

MISE AU POINT D'UN MODELE EXPERIMENTAL DE CANDIDOSE VAGINALE CHEZ LA SOURIS.

Reçu le 31/03/2003 – Accepté le 17/04/2005

Résumé

On assiste à une recrudescence importante de cas de mycoses superficielles, notamment les vulvovaginites candidosiques chez la femme. L'intérêt de la mise au point d'un modèle expérimental de la candidose vaginale s'est donc accrue ces dernières années pour étudier notamment, les différentes étapes de l'infestation de la muqueuse vaginale par les levures. Le modèle expérimental de candidose vaginale mis au point, est réalisé par inoculation intra-vaginale 25 µl d'une suspension de levures [$2,5.10^6$ UFC] chez la souris en oestrus permanent, entretenu par une injection hebdomadaire, en sous-cutané de 25 mg /kg de Benzoate d'oestradiol.

Mots clés : Candidose vaginale, *Candida albicans*, souris, Benzoate d'oestradiol.

Abstract

One witnesses a significant recrudescence of case of surface mycoses in particular the vaginal candidosis by the woman. The interest of the development of an experimental model of the vaginal candidosis thus increased this last years in particular to study the various stages of the infestation of the vaginal mucous membrane by yeasts. The experimental model of vaginal candidosis developed at the point, is carried out by intra-vaginal inoculation of 25 µl of a yeast suspension [$2,5.10^6$ CFU] in the mice in permanent oestrus, maintained by a weekly injection, under cutaneous of 25 mg / kg of Oestradiol Benzoate.

Keywords: Vaginal Candidosis - *Candida albicans* - Mice - Oestradiol Benzoate.

M. AISSI
K. HARHOURA
A. ABABOU

Laboratoire de parasitologie
Ecole nationale vétérinaire
Alger, Algérie.

ملخص

نلاحظ ازدياد كبير في حالة فطار سطحي، وخاصة التهاب الفرج والمهبل من نوع عند الأنثى. أهمية إيضاح نموذج تجريبي ل مهبل كثر خلال هذه السنوات الأخيرة لدراسة خاصة إصابة مخاط المهبل من طرف الخمائر. النموذج التجريبي للمهبلية المضاح، حقق عن طريق تلقيح ضم مهبل 25 ميكرو لتر من مزيج الخمائر [$2.5 \cdot 10^6$] عند الفأر، ووقاية بمعادل حقنة يومية تحت جلدية بمغيار 25 ملغ/كغ من Oestradiol benzoate. *Oestradiol benzoate, Candida albicans*

L'incidence des mycoses ne cesse d'augmenter ces dernières années, notamment les candidoses superficielles localisées à la muqueuse vaginale, qui sont l'une des manifestations les plus fréquentes dans la pathologie candidosique. Des études rétrospectives ont révélé que les vulvo-vaginites candidosiques représentaient une prévalence significative chez la femme ; Ainsi, des études ont estimé que cette affection représentait entre 44.9 % à 75 % de toutes les infections vaginales chez la femme [1, 32,42]. Certains facteurs favorisent l'apparition de cette affection, notamment : un antécédent de cystite fibrosique [35%][30], la prise d'antibiotiques et le diabète (entre 50% et 75%)[30,32], une affection bactérienne (34%)[26], la grossesse [entre 10% et 83%][6], la prise de pilules contraceptives [32], la période prémenstruelle [25], la prise de Tamoxifen par des femmes ménopausées [36] et enfin l'immunodéficience d'origine virale [35]. L'instauration d'un traitement antifongique efficace, le choix de la molécule à utiliser et le choix de la voie d'administration dépendent en grande partie de la maîtrise des différents facteurs favorisant l'apparition de l'infection vaginale. Les principaux facteurs qui ont fait l'objet d'études poussées sont nombreux, notamment, l'étude des facteurs de virulence impliqués dans la pathogénicité de *Candida albicans*, principale levure isolée dans les vulvo-vaginitescandidosiques. L'habilité de *C. albicans* à causer des infections vaginales, est liée en particulier à sa capacité à produire des filaments mycéliens *in vivo*, à la production d'enzymes, comme les aspartyl protéinases SAP1, SAP2 [7,27], la phospholipase B [27], et sa capacité à adhérer aux cellules épithéliales vaginales *in vitro* et *in vivo* [5, 7,20,21,31,32,33,34].

Ces facteurs ont pu être étudiés grâce à la mise au point d'un modèle expérimental de candidose vaginale chez la rate et la souris.

Ce modèle expérimental murin a permis, notamment de comparer l'efficacité de molécules antifongiques telles que les imidazoles et les triazoles dans le traitement de la candidose vaginale par voie intra-vaginale et orale [24, 40,46], l'étude de l'inhibition de l'adhérence *in vivo* des levures de *Candida albicans* aux cellules épithéliales vaginales, par un extrait soluble de chitine [20, 31,32].

Au vue des différents domaines d'intérêts que peut représenter la mise au point d'un modèle expérimental, nous avons tenté dans notre étude, de mettre au point un modèle expérimental de candidose vaginale chez la souris. A cet effet, nous avons comparé l'infection vaginale expérimentale des souris avec une souche de *C. albicans* [901092], isolée d'une patiente atteinte d'une vulvo-vaginite et une souche de *C. tropicalis* [901190] isolée d'une patient atteinte de mycose buccale et retenu celle qui nous permettra d'obtenir 100% d'animaux infectés durant toute l'expérimentation, à savoir 35 jours. Pour l'étude du développement des levures dans la sphère génitale, de nombreux modèles expérimentaux ont été proposés et étudiés depuis plus de 30 ans [11,19,25,27,39,38, 40,41,44, 45]. Ainsi, la rate et la souris sont les animaux de laboratoire les plus fréquemment utilisés. Certains auteurs préfèrent travailler sur la rate [24,4,16,19,38,39,45] et d'autres sur la souris [10,42,13,11,25,40,41,44] pour mettre au point leur modèle expérimental de candidose vaginale. Pour notre part, nous avons choisi la souris, essentiellement, pour son coût peu onéreux et parce qu'elle ne nécessite pas, contrairement à la rate, d'ovariectomie avant l'induction d'un oestrus.

MATERIELS ET METHODES

A-Souches utilisées et conditions de cultures

1- Organismes et conditions de culture : Deux souches de levures sont utilisées dans notre expérimentation, isolées de patients de l'Hôpital de Pasteur Paris, préalablement identifiées par le Centre de Référence des Mycoses de l'Institut Pasteur Paris. Une souche de *Candida albicans* [901092] isolée d'une patiente atteinte d'une vulvo-vaginite et une souche de *Candida tropicalis* [901190] isolée de la cavité buccale d'un patient. Ces souches sont entretenues par des repiquages hebdomadaires sur milieu gélosé Sabouraud additionné d'un antibiotique (20 g de glucose, 10 g de peptone de Chapoteau, 20 g de gélose, 0.5 g de chloramphénicol, 1 l d'eau).

2 - Obtention d'une suspension de levures : Une colonie de chaque souche de levures de *Candida albicans* [901092] et de *Candida tropicalis* [901190] est ensemencée dans une fiole, contenant 05 ml du milieu Sabouraud liquide additionné de chloramphénicol [20 g de glucose, 10 g de peptone de Chapoteau, 0.5 g de chloramphénicol, 1 l d'eau]. Le tout est incubé à 27°C durant 18 heures, sous agitation constante [20,21]. La suspension de levures obtenue de chacune de ces deux souches, est centrifugée à

1.500 tours/minute et le culot obtenu, est repris dans de l'eau distillée stérile. Les levures sont dénombrées sur la cellule de THOMA. La suspension mère obtenue pour chaque souche est de 10^8 levures/ml.

B – Mise au point du modèle expérimental de candidose vaginale :

1 – Les animaux utilisés : Pour cette expérience, des souris femelles Swiss [IOPS-OF1] [Laboratoires IFFA-CREDO], pesant 18 à 20 grammes sont utilisées. L'eau est distribuée ad libitum et la nourriture est constituée de granulés. Les animaux sont logés dans des cages en plastic et la litière [sciure de bois] est renouvelée deux fois par semaine. La température du local est maintenue 22°C, avec une hygrométrie de 30%, une ventilation de 15 renouvellements par heure et un éclairage de 14 heures par jour. Les souris sont réparties en 06 lots [lot A, lot B, Lot TA, lot TB, lot C et lot TC]. Chaque lot est constitué de 10 souris, à l'exception du lot C et lot TC constitué de 20 souris. Toutes les souris du lot A, lot B, lot C et des lots témoins [TA, TB et TC], reçoivent par voie intra-vaginale, 25 µl d'un inoculum de 5.10^6 levures.

2 – Protocole d'obtention d'un Oestrus permanent : Un oestrus permanent est entretenu chez les souris du lot A, lot B, et lot C, par des injections de Benzoate d'oestradiol, [Benzo-Gynestryl retard, ampoule de 5 mg, Laboratoires ROUSSEL] en sous-cutané de 25 mg/Kg, chaque semaine, durant 35 jours. La première injection est réalisée 03 jours avant l'inoculation des souris [18]. Les suivantes sont effectuées 04 jours, 11 jours, 18 jours, 24 jours et 30 jours, après l'inoculation. L'oestrus est déterminé par la présence de cellules épithéliales anucléées dans les frottis vaginaux. Les souris des lots témoins [TA, TB et TC] ne subissent aucun traitement hormonal. (Tableau 1).

3 – Inoculation des souris par voie intra-vaginale : Toutes les souris des lots A, C et TA et TC, reçoivent 25 µl d'un inoculum de $2,5.10^6$ levures de *Candida albicans*, tandis que les souris des lots B et TB, reçoivent 25 µl d'un inoculum de $2,5.10^6$ levures de *Candida tropicalis*, par voie intra-vaginale, à l'aide d'une micropipette. L'inoculation des souris est réalisée 03 jours après la première injection de Benzoate d'oestradiol.

C-Validation du modèle expérimental de la candidose vaginale :

Le modèle expérimental est validé par un suivi clinique de l'infection vaginale, un examen direct par la réalisation de frottis vaginaux, par la détermination des UFC à partir de prélèvements vaginaux, et enfin par une étude histopathologique de vagins de souris.

1-Détermination des UFC dans les prélèvements vaginaux : Pour la détermination des UFC, nous avons comparé deux méthodes de prélèvements vaginaux sur les souris infestées. Ces deux méthodes ont été proposées par Ryley J.F et Mc Greggor S. [29]. La méthode de prélèvement vaginal qui nous permettra d'obtenir des

résultats stables, quantifiables permettant un suivi de l'infection vaginale des souris durant les 35 jours, sera retenue.

a) La méthode des lavages vaginaux : Une désinfection préalable, à l'alcool à 90°, de la région périnéale de l'animal est réalisée. Les lavages vaginaux consiste à effectuer à l'aide d'une micropipette, des mouvements d'aspiration et de refoulements dans le vagin infesté, d'une solution de 50 µl d'eau physiologique stérile additionnée de Pénicilline [100 U/ml, Gibco, Grand Island, N.Y.] et de Streptomycine [100 µ/ml, Gibco, Grand Island, N.Y.]. Ces prélèvements vaginaux sont réalisés aux jours 03, 07, 15, 21, 28, et 35 post-inoculation. Chaque lavage subit une série de dilutions au dixième [1/10^e, 1/100^e, 1/1000^e, 1/10000^e]. Cent microlitres [100 µl] de chaque dilution sont ensemencés sur le milieu gélosé de Sabouraud additionné de chloramphénicol. Les géloses sont incubées à 30°C durant 24 heures puis la détermination des UFC [Colonies Formant Unité] est effectuée. Un duplicata de chaque dilution est réalisé.

b) La méthode du raclage vaginal : Comme pour la méthode précédente, une désinfection préalable à l'alcool à 90°, de la région périnéale de l'animal est réalisée. Les raclages vaginaux sont effectués à l'aide d'une anse en plastic stérile à usage unique, calibrée à 01µl. La muqueuse vaginale est raclée légèrement à l'aide de l'anse, puis le raclage récupéré correspondant à 1 µl, est dilué dans quatre vingt dix microlitres (90 µl) d'eau physiologique (Dilution au 1/100^e) stérile additionnée de Pénicilline (100 U/ml, Gibco, Grand Island, N.Y.) et de Streptomycine (100 µ/ml, Gibco, Grand Island, N.Y.).

Ces prélèvements vaginaux sont réalisés aux jours 03, 07, 15, 21, 28, et 35 post-inoculation. Des dilutions successives de 1/10^e sont effectuées à partir de chaque prélèvement puis ensemencées sur milieu gélosé de Sabouraud additionné de chloramphénicol, et incubées à 30°C pendant 24 heures. Les UFC sont déterminées. Un duplicata de chaque dilution est réalisé.

2 – Les frottis vaginaux : Un examen direct est effectué par la réalisation de frottis vaginaux chez toutes les souris à l'aide d'une anse en plastic stérile. Ces frottis sont réalisés 24 heures, 15 jours et 30 jours post-inoculation afin de rechercher la forme invasive de *Candida albicans*, représentée par les filaments mycéliens et les levures germées. Ces frottis subissent une coloration de Gram. Les frottis vaginaux sont fixés à la chaleur (flamme du bec bunsen), puis colorés au violet de gentiane quelques secondes (1 g de violet de gentiane, 100ml d'eau distillée). Une solution iodurée (1 g d'iode, 2 g d'iodure de potassium, 300 ml d'eau distillée) est déposée sur les lames sans rinçage durant quelques secondes. Les frottis sont décolorés par un mélange alcool acétone [mélange à partie égal]. Les lames sont ensuite lavées sous eau courante puis contre-colorées à la Fuchsine pendant quelques secondes. Un dernier lavage des frottis est effectué puis séchage. Cette coloration révèle les levures germées et des filaments mycéliens en rouge-violet et les cellules épithéliales vaginales en rose.

3 – Etude histo-pathologique : Une étude histo-pathologique est réalisée sur des coupes de vagins de souris

infestées. Une souris par lot est sacrifiée 24 heures, puis 20 jours post-inoculation. Les vagins sont conservés dans une solution de Bouin. Des coupes de vagins, de 07 µm de diamètre en paraffine, sont réalisées puis colorées à l'acide périodique de Schiff (P.A.S.) sur fond vert lumière. Ces coupes sont déparaffinées, puis sont rincées à l'eau distillée et incubées 5 minutes dans une solution d'acide périodique (01g d'acide périodique, 100 ml d'eau distillée). Les coupes sont ensuite lavées sous eau courante durant 15 minutes, puis trempées 30 minutes dans le réactif de Schiff (2 g de Fuchsine basique, 4g de métabisulfite dans 10 ml d'HCl, 1g de charbon décolorant, 10 ml d'HCl). Les coupes sont enfin incubées dans de l'eau durant 10 à 15 minutes puis lavées sous eau courante durant 4 à 10 minutes. Finalement les coupes sont colorées avec du vert lumière durant 01 à 02 minutes (1g de vert lumière, 1 ml d'acide acétique, 100 ml d'eau distillée). Une déshydratation est réalisée, puis les coupes sont montées au baume neutre.

RESULTATS

Les signes cliniques observés chez les souris infestées avec la souche *C. albicans*, ayant subis un traitement hormonal à base de benzoate d'oestradiol (lot A, lot C) débutent par une dépilation importante de la région périnéale et un prurit intense dès les premiers jours de l'infection. Ces symptômes sont associés à une inflammation importante de la vulve avec présence d'un dépôt de croûtes jaune-blanchâtre au pourtour de la vulve. Le prurit provoque chez certaines souris une automutilation de la région périnéale avec écoulement sanguin.

Ces symptômes persistent durant toute l'expérimentation, avec apparition vers le 20^{ème} jour post-inoculation, d'un amas compact à l'entrée du vagin très important chez quelques souris. Cet amas est de couleur blanchâtre, est constitué d'un enchevêtrement de filaments mycéliens de *Candida albicans*. Chez les souris infestées avec la souche *C. tropicalis*, ayant subis un traitement hormonal à base de benzoate d'oestradiol (lot B), les symptômes sont similaires, mais moins intenses et s'estompent au bout de 15 jours.

Chez les souris des lots témoins (lot TA, Lot TB et lot TC), les signes cliniques observés sont caractérisés par une légère vulvo-vaginite associée à un léger prurit, qui disparaissent au bout de 07 jours.

Le suivi de l'évolution de l'infection vaginale par la détermination des UFC dans les prélèvements vaginaux des souris infestées, effectués selon la méthode de lavage vaginal ou la méthode de raclage vaginal, nous a permis d'obtenir des résultats intéressants. Le nombre de UFC, dans les raclages vaginaux chez les souris infestées avec *C. albicans* (lot A), atteint les 10⁷ UFC le 3^{ème} jour post-inoculation et persiste durant les 30 jours puis diminue vers le 35^{ème} jour pour atteindre les 10⁶ UFC (Figure 1). Dans les raclages vaginaux des souris infestées avec *C. tropicalis* (lot B), le nombre de UFC, atteint les 10⁷ le 3^{ème} et 7^{ème} jour puis diminue à 10⁶ UFC le 15^{ème} jour post-inoculation puis 10⁵ UFC le 21^{ème} jour post-inoculation pour s'annuler à partir du 28^{ème} jour après l'infestation (Figure 2).

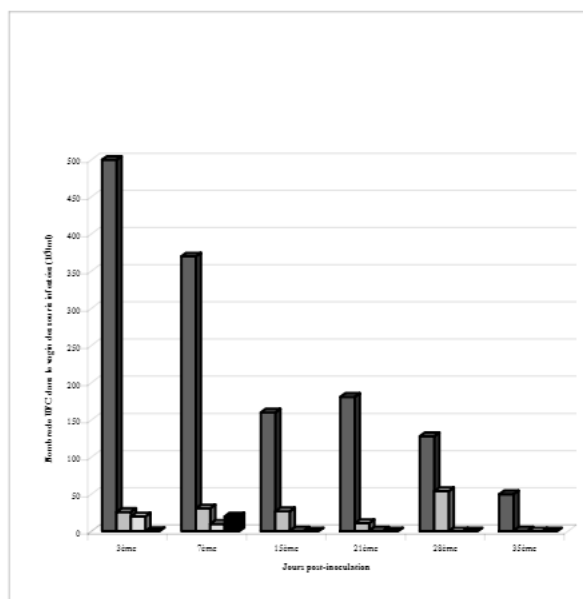


Figure 1 : Candidose vaginale expérimentale à *Candida albicans* chez la souris.

Les souris sont inoculées à J0, par voie intra-vaginale, avec 25 μ l d'un inoculum de $2.5.10^6$ levures de *Candida albicans* [901092]/souris. L'évolution de l'infection vaginale est suivie par la détermination des UFC dans des **prélèvements vaginaux** réalisés le 3^{ème}, 7^{ème}, 15^{ème}, 21^{ème}, 28^{ème}, et 35^{ème} jour post-inoculation.

Lot A : Les souris ont subi un traitement hormonal à base de Benzoate d'œstradiol [25mg/Kg] aux jours -3, 4, 11, 18, 24 et 30 de l'inoculation.

■ Prélèvements par des raclages vaginaux.

▨ Prélèvements par des lavages vaginaux

Lot TA : Les souris n'ont pas subi de traitement hormonal.

□ Prélèvements par des raclages vaginaux.

■ Prélèvements par des lavages vaginaux.

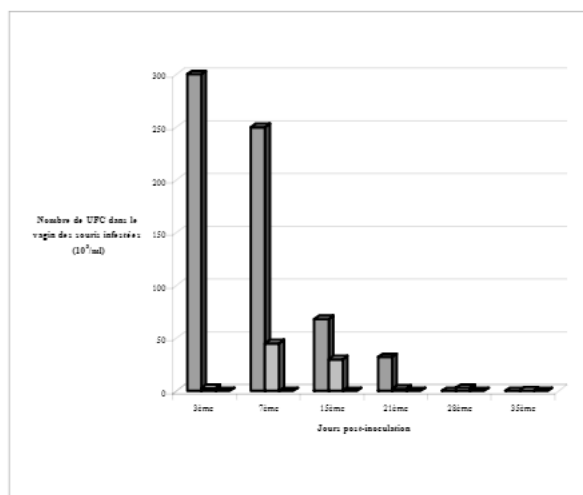


Figure 2 : Candidose vaginale expérimentale à *Candida tropicalis* chez la souris.

Les souris sont inoculées à J0, par voie intra-vaginale avec 25 μ l d'un inoculum de $2.5.10^6$ levures de *Candida tropicalis* [901190]/souris. L'évolution de l'infection vaginale est suivie par la détermination des UFC, dans des **prélèvement vaginaux** réalisés le 3^{ème}, 7^{ème}, 15^{ème}, 21^{ème}, 28^{ème}, et 35^{ème} jour post-inoculation.

Lot B : Les souris ont subi un traitement hormonal à base de Benzoate d'œstradiol [25mg/Kg] aux jours -3, 4, 11, 18, 24 et 30 de l'inoculation.

■ Prélèvements par des raclages vaginaux.

▨ Prélèvements par des lavages vaginaux.

Lot TB : Les souris n'ont pas subi de traitement hormonal.

■ Prélèvements par des raclages vaginaux.

Le nombre de UFC dans les raclages vaginaux des souris du lot Témoin TA, est de 10^6 et persiste jusqu'au 15^{ème} jour, puis s'annule dès 21^{ème} jour post-inoculation. (Figure 1). Le nombre de UFC dans les raclages vaginaux des souris du lot témoin TB est très faible, avoisinant les 10^3 le 3^{ème} et le 7^{ème} jour après l'infestation puis s'annule dès le 15^{ème} jour post-inoculation (Figure N°02). Le nombre de UFC dans les lavages vaginaux chez les souris infestées avec *C. albicans* (lot A), varie entre 9 et 6.10^6 les 30 premiers jours puis baisse le 35^{ème} jour pour atteindre les 10^5 UFC (Figure 1). Le nombre de UFC dans les lavages vaginaux chez les souris infestées avec *C. tropicalis* (lot B), avoisine les 10^6 le 3^{ème} jour puis diminue à 10^5 jusqu'au 21^{ème} jours pour atteindre 10^4 le 35^{ème} jour de l'expérimentation. (Figure 1). Le nombre de UFC dans les lavages vaginaux des souris du lot témoin (lot TA) atteint les 10^4 le 3^{ème} jour post-inoculation puis augmente à 2.10^6 UFC le 7^{ème} jour post-inoculation et s'annule les jours suivants (Figure 1). Le nombre de UFC dans les lavages vaginaux des souris du lot témoin TB, est négatif durant toute l'expérimentation. Le pourcentage d'animaux infectés avec *C. albicans* atteint les 100% dans le lot de souris sous traitement hormonal (lot A). Ce pourcentage se maintient durant toute l'expérimentation. Dans les lots de souris témoins infestées avec *C. albicans* (lot TA), le pourcentage de souris infestées ne dépasse pas les 50% et les souris témoins infestées avec *C. tropicalis* (lot B), le pourcentage d'animaux infestés ne dépasse pas les 25% et s'annule 07 jours après l'infestation. Le nombre de UFC dans les raclages vaginaux chez les souris du lot C, est très élevé 3 jours post-inoculation, avoisinant les 10^7 (Figure 3). Ce nombre demeure stable durant les 20 premiers jours. A partir du 21^{ème} jour post-inoculation, le nombre de UFC baisse de 10^2 . Les souris inoculées n'ayant pas subis de traitement (lot TC), présentent un nombre de UFC avoisinant les 10^6 UFC le 3^{ème} jour post-inoculation, puis s'annule à partir du 7^{ème} jour après l'infestation (Figure 3).

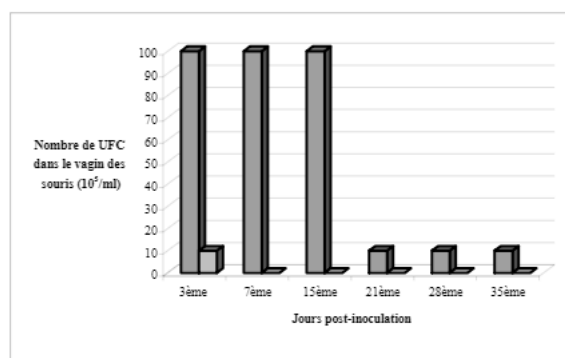


Figure 3 : Candidose vaginale expérimentale à *Candida* chez la souris.

Les souris sont inoculées à J0, par voie intra-vaginale avec 25 μ l d'un inoculum de $2.5.10^6$ levures de *Candida albicans* [901092]/souris.

L'évolution de l'infection vaginale est suivie par la détermination des UFC, dans des **prélèvement vaginaux** réalisés le 3^{ème}, 7^{ème}, 15^{ème}, 21^{ème}, 28^{ème}, et 35^{ème} jour post-inoculation.

Lot C : Les souris ont subi un traitement hormonal à base de Benzoate d'œstradiol [25mg/Kg] aux jours -3, 4, 11, 18, 24 et 30 de l'inoculation.

■ Prélèvements par des raclages vaginaux.

▨ Prélèvements par des lavages vaginaux.

Lot TC : Les souris n'ont pas subi de traitement hormonal.

■ Prélèvements par des raclages vaginaux.

Les frottis vaginaux effectués sur les souris traitées au benzoate d'œstradiol et infestées avec *C. albicans*, révèlent 24 heures après l'inoculation, la présence de levures bourgeonnantes, des levures adhérant aux cellules épithéliales vaginales anucléées, et des filaments mycéliens traversant les cellules épithéliales vaginales (Photo 1). Ces frottis révèlent 15 jours plus tard, la présence de nombreux filaments mycéliens ramifiés et enchevêtrés. (Photo 2). Les frottis vaginaux demeurent positifs durant les 35 jours de l'étude.

Dans les frottis vaginaux effectués sur des souris traitées au benzoate et infestées avec *C. tropicalis* (lot B), on observe de nombreux filaments 24 heures post-inoculation puis se raréfient 15 jours plus tard.

Chez les souris du lot témoin (lot TC) n'ayant subi aucun traitement hormonal, les frottis vaginaux sont positifs les premiers jours post-inoculation et se négativent au bout d'une semaine.

L'étude histo-pathologique des vagins de souris inoculées avec *Candida tropicalis* et traitées au benzoate d'œstradiol (lot B), révèle des filaments mycéliens dans la lumière vaginale le 1^{er} et le 3^{ème} jour post-inoculation (photos 3 A, B). Les filaments et les blastospores deviennent rares le 7^{ème} jour post-inoculation (photo 3 C), pour disparaître le 15^{ème} jour post-inoculation (photo 3 D). Chez les souris inoculées avec *Candida albicans* et traitées au benzoate d'œstradiol [lot A], on observe 03 jours post-inoculation, de nombreux filaments mycéliens et des levures de *C. albicans* dans la lumière du vagin et une exfoliation importante de la couche externe de la muqueuse vaginale (M.V.) associée à des polynucléaires localisés dans la muqueuse et la lumière vaginale (L.V.) (Photos 4 A, B). De nombreux filaments mycéliens, sont toujours observés 20 jours post-inoculation (photo 4 C).

DISCUSSION

L'induction de la candidose vaginale expérimentale chez la souris a été initialisée pour la première fois en 1960, par TASCHDJIAN et Collaborateurs [37], suivis par SEGAL et Collaborateurs [32, 33, 34]. Ils obtiennent l'installation de l'infection vaginale, lorsque l'inoculation est réalisée au moment de l'œstrus ou au début du metœstrus. Cette infection est de courte durée (2 à 5 jours) et sa résolution est spontanée, dès l'instauration du dioœstrus. Le rôle des œstrogènes et non pas celui de la progestérone dans le maintien de l'infection vaginale, a été également mis en évidence *in vivo* sur des rates infectées expérimentalement avec une souche de *C. albicans* par Fidel P.L., et collaborateurs [10].

Afin de prolonger l'œstrus chez les souris, Segal et collaborateurs [32,33], ont mis au point un modèle expérimental de candidose vaginale chez la souris, en induisant l'œstrus par des injections hebdomadaires, en sous-cutané, de 12.5 mg/kg de Benzoate d'œstradiol, pendant toute la durée de l'expérimentation. Ce traitement a permis de prolonger l'infection vaginale plus de 04 semaines et obtiennent 70% des souris entrant en œstrus. Ce protocole a été appliqué, depuis, par de nombreux auteurs qui obtiennent un pourcentage identique ou plus

faible variant entre 50% [20, 28] et 66% [13, 10] en utilisant soit du Benzoate d'œstradiol, soit du Valériate d'œstradiol à 0.2 mg ou à 0.5mg / souris pour le maintien de l'œstrus. En 1988, Segal et collaborateurs [32] augmentent le pourcentage d'animaux entrant en œstrus et atteignent les 97% une semaine après l'inoculation avec la même dose de Benzoate d'œstradiol (12.5mg/kg) mais ils inoculent les animaux par voie intra-vaginale avec 10^7 à 10^{10} levures par souris. Afin d'obtenir un pourcentage plus élevé de souris infectées, nous avons dans notre étude, doublé la dose de Benzoate d'œstradiol, à savoir 25 mg/kg et nous avons fixé notre choix sur un inoculum de 10^6 levures/souris. L'inoculum de 10^{10} levures par souris, nous a semblé trop élevé pour la muqueuse vaginale d'une souris. Les inoculums de 10^4 et 10^5 levures/souris, utilisés par les autres chercheurs [10, 13, 42] sont trop faibles, car ils ne permettent pas d'obtenir un nombre de CFU élevé dans les prélèvements vaginaux. En effet, le nombre de UFC, ne dépasse pas les 10^4 à partir des lavages et des raclages vaginaux [10,13]. Pour la mise au point de notre modèle expérimental de candidose vaginale, nous avons donc inoculé chaque souris avec 5.10^6 levures et traité par des injections hebdomadaires de 25 mg/kg de Benzoate d'œstradiol en sous-cutané.

Dans la première partie de cette étude, nous avons comparé la virulence de 02 souches de levures, *Candida albicans* [901092] et *Candida tropicalis* [901190] afin de retenir la souche la plus pathogène qui nous permettra de maintenir une infection vaginale durable à savoir 35 jours. Dans cette étude, les souris infestées en intra-vaginale avec *C. albicans*, ont présenté une infection vaginale persistante, avec un nombre de UFC très élevé de 9.10^7 dès le 3^{ème} jour post-inoculation dans les raclages vaginaux et se maintient durant 30 jours. Par contre, le nombre de UFC obtenu dans les raclages vaginaux des souris infestées avec *C. tropicalis*, diminue de 10^7 à 10^6 le 15^{ème} jour post-inoculation, puis s'annule le 28^{ème} jour post-inoculation. Les nombres de UFC dans les lavages vaginaux effectués sur les souris des lots traitées au Benzoate d'œstradiol ou les souris témoins non traitées, ont été en permanence inférieurs à ceux obtenus dans les raclages vaginaux, quelque soit la souche de levure utilisée. Dans les lots de souris témoins inoculées avec *C. albicans*, l'infection ne persiste pas longtemps, puisque le nombre de UFC dans les prélèvements vaginaux effectués le 15^{ème} jour post-inoculation sont négatifs. Dans le lot de souris témoins inoculées avec *C. tropicalis* les prélèvements vaginaux sont négatifs durant toute l'expérimentation. Enfin, seules les souris des lot A et lot C, présentaient 100% d'animaux infectés durant les 35 jours. La souche de levures *C. albicans* nous a donc permis d'établir une infection vaginale durable sur 100% des souris infestées. Nos résultats sont en concordance avec de nombreuses études qui ont mis en évidence l'affinité de *Candida albicans* pour la sphère génitale comparée à *C. tropicalis*. En effet, *C. albicans* présente des récepteurs spécifiques [N-acétyl-glucosamine-NAG, L.fucose] qui reconnaîtraient une fraction complémentaire de nature manno-protéine, de la couche externe de la paroi de la levure [8, 17, 20, 21, 22, 28, 32,32]. Cette particularité d'adhérer sur les cellules

épithéliales vaginale a été visualisée *in vivo* sur un modèle murin de candidose vaginale, par des études histopathologiques [33] et également par des observations en microscopie électronique par Calderone et collaborateurs en 1984 [5]. Cette particularité a également été mise en évidence par des études d'inhibition de l'adhérence *in vivo* par l'inoculation intra-vaginale d'extraits solubles de chitine qui bloquent l'attachement des levures de *C. albicans* aux cellules épithéliales vaginales, par un effet adhésine like [20, 21, 31, 32, 33,34]. Nous avons également comparé deux méthodes de prélèvements vaginaux, les raclages vaginaux [4, 24,42] et les lavages vaginaux [10, 13] qui sont très largement utilisés par de nombreux auteurs. Au vue de nos résultats, nous avons retenu la méthode des raclages vaginaux, car comparée à la méthode des lavages vaginaux, elle est d'exécution plus rapide, moins astreignante et nous a permis d'obtenir un nombre de CFU plus élevé, durant les 35 jours. Ce nombre de UFC faible dans les lavages vaginaux pourrait être lié au fait que la méthode du raclage vaginal étant très térébrante, les levures et les filaments de *C. albicans* sont plus facilement récupérables que dans la méthode du lavage vaginal, méthode plus douce et donc seule la forme levure serait récupérée. Pour la mise au point de notre modèle expérimental de la candidose vaginale chez la souris, nous avons donc retenu la souche *C. albicans*. Le protocole consiste en une inoculation intra-vaginale des souris avec 25 µl contenant 5.10^6 levures de *C. albicans*, trois [03] jours après le début d'un traitement hormonal hebdomadaire à base de 25 mg/kg de Benzoate d'oestradiol en sous-cutané. Ce protocole, nous a permis d'obtenir 100% d'animaux entrant en oestrus et présentant une infection vaginale persistant durant 35 jours. Pour valider notre modèle expérimental, nous avons utilisé des méthodes d'évaluation du développement du champignon dans le tissu vaginal. La première méthode est la détermination des UFC dans les raclages vaginaux qui est largement utilisée, et permet de quantifier la présence du champignon dans un tissu infesté. En effet, dans notre étude, le nombre de UFC dans les raclages vaginaux des souris infestées (lot C) est très élevé et demeure stable durant les 35 jours comparé au nombre de UFC retrouvés dans les raclages vaginaux des souris du lot témoin (lot TC) s'annulant dès la fin de la première (1^{ère}) semaine. Nous avons associé à cette méthode, la réalisation d'examen directs : les frottis vaginaux, dès le premier jour post-inoculation, et une étude histopathologique des vagins des souris infectées, sacrifiées 24 heures et 20 jours post-inoculation. Ces deux méthodes confirment le développement de *C. albicans* dans la sphère vaginale et l'envahissement des couches superficielles et profondes de la muqueuse vaginale par les filaments mycéliens. Ces méthodes révèlent également que *C. albicans* se développe très rapidement dans le vagin, puisque les filaments mycéliens sont observés dans les frottis vaginaux, 24 heures après l'infestation. Ces résultats concordent avec ceux obtenus en 1984, par Calderone et collaborateurs [5], qui observent en microscopie électronique, des levures adhérant aux cellules vaginales épithéliales, 2 heures post-inoculation et des filaments mycéliens de *C. albicans*, 6 heures post-inoculation. Notre

modèle expérimental, nous a permis également d'observer au niveau de la muqueuse et la lumière vaginale des souris infestées et sous traitement hormonal(photos N°04 A, B), une réaction inflammatoire intense, représentée par la présence de nombreux polynucléaires neutrophiles, et une desquamation importante de cellules épithéliales vaginales.

Bien que les défenses locales de l'hôte soient présentes dans notre étude, représentées par les cellules épithéliales vaginales qui inhiberaient la croissance de *C. albicans* et les polynucléaires, il semblerait que leur activité soit inhibée. Nos résultats concordent avec ceux de nombreux auteurs [10, 15, 24], à savoir, une réaction granulomateuse [24] associée une nécrose de la couche superficielle de la muqueuse vaginale.

Ces mêmes auteurs ont mis en évidence le rôle du contrôle de l'infection par la couche stratifiée de la muqueuse vaginale, sur des souris infectées, chez lesquelles l'activité des cellules épithéliales est clairement inhibée sous l'effet du traitement aux oestrogènes. Le rôle des anticorps (IgA, IgM) dans la défense contre l'infection vaginale, a également été étudié [3,46]. Ainsi, Yongmoon et collaborateurs [46], après étude sur un modèle expérimental, pensent qu'une réponse humorale appropriée ou l'administration d'anticorps protecteurs pourraient permettre la résistance de l'hôte à une infection vaginale candidosique.

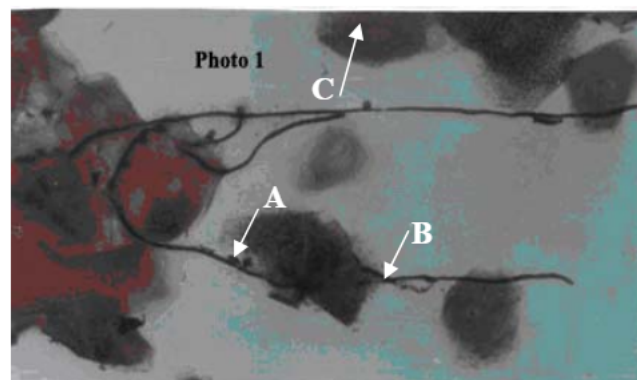


Photo 1 : Candidose vaginale chez la souris. Frottis vaginal effectué 24 heures post-inoculation chez une souris atteinte de candidose vaginale, inoculée avec *C. albicans* et traitée au benzoate d'oestradiol (lots A et C). Coloration de Gram (x40).

A : Début de filamentation de blastospore de *C. albicans*.

B : Filament mycélien de *C. albicans* traversant une cellule épithéliale vaginale.

C : Cellules épithéliales vaginales (C.E.V.).

Actuellement, le suivi du développement fongique *in vivo*, est mis en évidence par certains chercheurs, non pas du vivant de l'animal par la détermination des UFC, mais sur les souris ou rates sacrifiées dès les premiers jours post-inoculation (48 heures, 10 jours post-inoculation) ; les UFC sont alors déterminés après extraction et pesée des vagins infectés, soit par leur broyage dans une solution physiologique additionnée d'antibiotiques puis calcul des UFC/g [42], soit par des lavages des vagins chez la rate puis réalisation de dilutions sériées et calcul des UFC/100 µl, notamment dans l'étude de l'efficacité des molécules antifongiques [10]. Au travers des résultats obtenus par d'autres auteurs, il semblerait qu'il n'y est pas d'unanimité

quant au choix de la technique prélèvement vaginal. Aussi, le modèle expérimental de l'infection vaginale candidosique murine pourrait être validé par une méthode de dosage colorimétrique de la chitine, composant majeur de la paroi des levures. Le dosage de chitine se ferait soit dans les sécrétions vaginales, soit dans un broyat de vagins infectés, par rapport à une gamme d'étalonnage de glucosamine croissante (étude en cours).

Notre étude expérimentale pourrait contribuer à approfondir les données actuelles dans le développement de cette affection et les différents facteurs influençant son apparition et sa persistance dans la sphère génitale. Des travaux récents, ont utilisé le modèle expérimental pour étudier, notamment, l'influence des hormones de reproduction et du taux de zinc dans la sang et les sécrétions vaginales dans l'infection vaginale [3, 10, 46], l'étude des mécanismes de défense de l'hôte contre *C. albicans*, comme la production d'anticorps (IgA) lors de vulvo-vaginite candidosique [2] ou tester l'efficacité de vaccins monoclonaux dans la résistance contre l'infection vaginale à *Candida* [46].

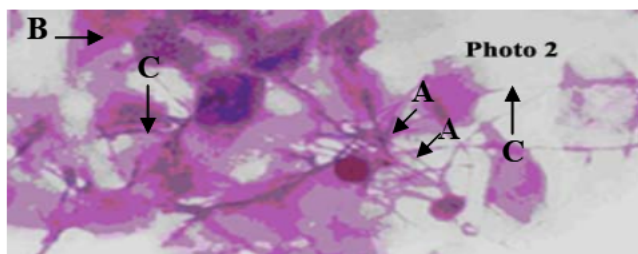


Photo 2 : Candidose vaginale chez la souris. Frottis vaginal effectué 15 jours post-inoculation chez une souris atteinte de candidose vaginale, inoculée avec *C. albicans* et traitée au benzoate d'oestradiol (lots A et C). Coloration de Gram (x40).

A : Nombreux filaments mycéliens enchevêtrés de *C. albicans*, traversant les cellules épithéliales vaginales.

B : C.E.V.

C : Filaments mycéliens de *C. albicans*.

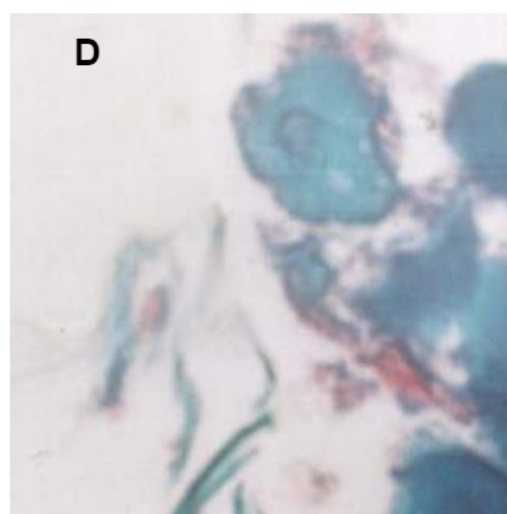
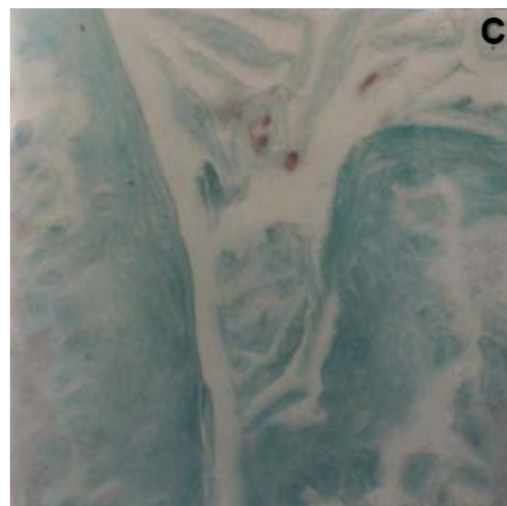
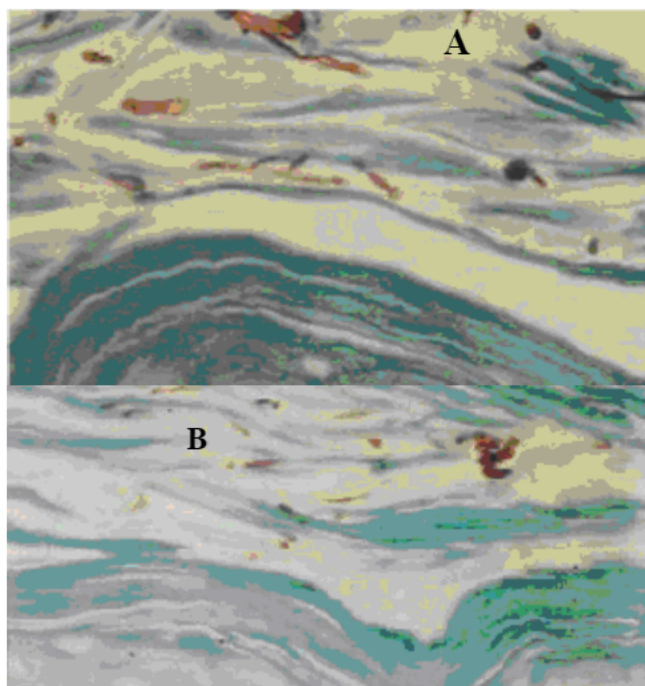


Photo 3 : Coupes histo-pathologiques de vagins de souris atteintes de candidose vaginale, inoculées avec *C. tropicalis* (Lot B).

Les souris ont subi un traitement à base de benzoate d'oestradiol (25mg/souris) aux jours -3, 4, 11, 18, 24 et 30. Les souris sont inoculées par voie intra-vaginale à j0 avec un inoculum de 5.10^6 levures/souris puis sont sacrifiées, 24heures, 3 jours, 7 jours et 15 jours post-inoculation. Coloration des coupes au PAS sur fond vert lumière. A : Présence de levures et de filaments mycéliens dans la lumière et la muqueuse vaginale le 1^{er} jour post-inoculation (x40). B : Présence de levures et de filaments mycéliens dans la lumière et la muqueuse vaginale le 3^{ème} jour post-inoculation (x40). C : Présence de rares blastospores de *C. tropicalis* le 7^{ème} jour et des cellules épithéliales vaginales (x40). D : Absence de champignons dans le vagin le 15^{ème} jour post-inoculation (x40).

Tableau I : Protocoles expérimentaux de candidose vaginale sur la souris.* Inoculum Levures/animal à Jour zéro [J0] = $5 \cdot 10^6$

** Intra-vaginale

Lot de souris	Protocole d'infestation des souris		Protocole d'obtention d'un oestrus permanent			
	Souche inoculée*	Volume Administré**	Œstrogène utilisé	Dose mg/kg/injection	Voie d'administration	Rythme d'injections
Lot A	<i>Candida albicans</i>	25 µl	Benzoate d'Œstradiol	5 mg	Sous-cutané	J-3, J+4, J+11, J+18, J+24 et J+30
Lot B	<i>Candida tropicalis</i>	25 µl	Benzoate d'Œstradiol	5 mg	Sous-cutané	J-3, J+4, J+11, J+18, J+24 et J+30
Lot C	<i>Candida albicans</i>	25 µl	Benzoate d'Œstradiol	5 mg	Sous-cutané	J-3, J+4, J+11, J+18, J+24 et J+30
Lot témoin A [Lot TA]	<i>Candida albicans</i>	25 µl	Aucun traitement hormonal reçu			
Lot témoin B [Lot TB]	<i>Candida tropicalis</i>	25 µl				
Lot témoin C [Lot TC]	<i>Candida albicans</i>	25 µl				

REFERENCES

- [1]-ABU-ELTEEN KH. Increased incidence of vulvovaginal candidiasis caused by *Candida glabrata* in Jordan. Jpn. J. Infect. Dis., **54**, (2001), pp. 103 – 107.
- [2]-BOHLER K., KLADE H., POITSCHKEK C., and REINTHALLER A. Immunohistochemical study of *in vivo* and *in vitro* IgA coating of *Candida* species in vulvovaginal candidiasis. Genitourinary Medicine, **70**, [1994], pp. 182 – 186.
- [3]-BOHLER K., MEISINGER V., KLADE H., and REINTHALLER A. Zinc levels of serum and cervicovaginal secretion in recurrent vulvovaginal candidiasis. Genitourinary Medicine, **70**, (1994), pp. 308 – 310.
- [4]-BUURMAN Ed.T., WESTWATER C., HUBE B., BROWN A.J.P., ODDS F.C., and GROW N.A.R. Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: **95**, [1998], pp. 7670 – 7675.
- [5]-CALDERONE R.A., LEHRER N. and SEGAL E. Adherence of *Candida albicans* to buccal and vaginal epithelial cells: ultrastructural observations. Can.J. Microbiol. **30** (1984), pp. 1001 – 1007.
- [6]-COTCH M.F., HILLIER S.L., GIBBS R.S., and ESCHENBACH D.A. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. Vaginal infections and prematurity study group. Am. J. Obstet. Gynecol., **178** (1998), pp. 374 – 380.
- [7]-De BERNARDIS F., CASSONE A., STURTEVANT J., and CALDERONE R. Expression of *Candida albicans* SAP1 and SAP2 in experimental vaginitis. Infect. Immun., **63**, (1995), pp. 1887 – 1892.
- [8]-DOUGLAS L.J. Adhesion of pathogenic species to host surfaces. Microbiol. Sci., **2**, (1985), pp. 243 – 247.
- [9]-FERRIS DG., HENDRICH J., PAYNE P.M., GETTS A., RASSEKH R., MATHIS D., and LITAKER M.S. Office laboratory diagnostic of vaginitis. Clinician-performed tests compared with a rapid nucleic acid hybridization test. J. Fam. Pract., **41** (1995), pp. 575 – 81.
- [10]-FIDEL Jr.P.L., CUTRIGHT J., and STEELE C. Effect of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. Infect. Immun., **68** (2000), pp. 651 – 657.
- [11]-FIORILLO M., RIPEAU J.S., AUMONT F., BELHUMEUR P., et DE REPENTIGNY L. Expression *in vivo* des facteurs de virulence de *Candida albicans*. 68^{ème} Congrès de l'Acfas 2000, Session : S-105 Microbiologie, Virologie.
- [12]-GALGANI J.N. Susceptibility of *Candida albicans* and other yeasts to fluconazole : Relation between *in vitro* and *in vivo* studies. Rev. Infect. Dis., **12**, (1990), pp. 272 – 275.
- [13]-GHELARDI E., TAVANITI A., LUPETTI A., CELANDRONI F., BOLDRINI E., CAMPA M., and SENESI S. Control of *Candida albicans* murine vaginitis by topical administration of polycarbophil-Econazole

- complex. Antimicrob. Agents and Chemoth., **42** (1998), pp. 2434 – 2436.
- [14] - GIRALDO P., VON NOWASKONSKI A., GOMES F.A., LINHARES I., NEVES N.A., and WITKIN S.S. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. Obstet. Gynecol., **95** (2000), pp. 413 – 416.
- [15] - HAN Y., RICHARD P., MORRISON P., and CUTLER J.E. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. Infect. Immun., **66** (1998), pp. 5771 – 5776.
- [16] - HEERES I., and BACKX L.J.J. Antimycotic imidazoles. Part 4 : Synthesis and antifungal activity of Ketoconazole, a new potent orally active broad spectrum antifungal agent. J. Med. Chem., **22**, (1979), pp. 1003 – 1005.
- [17] - HIGASHIDE AMAN R. Clinical characteristics correlated with different fungi causing vulvovaginal mycosis. Mycoses, **31**, (1988), pp. 213 – 226.
- [18] - KINSMAN O.S., and COLLARD A.E. Hormonal factors in vaginal candidiasis in rats. Infect. Immun., **53**, (1986), pp. 498 – 504.
- [19] - LEVINE H.B. Ketoconazole in the management of fungal disease. ADIS Press. Revised first edition. (1982)
- [20] - LEHRER N, SEGAL E., LIS H., and GOV Y. Effect of *Candida albicans* cell wall components on the adhesion of the fungus to human and murine vaginal mucosa. Mycopathologia, **102**, (1983), pp. 115-121.
- [21] - LEHRER N, SEGAL E., and BARR-NEA L. *In vitro* and *in vivo* adherence of *Candida albicans* to ucosal surfaces. Ann. Microbiol. (Paris), **134B**, (1983), pp. 293 – 306.
- [22] - LINAS M.D., et POURRUT J.C. *Torulopsis glabrata* au CHU RANGUEIL : Epidémiologie et pathogénie. Bull. Soc. MYCOL. Med., **XV**, (1986), pp. 135 – 138.
- [23] -MAROT-LEBLOND A., ROBERT R., LOISEAU O., APAIRE-MARCHEAIS V. and SENET J.M. Hydrophobic and hydrophilic cell surface (glyco) proteinic components of *Candida albicans*. J. Myl. Méd., **10**, (2000) pp.115 – 122.
- [24] - MARTINEZ A., FERRER S., SANTOS I., JIMENEZ E., SPARROWE J., REGADERA J. GOMEZ DE LAS HARAS F., and GARGALLO-VIOLA D. Antifungal activities of two new azasordarins, GW471552 and GW471558, in experimental models of oral and vulvovaginal candidiasis in immunosuppressed rats. Antimicrob. Agents. Chemoth., **45**, (2001), pp. 3304 – 3309.
- [25] - PELZER A. Vaginal mycoses during the menstrual cycle. Mykosen. (1978), pp. 271 – 273.
- [26] - REDONDO-LOPEZ V., MERIWETHER C., SCHMITT C., OPTZ M., COOK R., and SOBEL J.D. Vulvovaginalcandidiasis complicating reccurent bacterial vaginosis. Sex. Transm. Dis. **17** (1990), pp. 51 – 53.
- [27] - RIEPEAU J.S., FIORILLO M., AUMONT F., BELHUMEUR P., et DE REPENTIGNY L. Expression des protéases aspartyles et de la phospholipase de *Candida albicans* au cours de l'infection *in vivo*. 67^{ème} Congrès de l'Acfas. (1999), Session : S-105 Biologie et génétique moléculaire.
- [28] - RYLEY J.F. Pathogenicity of *Candida albicans* with particular reference to the vagina. J. Med. Vet. Mycol., **24**, (1986), pp. 5 – 22.
- [29] - RYLEY J.F., and MCGREGOR S. Quantification of vaginal *Candida albicans* infections in rodents. J. Med. Vet. Mycol., **24**, (1986), pp. 455 – 460.
- [30] - SAWYER S.M., BOWES G., and PHELAN P.D. Vulvovaginal candidiasis in young women with cystic fibrosis. B.M.J., **308** (1994), pp. 1609.
- [31] - SEGAL E., LEHRER N., and OFEK I. Adherence of *candida albicans* to human vaginal epithelial cells; inhibition by amino sugars. Exp. Cell. Biol., **50**, (1982), pp. 13 – 17.
- [32] - SEGAL E., GOTTFRIED L., and LEHRER N. Candidal vaginitis in hormone treated mice: Prevention by a chitin extract. Mycopathologia, **102**, (1988), pp. 157 – 163.
- [33] - SEGAL E., SOROKA A., and LEHRER N. Attachement of *Candida* to mammalian tissues : Clinical and experimental studies. Zentralbl. Bakteriell. Mikrobio. Hyg.(A). **A257** (1984), pp. 257 – 265.
- [34] - SEGAL E., SOROKA A., and SCHECHTER A. Correlative relationship between adherence of *Candida albicans* to human vaginal epithelial cells *in vitro* and candidal vaginitis. Sabouraudia, **22**, (1984), pp.191– 200.
- [35] - SHIFRIN E., MATITYAHU D., FELDMAN J., and MINKOFF H. Determinants of incident vulvovaginal candidiasis in human immunodeficiency virus-positive women. Infect. Dis. Obstet. Gynecol., **8**, (2000), pp. 176 – 180.
- [36] - SOBEL J.D., CHAIM W., and LEAMAN D. Recurrent vulvovaginal candidiasis associated with long-term tamoxifen treatment in postmenopausal women. Obstet. Gynecol., **88**, (1996), pp. 704 – 706.
- [37] - TASCHDJIAN C.L. and REISS F. Experimental vaginal candidiasis in mice: Its implications for superficial candidiasis in humans. J. Invest. Derm., **34**, (1960), pp. 89-94.
- [38] - THIENPONT D., and VAN CUTSEM J. Ketoconazole in experimental candidosis. Rev. Infect. Dis., **2**, (1980), pp. 570 – 577.
- [39] - THIENPONT D., and VAN CUTSEM J. Ketoconazole a new broad spectrum orally active antimycotic. Experientia., **35**, (1979), pp. 606 – 607.
- [40] - TROKE P.F., and ANDREWS R.J. Fluconazole and other azoles : translation of *in vitro* activity to *in vivo* clinical efficacy. Rev. Infect. Dis., **12**, (1990), pp. S276 – S280.
- [41] - TROKE P.F., and MARRIOTT M.S. *In vitro* potency and *in vivo* activity of azoles. Ann. N.Y. Acad. Sci., **544** (1988), pp. 284 – 293.
- [42] - YONGMOON H., MORRISON R.P., and CUTLER J.E. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* infection. Infect. Immun., **66**, (1998), pp.5771 – 5776.
- [43] - UCHIDA K. Experimental candidiasis : participation of indigenous bacterial flora and resistance factors of the host in producing on animal mouse. Jpn., J. Med. Mycol., **29** (1988), pp. 169 – 181.
- [44] - VAN CAUTEREN H., and HEYKANTS J. Itraconazole: Pharmacologic studies in animals and humans. Rev. Infect. Dis., **9**, (1987), pp. 43 – 46.
- [45] - VAN CUTSEM J., and VAN GERVEN. Activity of orally, topically, and parenterally administered Itraconazole in the treatment of superficial and deep mycoses : Animal model. Rev. Infect. Diseases, **9**, (1987), pp. 15 – 31.
- [46] - WATSON M.C., GRIMSHAW J.M., BOND C.M., MOLLISON J. and LUDBROOK A. Oral versus intra-vaginal imidazole and triazole anti-fungal treatment of uncomplicated vulvovaginal candidiasis (thrush). Cochrane Database Syst. Rev., (2001), CD 002845.

