'évolution ultérieure peut se faire vers une destruction totale de l'ongle : on parle d'onychomycodystrophie totale . Les agents en cause sont *T. Rubrum* et *T. Interdigitale*.

b. Les levuroses (VANBREUSEGHEM et coll., 1979)

Ce sont des mycoses causées par des levures appartenant majoritairement au genre *Candida* . Les candidoses sont les plus fréquentes et les plus variées dans leurs expressions cliniques. On cite :

Les candidoses des plis (INTERTRIGO) (PEYRON et coll. , 1984)

Le revêtement cutané a un aspect rouge vif, luisant, recouvert parfois de squames blanchâtres . La lésion a une extension centrifuge, à limites nettes, irrégulières, marquées par une collerette épidermique . Les signes peuvent être variés , allant de la sensation prurigineuse ou de cuisson à l'absence de manifestations .

Candida albicans domine la pathologie des plis inguinaux (82,5 %) et interdigito-plantaires (48,8 %) en Côte d'Ivoire (selon ASSOUMOU et coll., 1993).

Les candidoses de la peau glabre

L'aspect clinique est identique à celui des candidoses des plis . Le cas le plus typique est l'érythème fessier .

Les candidoses des ongles

L'atteinte des ongles par *Candida* débute toujours au niveau du sillon péri-unguéal, à la partie proximale de l'ongle . La progression des lésions se fait de façon centrifuge, vers le bord libre de l'ongle . La caractéristique clinique de cette lésion est l'existence d'un bourrelet péri-unguéal inflammatoire ou périonyxis douloureux, pouvant laisser sourdre une goutte de sérosité .

c. Le Pityriasis Versicolor (BOUCHET , 1979)

Le Pityriasis Versicolor est probablement la mycose la plus courante , la plus fréquente et la plus répandue à travers le monde .

L'agent responsable est *Malassezia furfur*. C'est un champignon saprophyte universellement répandu. Il se révèle pathogène surtout dans les régions chaudes et humides.

La lésion élémentaire est une tache superficielle bien délimitée de quelques millimètres de diamètre, recouverte de squames très fins non adhérents au tissu sous-jacent mais suffisamment accolés les uns aux autres. Cette lésion se localise préférentiellement au niveau du tronc et des bras, elle est de couleur variable, brun plus ou moins foncé, chamois, parfois claire, rarement rose.

1.2 Profil épidémiologique (ASSOUMOU et coll., 1993)

Les mycoses tiennent aujourd'hui une place de tout premier plan dans la pathologie infectieuse, leur fréquence et leur gravité n'ont cessé de croître depuis quelques années. Elles se traduisent en effet par un cortège symptomatique le plus souvent pénible (prurit, brûlures, surinfection bactérienne) et représentent une source de gêne permanente dans la vie de tous les jours. Par ailleurs leur fréquence est accrue dans les climats chauds et humides.

De 1986 à 1991, 2586 examens mycologiques ont été pratiqués sur la peau et les phanères au laboratoire de Mycologie de la Faculté de Médecine par ASSOUMOU et COLL. Parmi ceux-ci, 41,7 p.100 des examens présentent des infections mycosiques. Ces examens ont permis d'isoler 1067 souches dont 48,7 % de dermatophytes

50,8 % de champignons levuriformes

0,3 % de champignons dématiés

1.3 Les difficultés liées au traitement actuel des mycoses superficielles

Les mycoses superficielles ont une importance croissante en pratique quotidienne. L'arsenal thérapeutique existant est efficace.

Cependant la grande majorité des molécules actives utilisées actuellement présente des effets secondaires très désagréables pour le patient (voir **annexe 2**)

Dans la thérapeutique actuelle, il faut procéder nécessairement à une association de molécules actives (souvent association antiseptique + antifongique) et cela pendant une durée assez longue pour obtenir une éradication complète de l'agent pathogène.

La durée du traitement et la nécessité d'une association médicamenteuse entraînent un coût élevé du traitement .

Enfin, après l'éradication de la mycose, ces médicaments ne favorisent pas une reconstitution rapide de la peau lésée .

2 . FONDEMENT DE NOTRE ETUDE

Compte tenu des différents aspects médicaux que nous venons d'évoquer, il nous apparaît opportun de rechercher les substances naturelles minimisant les effets indésirables, favorisant la reconstitution de la peau et présentant à la fois une activité antiseptique et antifongique , en même temps qu'un coût réduit du traitement .

Nous nous sommes donc intéressés à une substance naturelle, MISCA, un extrait de plantes très actives contre des affections dermatologiques fréquentes en Afrique intertropicale , particulièrement les mycoses cutanées .

MISCA a fait l'objet de nombreuses études de la part des biochimistes, des toxicologues et des pharmacologues des Laboratoires Antigène , CROCKETT et coll. , 1992 , VANGAH-MANDA et coll. , 1993, 1995 , GUEDE GUINA et coll. , 1995 , 1997 , BONGA et coll., 1995 , MOBIE et coll. , 1996 , KRA et coll. , 1996 , SALIMATA et coll., 1995 .

3. ETUDES ANTERIEURES REALISEES SUR MISCA

& . Etude de l'activité antimicrobienne de l'extrait végétal total, le MISCA, contre les germes opportunistes au cours du SIDA [6]

L'extrait a été étudié sur *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Tricophyton mentagrophytes* et *Cryptococcus neoformans* .

Tous les germes testés ont été sensibles à l'extrait selon une relation doses/effets.

La sensibilité de ces germes a été aussi cliniquement confirmée ; l'analyse des antifongigrammes a montré une grande sensibilité du *Tricophyton* qui est un sérieux agent de la teigne ainsi que le *Cryptococcus*, agent très redouté de la méningite à Cryptocoque qui dans 36 % des cas en Afrique aggrave le pronostic chez les immunodéprimés .

& . Amélioration de l'action antifongique de MISCA, un extrait végétal contre *Cryptococcus neoformans* [13]

L'objectif de cette étude a été de tester et d'améliorer par une extraction éthanolique et un fractionnement chromatographique sur sephadex G 50, l'activité antifongique de MISCA .

Ce travail a montré que les extraits de MISCA ont une action antifongique et plus singulièrement contre *Cryptococcus neoformans* avec une nette amélioration de la CMF de la fraction chromatographique alcoolique.

& . Mise en évidence de phytostérols antifongiques dans l'extrait alcoolique de MISCA, contre *Cryptococcus neoformans* . [3]

Au cours de cette étude , il a été mis en évidence, par une évaluation chimique simple, la présence de phytostérols, de Baryum et d'ion iodure dans la fraction chromatographique à l'éthanol (F2) . Cette fraction F2 qui est une substance huileuse représente une excellente matière première pour la production de molécules actives contre *Cryptococcus neoformans* ;

& . Action antifongique de MISCA sur *Tricophyton rubrum* [14]

Sur milieu sabouraud chloramphénicol l'action de MISCA a été testée sur la croissance in vitro de *Tricophyton rubrum*. On a observé des inhibitions importantes de croissance, avec une concentration minimale fongicide égale à 6,25 mg/ml et une concentration pour 50 % d'inhibition égale à 4,69 mg / ml , sur une culture de 48 à 72 heures à 30°C.

& . Evaluation de l'action antiaspergillaire de MISCA [10]

L'action antifongique de MISCA F2 a été testée sur la croissance in vitro de *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*. Cet extrait a présenté une action fongistatique doublée d'une action fongicide.

En conclusion, cette substance huileuse de MISCA peut faire l'objet d'une formulation galénique parce que c' est une substance active dont l'activité antimycosique a été parfaitement mise en évidence et parce que ses propriétés physico-chimiques sont connues.

4. LA FORMULATION GALENIQUE

4.1 Les objectifs

La préparation de forme galénique est extrêmement importante pour l'utilisation rationnelle des substances actives en les adaptant à la voie d'administration adéquate.

Il faut cependant noter que l'opération de mise en forme galénique a d'autres objectifs importants :

- Favoriser la conservation des substances actives en les protégeant contre les facteurs d'altération ;
- Masquer et corriger les sensations et effets secondaires : odeur et saveur désagréables , réactions douloureuses ;
- Modifier la durée de l'activité thérapeutique de la substance .

4.2 La méthode de formulation ou le choix des excipients [14]

La formulation est l'art de sélectionner pour un principe actif donné, la ou les formes pharmaceutiques en fonction de la voie d'administration. Elle comporte plusieurs étapes :

• La sélection de la forme pharmaceutique

En se limitant à la voie cutanée, les formes pharmaceutiques pouvant être envisagés pour l'administration de notre substance active sont la pommade, la lotion, la crème, la poudre, le gel, la suspension, l'émulsion, la solution, la teinture..

Le choix de la forme appropriée va dépendre :

- des propriétés physico-chimiques de la substance active
- de la stabilité du produit fini
- des dermatoses à traiter
- et des choix commerciaux .

• Choix qualitatifs de l'excipient

Les excipients de base interviennent par leur nature chimique, leurs propriétés physiques et mécaniques, leur lipophilie ou leur hydrophilie.

Un bon excipient doit contribuer à donner à la pommade une consistance convenable qui permette un étalement facile ;

- il doit être bien toléré et son pouvoir allergisant doit être faible ;
- il doit en général faciliter la pénétration des principes actifs dans les tissus ;
- il doit être suffisamment stable pour permettre une bonne conservation .

Les excipients utilisés pour notre formulation font partie des glycérides. Ces glycérides d'une façon générale sont bien tolérés par les tissus . Etant miscibles au sébum, ils peuvent faciliter la pénétration des principes actifs . Etant occlusifs, ils favorisent l'hydratation de la peau et ainsi la pénétration de certains principes actifs .

• Choix quantitatifs des excipients

Les choix quantitatifs des excipients résultent de la connaissance d'un domaine expérimental dans lequel :

- les paramètres d'entrée sont représentés par des formules dans lesquelles les proportions de chacun des excipients varient ;
- les paramètres de sortie correspondent aux caractéristiques du produit fini.

5. OBJECTIF DE NOTRE ETUDE

Notre étude a consisté à réaliser une mise en forme galénique, d'une pommade hydrophobe avec comme substance active l'extrait huileux de MISCA.

Nous avons rassemblé toutes les observations sur MISCA qui peuvent nous être utiles. Il s'agit essentiellement des propriétés physico-chimiques et de tout ce qui concerne sa pharmacocinétique.

Les excipients ayant permis la fabrication de la pommade sont des substances produites localement.

La pommade obtenue a fait l'objet, dans un premier temps, d'un contrôle galénique et d'une étude de tolérance cutanée ; dans un deuxième temps, son activité antimycosique a été mise en évidence sur certaines dermatophytoses et sur le Pityriasis Versicolor.

Notre travail est subdivisé en cinq parties :

- Introduction
- Etude expérimentale
- Résultats expérimentaux
- Conclusion générale, discussion et perspectives

PARTIE
EXPERIMENTALE

I - MATERIELS

I - 1 MATERIELS DE FOMULATION

A - Matériel biologique

1. Huile de MISCA :

- matière grasse de consistance semi-solide , de couleur verdâtre ;
- pH = 6,8
- présence de stérols mise en évidence par la réaction à l'anhydride acétique et l'acide sulfurique : observation d'un anneau pourpre ou violet virant au bleu, puis au vert à l'interphase ;
- présence d'ions Ba 2+ mise en évidence par la réaction à l' HCL et au sulfate d'ammonium au bain marie : observation d'un précipité blanc .

2. Beurre de karité purifié :

- matière grasse de consistance solide et de couleur blanche
- pH = 5,8
- indice d'iode = 11
- indice d'acidité (en acide oléique) = 1,3
- indice de saponification = 200
- indice de peroxydes = 0,8

3. Huile de coco :

- masse solide fondant vers 25°C, de couleur blanche, saveur douce et agréable ;
- pH = 6,3
- Indice d'acidité (en acide oléique) = 1,009
- indice d'iode = 9,31
- indice de saponification = 262,96
- indice de peroxyde = 0,5

B - Petit matériel et verrerie

Nous avons utilisé ceux disponibles au laboratoire .

I - 2 MATERIELS DU CONTROLE GALENIQUE

Microscope

Viscosimètre à écoulement

Spatule

Lames et lamelles

pH-mètre

I - 3 MATÉRIELS D'ÉTUDE DE LA TOLÉRANCE CUTANÉE

B - Matériel biologique

Des volontaires sains pour l'étude d'irritation primaire et des volontaires malades pour l'étude de l'allergie cutanée .

A. 2 Matériel opératoire

Sparadrap

Pansement adhésif non médicamenteux

II - METHODES

A. METHODES DE FORMULATION

A. 1 Préparation de l'extrait végétal

La poudre de rameaux feuillée a été extraite selon la méthode mise au point par GUEDE-GUINA et coll. (1993) .

A. 2 Purification du beurre de karité

- 1 . Beurre de karité brute chauffée jusqu'à ébullition ;
- 2 . Ajout de la terre à foulon ;
3. laisser chauffer pendant 20 minutes ;
4. première filtration sur du coton ;
5. deuxième filtration sur du papier filtre .

A. 3 Méthodes de formulation

a / La préformulation

1—*Choix de la forme adéquate, une pommade hydrophobe*

Le choix de la pommade s'explique par plusieurs raisons :

- l'extrait de plantes est lipophile, donc peu miscible à l'eau. Ainsi formuler des crèmes , laits , émulsions et solutions nécessite l'adjonction de surfactifs qui sont des excipients onéreux ;
- les mycoses entraînent généralement un dessèchement du stratum cornéum , il y a donc nécessité de formuler un médicament qui permet de maintenir la peau à un état d'hydratation facilitant la pénétration du principe actif ;

- la substance active étant hydrophobe, préparer une pommade hydrophobe est donc aisée et ne nécessite que l'adjonction de substances plus ou moins lipophiles.

2—Essais de formulation

Ils se sont déroulés en plusieurs étapes :

- Première étape : réalisation de mélange binaire

Huile de Misca 0,4 g
Beurre de karité 20 g

selon le mode opératoire suivant :

1. la moitié de beurre de karité est fondue
2. l'huile de Misca est introduite dans le beurre fondu
3. le beurre non fondu est ensuite introduit dans le mélange huile de Misca + beurre de karité .

- Deuxième étape : réalisation de mélange ternaire

Huile de Misca
Huile de coco
Beurre de karité

selon le mode opératoire suivant :

1. Huile de Misca dissous dans l'huile de coco préalablement fondue ;
2. le mélange Misca-huile de coco est mélangé à une partie de beurre de karité fondue ;
3. le reste de beurre non fondu est ensuite introduit progressivement .

Dans cette deuxième étape, on fait varier proportionnellement la quantité d'huile de coco et la quantité de beurre de karité en tenant compte de la concentration active du Misca qui doit être de 2 % dans la pommade .

Les formules testées sont :

	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Huile de Misca (en g)	1	1	1	1	1	1	1
Huile de coco (en g)	1	2	4	6	8	9	10
beurre de karité (en g)	48	47	45	43	41	40	39

Un examen macroscopique a permis d'apprécier dans le temps la stabilité, l'homogénéité et la consistance de ces pommades. La formule la plus stable , la plus homogène et d'une consistance convenable a été retenue pour la formulation de la pommade définitive.

b/ La formulation proprement dite

Elle a consisté à reproduire en plus grande quantité (200 g) la formule de base retenue . A cette formule est ajouté en plus un aromatisant en quantité suffisante pour avoir une odeur agréable.

Cette formulation a permis :

- de connaître l'influence de la variation de teneur de chacun des excipients
- et de vérifier la reproductibilité des propriétés du mélange .

Cette pommade a été ensuite conditionnée dans des pots en quantité de 10 g.

Elle a ensuite fait l'objet de contrôles galéniques.

B - METHODES DU CONTROLE GALENIQUE

B.1 Essais d'homogénéité

--- Macroscopiquement on vérifie l'homogénéité de la pommade par étalement en couche mince sur une lame à l'aide d'une spatule ; la pommade est homogène si elle présente une coloration uniforme ;

--- Un examen microscopique va permettre de contrôler la dispersion de l'huile de Misca dans le beurre de karité ; la pommade étant à phase unique, elle est considérée homogène si elle renferme des particules de taille moléculaire .

B.2 Détermination de la consistance

--- La viscosité : Grâce au viscosimètre à écoulement on va déterminer à la température de 25°C, le temps que la pommade met à s'écouler .

--- La capacité d'étalement : elle est déterminée en mesurant la surface d'étalement sous l'action d'une force déterminée .

B.3 Détermination du Ph

La pommade est triturée avec de l'eau distillée dont on mesure ensuite le pH. Cette méthode permet de voir si la pommade est susceptible de céder des acides ou des bases aux tissus au contact desquels elle va se trouver.

C - METHODES D'ETUDE DE LA TOLERANCE CUTANEE

Indépendamment des manifestations toxicologiques systémiques , liées à la résorption d'un médicament, toute substance placée au contact de la peau peut

provoquer des réactions cutanées spécifiques .Ces effets indésirables se manifestent surtout sous forme de réactions d'irritations et d'allergie.

La toxicité locale de notre pommade sera donc examinée spécifiquement sous les aspects suivants :

Etude de l'irritation primaire : c'est une cytotoxicité locale apparaissant immédiatement après une première application ou se manifestant par effet cumulatif .

Etude de l'allergie cutanée, de mécanisme immunologique .

C.1 METHODES D'ETUDE DE L'IRRITATION PRIMAIRE

1- Patch test unitaire chez l'homme

Ce test permet de déceler en premier lieu des réactions d'irritations dues à un premier contact avec le produit .Toute fois il peut mettre en évidence, et indirectement, des réactions allergiques dues à une sensibilisation antérieure à certains composants de la préparation .

La méthodologie est la suivante :

- a. Mettre la peau en contact avec la préparation, sous un pansement, durant 48 heures ;
- b. Lire les réactions un quart d'heure après l'enlèvement du patch (délai nécessaire pour que toute rougeur causée par la compression ait disparue) ;
- c. la zone d'application est ensuite surveillée durant 2 à 3 jours pour noter les réactions tardives .
- d. les réactions sont soigneusement notées :

- prurit	- vésiculation
- érythème	- escarre
- oedème	

Test réalisé sur 50 volontaires.

2. Patch test itératif chez l'homme

Ce test permet la recherche d'un éventuel pouvoir d'irritation durant une courte période, en applications itératives .

La méthodologie est la suivante :

- a. Faire un pansement occlusif à 6 heures du matin avec la pommade
- b. retirer le pansement à 9 heures du matin (soit 3 H d'application)
- c. laver à l'eau et essuyer
- d. remettre le pansement à la même zone

- e. recommencer l'opération pendant 4 jours consécutifs ;
- f. après les 4 jours, une appréciation visuelle chiffrée de l'intensité des réactions permet d'évaluer l'importance de l'irritation

Test réalisé sur 10 volontaires .

C.2 ETUDE DE L'ALLERGIE CUTANEE

Cette étude permet de mettre en évidence une dermatite de contact allergique (D.C.A).

La dermatite de contact allergique est une réaction qui , contrairement aux dermatites toxiques se manifestent rapidement (après 1 à 2 heures), mais peut apparaître après plusieurs heures, généralement 24 à 48 heures après l'application

Cette étude a été réalisée en même temps que l'expertise clinique, en recherchant les éventuelles manifestations allergiques présentées par les malades. Les réactions à détecter sont celles d'un eczéma, accompagné de prurit . Elle est limitée au point de contact, mais elle peut diffuser.

D. METHODE DE L'EXPERTISE CLINIQUE

Cette étude clinique préliminaire tente de répondre aux questions suivantes :

- l'extrait huileux Misca conserve - t - elle son activité antimycosique une fois formulé en pommade ?
- la forme galénique finie est- elle d'une utilisation plus aisée que la forme intermédiaire qu'est l'huile de Misca ?

Le protocole adopté est le suivant :

1. Lorsque le malade est reçu, on fait le diagnostic de la lésion pour identifier le type de lésion ;
2. une fiche maladie est ouverte (voir **annexe 3**)
3. la pommade à 2 % (10 g) est ensuite remise au malade qui va l'appliquer une fois par jour sur les lésions en débordant largement sur les zones saines ;
4. Un premier contrôle est effectué 2 semaines après la première visite ;
5. le deuxième contrôle est effectué 4 semaines après la première visite ;
6. Trois faits seront à apprécier :
 - soit un état stationnaire ou parfois aggravé
 - soit une amélioration
 - soit une guérison.

Nous avons travaillé sur une communauté scolaire de 13 élèves présentant des mycoses superficielles diverses :

RESULTATS EXPERIMENTAUX

A. LES RESULTATS DE LA FORMULATION GALENIQUE

& Le mélange binaire est de préparation difficile et présente une mauvaise homogénéité .

& Le mélange ternaire la plus homogène, la plus stable et ayant présenté une bonne consistance est de formule suivante :

Huile de Misca 1 g
 Huile de Coco 8 g
 Beurre de karité purifié 41 g

& La formule retenue pour 10 g de pommade est la suivante :

Huile de Misca	0,2 g
Huile de coco	1,6 g
Beurre de karité purifié	8,2 g
Alcoolature de citron	qsp

B. LES RESULTATS DU CONTROLE GALENIQUE DE LA POMMADE

<u>LES ESSAIS</u>	<u>LES RESULTATS</u>
Essai d'homogénéité	Couleur cyan foncé homogène
Consistance	consistance molle ; ne s'écoule pas ; et s'étale facilement par faible pression.
pH	6,8

C. LES RESULTATS DES ETUDES DE TOLERANCE CUTANEE

& Le patch unitaire : sur les 50 volontaires 5 ont présenté des érythèmes au niveau de la zone d'application (**90 % de tolérance**).

& Le patch itératif : sur les 10 volontaires aucun n'a présenté des irritations (**100 % de tolérance**).

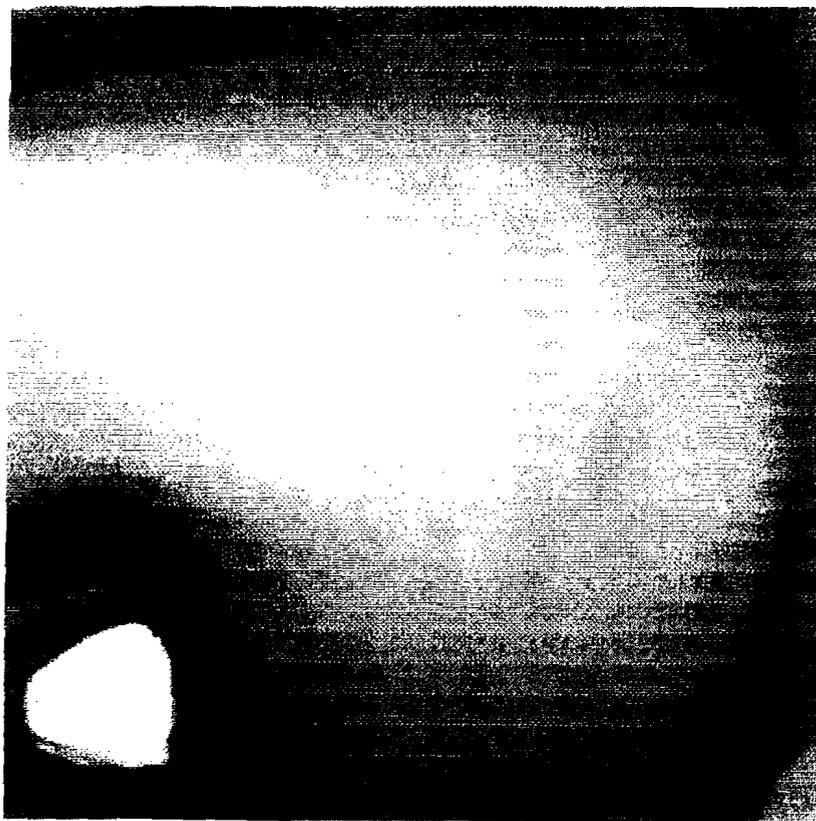
& L'allergie cutanée : sur les douze malades traités , aucun n'a manifesté des signes d'allergie (**100 % de tolérance**).

D. LES RESULTATS DES ETUDES D'EXPERTISE CLINIQUE

<u>Types d'infection</u>	<u>Après 14 jours de traitement</u>	<u>Après 28 jours de traitement</u>	<u>Après 1 mois et 14 jours de traitement</u>
Pityriasis Versicolor	<ul style="list-style-type: none"> • 2 (deux) malades ont présenté un état stationnaire ; • 5 (cinq) ont présenté une amélioration ; 	<ul style="list-style-type: none"> • 6 (six) malades sont totalement guéris . • 1 (un) est stationnaire 	Les 7 (sept) malades sont totalement guéris et pas de récurrence .
Dermatophytie circinée	les deux (2) malades ont présenté une amélioration .	Les deux malades sont totalement guéris .	Pas de récurrence
Teignes trichophytiques	Les deux malades ont présenté un état stationnaire .	Evolution stationnaire	Les deux sont totalement guéris
Eczématites hypochromantes	Le malade est totalement guéri .	Pas de récurrence.	Pas de récurrence
Dermite séborréique	Le malade est totalement guéri	Pas de récurrence	Pas de récurrence

EVOLUTION D'UN MALADE PRESENTANT LE PITYRIASIS VERSICOLOR

Avant traitement : taches superficielles répandues sur tout le dos, de quelques millimètres de diamètre, accolées les unes aux autres et de couleur chamois.



Après traitement : disparition des taches et la peau a retrouvé sa coloration normale après un mois

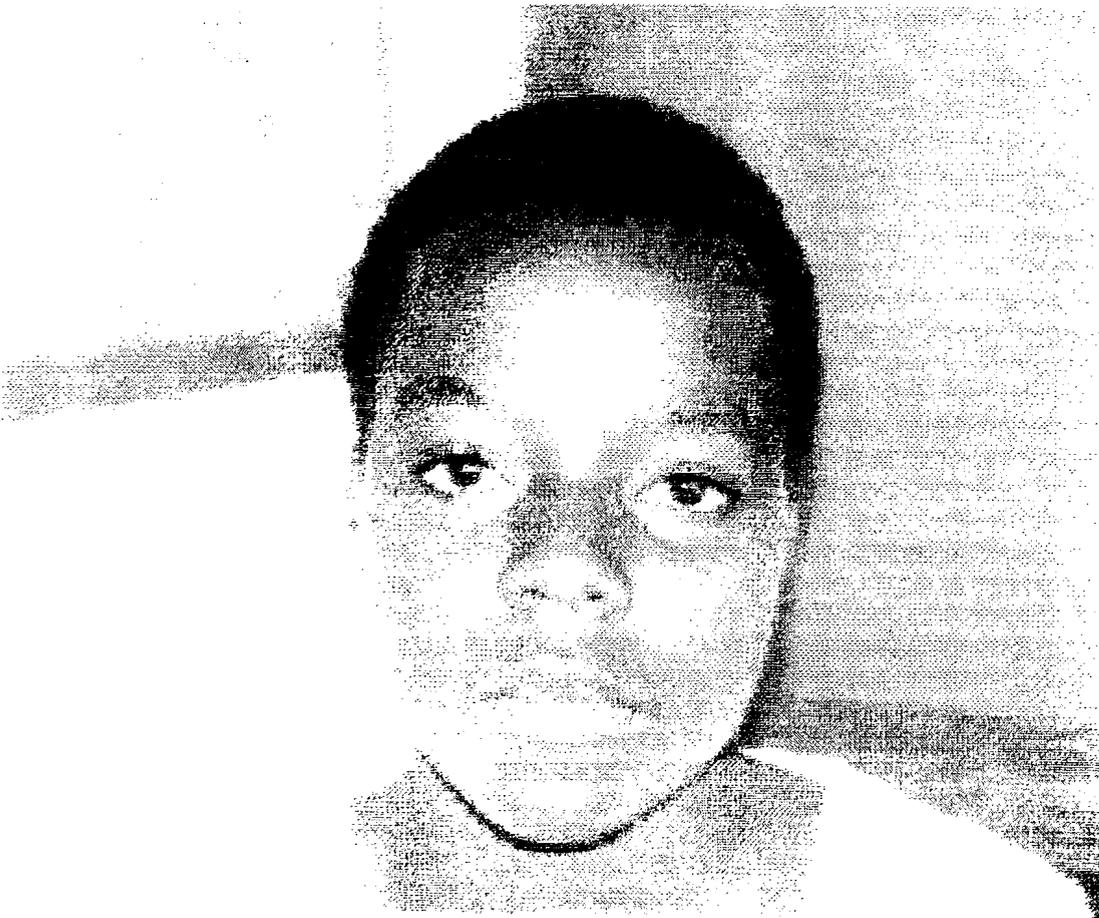


**EVOLUTION D'UN MALADE PRESENTANT
LE PITYRIASIS VERSICOLOR**

Avant traitement : lésions élémentaires recouvertes de squames très fins accolés les uns aux autres , localisées au niveau du front et de couleur claire

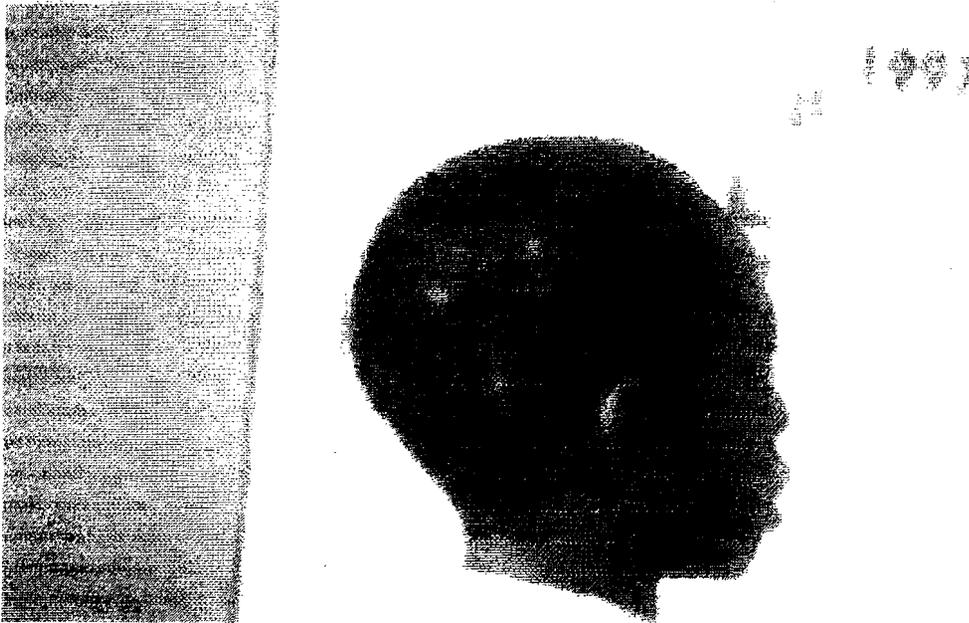


Après traitement : Disparition totale des lésions après un mois et le front a retrouvé une peau normale et lisse.



**EVOLUTION D'UN MALADE PRESENTANT
LES TEIGNES**

Avant traitement : teignes tondantes au niveau du cuir chevelu, sous forme de petites plaques d'alopecie de 1 à 2 cm



Après traitement : Disparition partielle des plaques d'alopecie après un mois et début de pousse des cheveux .

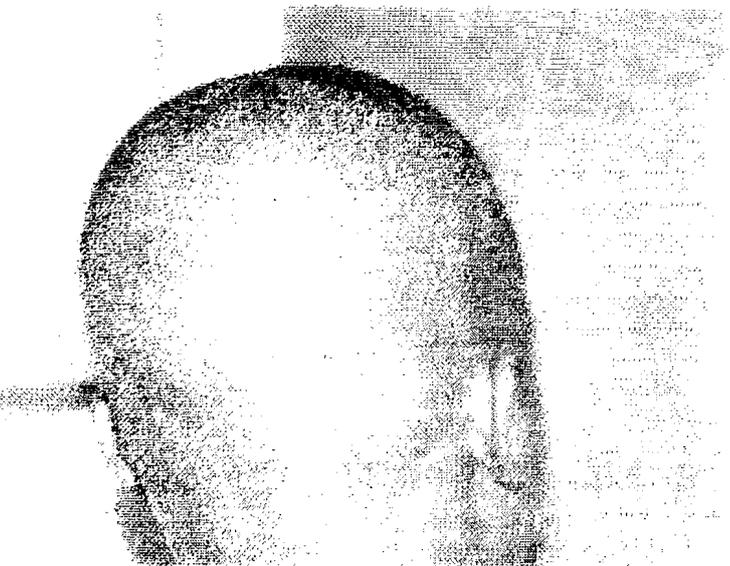


**EVOLUTION D'UN MALADE PRESENTANT
LES TEIGNES**

Avant traitement : Teignes tondantes au niveau du cuir chevelu , sous forme de petites plaques d'alopecie de 1 à 2 cm de diamètre et de couleur blanchâtre.



Après traitement : Disparition totale des plaques d'alopecie et pousse des cheveux au bout d' un mois



**EVOLUTION D'UN MALADE PRESENTANT
LA DERMATOPHYTIE CIRCINEE**

Avant traitement : lésion en couches concentriques au niveau du dos , du côté de l'omoplate droite et forme un bourrelet vésiculeux-squameux.

Après traitement : disparition du bourrelet après un mois , mais on note la présence d'une cicatrice.



**EVOLUTION DU MALADE PRESENTANT
L'ECZEMATITE HYPOCHROMANTE**

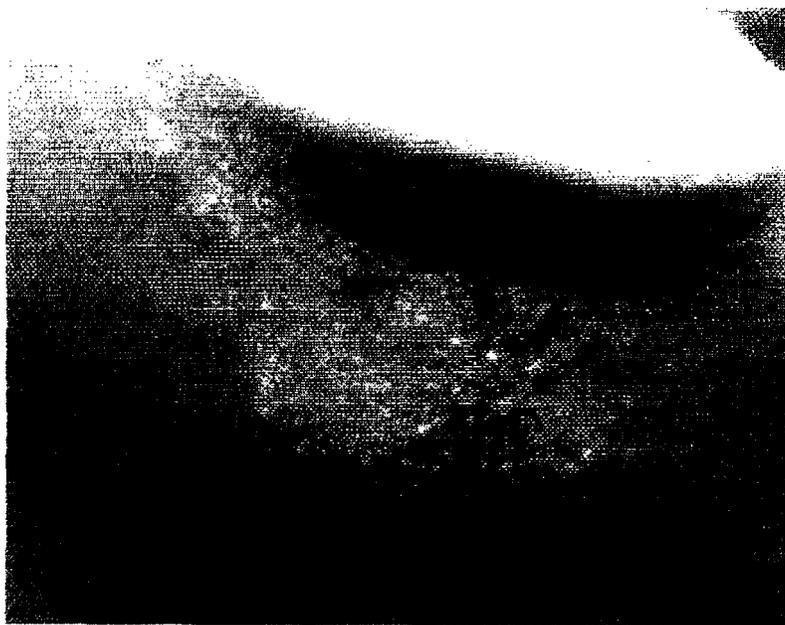
Avant traitement : bourrelet circiné érythémato-vésiculeuse localisé au niveau des plis du nez.

Après traitement : disparition du bourrelet après trois semaines, mais on note la présence d'une cicatrice claire.



**EVOLUTION DU MALADE PRESENTANT
LA DERMITE SEBORREIQUE**

Avant traitement : nombreux pustules séborréiques localisés au niveau du menton.



Après traitement : Disparition totale des pustules après deux semaines de traitement et le menton a retrouvé une peau normale et lisse.



DISCUSSION

ET

CONCLUSION GENERALE

Des études de préformulation et de formulation ont permis de mettre au point une **pommade à 2 %** avec comme substance active l'extrait huileux de **MISCA** et comme excipients le beurre de karité et l'huile de coco .

Les études de tolérance cutanée ont montré que la pommade obtenue ne présente à priori **aucun effet indésirable** pour le patient . Cela constitue un avantage majeur par rapport aux antimycosiques à usage cutané présents actuellement sur le marché pharmaceutique .

Cinq mycoses superficielles (le Pityriasis Versicolor, les teignes , la dermite séborréique , l'eczématite hypochromante , la dermatophytie circinée) ont été traitées par cette pommade à une posologie de une application par jour sur les parties lésées. Nous avons observé **une guérison généralement au bout d'un mois de traitement avec une reconstitution plus ou moins complète de la peau lésée** ; des récurrences n'ont également pas été observées .

Nous en déduisons donc que l'extrait végétal , **le MISCA**, conserve son **activité antimycosique une fois formulée en pommade** .

La pommade de MISCA obtenue est un donc un médicament parce que répondant à des normes galéniques et présentant une activité thérapeutique antimycosique parfaitement mise en évidence .

Ce médicament peut faire l'objet d'une autorisation de mise sur la marché (A.M.M) après constitution d'un dossier allégé de mise sur le marché . Pour constituer un dossier complet , il faudrait approfondir l'expertise clinique en traitant un nombre important de mycoses et de patients et faire une étude de tolérance biochimique qui permettra d'apprécier un éventuel passage du produit dans la circulation sanguine et les modifications ou non des constantes biologiques .

BIBLIOGRAPHIE

1. **ASSOUMOU A. , OUHON J. , KASSI E.A. , KOUAKOU D. , KONE M. , FERLY -THERIDOL .**
Bilan de la flore fongique isolée de la peau et des phanères à la faculté de Médecine d'Abidjan (C.I)
Journal de mycologie médicale , 1993, 3, p 150-153
2. **BADILLET G.**
Leuconychies superficielles et mycoses unguéales cliniquement apparentes
Bull. Soc . Fr . mycol . méd. 1979 , vol 8, n°1, p .85-89
3. **BONGA G. M. , VANGAH-MANDA M. , DE SOUZA C. , GUEDE GUINA F. R**
Mise en évidence de phytostérols antifongiques contre *Cryptococcus neoformans*.
Revue Méd. Pharm. Afr. , 1995, vol 9 , n°1, p 21-28.
4. **BOUCHET ph .**
Abrégé de cytogamie . Paris. Masson 1979 . 209 p
5. **CROCKETT C.O , GUEDE-GUINA F. , PUGH D.A. , VANGAH-MANDA M., BODO B., SMITH M.O , OCHILLO R.F.**
Antifungal activities of water extract of misca.
The FASEB journal , 1992 , 6 (4) p 1590
6. **DUNAND J. , ASSALE G. , DOULET J. , HERROIN P.**
Principaux agents d'onychomycoses à Abidjan
Bull . Soc . Fr . mycol . méd 1979, vol 7 , N° 2, p . 153 - 155
7. **GUEDE-GUINA F. , VANGAH -MANDA M. , BONGA M. , DE SOUZA C .**
Activité antimicrobienne d'un extrait végétal, Misca, contre les germes opportunistes au cours du SIDA.
Revue. Med. Pharm . Afr . 1995 - vol . 9 , N° 1, p 13-19
8. **GUEDE-GUINA F., KRA M.A , VANGAH-MANDA M. , BONGA M.G.**
Inhibition par MISCA-F2 de la croissance de *Apergillus fumigatus*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* : trois germes fongiques opportunistes du SIDA.
Afrique biomédicale, 1997, Volume n°2, N°1, p.11-16

9. **JACQUEMIN P. , JACQUEMIN JL .**
Parasitologie clinique. Paris : Masson, 1987, 228 p.
10. **KRA ADOU K.M**
Evaluation des effets d'un nouvel antiaspergillaire de source naturelle . DEA de biotechnologie , Faculté des sciences et techniques (Abidjan) 1996, p.30
11. **LARIVIERE M. , BEAUVAU B. , DEROVIN F., TRAORE F.**
Parasitologie médicale . Paris : Ellipse , 1987 , 238 p.
12. **LE HIR A.**
Bonnes pratiques de fabrication
Abrégés . 7^e Edition. Masson, 1997, 382 p.
13. **MOBIE P. , KRA A., BONGA M., VANGAH-MANDA M.,
GUEDE-GUINA F.**
Quelques éléments du spectre préliminaire d'une action anti-infectieuse des phytostérols de MISCA-F2.
Poster CISMA ,1997.
14. **MOBIE P. , BONGA G.M. , VANGAH-MANDA M., de SOUZA C.,
GUEDE-GUINA F.**
Action antifongique d'un huile végétale sur *Tricophyton Rubrum*
Revue Médicale et Pharmacopée africaine (sous presse) , 1997 .
15. **PEYRON F. , PIENS M. A.**
Dermatophytoses en Afrique tropicale
Med. d'Afr. Noire , 1984, T. 31 , N°3 , p 179- 188
16. **PRIGENT F. , JENMOUGIN M. , GIVATTE J.**
Les mycoses superficielles à dermatophytes
Revue . Prat, 184, T. 34, N° 7 , p 279-287
17. **VANBREUSEGHEM R. , DEUROEY CH , TAKASHIO M .**
Guide pratique de mycologie médicale et vétérinaire
2^e Ed. Paris : Masson , 1979, 265 p

**18. VANGAH-MANDA M., BONGA M., DE SOUZA C., GUEDE
GUINA F.**

Amélioration de l'action antifongique de Misca , un extrait végétal
contre *Cryptococcus néoformans*.

Afrique Bio-médicale , 1995, vol 1 , N°1, p 16 - 19

19. VEILLARD M.

La formulation ou le choix des excipients

STP pharma N°6 (hors série) , 1990 , p 29-36

ANNEXE 1

Principaux antifongiques à usage cutané et leurs présentations médicamenteuses

Nom DCI . Dénomination commerciale	Forme galénique	Actif sur
<u>ANTIBIOTIQUES</u>		
Nystatine (MYCOLOG)	Pommade	C
Amphotéricine (FUNGIZONE)	Pommade , Lotion	C + M
Pimaricine (PIMAFUCINE)	Pommade	C + D + PO + M
Griséofulvine (GRISEFULINE)	Pommade	D
Variotine (LEOFUNGINE)	Pommade	D
<u>DEV . IMIDAZOLES</u>		
Nitrate d'éconazole (PEVARYL)	Lait, crème, poudre	C + D + PO + M
Clotrimazole (TRIMYSTEN)	Crème 1%	
Nitrate de Miconazole (DAKTARIN)	Gel, lotion, poudre 2%	
Nitrate d'Isoconazole (FAZOL)	Crème 2%	
<u>DEV . SOUFRES</u>		
Tolnaftate (SPORILINE)	Lotion 1%	D + PO
Tolnaftate (SPORIDERM)	Poudre 0,5 %	
Disulfure de Sélénicum (SELSUN)	Suspension	PO
THEROPS	Soluté , poudre	D + PO
FONDERMA	Emulsion, solution	D + PO
	Pommade, solution 1%	D
<u>ACIDES GRAS SATURES et leurs ESTERS</u>		
Acide undécylénique		
MYCODECYL	Pommade, poudre	D
PAPS	Poudre	D
<u>AMMONIUMS QUATERNAIRES</u>		
FONGERYL	Pommade, liquide	D + C
FONGIBACTYL	Solution	PO

D : dermatophyte

C : Candida

PO : Pityrosporum orbiculaire

M : moisissure

ANNEXE 2

Principaux antifongiques à usage cutané et leurs effets indésirables

<u>PRODUITS</u>	<u>EFFETS INDESIRABLES / INSUFFISANCES</u>
MYCOLOG	Lors traitement prolongé, on peut observer : <ul style="list-style-type: none"> - peau sèche - éruptions acneiformes ou pustuleuses - hypertrichose - dépigmentation - eczéma allergique de contact
FUNGIZONE	Réactions locales exceptionnelles
GRISEOFULVINE	Réactions allergiques cutanées
PEVARYL	Irritations locales se manifestant par : sensation de chaleur , picotement , prurit , érythème . La guérison mycologique est en général obtenu à l'issue d'un traitement de 2 semaines. Mais la guérison clinique (disparition des taches) peut ne s'observer que plusieurs mois après la fin du traitement .
DAKTARIN	Sensations de brûlures , ou parfois prurit et rougeur de la peau .
FAZOL	Réactions locales type prurit ou brûlure

	qui cède dès arrêt du traitement .
SPORILINE	Effets systémiques possibles lors utilisation sur une grande surface . Réactions locales : irritations ou sensibilisations possibles .
SELSUN	Irritations cutanées. Usage prolongé entraîne séborrhée réactionnelle.
FONGERYL	Idem sporiline

ANNEXE 3

TRAITEMENT DES MYCOSES CUTANÉES
AVEC MISCA POMMADE 2%

Application une seule fois par jour sur les lésions en débordant largement sur les zones saines.

NOM DU MÉDECIN..... N°
IDENTITE DU MALADE
NOM ET PRÉNOMS.....
PROFESSION.....
DOMICILE.....
DATE DE NAISSANCE.....
SEXE.....

DESCRIPTION DE LA LÉSION

NOMBRE.....
SIÈGE.....
TYPE ^ MICROSPORIQUE TRICHOPHYTIQUE
ANCIENNETÉ.....

TRAITEMENTS DÉJÀ UTILISÉS.....
MOTIF DE SON ARRÊT ÉCHEC
INTEMPESTIF
EFFETS INDÉSIRABLES

RESULTAT DU PRÉLEVEMENT MYCOLOGIQUE.....

CONTROLES J7 J14 J21 J40 AUTRES
ÉTAT STATIONNAIRE
AMÉLIORATION
GUÉRISON

TOLÉRANCE

SIGNES RAPPORTÉS PAR LE PATIENT.....
SIGNES OBSERVÉS PAR LE MÉDECIN.....