

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



Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie

Option: Biochimie appliquée

Présentée

Par

Mr BELHACHEMI Mohammed Habib

Thème

**Mécanisme d'action de l'amphotéricine B en complexation avec quelques molécules  
antioxydantes**

Soutenue le :

Devant le jury :

<b>Présidente</b>	Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen
<b>Directeur de thèse</b>	Pr. Boucherit Kebir	Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen
<b>Examinatrice</b>	Pr. Sari-Belkherroubi Lamia	Université Aboubekr Belkaïd-Tlemcen
<b>Examineur</b>	Pr. Kahloula Khaled	Université Moulay Tahar-Saida
<b>Examineur</b>	Pr. Baba Hamed El Bey	Ecole Supérieure de Biologie-Oran

Année universitaire: 2020-2021

## *Dédicaces*

*Avec l'aide de Dieu, nous avons pu réaliser ce modeste travail que je dédie :*

*A mes parents pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour leur confiance permanente. Malgré toutes les difficultés durant ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de rendre tout ce qui m'a été offert. Cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout beaucoup la leur. Aucun remerciement ne serait être suffisant.*

*A ma femme, qui m'a aidé par tous ses moyens et qui a toujours fait preuve de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions.*

*A ma fille Nadjlâa et mon fils Anes Abdou'ALLAH, dont je suis très fière.*

*A Mes frères, mes sœurs et leurs familles pour leur dévouement, leur compréhension et leur grande tendresse tout le long de mes études.*

*A tous les membres de ma belle-famille qui non jamais cessé de prier pour moi et qui m'ont beaucoup encouragé.*

*A toutes les personnes qui me sont chères ; Cherif, Zineddine, Imad, Salah, Karim, Salim, Lotfi, Youcef.*

*Mohammed Habib*

## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse Boucherit Kebir, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour m'avoir permis d'intégrer son équipe, et appris à être autonome tout au long de ce travail de recherche. Nonobstant sa relecture finale enrichissante m'a permis de préciser mes propos.

Je remercie également Madame Boucherit-Otmani Zahia Professeure à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit et pour avoir accepté de présider ce jury.

Je voudrais aussi remercier Madame Sari-Belkherroubi Lamia, Professeure à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur Baba Hamed El Bey, Professeur à l'Ecole Supérieure de Biologie-Oran, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de siéger parmi les membres du jury.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Kahloula Khaled, Professeur à la faculté des sciences, Université Moulay Tahar de Saida, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail.

J'adresse un grand merci à tous les membres du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) qui m'ont soutenus, et aidé pour réaliser ce travail.

Mes remerciement vont à l'ensemble du personnel du laboratoire « microscopie électronique II (MEII)» de la faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen pour avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour analyser tous mes échantillons.

Mes sincères remerciements vont à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

## الملخص :

يمثل الأمفوتريسين ب (AmB) العلاج النوعي للعدوى الفطرية الجهازية ، ولكن تشكل الجزيئات التفاعلية مع الأكسجين يقلل من كفاءة واستقرار هذا الجزيء.

الهدف من عملنا هو المساهمة في فهم آلية عمل الأمفوتريسين ب مع بعض جزيئات مضادات الأكسدة، حمض الأسكوربيك و  $\alpha$  توكوفيرول.

تشير نتائج دراسة مركب الأمفوتريسين ب مع حمض الأسكوربيك و  $\alpha$  توكوفيرول المستخدمة بتركيزات نهائية تبلغ  $3.10^2$  ميكروغرام / مل و 16 ميكروغرام / مل علي التوالي ، الي زيادة نشاطه المضاد للفطريات تجاه *Candida albicans* والتقليل من نسبة السمية تجاه خلايا الدم الحمراء البشرية.

بالإضافة إلى ذلك ، أظهرت النتائج المتعلقة بتأثير حمض الأسكوربيك و  $\alpha$  توكوفيرول على النشاط التأكسدي للأمفوتريسين ب انخفاضاً في مستوى المواد المتفاعلة مع حمض الثيوباربيتوريك (sr-TBA) المتكونة و استقراره الجزيئي.

سمحت لنا هذه النتائج بإشياء مركب فعال وأقل سمية هدفه الرئيسي هو زيادة المؤشر العلاجي للأمفوتريسين ب.

**الكلمات المفتاحية:** أمفوتريسين ب ، حمض الأسكوربيك ، ألفا توكوفيرول ، الفعالية ، السمية الخلوية ، الأكسدة الدهنية.

## Résumé :

L'amphotéricine B (AmB) reste le traitement standard des infections fongiques systémiques mais la formation d'espèces réactives de l'oxygène réduit l'efficacité et la stabilité de cette molécule.

L'objectif de notre travail est une contribution à la compréhension du mécanisme d'action de l'amphotéricine B complexée à deux molécules antioxydantes, l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol.

La complexation de l'amphotéricine B à l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol utilisés à des concentrations finales respectives de  $3.10^2\mu\text{g/mL}$  et  $16\mu\text{g/mL}$ , augmente son activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* et réduit sa cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges humains. De plus, les résultats relatifs à l'effet de l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol sur l'activité peroxydative de l'amphotéricine B ont révélé une diminution du taux des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) formé dans le milieu réactionnel de l'antifongique tout en maintenant sa stabilité moléculaire.

Ces résultats nous ont permis de mettre en place un complexe efficace et moins toxique dont le but principal est d'augmenter l'index thérapeutique de l'amphotéricine B.

**Mots clés :** Amphotéricine B, Acide ascorbique,  $\alpha$  tocophérol, Efficacité, Cytotoxicité, Peroxydation lipidique.

## Abstract:

Amphotericin B (AmB) remains the standard treatment for systemic fungal infections, but the formation of reactive oxygen species reduces the efficiency and stability of this molecule.

The objective of our work is to contribute to understanding the mechanism of action of amphotericin B complexed to two antioxidant molecules, ascorbic acid and  $\alpha$  tocopherol.

The complexation of amphotericin B with ascorbic acid and  $\alpha$  tocopherol used at respective final concentrations of  $3.10^2\mu\text{g} / \text{mL}$  and  $16\mu\text{g} / \text{mL}$ , increases its antifungal activity against *Candida albicans* and reduces its cytotoxicity against -to human red blood cells. In addition, the results relating to the effect of ascorbic acid and  $\alpha$  tocopherol on the peroxidative activity of amphotericin B revealed a decrease in the level of substances reactive to thiobarbituric acid (sr-TBA) formed in the reaction medium of the antifungal while maintaining its molecular stability.

These results allowed us to set up an effective and less toxic complex whose main goal is to increase the therapeutic index of amphotericin B.

**Key words:** Amphotericin B, Ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol, Efficacy, Cytotoxicity, Lipid peroxidation.

## Table des matières

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Première partie : Synthèse bibliographique</b> .....	04
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b> .....	14
1. Matériel.....	15
1.1. Antifongique.....	15
1.2. Molécules antioxydantes.....	15
1.3. <i>Candida albicans</i> .....	16
1.4. Globules rouges humains.....	16
2. Méthodes.....	16
2.1. Préparation des solutions antifongiques.....	16
2.2. Préparation des vitamines.....	16
2.3. Préparation des complexes AmB/vitamine C et AmB/vitamine E.....	17
2.4. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	17
2.5. Observations au microscope électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 en l'absence et en présence des complexes AmB/Vit C et AmB/Vit E.....	17
2.6. Evaluation de l'effet toxique induit par l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis des globules rouges humains.....	18
2.7. Etude spectrale de la forme monomérique de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E).....	19
2.8. Evaluation de l'effet de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ tocophérol sur l'activité peroxydative de l'amphotéricine B.....	21
2.8.1. Dosage des hydroperoxydes par l'indice de peroxyde (IP).....	21
2.8.2. Dosage des diènes conjugués.....	23
2.8.3. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA).....	24
2.9. Analyse statistique.....	25
<b>Troisième partie : Résultats et discussion</b> .....	26
1. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	27
1.1. En l'absence d'amphotéricine B.....	27
1.2. Amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (AmB/Vit C).....	29

1.3. Amphotéricine B complexée à l'α tocophérol (AmB/Vit E).....	31
2. Observations au microscope électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 en l'absence et en présence des complexes AmB/Vit C et AmB/Vit E.....	33
2.1. En l'absence d'amphotéricine B.....	33
2.2. Amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (AmB/Vit C).....	35
2.3. Amphotéricine B complexée à l'α tocophérol (AmB/Vit E).....	37
3. Evaluation de la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l'α tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis des globules rouges humains.....	40
3.1. Amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (AmB/Vit C).....	40
3.2. Amphotéricine B complexée à l'α tocophérol (AmB/Vit E).....	42
4. Etude spectrale de la forme monomérique de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et l'α tocophérol (AmB/Vit E).....	44
5. Analyse statistique.....	47
6. Evaluation de l'effet de l'acide ascorbique et l'α tocophérol sur l'activité peroxydative de l'amphotéricine B.....	48
6.1. Dosage des hydroperoxydes.....	48
6.2. Dosage des diènes conjugués.....	50
6.3. Mesure des produits secondaires: dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA).....	52
<b>Quatrième partie : Conclusion générale.....</b>	<b>56</b>
<b>Cinquième partie : Références bibliographiques.....</b>	<b>60</b>
<b>Sixième partie: Articles publiés.....</b>	<b>67</b>

## Liste des abréviations

AmB	Amphotéricine B
As	Absorbance spécifique
ATCC	American type culture collection
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
I <sub>2</sub>	Diode
IP	Indice de peroxyde
KI	Iodure de potassium
LDL	Low density lipoprotein (lipoprotéines de basse densité)
MDA	Malondialdéhyde (dialdéhyde malonique)
m/v	masse/volume
p	Propabilité
PBS	Phosphate buffered saline (tampon phosphate salin)
ROS	Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
sr-TBA	Substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TBA	Thiobarbituric acid
UV	Ultraviolet
v/v	volume/volume
Vit C	Vitamine C
Vit E	Vitamine E

## Liste des figures

<b>Figure n°1</b>	Structure chimique de l'amphotéricine B (a), Modèle tridimensionnel avec les dimensions moléculaires de l'amphotéricine B (b).....	06
<b>Figure n°2</b>	Spectre d'absorption électronique et de dichroïsme circulaire de l'amphotéricine B solubilisé dans le propanol (a : forme monomérique) et dans le PBS (b : forme agrégée).....	07
<b>Figure n°3</b>	Mécanisme d'action de l'amphotéricine B par la formation des canaux ioniques dans la cellule fongique.....	09
<b>Figure n°4</b>	Dimension des canaux ioniques au sein de la bicouche lipidique de la cellule fongique .....	10
<b>Figure n°5</b>	Interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol et l'ergostérol membranaires.....	11
<b>Figure n°6</b>	Modèle de l'éponge du stérol (sterol sponge model).....	12
<b>Figure n°7</b>	Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B et son activité peroxydative dans la cellule fongique.....	13
<b>Figure n°8</b>	Structure chimique de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ tocophérol .....	15
<b>Figure n°9</b>	Effets possibles sur une bande d'absorption d'un groupement chromophore .....	20
<b>Figure n°10</b>	Spectres d'absorption des polyènes conjugués.....	21
<b>Figure n°11</b>	Réaction de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le malonaldéhyde (MDA).....	24
<b>Figure n°12</b>	Effet de l'addition de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) et de l' $\alpha$ tocophérol ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) sur la croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	28
<b>Figure n°13</b>	Effet de l'addition de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) sur l'activité antifongique de l'AmB ( $0,4 \mu\text{g/mL}$ ) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	30
<b>Figure n°14</b>	Effet de l'addition de l' $\alpha$ tocophérol ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) sur l'activité antifongique de l'AmB ( $0,4 \mu\text{g/mL}$ ) vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	32

<b>Figure n°15</b>	Observations au microscope électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 au cours de phase de latence (a), exponentielle (b) et stationnaire (c) sans aucune addition.....	34
<b>Figure n°16</b>	Observations au microscope électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 au cours de la phase stationnaire en présence d'amphotéricine B seule (0,4µg/mL) (a) et du complexe AmB/Vit C (b).....	36
<b>Figure n°17</b>	Observations au microscope électronique à balayage de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 au cours de la phase stationnaire en présence d'amphotéricine B seule (0,4µg/mL) (a) et du complexe AmB/Vit E (b).....	38
<b>Figure n°18</b>	Effet de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) sur la toxicité induite par l'amphotéricine B (20µg/mL) vis-à-vis des globules rouges humains.....	41
<b>Figure n°19</b>	Effet de l'α tocophérol (16µg/mL) sur la toxicité induite par l'amphotéricine B (20µg/mL) vis-à-vis des globules rouges humains.....	43
<b>Figure n°20</b>	Spectres caractéristiques de la forme monomérique de l'amphotéricine B ( $10^{-5} \text{mg/mL}$ ) en présence de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) en fonction de temps .....	45
<b>Figure n°21</b>	Spectres caractéristiques de la forme monomérique de l'amphotéricine B ( $10^{-5} \text{mg/mL}$ ) en présence de l'α tocophérol (16µg/mL) en fonction de temps .....	46
<b>Figure n°22</b>	Effet de l'addition de l'acide ascorbique et l'α tocophérol dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B sur la formation des hydroperoxydes.....	49
<b>Figure n°23</b>	Effet de l'acide ascorbique et de l'α tocophérol sur l'absorbance des diènes conjugués dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B	51
<b>Figure n°24</b>	Concentration des diènes conjugués formés dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l'α tocophérol .....	51

<b>Figure n°25</b>	Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration de dialdéhyde malonique (MDA).....	54
<b>Figure n°26</b>	Concentration en malonaldéhyde dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l'α tocophérol.....	54

# ***Introduction***

Les infections fongiques systémiques ou invasives sont des pathologies graves responsables d'une importante mortalité surtout chez les patients immunodéprimés. La prise en charge de ces mycoses est basée essentiellement sur l'utilisation de l'amphotéricine B, antifongique polyène, découvert en 1956. Les atouts majeurs de cet antifongique sont, son large spectre d'action, son excellente activité fongicide qui limite l'émergence des résistances et le faible taux d'apparition de souches résistantes (**Legrand et al., 2015**).

Bien que l'amphotéricine B soit une molécule très active, son utilisation est limitée par des problèmes de solubilité, de stabilité et d'absorption, ce qui est à l'origine d'une toxicité très sévère vis-à-vis des cellules animales hôtes.

La toxicité rénale est la complication majeure liée à l'utilisation de cet antifongique. Elle se traduit sur le plan clinique par une diminution de la filtration glomérulaire et une atteinte tubulaire qui conduit à un déséquilibre du flux plasmatique (**Benbella et al., 2016**).

Cette cytotoxicité est liée principalement au mécanisme d'action traditionnel de l'amphotéricine qui est basé sur son interaction avec les stérols membranaires à savoir l'ergostérol des levures et fungi et le cholestérol des cellules animales qui sont deux analogues structuraux. L'amphotéricine B présente alors une plus grande affinité pour l'ergostérol des cellules fongiques (**Gaboriau et al., 1997**).

L'effet toxique de l'amphotéricine B s'exprime également par la production des espèces réactives de l'oxygène, principale cause de la peroxydation lipidique au niveau des membranes plasmiques, ce qui induit une augmentation de la sensibilité des cellules des mammifères au choc osmotique (**Czernel et al., 2016**).

En effet, les premiers travaux d'**Andrews et al., (1977)** ainsi que ceux de **Beggs et al., (1978)**, ont montré que l'addition d'antioxydants tels que le n-propyl gallate, l'hydroxytoluène butylé et l'acide D- $\alpha$ -tocophérol succinate, protègent l'amphotéricine B contre son auto-dégradation et préservent ainsi son activité antifongique vis-à-vis des levures responsables de pathologies humaines telle que *Candida albicans*.

Par ailleurs, **Brajtburg et al., (1985)** et **Sokol-Anderson et al., (1986)**, ont mis en évidence l'effet protecteur de la catalase contre les dommages oxydatifs induits par l'amphotéricine B sur les membranes des érythrocytes humains.

De plus, **Ferreira et al., (2013)** ont révélé que la production des espèces réactives de l'oxygène augmente l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii*.

De ce fait, l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B via sa complexation à des molécules antioxydantes, semble être une approche prometteuse et peu onéreuse en raison de leurs disponibilités, leurs activités anti-radicalaires et leurs toxicités négligées afin d'obtenir une formulation efficace, stable et moins toxique.

Partant de ces données et pour mieux comprendre le mécanisme d'action de l'amphotéricine B, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur l'évaluation de l'efficacité et de la cytotoxicité de cet antifongique seul et complexé à deux molécules antioxydantes, l'acide ascorbique (vitamine C) et l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E).

Afin d'atteindre ces objectifs, nous avons :

- Evaluer l'effet de ces deux vitamines sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 par la mesure de la croissance en réalisant un dénombrement des levures sur cellule de Thoma et vérification de leurs morphologies au cours de la croissance par microscopie électronique à balayage.
- Evaluer l'effet de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol sur la cytotoxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains par la mesure de la fuite de l'hémoglobine intracellulaire.
- Etudier l'effet de ces deux molécules antioxydantes sur l'activité peroxydative de l'amphotéricine B par la mesure des produits primaires (dosage des hydroperoxydes et des diènes conjugués) et le dosage spectroscopique des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA) qui permet de mesurer les produits secondaires de la réaction d'oxydation des lipides.

***Première partie :***  
***Synthèse bibliographique***

L'amphotéricine B (AmB) est un antifongique, produit par fermentation d'un actinomycète du sol *Streptomyces nodosus*. Elle se présente sous forme de poudre jaune instable, insoluble dans l'eau, peu soluble dans les solvants organiques apolaires comme l'éther de pétrole, et soluble dans les solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) **(Falcón-González et al., 2017)**.

Sa structure chimique a été établie en 1970. C'est un antifongique de la famille des polyènes comportant 47 atomes de carbone et un cycle macrolactone lié à une mycosamine par une liaison  $\beta$ -glycosidique au carbone n°19. L'amphotéricine B est caractérisée par une partie hydrophobe formée d'un groupement chromophore composé de sept doubles liaisons conjuguées en configuration trans et une partie hydrophile, constituée de sept groupements hydroxyles et une fonction carboxylique sur le carbone n°16 ce qui lui confère un caractère amphiphile **(Gagoś et Czernel, 2014)**.

L'amphotéricine B renferme aussi un cycle hemiacétal entre le carbone n°13 et le carbone n°17. La présence d'une fonction carboxylique et d'un amino-sucre lui donne un caractère amphotère **(Figure n°1a) (Kamiński, 2014)**.

Son poids moléculaire est de 924,079, avec des dimensions moléculaires de 0,6nm de hauteur, 0,7nm de largeur et 2,4nm de longueur **(Figure n°1b) (Neumann et al., 2016)**.

A l'état solide, cet antifongique est photosensible. Les analyses thermiques ont révélé que l'amphotéricine B chauffée dans une atmosphère d'argon conserve sa structure moléculaire, ses propriétés chimiques et ne perd pas son activité jusqu'à des températures pouvant atteindre 137°C. Cependant, sa décomposition complète est achevée à 447°C **[(Łubkowski et al., 1989) ; (Zielińska et al., 2016)]**.

En revanche, en présence d'oxygène moléculaire, l'oxydation commence et se termine à 150°C qui s'accompagne d'effet exothermique très fort et d'une volatilisation rapide de l'échantillon. La perte d'activité de cet antifongique peut être aussi causée par le processus d'auto-oxydation dans lequel la présence des radicaux libres joue un rôle important **(Czernel et al., 2016)**.

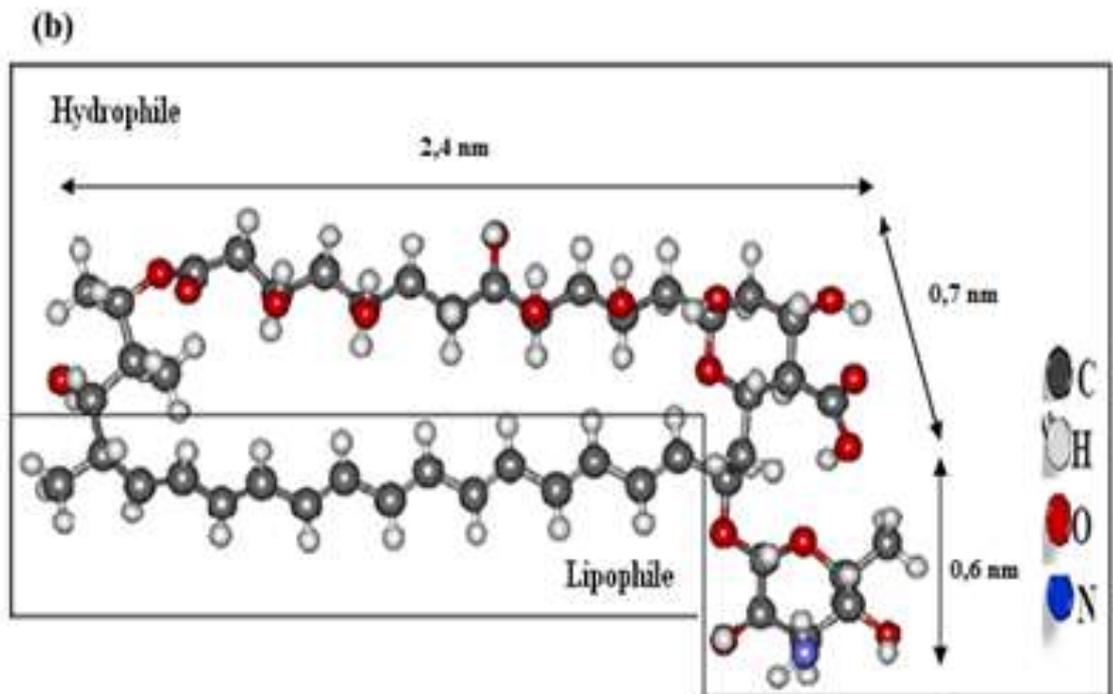
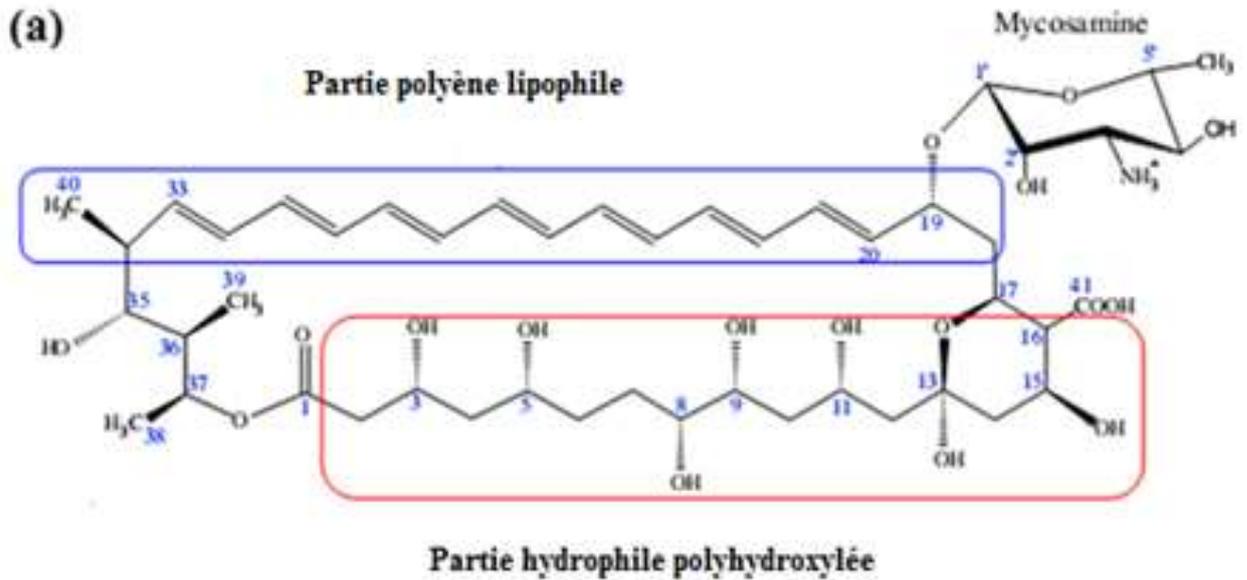


Figure n°1 : Structure chimique de l'amphotéricine B (a) (Kamiński, 2014),  
Modèle tridimensionnel avec les dimensions moléculaires de l'amphotéricine B  
(b) (Neumann et al., 2016).

La présence d'une série de doubles liaisons conjuguées permet l'étude de cet antifongique par méthode d'absorption en UV dans un intervalle allant de 320 à 450nm (Alvarez et al., 2016).

Le spectre de la solution aqueuse de l'amphotéricine B à très faibles concentrations (de l'ordre de  $10^{-8}$ M) ou à des concentrations plus élevées (de l'ordre de  $10^{-6}$ M) dans le propanol, montre la structure vibrationnelle propre aux polyènes conjugués qui présentent une série de bandes principales à 409nm, 385nm, 366nm et 348nm (Figure n°2a).

Par ailleurs, dans une solution aqueuse à une concentration de  $10^{-6}$ M d'amphotéricine B, la structure vibrationnelle diminue, l'absorbance de la bande à 347nm augmente et une nouvelle bande apparaît à 328nm alors qu'à une concentration de  $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, un nouveau pic apparaît à 421nm (Starzyk et al., 2014) (Figure n°2b).

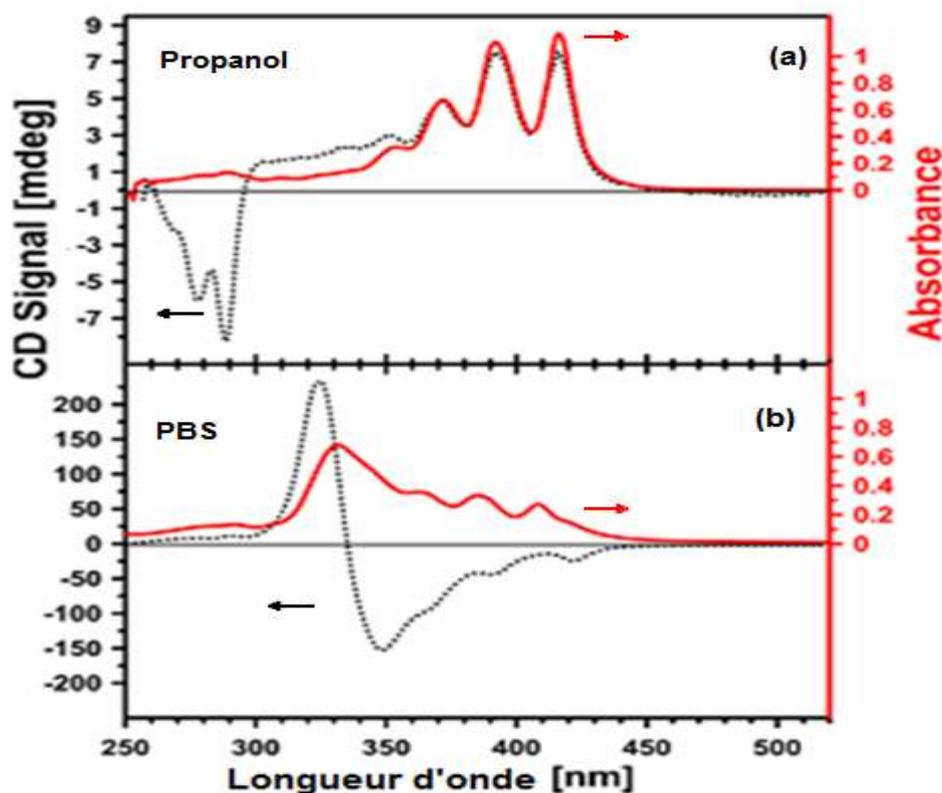


Figure n°2 : Spectre d'absorption électronique et de dichroïsme circulaire de l'amphotéricine B solubilisé dans le propanol (a : forme monomérique) et dans le PBS (b : forme agrégée) (Starzyk et al., 2014).

Ces nouvelles bandes représentent le découplage des niveaux d'énergie causé par l'interaction excitonique des molécules d'amphotéricine B (**Mohamed-Ahmed et al., 2013**).

L'amphotéricine B avec un spectre d'action très large, couvre la plupart des espèces pathogènes pour l'homme. Elle est indiquée principalement dans les mycoses systémiques causées par *Candida sp*, ou autres, comme les aspergilloses et les cryptococcoses (**Poissy et al., 2017**).

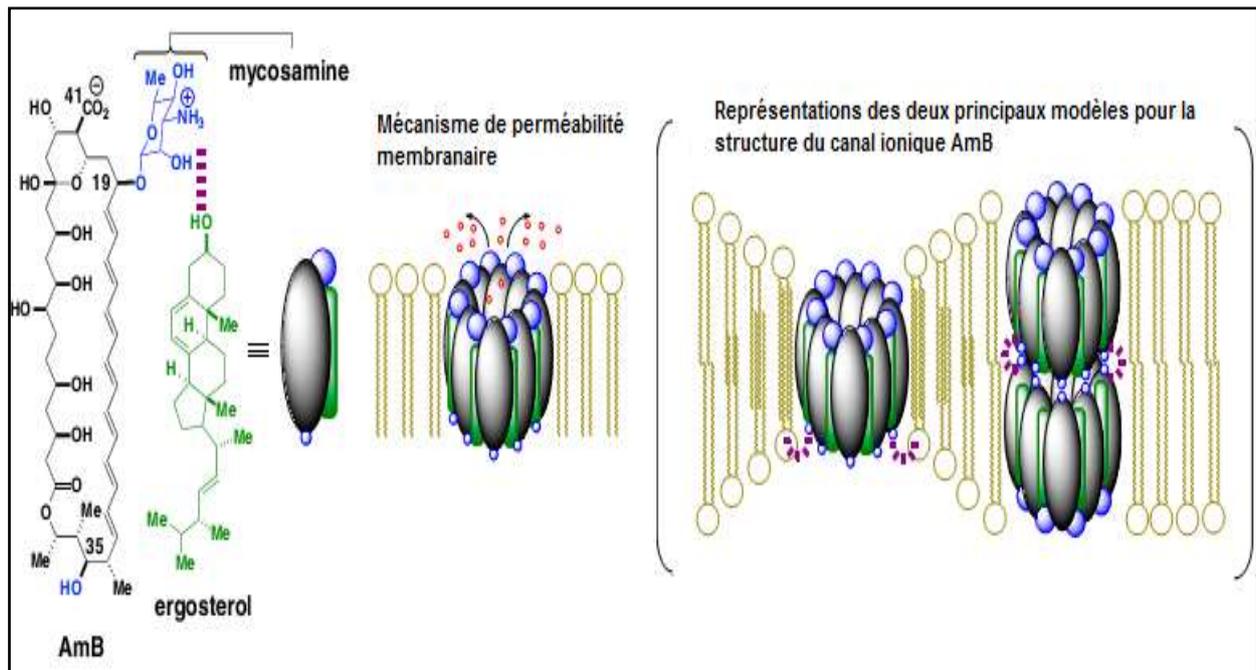
Sa posologie est de 1mg/kg/24h en cas d'insuffisance cardio-pulmonaire et peut atteindre 3mg/kg/24h pour les infections sévères causées par les germes les moins sensibles à cette drogue (**Della Pepa et al., 2016**).

Sur le plan pharmacologique, l'amphotéricine B doit être administrée par voie parentérale pour la prise en charge des mycoses systémiques en raison de son absorption digestive faible (moins de 5%).

Après injection intraveineuse, l'amphotéricine B se lie fortement aux protéines plasmatiques et aux lipoprotéines sériques ( $\geq 90\%$ ). Elle est largement distribuée dans les tissus avec un volume de diffusion de 2,4 à 4L/kg. Elle s'accumule essentiellement dans le foie et la rate et à un degré moindre dans les reins et les poumons (**Stone et al., 2016**). Sa demi-vie plasmatique varie de 24 à 48 heures et aucun métabolite de l'amphotéricine B n'a été identifié. Son élimination totale de l'organisme est longue (demi-vie  $>15$  jours) et est principalement assurée par les reins, mais aussi par la bile (**Kagan et al., 2014**).

En solution aqueuse, l'amphotéricine B se répartit en trois états : une forme agrégée responsable de la toxicité, une forme oligomérique (moins toxique) et une forme monomérique peu toxique, responsable de l'activité antifongique (**Falcón-González et al., 2017**).

Bien que son mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé, il reste généralement admis que sa propriété antifongique résulte de son interaction avec l'ergostérol, stérol dominant des cellules fongiques (**Anderson et al., 2014**) (**Figure n°3**).



**Figure n°3 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B par la formation des canaux ioniques dans la cellule fongique (Gray et al., 2012).**

L'amphotéricine B serait à l'origine d'une perméabilisation membranaire par la formation de pores transmembranaires d'un diamètre de 0,8nm, en provoquant la fuite des ions ( $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $H^+$ ,  $Cl^-$ ) et de petits composés intracellulaires suivie par une lyse cellulaire. Ces canaux ioniques sont formés de 8 molécules d'antifongique agrégées. L'ensemble constitue un canal ancré à la surface membranaire par ses groupes chargés dont l'intérieur est tapissé de groupes hydroxyles (Yang et al., 2013) (Figure n°4).

De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre la fixation membranaire de l'antifongique et son action perméabilisante, précisant le rôle des lipides membranaires et plus particulièrement les stérols dans l'interaction amphotéricine B-membrane [(Gray et al., 2012);(Wilcock et al., 2013);(Kamiński, 2014)].

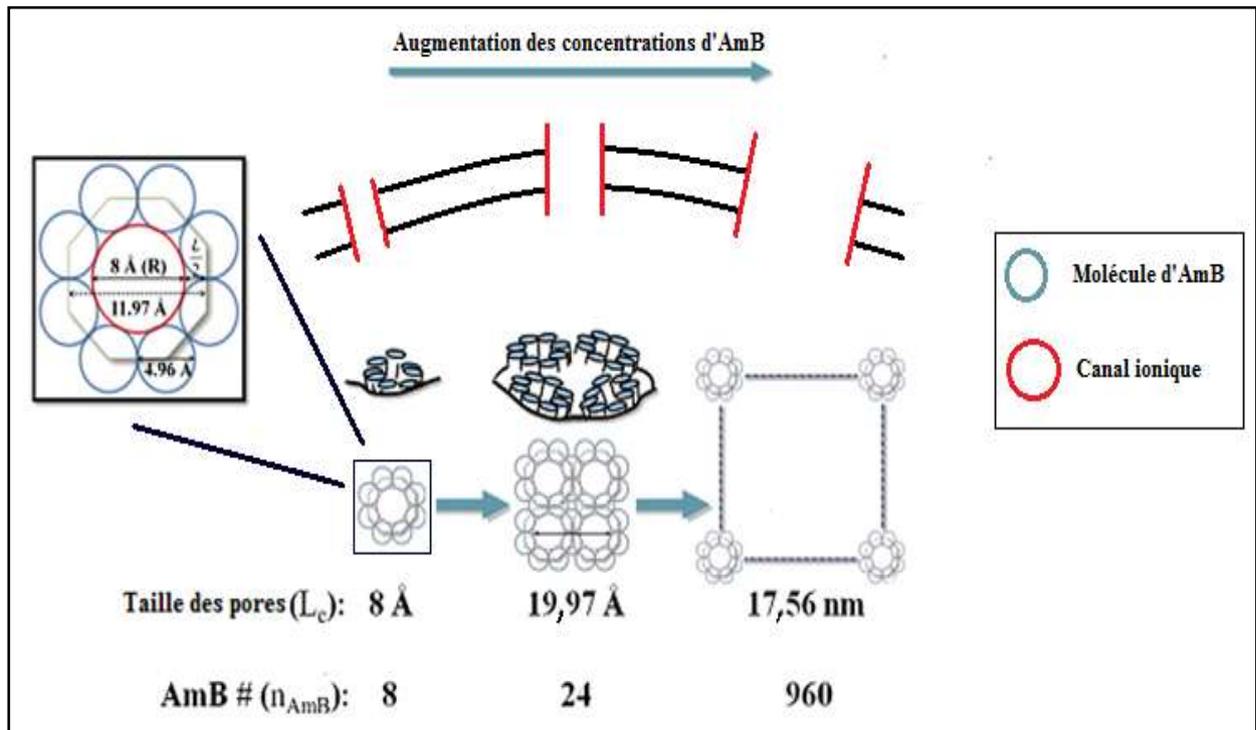


Figure n°4: Dimension des canaux ioniques au sein de la bicouche lipidique de la cellule fongique (Yang et al., 2013).

L'interaction entre l'amphotéricine B et le cholestérol est responsable de sa toxicité vis-à-vis des cellules des mammifères. Selon Kamiński (2014), la sélectivité de l'amphotéricine B envers les cellules fongiques est due à une grande affinité de cette drogue pour l'ergostérol membranaire, cela est probablement lié à la présence d'une double liaison en C22 sur l'ergostérol qui renforce l'interaction mettant en jeu la chaîne rigide de l'amphotéricine B et la molécule de stérol.

Ainsi, la conformation plane de l'ergostérol serait plus propice à une interaction avec l'amphotéricine B que le cholestérol (Nakagawa et al., 2014) (Figure n°5).

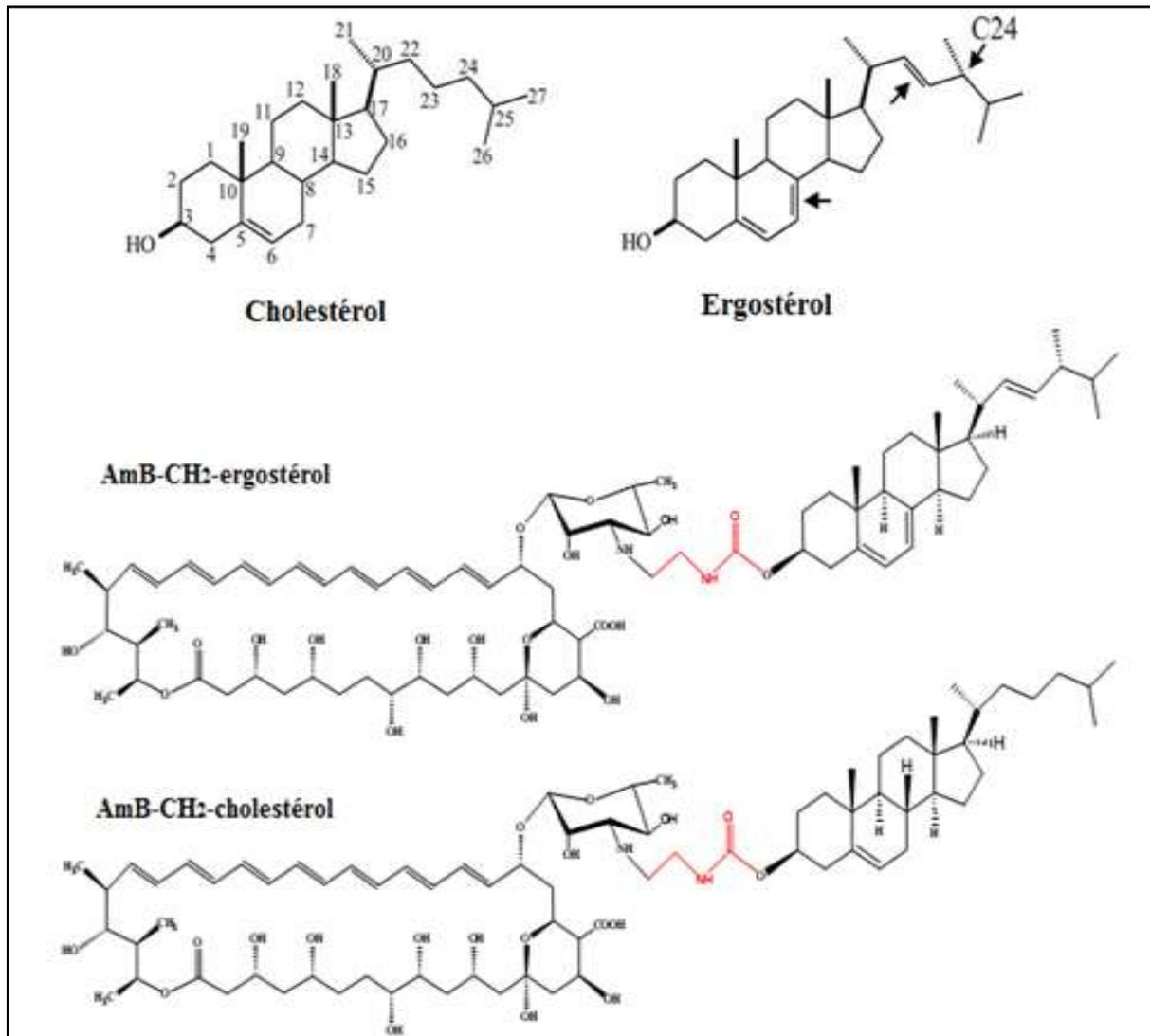


Figure n°5 : Interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol et l'ergostérol membranaires (Kamiński, 2014).

Un autre mécanisme a été mis en évidence par **Anderson et al., (2014)**, il s'agit du modèle de l'éponge de stérols «*sterol sponge model*» selon lequel, les molécules d'amphotéricine B s'organisent sous forme de super agrégats extra-membranaires au voisinage de la membrane plasmique fongique et tuent la levure par extraction de l'ergostérol à partir de la bicouche lipidique. Ce modèle a permis d'expliquer la rareté de la résistance microbienne qui caractérise cet antifongique en milieu hospitalier (**Figure n°6**).

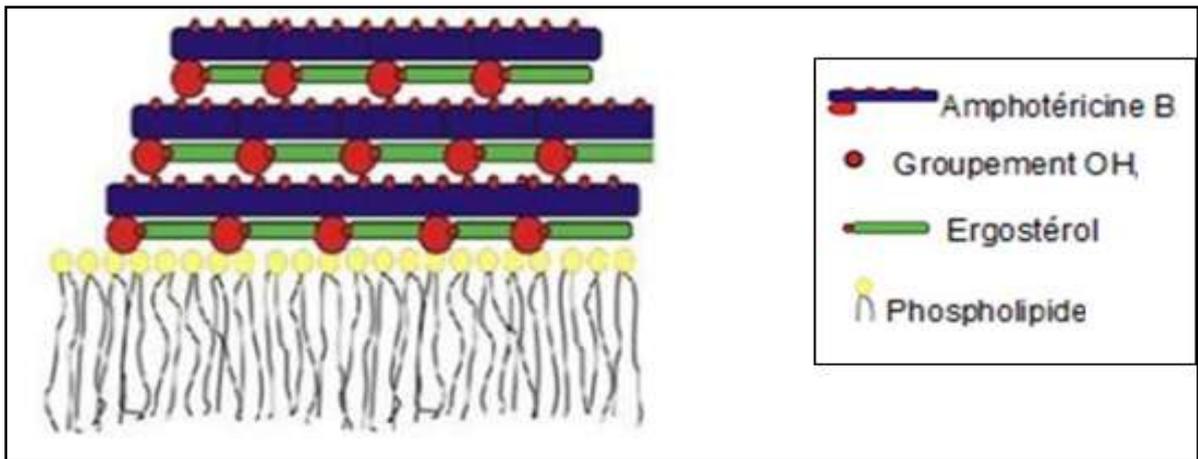


Figure n°6: Modèle de l'éponge du stérol (*sterol sponge model*) (Anderson et al., 2014).

Les études de **Kawabe et al., (2017)**, ont montré que la toxicité cellulaire de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules fongiques et animales dépend de sa dose. En effet, pour passer d'une stimulation à une perméabilisation irréversible de la membrane aux cations, la dose d'amphotéricine B doit être comprise entre  $0,02\mu\text{M}$  et  $0,3\mu\text{M}$  pour *Candida albicans* et entre  $1\mu\text{M}$  et  $20\mu\text{M}$  pour les lymphocytes murins.

Ces différents phénomènes ne peuvent pas s'expliquer uniquement par la formation de pores transmembranaires et par des changements de perméabilité. En effet, en **1986, Sokol-Anderson et ses collaborateurs**, ont mis en évidence le phénomène de la peroxydation des lipides membranaires comme un autre mécanisme d'action de l'amphotéricine B qui pourrait être responsable de la destruction des cellules fongiques et animales. Ce mécanisme de peroxydation lipidique est un facteur principal dans la dégradation auto-oxydative de cet antifongique, ce qui explique la diminution de son efficacité avec le temps (**Mesa-Arango et al., 2012**) (Figure n°7).

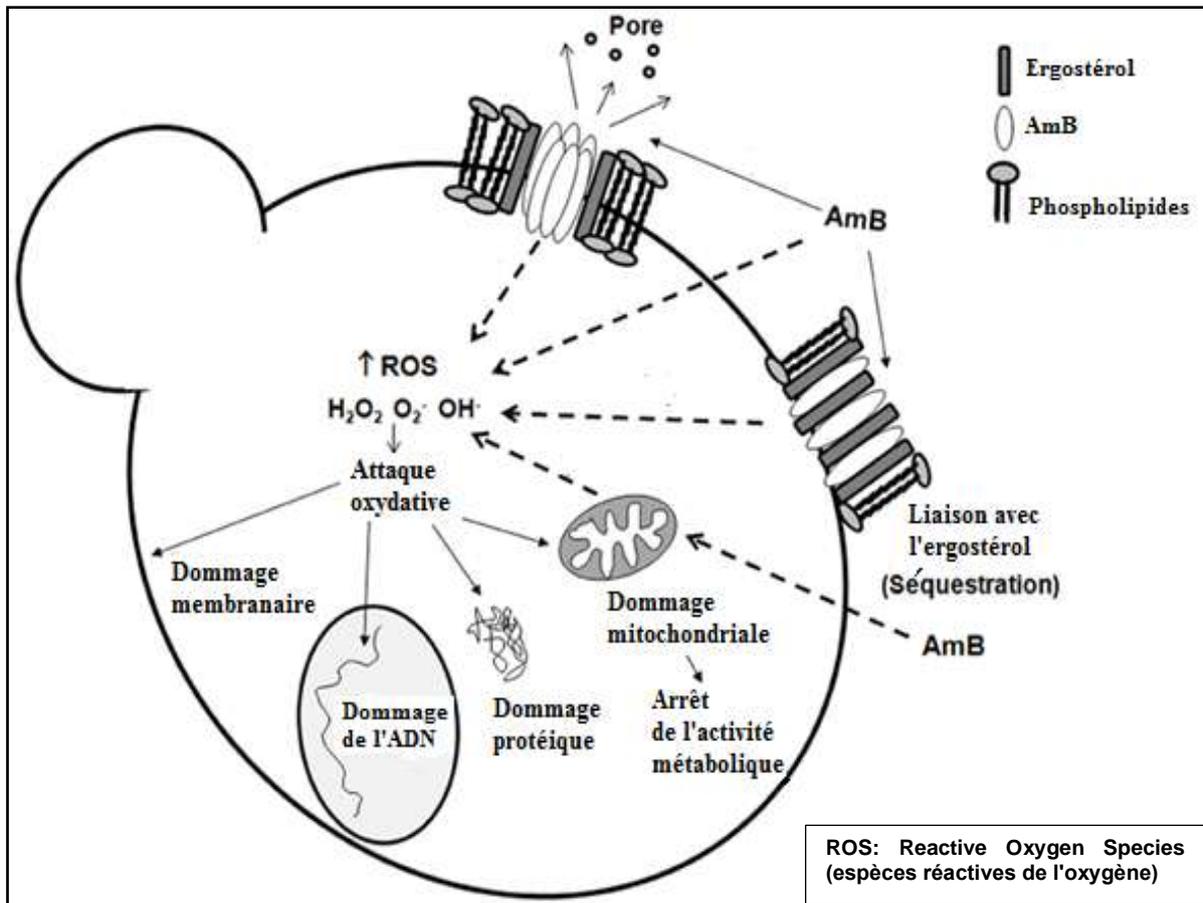


Figure n°7 : Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B et son activité peroxydative dans la cellule fongique (Mesa-Arango et al., 2012).

***Deuxième partie :***  
***Matériel et méthodes***



### 1.3. *Candida albicans*

Les tests d'efficacité de l'amphotéricine B ont été menés sur une souche de levure de référence ; il s'agit de *Candida albicans* ATCC10231 (American Type Culture Collection, Rockville, MD., USA.).

Les levures sont entretenues par repiquages réguliers sur gélose Sabouraud et conservées à +4°C.

### 1.4. Globules rouges humains

Les tests de cytotoxicité des différentes formulations de l'amphotéricine B, ont été effectués sur un modèle universel des membranes cellulaires animales, le globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

## 2. Méthodes

### 2.1. Préparation des solutions antifongiques

La solution mère de l'antifongique est préparée en extemporané dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de  $10^{-3}$ M puis ajustée à  $10^{-4}$ M au spectrophotomètre à 406nm selon la formule  $A = \epsilon \cdot C \cdot l$  ( $\epsilon_{406} = 160\,000\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) après une dilution au 1/100 dans le méthanol absolu (**Szlinger-Richert et al., 2001**).

L'amphotéricine B est utilisée à une concentration finale de 0,4µg/mL; ce qui correspond à sa concentration minimale inhibitrice (CMI) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 (**Boucherit et al., 2007**). En revanche, pour les tests de cytotoxicité, l'amphotéricine B est ajoutée à une concentration finale de 20µg/mL [(**Knopik-Skrocka et Bielawski, 2002**); (**Espada et al., 2008**)].

### 2.2. Préparation des vitamines

L'acide ascorbique et l'α tocophérol sont préparés en extemporané dans du diméthylsulfoxyde et utilisés à des concentrations finales de  $3 \cdot 10^2$ µg/mL pour la vitamine C et de 16µg/mL pour la vitamine E [(**Khalil et al., 2012**); (**Andrade et al., 2014**)].

Pour une meilleure stabilité, les solutions mères ainsi préparées sont gardées pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

### 2.3. Préparation des complexes AmB/vitamine C et AmB/vitamine E

L'amphotéricine B est mélangée à la vitamine C ou à la vitamine E et les complexes ainsi formés sont incubés pendant 20 minutes à température ambiante avant leur utilisation.

### 2.4. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231

Des tubes coniques de 30mL contenant les milieux de cultures sontensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 18 heures puis mis dans un incubateur de paillasse (Thermo Forma Orbital Shaker) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute. La concentration cellulaire de départ est fixée à  $2 \cdot 10^6$  cellules/mL.

Pour étudier le phénomène de dormance des levures, la croissance est suivie sur une période de 40 heures. La croissance est suivie par un dénombrement des levures sur cellule de Thoma toutes les heures.

Le temps zéro correspond à l'addition de l'inoculum et de l'antifongique en l'absence et en présence des vitamines.

### 2.5. Observations au microscope électronique à balayage de *Candida albicans* ATCC10231 en l'absence et en présence des complexes AmB/Vit C et AmB/Vit E

Pour vérifier la viabilité des levures et leurs morphologies au cours de la croissance, nous avons réalisé des observations microscopiques à l'aide d'un microscope électronique à balayage (HITACHI TM-1000) au laboratoire de microscopie du département de physique-Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

Nous avons réalisé des frottis à partir des cultures de *Candida albicans* ATCC10231 menées sur bouillon Sabouraud en l'absence et en présence d'antifongique. Les frottis ainsi préparés sont maintenus dans des boîtes de Pétri stériles.

Les microphotographies sont traitées et analysées par le logiciel ImageJ version 1.51a (2016), dans le but de déterminer la charge et les dimensions cellulaires de *Candida albicans* ATCC10231 pendant la phase stationnaire en l'absence et en présence des différentes formulations (**Benmansour et al., 2014**)

### **2.6. Evaluation de l'effet toxique induit par l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l'α tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis des globules rouges humains**

Les globules rouges humains sont resuspendus dans le tampon phosphate salé (PBS) pH 7,4, 10mM, à raison de 4000 cellules/mL.

La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue à 130 tours/minute pendant 120 minutes.

Dès l'addition de l'amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique, ou à l'α tocophérol qui correspond au temps zéro de la réaction, 500µL sont prélevés à intervalles de temps irréguliers auxquels 2mL d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM) sont ajoutés. Après centrifugation à 4000 tours/minute pendant 5 minutes, le culot est éliminé et le surnagent est récupéré et servira pour le dosage de l'hémoglobine par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548nm (**Serrano et al., 2013**).

L'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges dans de l'eau distillée. Le taux d'hémolyse est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse}(\%) = \frac{AE - A0}{A100 - A0} \cdot 100$$

Où:

AE: Absorbance de l'échantillon (AmB/Vit) à 548nm.

A0: Absorbance du témoin négatif (PBS) à 548nm.

A100: Absorbance du témoin positif (100% d'hémolyse) à 548 nm.

### **2.7. Etude spectrale de la forme monomérique de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E)**

Afin de mettre en évidence la structure vibrationnelle propre aux polyènes conjugués qui présentent une série de bandes principales à 408, 385, 366 et 348nm, nous avons utilisé l'amphotéricine B à une concentration finale de  $10^{-5}$  mg/mL et l'étude spectrale des différentes formulations est réalisée à 37°C selon le protocole de **Mohamed-Ahmed et al., (2013)**.

Afin d'obtenir le spectre caractéristique de la forme monomérique de l'amphotéricine B à 408nm, les solutions préparées sont diluées dans le méthanol absolu.

L'étude spectroscopique est réalisée par un balayage spectral dans le domaine ultraviolet (UV) à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UV-Visible SPECORD<sup>®</sup> PLUS-Analytik Jena. Les spectres obtenus sont enregistrés dans un intervalle allant de 320 à 450nm et sont caractéristiques des doubles liaisons conjuguées (groupement chromophore).

Selon **Rouessac et ses collaborateurs (2000)**, il existe quatre effets possibles sur une bande d'absorption d'un groupement chromophore (**Figure n°9**) :

- Effet bathochrome : dû principalement à une substitution et/ou une conjugaison du groupement chromophore. Il correspond à un déplacement des bandes d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.
- Effet hypsochrome : lié généralement à l'augmentation de la polarité du solvant et correspond à un déplacement des bandes d'absorption vers les courtes longueurs d'onde.
- Effet hyperchrome: c'est l'augmentation de l'intensité d'absorption qui est le résultat d'une conjugaison et/ou une substitution.
- Effet hypochrome : c'est la diminution de l'intensité d'absorption qui est probablement dûe à une dégradation du groupement chromophore.

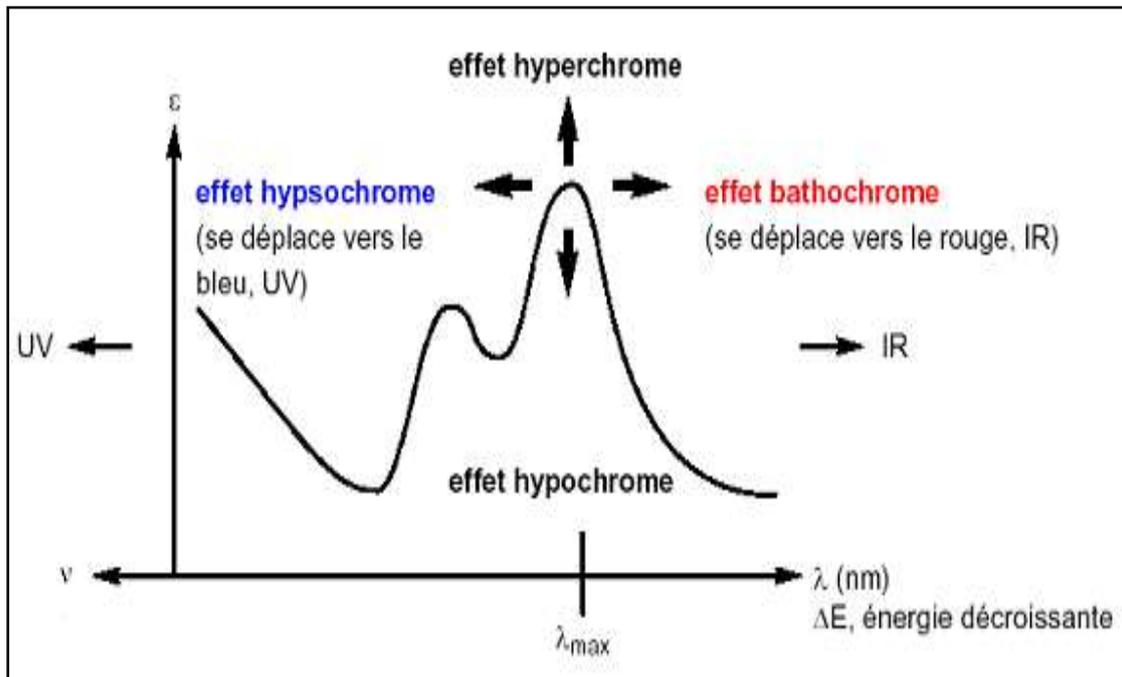


Figure n° 9 : Effets possibles sur une bande d'absorption d'un groupement chromophore (Rouessac et al., 2000).

Selon la nature chimique de l'amphotéricine B, la présence de plusieurs chromophores conjugués (partie lipophile apolaire contenant 7 doubles liaisons conjuguées en configuration trans) entraîne un déplacement du maximum d'absorption vers les grandes longueurs d'onde (effet bathochrome), associé à une augmentation du coefficient d'absorption molaire (effet hyperchrome) (Biémont, 2008) (Figure n°10).

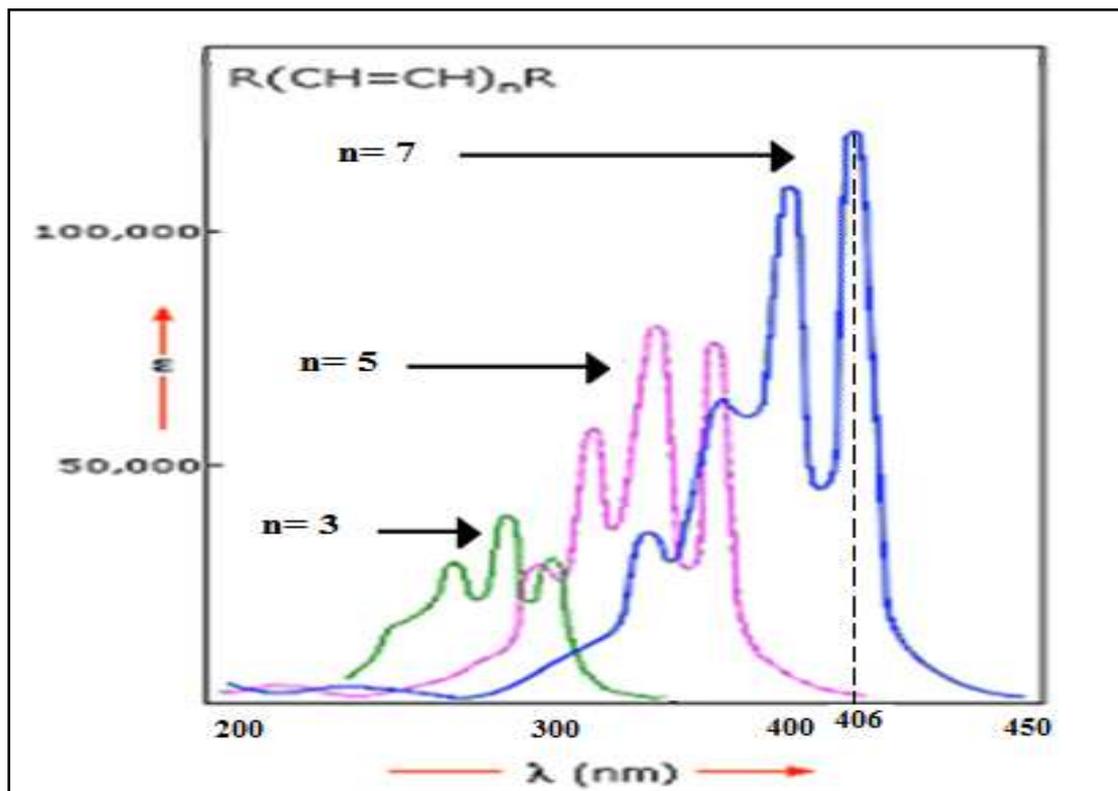


Figure n°10 : Spectres d'absorption des polyènes conjugués ( $n$  = nombre de doubles liaisons) (Biémont, 2008).

## 2.8. Evaluation de l'effet de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ tocophérol sur l'activité peroxydative de l'amphotéricine B

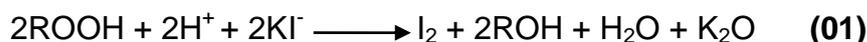
Afin de déterminer l'état d'oxydation de l'amphotéricine B en l'absence et en présence des molécules antioxydantes, il est nécessaire de mesurer simultanément les quantités des produits primaires et secondaires résultant de l'oxydation des lipides.

### 2.8.1. Dosage des hydroperoxydes par l'indice de peroxyde (IP)

L'indice de peroxyde (IP) est défini comme étant la quantité d'oxygène actif, exprimée en mg, contenue dans 1g de corps gras et susceptible d'oxyder l'iodure de potassium avec libération d'iode.

Il s'agit de la méthode la plus utilisée pour quantifier les hydroperoxydes totaux correspondant au titrage iodométrique (Laguerre et al., 2007).

En milieu acide, les hydroperoxydes réagissent avec l'ion iodure **(01)**, pour générer de l'iode qui est titré par une solution de thiosulfate de sodium en présence d'empois d'amidon **(02)**.



Afin de mesurer l'oxydation des lipides, nous avons utilisé le jaune d'œuf comme modèle lipidique.

Il faut noter que la quantité des lipides présente dépasse 32% avec une composition variée telle que : les acides gras saturés, les acides gras insaturés, les lipides chargés et le cholestérol.

1mL de jaune d'œuf est mélangé avec 1mL de tampon phosphate à pH 7,4 (50mM). Après homogénéisation, le mélange est dispersé dans un volume de chloroforme et d'acide acétique (2/3, v/v) auquel nous avons ajouté 20µg/mL d'amphotéricine B en l'absence et en présence de 3.10<sup>2</sup>µg/mL d'acide ascorbique ou de 16µg/mL d'α tocophérol **(Cirlini et al., 2012)**.

Une solution aqueuse saturée en iodure de potassium (KI) est ensuite additionnée et le mélange réactionnel est laissé pendant 5 minutes à l'abri de la lumière. Le diiode (I<sub>2</sub>) formé est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) à 0,0005N, jusqu'à la disparition complète de la couleur bleue-violette.

L'indice de peroxyde (IP) est exprimé en mmol de peroxyde.kg<sup>-1</sup> d'échantillon, selon l'équation suivante :

$$IP = \frac{V \cdot N \cdot 1000}{m}$$

Où :

V : volume de thiosulfate 0,0005N nécessaire pour titrer l'échantillon à analyser (mL),

N : Normalité de la solution de thiosulfate (0,0005N),

m : la masse d'échantillon prélevée (g).

### 2.8.2. Dosage des diènes conjugués

Les diènes conjugués sont des produits primaires de l'oxydation des lipides qui se forment par réarrangement des doubles liaisons du radical lipoylé des acides gras polyinsaturés. Les diènes conjugués sont mesurés par spectrophotométrie à 234nm, selon le protocole expérimental décrit par **Barriuso et al., (2013)**.

Cette méthode est réalisée sur des extraits lipidiques à base de jaune d'œuf et du tampon phosphate à 50mM solubilisés dans un mélange méthanol/hexane (3/1 v/v).

Après homogénéisation, nous avons réalisé deux séries de dilutions l'une dans le tampon phosphate à pH 7,4 (50mM) et l'autre dans le mélange méthanol/hexane. Nous avons, ensuite ajouté 20µg/mL d'amphotéricine B seule puis en complexée à l'acide ascorbique ou à l'α tocophérol.

La formation des diènes conjugués est suivie pendant 60 minutes à 37°C par lecture de l'absorbance à une longueur d'onde de 234nm à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UV-Visible (**Karppi et al., 2010**).

La concentration en diènes conjugués, exprimée en mol. L<sup>-1</sup> d'émulsion, est calculée à partir de la valeur d'absorbance obtenue (As), en considérant un coefficient d'extinction molaire(ε) des diènes conjugués égal à 29000L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>1</sup> (**Farhoosh et al., 2012**).

$$C = \frac{As \cdot 10^2 \cdot \rho_{émulsion}}{\epsilon}$$

Où :

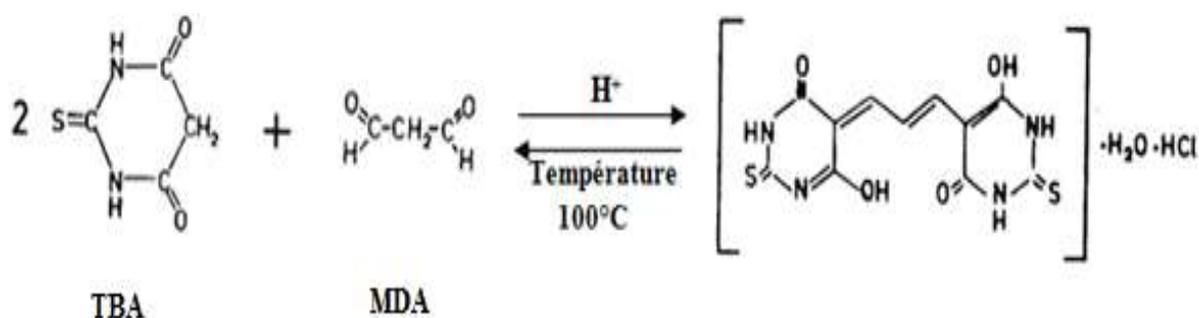
A<sub>S</sub>: Absorbance spécifique des diènes conjugués à 234nm.

ρ d'émulsion : densité de l'émulsion.

### 2.8.3. Dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA)

Le test à l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) est basé sur la formation d'un complexe coloré résultant de la réaction entre une molécule de malonalaldéhyde (MDA) et deux molécules d'acide 2-thiobarbiturique à une longueur d'onde de 532nm.

La réaction du TBA est réalisée à 100°C en milieu acide (pH 1-2) pour accélérer la vitesse de réaction et augmenter la sensibilité. La concentration en substances réactives au (sr-TBA) est exprimée en mmol de MDA.kg<sup>-1</sup> d'échantillon (**Guzun-Cojocar, 2010**) (**Figure n°11**).



**Figure n°11 : Réaction de l'acide thiobarbiturique avec le malonalaldéhyde (Gao et al., 2013).**

Les substances réactives au TBA (sr-TBA) ont été mesurées selon la méthode de **Sakanaka et Tachibana, (2006)**.

1mL de l'extrait lipidique est mélangé avec 0,5mL d'amphotéricine B à une concentration finale de 20µg/mL auxquels nous avons ajouté les molécules antioxydantes. La solution ainsi préparée est additionnée de 2mL de FeSO<sub>4</sub> à 0,01mM. Après une incubation de 15 minutes à 37°C sous agitation continue, 1mL d'acide trichloracétique à 2,5% sont ajoutés. Le mélange obtenu est centrifugé à 4000 tours/minute pendant 20 minutes à +4°C, le surnageant récupéré est additionné à l'acide 2-thiobarbiturique (0,8%, m/v).

Les solutions réactionnelles sont ensuite placées dans un bain-marie à 100°C pendant 15 minutes puis immédiatement à température ambiante pendant 20 minutes.

La teneur en substances réactives au TBA est évaluée par lecture de l'absorbance au spectrophotomètre à 532nm.

Une gamme étalon est réalisée à partir de la solution de 1,1,3,3-tetraethoxypropane à des concentrations finales allant de 0 à 0,25mM. Ce dernier se décompose en malonaldéhyde dans l'eau.

### **2.9. Analyse statistique**

Nous avons réalisé des tests statistiques sur l'ensemble des résultats obtenus afin de déterminer s'il existe des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les différentes formulations de l'amphotéricine B. Ces études ont été effectuées à l'aide du logiciel XLSTAT Version 2014.5.03.

***Troisième partie :***  
***Résultats et discussion***

L'amphotéricine B induit des dommages oxydatifs sur les cellules fongiques et animales [(Brajtburg et al., 1985); (Sokol-Anderson et al., 1986)]. Elle est à l'origine de la formation de radicaux libres responsables des peroxydations lipidiques et de la lyse cellulaire par sa liaison aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LDL) (Barwicz et al., 2000). De ce fait, la complexation de l'amphotéricine B avec des molécules antioxydantes semble présenter un grand intérêt thérapeutique.

Notre étude s'inscrit dans cet ordre d'idée et consiste à évaluer, *in vitro*, l'efficacité et la cytotoxicité d'une nouvelle formulation de l'amphotéricine B basée sur sa complexation avec deux molécules antioxydantes, l'acide ascorbique (vitamine C) et  $\alpha$ -tocophérol (vitamine E).

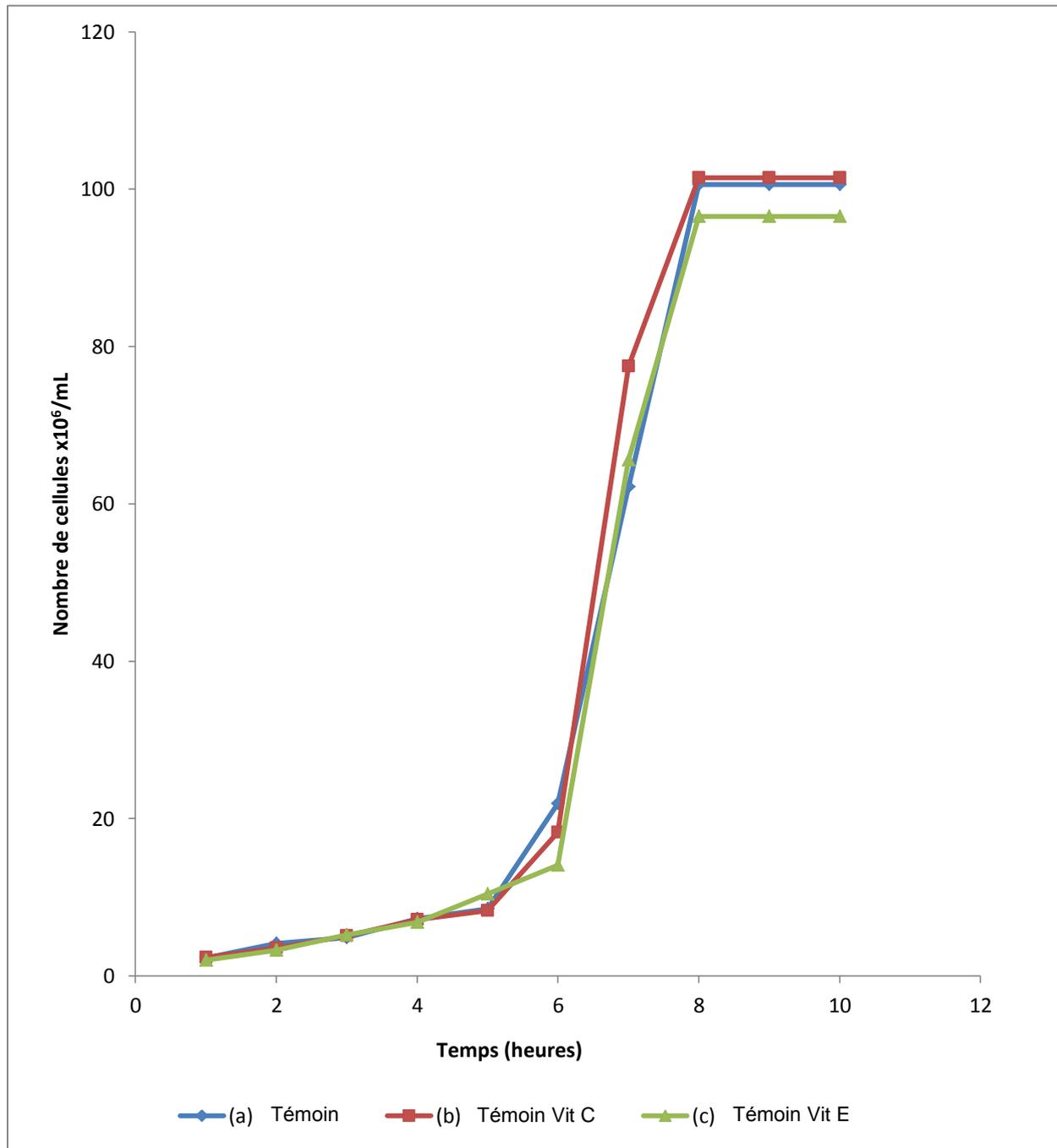
## **1. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231**

### **1.1. En l'absence d'amphotéricine B**

La **figure n°12** regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'addition de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) et l' $\alpha$  tocophérol ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Les levures passent par une phase de latence de 2 heures caractérisée par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle par trois générations successives. Le nombre de cellules augmente pour atteindre un maximum au bout de 8 heures d'incubation. Ce taux reste inchangé durant une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation à 30° C sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de l'acide ascorbique (vitamine C) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. La culture menée en présence de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) donne une courbe de croissance similaire à la culture témoin.
- La courbe (c) représente l'effet de l' $\alpha$  tocophérol (vitamine E) ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. La culture menée en présence

de l' $\alpha$  tocophérol donne une courbe de croissance similaire à la culture témoin.



**Figure n°12 : Effet de l'addition de l'acide ascorbique (vitamine C) ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) et de l' $\alpha$  tocophérol (vitamine E) ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.**

## 1.2. Amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (AmB/Vit C)

Les résultats relatifs à l'effet de l'addition de l'acide ascorbique ( $3.10^2\mu\text{g/mL}$ ) sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B ( $0,4\mu\text{g/mL}$ ) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 sont représentés sur la **figure n°13**.

- La courbe (a) représente la culture témoin. Le taux de croissance est optimal avec un nombre de cellules de  $101.10^6$  cellules/mL.
- La courbe (b) représente l'effet de l'acide ascorbique (vitamine C) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Les cultures menées en présence de l'acide ascorbique ( $3.10^2\mu\text{g/mL}$ ) donnent des croissances similaires à la culture témoin.
- La courbe (c) représente l'effet de l'amphotéricine B sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Nous remarquons un prolongement de la phase de latence. Cette dernière passe de 2 heures en l'absence de l'antifongique à 24 heures en présence de  $0,4\mu\text{g/mL}$  d'amphotéricine B. Ensuite, les cellules reprennent leur croissance pour atteindre un nombre maximum de  $59.10^6$  cellules/mL avec un taux d'inhibition de 41% par rapport à la culture témoin.
- La courbe (d) représente l'effet du complexe amphotéricine B/acide ascorbique (AmB/Vit C) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Nous remarquons que la phase de latence passe de 24 à 27 heures. Le nombre de cellules maximum est de  $48.10^6$  cellules/mL avec un taux d'inhibition de 52% par rapport à la culture témoin.

Il est important de noter que la complexation de l'amphotéricine B ( $0,4\mu\text{g/mL}$ ) avec l'acide ascorbique ( $3.10^2\mu\text{g/mL}$ ) améliore son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 de 11%

Ce résultat est en accord avec celui de **Brajtburg et al., (1989)** et de **Atmaca et Çiçek, (1996)**, qui ont montré que le pouvoir antioxydant de l'acide ascorbique confère une protection contre l'autoxydation de la molécule de l'amphotéricine B et par conséquent, augmente leur activité antifongique.

Le prolongement de la phase de latence au-delà de 24h correspond à un ressuscitement d'un certain nombre de cellules. En effet, le pourcentage des cellules qui reprennent leur croissance est de 59% en présence d'amphotéricine B seule

avec une phase de latence de 24 heures et de 48% en présence du complexe AmB/acide ascorbique avec une phase de latence de 27 heures.

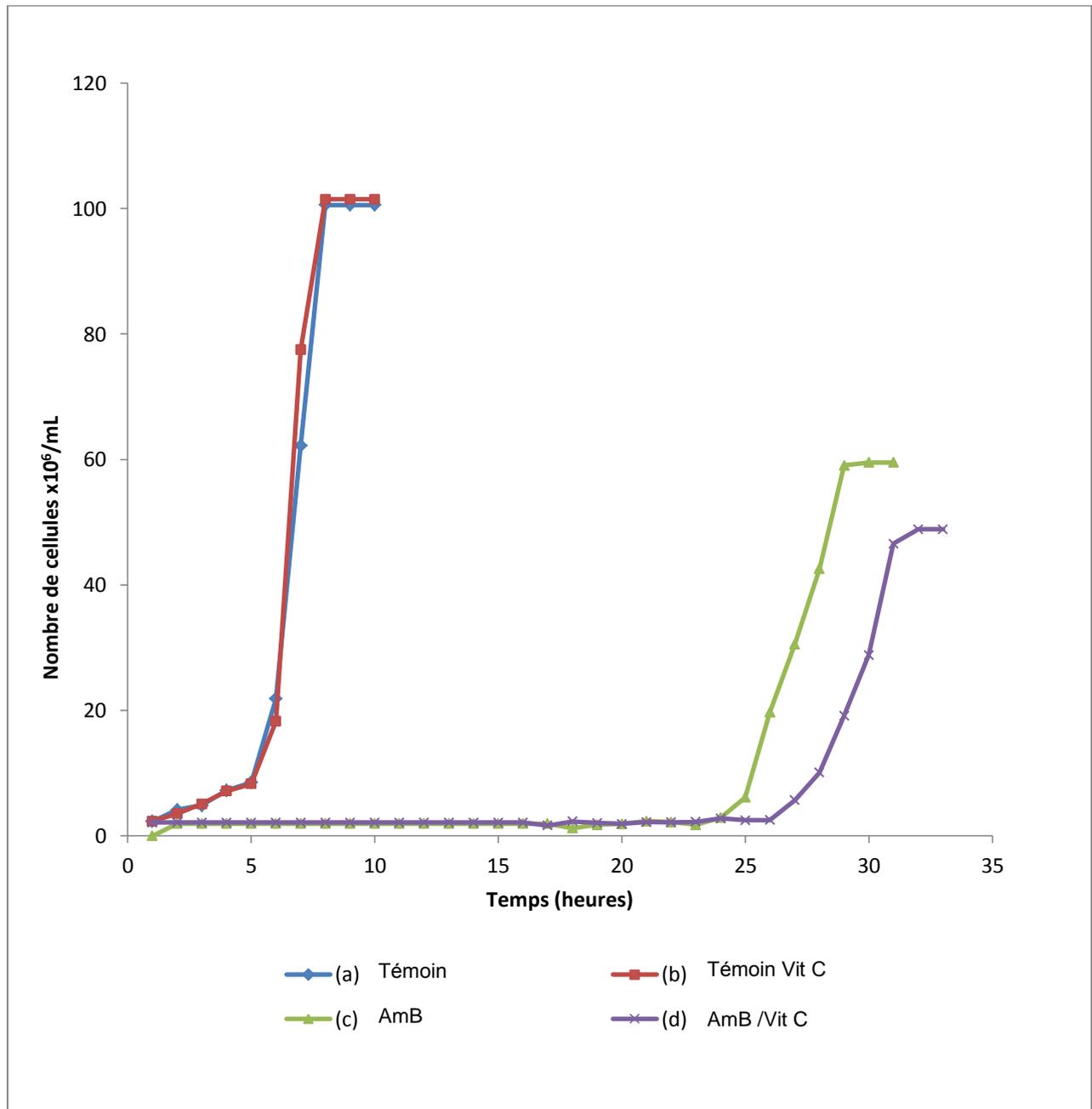


Figure n° 13 : Effet de l'addition de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B ( $0,4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

### 1.3. Amphotéricine B complexée à l'α tocophérol (AmB/Vit E)

La **figure n°14** regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'addition de l'α tocophérol (16µg/mL) sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B (0,4µg/mL) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

- La courbe (a) représente la culture témoin à 100% de croissance.
- La courbe (b) représente l'effet de l'α tocophérol (vitamine E) sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Les cultures menées en présence de l'α tocophérol (16µg/mL) donnent des croissances similaires à la culture témoin.
- La courbe (c) représente l'effet de l'amphotéricine B sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Nous remarquons l'addition de l'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4µg/mL, entraîne un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 à 24 heures. Les levures reprennent ensuite leur croissance pour atteindre un nombre maximum égal à  $59 \cdot 10^6$  cellules/mL. Le taux d'inhibition est estimé à 41% par rapport à la culture témoin.
- La courbe (d) représente l'effet de l'addition de l'α tocophérol (vitamine E) sur l'efficacité de de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231. Nous remarquons que la phase de latence passe de 24 à 28 heures le nombre de cellules maximum est de  $40 \cdot 10^6$  cellules/mL avec un taux d'inhibition de 60%. En effet, la complexation de l'amphotéricine B (0,4µg/mL) à l'α tocophérol (vitamine E) (16µg/mL) améliore son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 de 19%.

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Andrews et ses collaborateurs (1977)** ainsi que celui de **Baran et Thomas, (2009)**, qui ont montré que la complexation de l'amphotéricine B avec la vitamine E permet de stabiliser cet antifongique contre l'auto-dégradation et augmente par conséquent son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans*.

Par ailleurs, le pourcentage de cellules qui reprennent leur croissance est de 59% en présence d'amphotéricine B seule avec une phase de latence de 24 heures et de 40% en présence du complexe AmB/vitamine E avec une phase de latence de 28 heures.

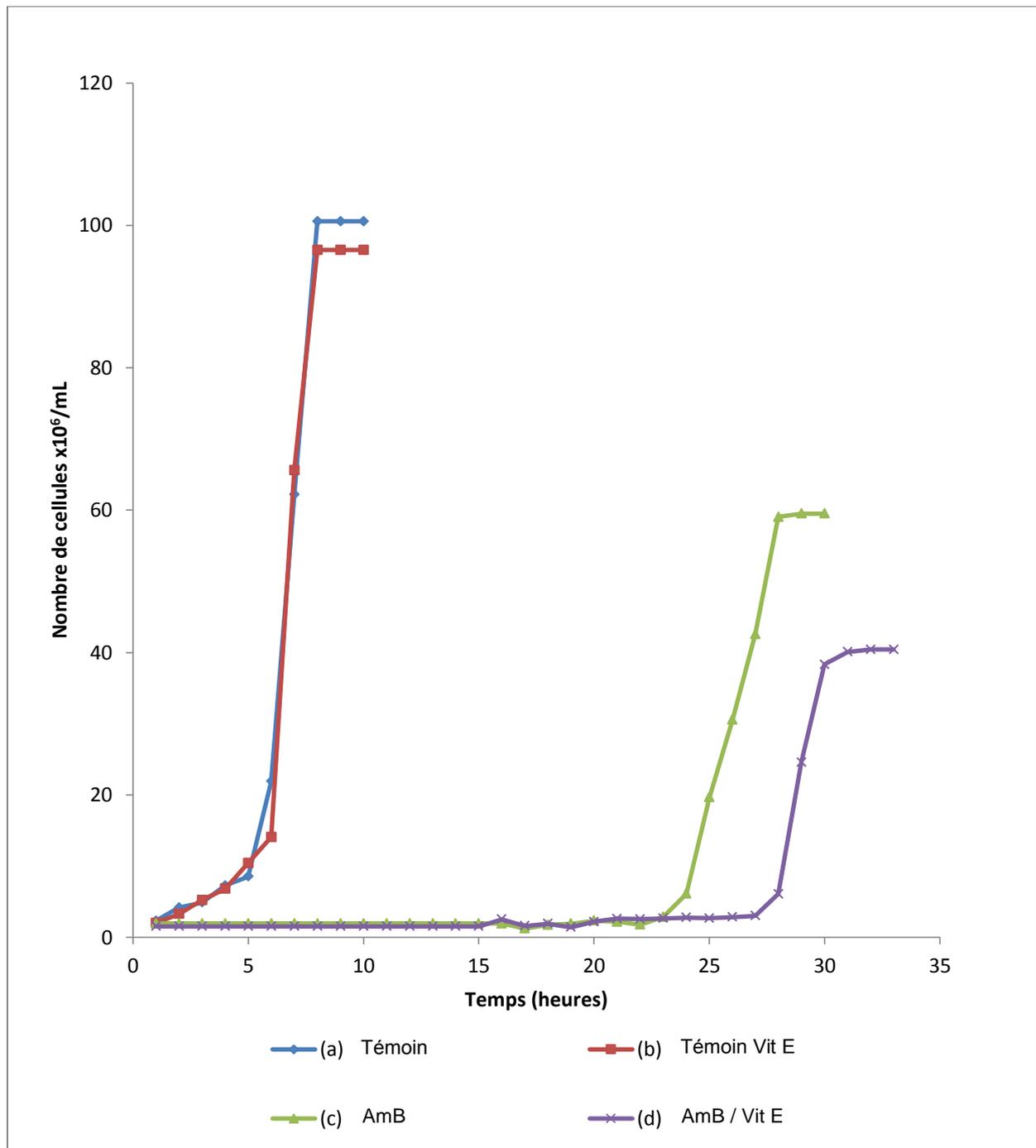


Figure n° 14 : Effet de l'addition de l' $\alpha$  tocophérol (16 $\mu\text{g/mL}$ ) sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B (0,4 $\mu\text{g/mL}$ ) vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

## 2. Observations au microscope électronique à balayage de *Candida albicans* ATCC10231 en l'absence et en présence des complexes AmB/Vit C et AmB/Vit E

### 2.1. En l'absence d'amphotéricine B

La **figure n°15** correspond aux changements morphologiques de *Candida albicans* ATCC10231 incubées en l'absence de l'antifongique (culture témoin).

Nous constatons qu'au cours de la phase de latence (**Figure n°15, microphotographie a**), les levures sont caractérisées par une augmentation de leur taille. En revanche, sur les micrographies prises au cours de la phase exponentielle et de la phase stationnaire, les levures sont regroupées en amas (formes agrégées) (**Figure n°15, microphotographies b et c**).

Par ailleurs, nous avons vérifié la viabilité des cellules de *Candida albicans* par rapport à leur forme morphologique et leur dimension cellulaire pendant la phase stationnaire, par le logiciel Image J version 1.51a (2016).

Les résultats obtenus ont montré qu'au cours la phase stationnaire, en l'absence de toute addition, la moyenne de la taille cellulaire de *Candida albicans* ATCC10231 est de 3,43µm.

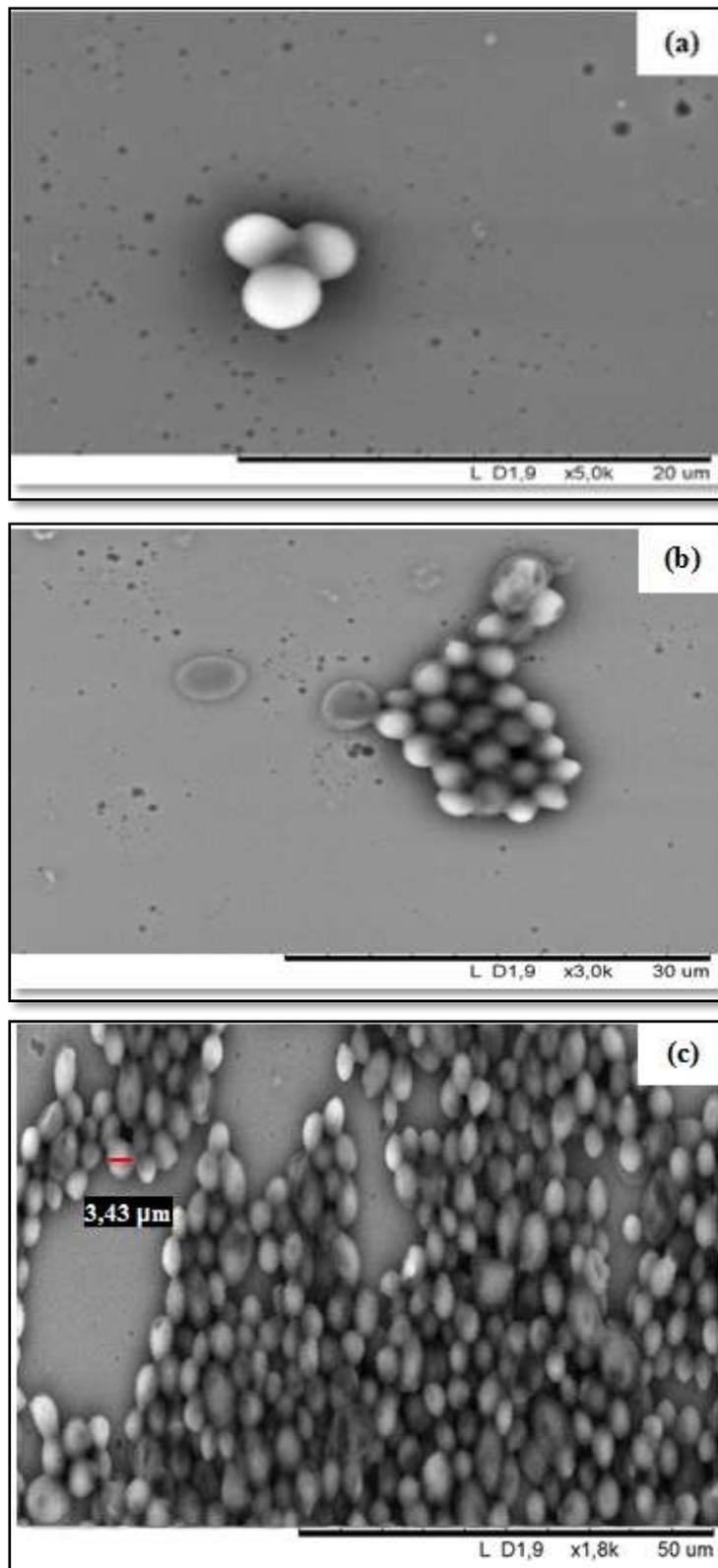


Figure n°15 : Observations au microscope électronique à balayage de *Candida albicans* ATCC10231 au cours de la phase de latence (a), exponentielle (b) et stationnaire (c) sans aucune addition.

## 2.2. Amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (AmB/Vit C)

La **figure n°16** regroupe les microphotographies (a) et (b) relatives aux changements morphologiques de *Candida albicans* ATCC10231, en présence d'amphotéricine B seule (0,4µg/mL) et du complexe AmB/Vit C au cours de la phase stationnaire. La vitamine C est utilisée à une concentration finale de (3.10<sup>2</sup>µg/mL).

Les microphotographies a et b montrent :

- Qu'en présence d'amphotéricine B seule et du complexe AmB/Vit C, la taille des cellules augmente comparée à celle des cultures menées sans aucune addition. En effet, l'analyse de ces résultats par le logiciel Image J a montré que la valeur moyenne de la taille cellulaire de *Candida albicans* ATCC10231 est de 7,60µm en présence d'amphotéricine B seule (**microphotographie a**) et de 8,47µm en présence du complexe AmB/Vit C (**microphotographie b**).
- La présence de débris cellulaires qui correspondent probablement à une lyse des levures de *Candida albicans* ATCC10231. Cet éclatement des levures en présence d'amphotéricine B seule ou du complexe AmB/Vit C pourrait être à l'origine de la diminution de la charge cellulaire observée au cours de la phase stationnaire.

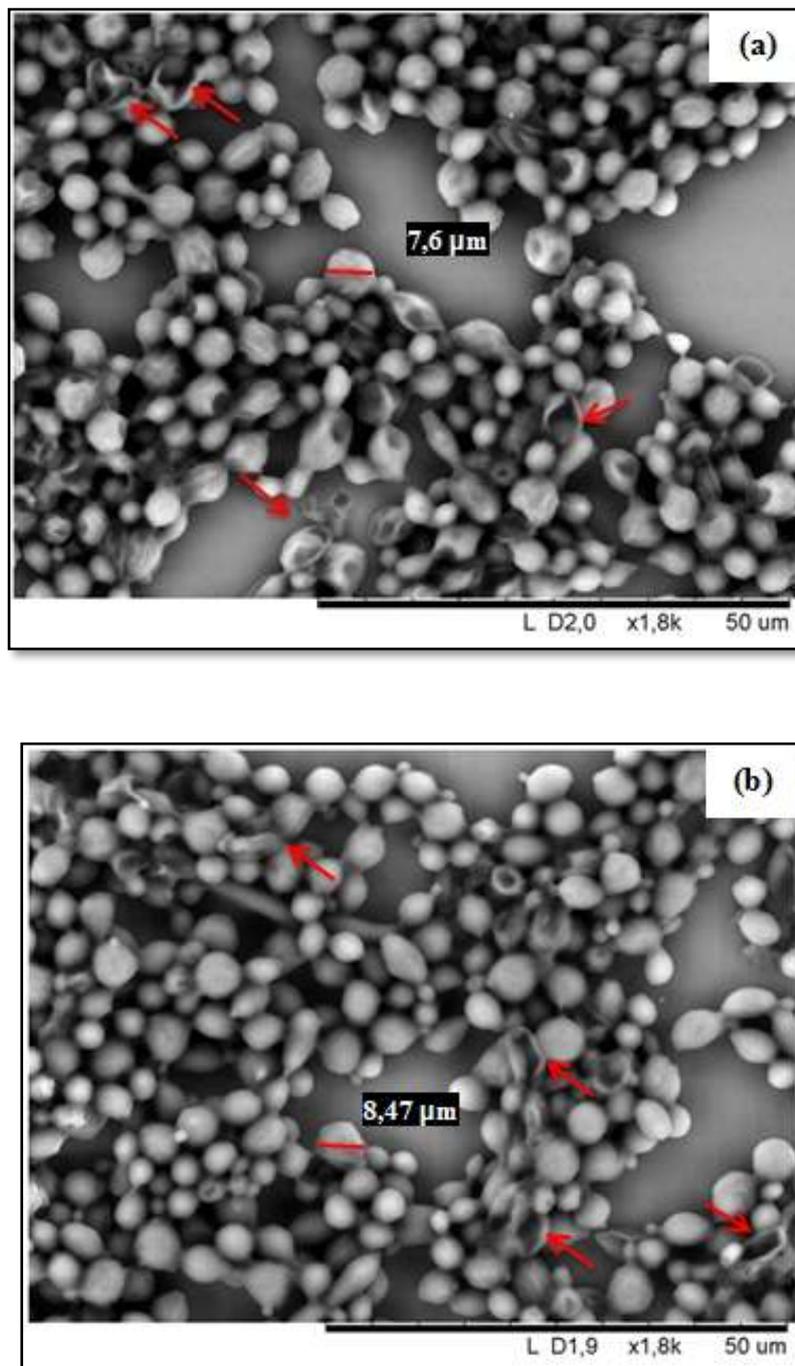


Figure n°16 : Observations au microscope électronique à balayage de *Candida albicans* ATCC10231 au cours de la phase stationnaire en présence d'amphotéricine B seule (0,4µg/mL) (a) et du complexe AmB/Vit C (b).

### 2.3. Amphotéricine B complexée à l'α tocophérol (AmB/Vit E)

La **figure n°17** regroupe les microphotographies (a) et (b) relatives aux changements morphologiques de *Candida albicans* ATCC10231, en présence d'amphotéricine B seule (0,4µg/mL) et du complexe AmB/Vit E au cours de la phase stationnaire. La vitamine E est utilisée à une concentration finale de (16µg/mL).

Les microphotographies a et b montrent que :

- En présence d'amphotéricine B seule et du complexe AmB/Vit E, la taille des cellules augmente comparée à celle des cultures menées sans aucune addition. En effet, l'analyse de ces résultats par le logiciel Image J a montré que la valeur moyenne de la taille cellulaire de *Candida albicans* ATCC10231 est de 7,60µm en présence d'amphotéricine B seule (**microphotographie a**) et de 8,11µm en présence du complexe AmB/Vit E (**microphotographie b**).
- La présence de débris cellulaires qui correspondent probablement à une lyse des levures de *Candida albicans* ATCC10231. Cet éclatement des levures en présence d'amphotéricine B seule ou du complexe AmB/Vit E pourrait être à l'origine de la diminution de la charge cellulaire observée au cours de la phase stationnaire.

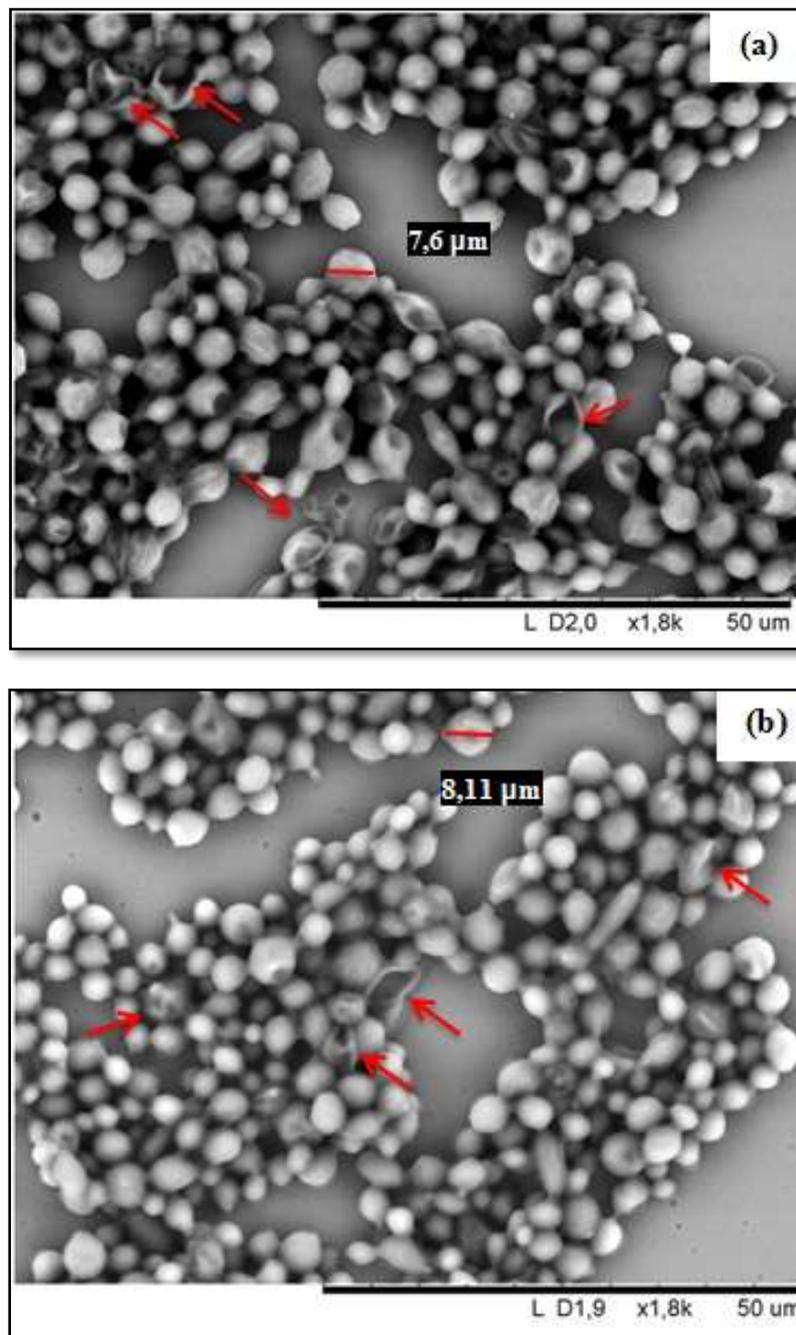


Figure n°17 : Observations au microscope électronique à balayage de *Candida albicans* ATCC10231 au cours de la phase stationnaire en présence d'amphotéricine B seule (0,4µg/mL) (a) et du complexe AmB/Vit E (b).

Il ressort de cette partie de l'étude que :

- L'addition de l'amphotéricine B seule au milieu de culture à une concentration finale de 0,4µg/mL, induit un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 heures à 24 heures avec un taux d'inhibition de 41% par rapport aux cellules témoins incubées sans aucune addition. Ce résultat est en accord avec celui de **Boucherit et al., (2007)** et de **Benmansour et al., (2014)** qui ont montré que *Candida albicans* ATCC10231, incubée en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B rentrent dans une phase de latence de 21 heures avant de reprendre leur croissance avec des taux d'inhibition respectifs de 45% et de 21%.

Rappelons que la phase de latence est une phase importante, dans laquelle les cellules accomplissent leur travail cellulaire avant d'entrer en division (**Koutsoumanis et Sofos, 2005**). De ce fait, les levures soumises à un stress comme l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices d'amphotéricine B, doivent réparer les dommages métaboliques et cellulaires avant d'entamer la division ce qui se traduit par un prolongement de la phase de latence. Selon **Boucherit et al., (2007)**, les levures qui reprennent leur croissance lorsque le temps d'incubation est prolongée au-delà de 24 heures, sont appelées les cellules dormantes

Le phénomène de dormance des levures en présence d'amphotéricine B est encore mal connu et les questions concernant le ressuscitement des cellules dormantes sont à prendre en compte. En effet, le phénomène de dormance pourrait être la conséquence du rétablissement des dommages induits par l'amphotéricine B au niveau de la membrane plasmique des cellules souches hématopoïétiques de souris [(**Essers et al., 2009**); (**Trumpp et al., 2010**)].

- L'addition de l'acide ascorbique et l'α tocophérol au milieu réactionnel de l'amphotéricine B a favorisé l'effet lytique de cette molécule sur les membranes plasmiques des cellules fongiques et a provoqué une diminution de la croissance de *Candida albicans*.

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Benmansour et al., (2014)** qui ont montré que l'amphotéricine B à 0,4µg/mL, agit au niveau des radeaux lipidiques «rafts» qui génèrent à leurs tours une élasticité membranaire pour s'adapter au déséquilibre osmotique créé par cet antifongique.

- La complexation de l'amphotéricine B à la vitamine C ou à la vitamine E, améliore son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 de 11% et de 19% respectivement. Cela est probablement lié au pouvoir antioxydant de ces deux vitamines.

Il est à noter que la complexation de l'amphotéricine B à la vitamine E ( $\alpha$  tocophérol) améliore son efficacité de 8% par rapport à la vitamine C (acide ascorbique). Cela est dû à la nature chimique de la vitamine E, son caractère lipophile et son pouvoir antioxydant qui confèrent au complexe formé une meilleure stabilité (Thomas et al., 2014).

### **3. Evaluation de la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l' $\alpha$ tocophérol (AmB/Vit E) vis-à-vis des globules rouges humains**

Lorsque la membrane plasmique du globule rouge est altérée par l'amphotéricine B, il s'ensuit une lyse qui se traduit par une fuite de l'hémoglobine intracellulaire, c'est pourquoi nous avons dosé le taux d'hémoglobine extracellulaire avant et après addition des vitamines.

L'antifongique et les vitamines sont ajoutés aux milieux réactionnels au même moment que les globules rouges, ce qui correspond au temps zéro des expériences.

#### **3.1. Amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (AmB/Vit C)**

La **figure n°18** représente l'effet de l'addition de l'acide ascorbique ( $3.10^2\mu\text{g/mL}$ ) sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire induite par l'amphotéricine B ( $20\mu\text{g/mL}$ ) chez le globule rouge humain. Nous constatons que :

- Les globules rouges humains incubés en l'absence d'amphotéricine B et d'acide ascorbique, courbe (a) (témoin) ainsi que ceux incubés en présence d'acide ascorbique (vitamine C) seul à une concentration finale de  $3.10^2\mu\text{g/mL}$  (courbe (b)), gardent la totalité de leur hémoglobine intracellulaire durant les 120 minutes d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  sous agitation continue à 130 tours/minute.
- L'addition de  $20\mu\text{g/mL}$  d'amphotéricine B seule aux globules rouges (courbe (c)) induit une fuite de l'hémoglobine intracellulaire qui atteint un taux de 22% après 5 minutes d'incubation et près de 73% après 15 minutes d'incubation. Ce taux atteint un maximum de 85% après 120 minutes d'incubation à  $37^\circ\text{C}$ .

- Les globules rouges incubés en présence du complexe AmB/vitamine C (courbe (d)), perdent près de 20% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux passe à 60% après 15 minutes et atteint un maximum de 68% après 120 minutes d'incubation.

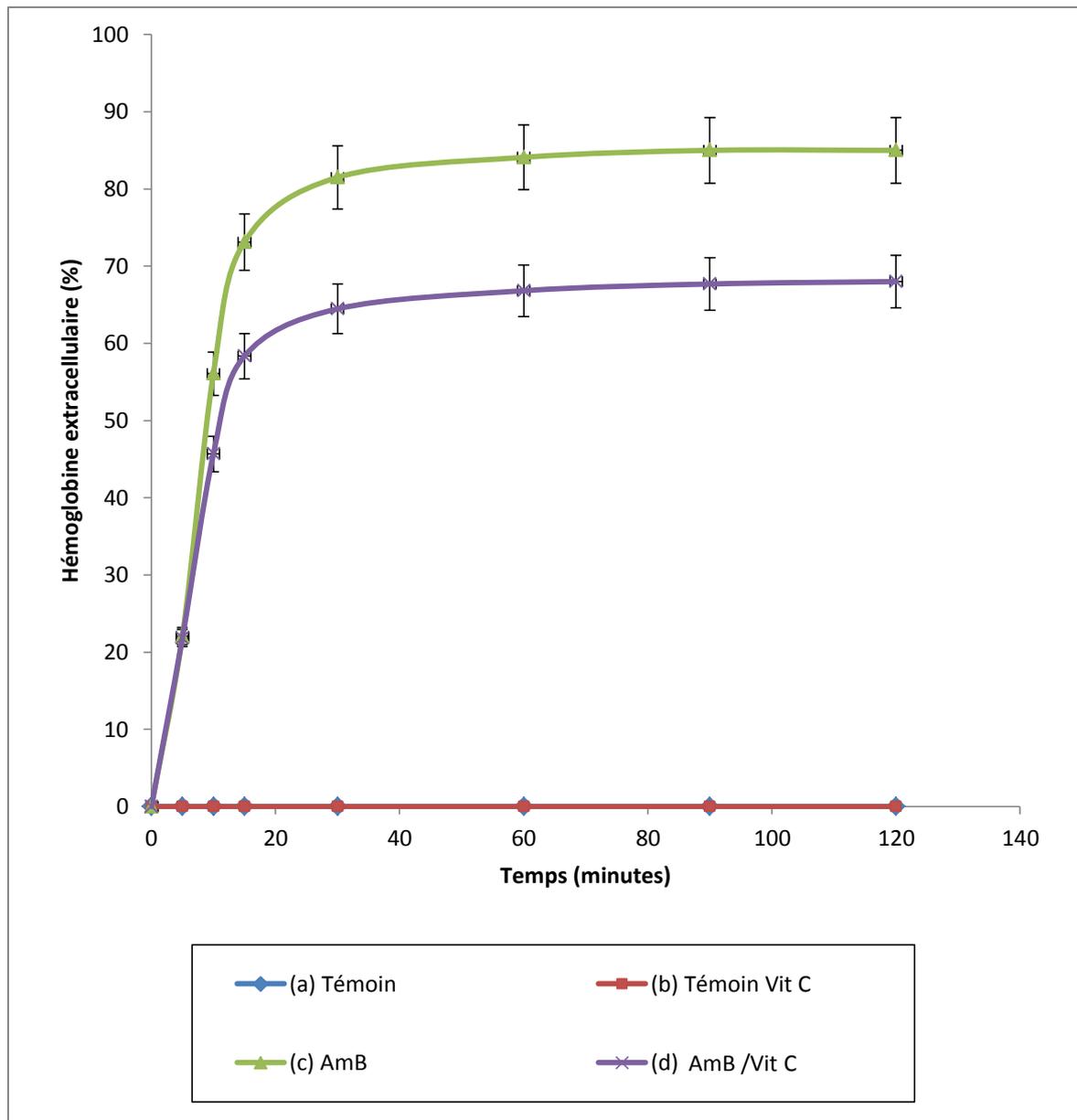


Figure n°18 : Effet de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) sur la toxicité induite par l'amphotéricine B ( $20 \mu\text{g/mL}$ ) vis-à-vis des globules rouges humains.

### 3.2. Amphotéricine B complexée à l'α tocophérol (AmB/Vit E)

La **figure n°19** représente l'effet de l'addition de l'α tocophérol (16µg/mL) sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire induite par l'amphotéricine B (20µg/mL) chez le globule rouge humain. Nous remarquons que :

- Les globules rouges humains incubés en l'absence d'amphotéricine B et de l'α tocophérol, courbe a (témoin) ainsi que ceux incubés en présence de l'α tocophérol (vitamine E) seul à une concentration finale de 16µg/mL (courbe b), gardent la totalité de leur hémoglobine intracellulaire durant les 120 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue à 130 tours/minute.
- L'addition de 20µg/mL d'amphotéricine B seule aux globules rouges (courbe c) induit une fuite de l'hémoglobine intracellulaire qui atteint un taux de 22% après 5 minutes d'incubation et près de 73% après 15 minutes d'incubation. Ce taux atteint un maximum de 85% après 120 minutes d'incubation à 37°C.
- Les globules rouges incubés en présence du complexe AmB/vitamine E (courbe d), perdent près de 19% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux passe à 58% après 15 minutes et atteint un maximum de 65% après 120 minutes d'incubation.

D'après ces résultats, nous remarquons que l'amphotéricine B seule utilisée à une concentration finale de 20µg/mL provoque une fuite massive de l'hémoglobine intracellulaire chez le globule rouge humain qui atteint un maximum de 85% après 60 minutes d'incubation. En revanche, la complexation de cet antifongique à l'acide ascorbique (vitamine C) ( $3.10^2\mu\text{g/mL}$ ) ou à l'α tocophérol (vitamine E) (16µg/mL), réduit la fuite de l'hémoglobine qui atteint un maximum de 68% et 65% respectivement après 60 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue à 130 tours/minute. Ce résultat est en accord avec celui de **Brajtburg et al.,(1985)**, qui ont montré que la catalase et l'acide ascorbique protègent les érythrocytes contre la toxicité de l'amphotéricine B. selon **Ajith et ses collaborateurs, (2007)**, cet effet protecteur serait du au pouvoir antioxydant des vitamines.

De plus, contrairement à l'acide ascorbique (vitamine C), l'α tocophérol (vitamine E) présente une meilleure protection des globules rouges humains contre l'effet toxique induit par l'amphotéricine B. cela peut être expliqué par le caractère lipophile de la

vitamine E qui augmente la solubilité de certains médicaments hydrophobes (Nielsen et al., 2001).

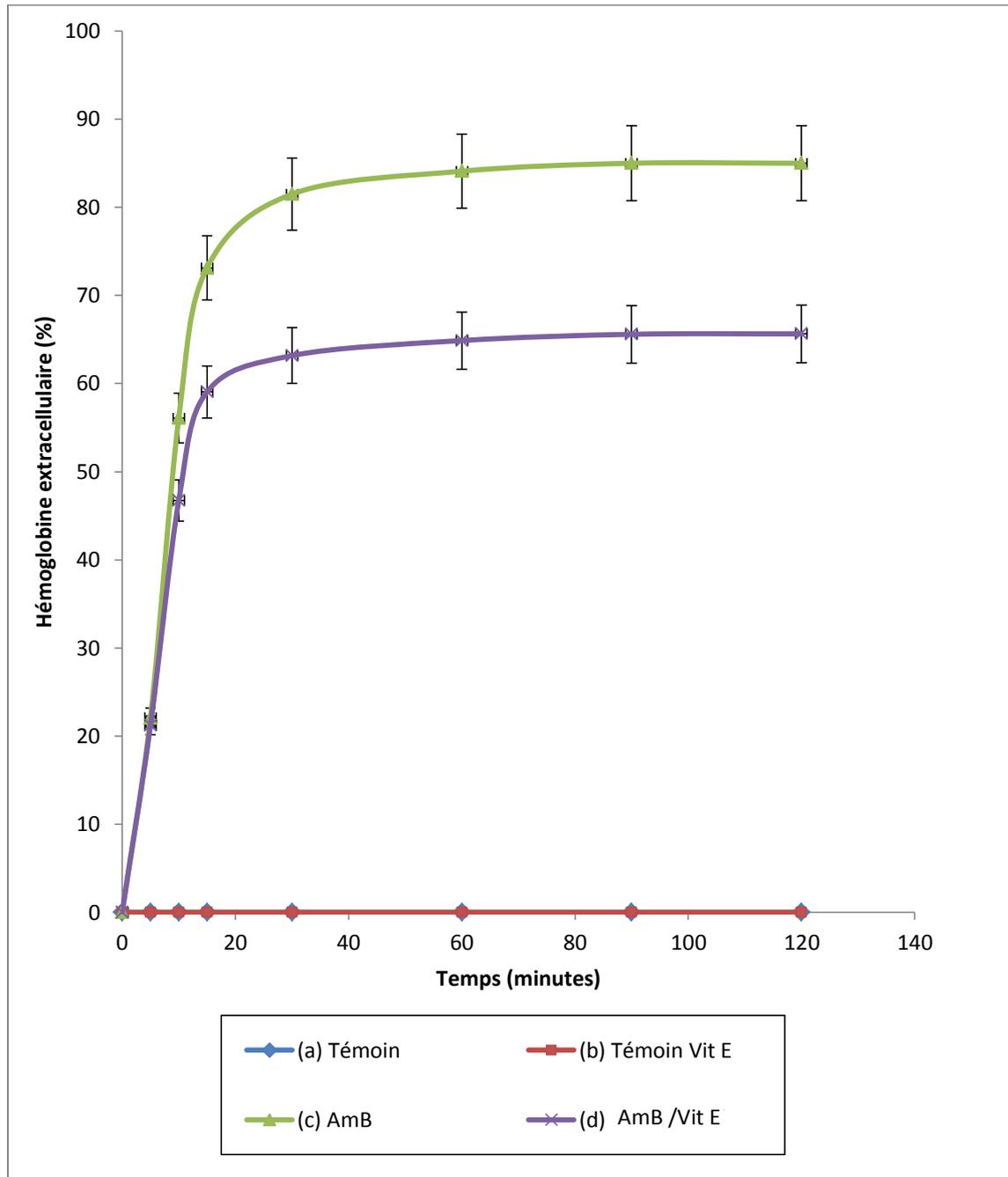


Figure n°19 : Effet de l'α tocophérol (16µg/mL) sur la toxicité induite par l'amphotéricine B (20µg/mL) chez les globules rouges humains.

#### **4. Etude spectrale de la forme monomérique de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique (AmB/Vit C) et de l'α tocophérol (AmB/Vit E)**

Les résultats relatifs à l'étude spectrale de l'amphotéricine B seule et complexée à l'acide ascorbique en fonction du temps sont représentés sur la **figure n°20**.

Nous remarquons que :

- Quelle que soit la forme de l'amphotéricine B utilisée, seule ou complexée à la vitamine C, le pic caractéristique de sa forme monomérique ne subit aucun changement et apparaît à 408nm.
- Après 18 et 24 heures d'incubation à 37°C, l'intensité du pic d'absorbance obtenue à 408nm pour l'amphotéricine B complexée à la vitamine C est légèrement supérieure à celui de l'amphotéricine B seule. En effet, la complexation de cet antifongique à la vitamine C induit une légère augmentation de l'intensité des pics d'absorbances qui passent de 0,47 pour l'amphotéricine B seule à 0,5 pour le complexe AmB/Vit C.

La **figure n°21** représente les résultats de l'étude spectrale de l'amphotéricine B seule et complexée à l'α tocophérol en fonction du temps.

Nous constatons que :

- Le pic caractéristique des formes monomériques de l'amphotéricine B apparaît à 408nm pour l'antifongique seul et complexé à la vitamine E.
- L'intensité des pics d'absorbances obtenues à 408nm pour le complexe AmB/Vit E est nettement supérieure à celle de l'amphotéricine B seule. Cette variation diminue au cours du temps. En effet, en présence de la vitamine E, l'intensité des absorbances des pics passe de 0,5 à 0,71 et de 0,49 à 0,6 après 1 heure et 18 heures d'incubation à 37°C.
- Après 24 et 36 heures d'incubation les intensités des pics de l'amphotéricine B seule et du complexe AmB/Vit E redeviennent identiques.

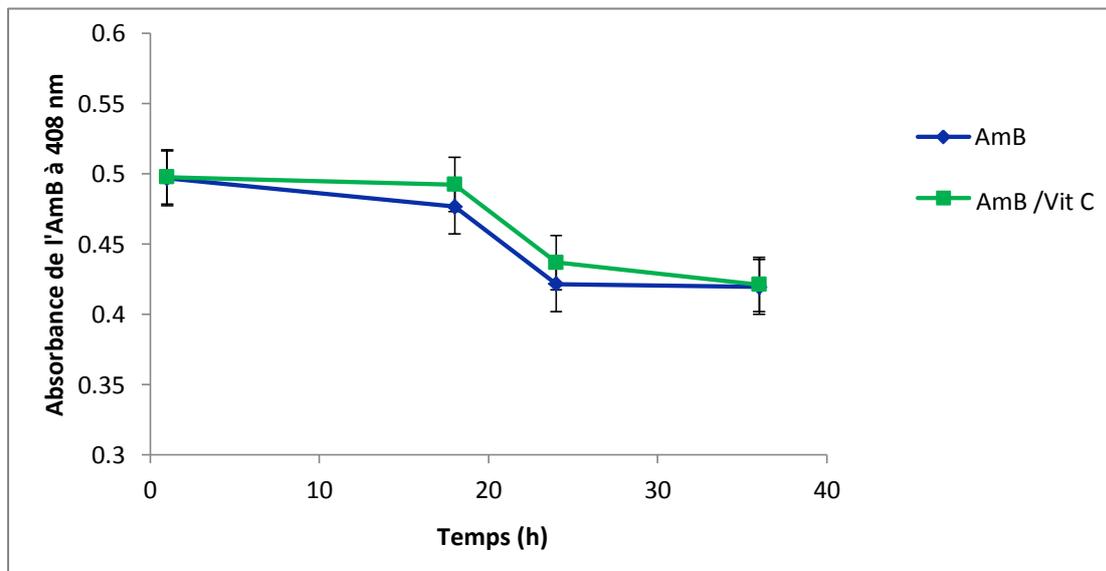
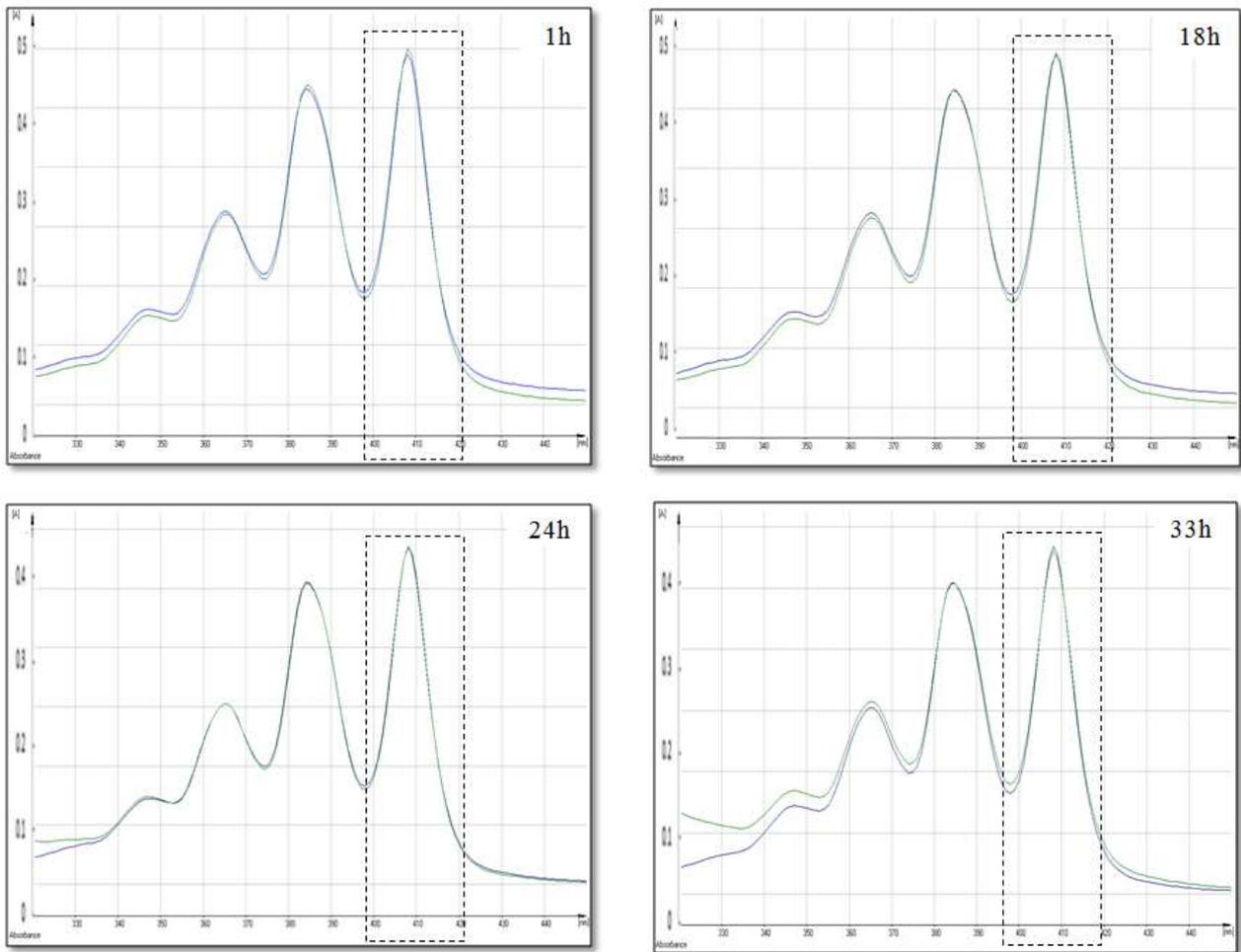


Figure n°20 : Spectres caractéristiques de la forme monomérique de l'amphotéricine B ( $10^{-5}$ mg/mL) à 408nm en présence de l'acide ascorbique ( $3 \cdot 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) en fonction de temps.

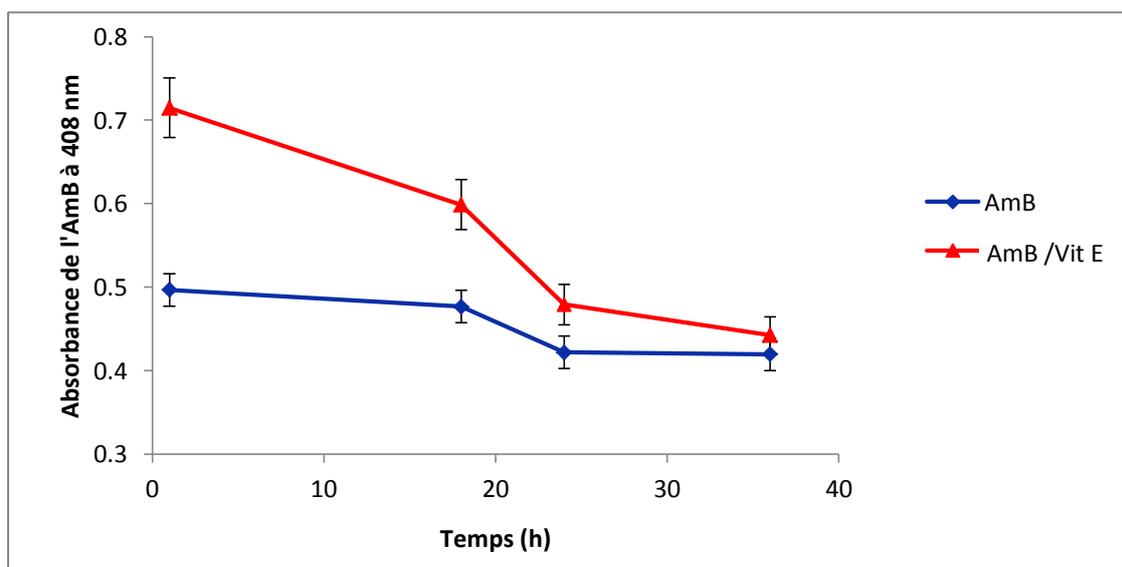
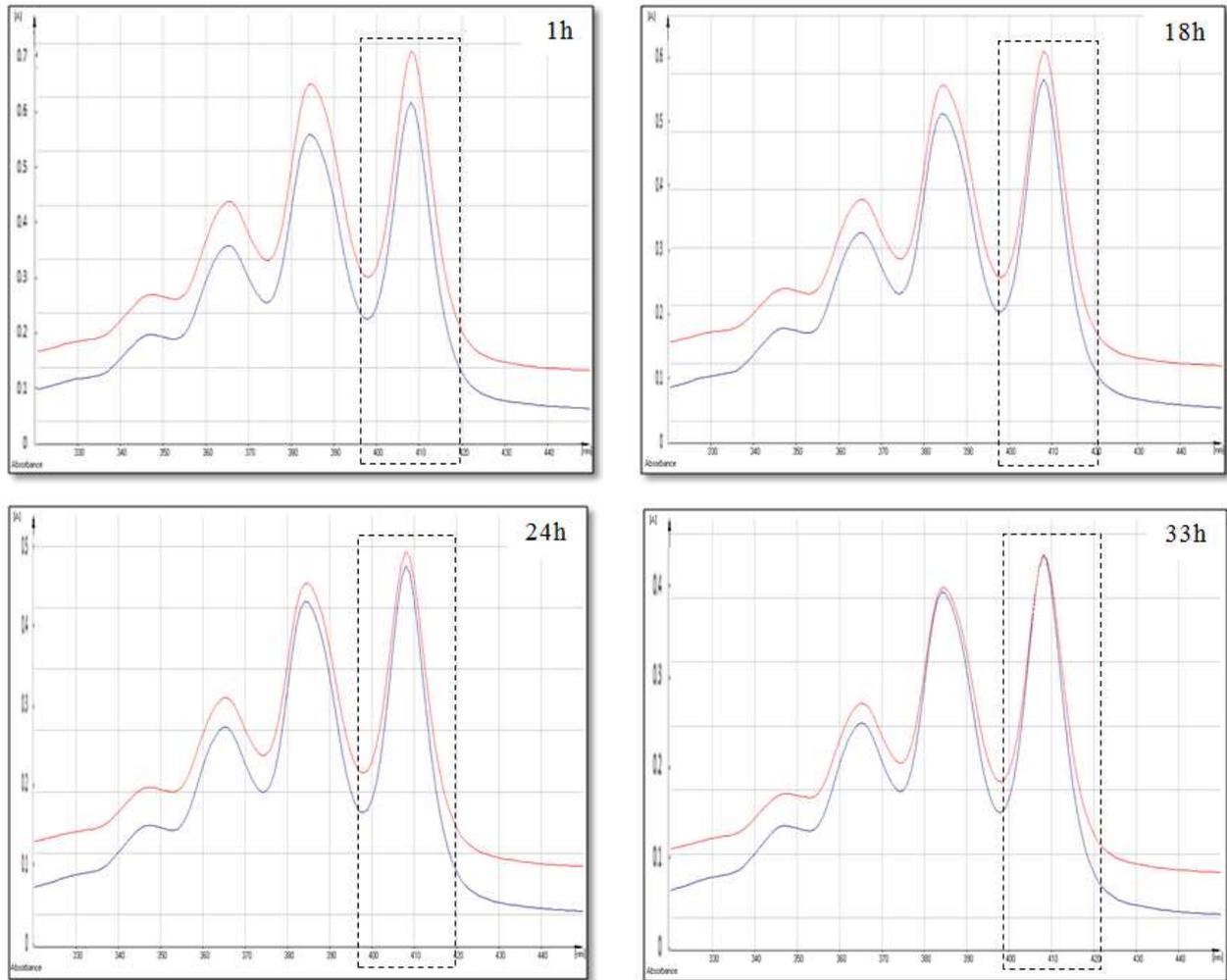


Figure n°21 : Spectres caractéristiques de la forme monomérique de l'amphotéricine B ( $10^{-5}$ mg/mL) à 408nm en présence de l' $\alpha$  tocophérol ( $16\mu\text{g/mL}$ ) en fonction de temps.

Les résultats de l'analyse spectrale de l'amphotéricine B seule et complexée à l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol ont montré que l'addition des deux vitamines à des concentrations finales respectives de  $3.10^2 \mu\text{g/mL}$  et  $16 \mu\text{g/mL}$  au milieu réactionnel ne modifie pas la stabilité moléculaire et la valeur du pic caractéristique de la forme monomérique de cet antifongique qui reste fixe à 408nm. En revanche, les deux vitamines, génèrent un effet hyperchrome qui est meilleure pour la vitamine E.

Selon **Biémont (2010)**, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution dépendent de différents critères tels que la nature du solvant et la température. De ce fait, les changements observés traduisent des interactions physiques soluté-solvant qui modifient la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité. C'est pourquoi, l'effet hyperchrome que nous avons observé peut renseigner sur la taille de la molécule de l'amphotéricine B et sa capacité à former un complexe moléculaire avec l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol. Cet effet traduit également une augmentation de la concentration des formes monomériques de l'amphotéricine B responsable de son activité antifongique.

Par ailleurs, nous remarquons que l'effet lié à l'addition de ces vitamines au milieu réactionnel de l'amphotéricine B persiste généralement au-delà de 24 heures. Ce résultat peut expliquer l'amélioration de l'efficacité de l'amphotéricine B complexée à la vitamine E vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Nielsen et ses collaborateurs, (2001)**, qui ont révélé que l'addition de l' $\alpha$  tocophérol à des solutions micellaires mixtes augmente leur solubilisation.

## 5. Analyse statistique

Les résultats que nous avons obtenus sont traités par un test non paramétrique permettant de comparer deux échantillons indépendants (Mann-Whitney) et un test de corrélation de Spearman.

Le choix de ces tests est justifié par le fait que la variable dont provient l'échantillon ne suit pas une loi Normale ( $p < 0,05$ ).

La comparaison entre l'efficacité de l'amphotéricine B seule et complexée à l'acide ascorbique ou à l' $\alpha$  tocophérol vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 a été étudiée par le test de Mann-Whitney.

L'activité antifongique de l'amphotéricine B seule diffère de façon significative par rapport aux formes complexées (AmB/Vit C et AmB/Vit E) ( $p_{(AmB/Vit C)} = 0,0368 / p_{(AmB/Vit E)} = 0,0237$ ) ( $p < 0,05$ ). En revanche, la comparaison entre l'efficacité des deux complexes de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231, montre une différence non significative avec une valeur de  $p = 0,0589$  ( $p > 0,05$ ).

De plus, les résultats du test de Mann-Whitney relatifs à l'étude spectrale de la forme monomérique de l'amphotéricine B seule et complexée à l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol ont révélé que l'addition de l'acide ascorbique ( $p = 0,4189$ ), présente un effet non significatif sur la stabilité de la molécule de l'amphotéricine B contrairement à l' $\alpha$  tocophérol ou nous remarquons un effet hautement significatif ( $p = 0,0002$ ).

Par ailleurs, en comparant l'effet des complexes AmB/Vit C et AmB/Vit E sur la stabilité de cet antifongique, nous constatons un effet hautement significatif en présence de la vitamine E ( $p < 0,0001$ ).

Nous avons également comparé entre l'efficacité et la stabilité de l'amphotéricine B en l'absence et en présence d'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol en réalisant des corrélations par le test de Spearman. Les résultats de ce test ont montré que quelle que soit la vitamine utilisée, une corrélation positive avec une valeur de  $p$  inférieure au seuil de signification ( $p < 0,0001$ ) et un coefficient de corrélation supérieur à 0,7 sont obtenus.

L'analyse statistique nous a permis de confirmer les résultats que nous avons obtenus lors de la première partie de cette étude et qui ont mis en évidence le rôle de la vitamine E dans l'amélioration de l'index thérapeutique et la stabilité de l'amphotéricine B par rapport à la vitamine C.

## **6. Evaluation de l'effet de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ tocophérol sur l'activité peroxydative de l'amphotéricine B**

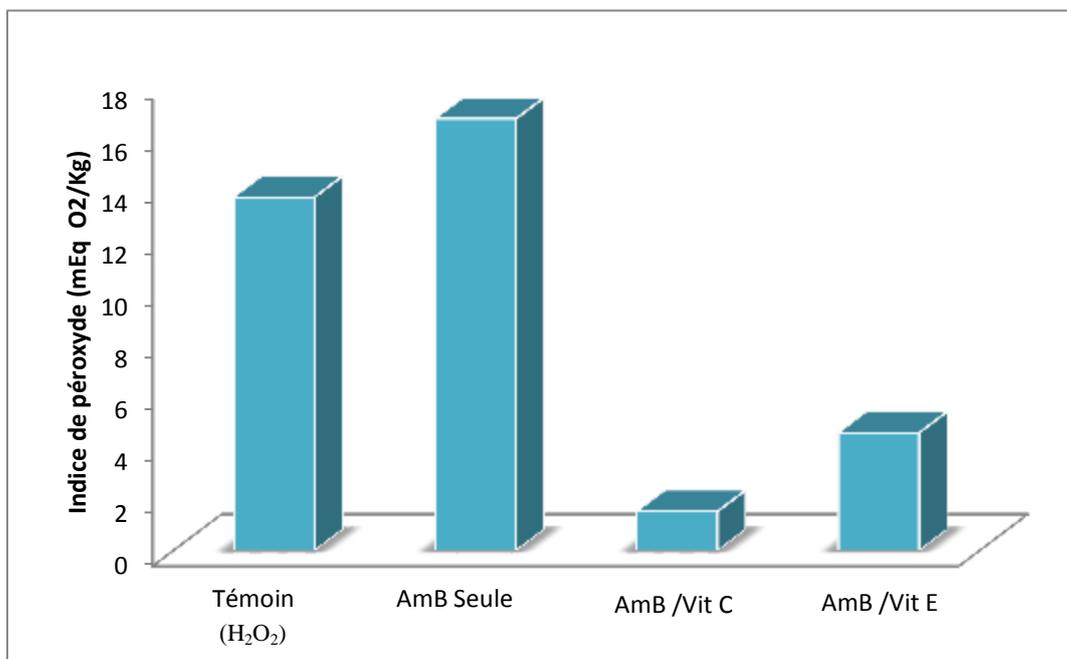
### **6.1. Dosage des hydroperoxydes**

La **figure n°22** regroupe les résultats relatifs à l'indice de peroxyde de d'amphotéricine B dans le milieu réactionnel en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol.

Nous remarquons que l'amphotéricine B utilisée à une concentration finale de 20 $\mu$ g/mL en l'absence de vitamines, induit la formation d'hydroperoxydes,

représentée par un indice de peroxyde égal à 16,66mEq O<sub>2</sub>/Kg. En revanche, l'utilisation de l'amphotéricine B complexée à l'acide ascorbique (3.10<sup>2</sup>µg/mL) ou à l'α tocophérol (16µg/mL), induit une diminution des hydroperoxydes. Les indices de peroxyde sont de 1,51mEq O<sub>2</sub>/Kg pour le complexe AmB/Vit C et de 4,54mEq O<sub>2</sub>/Kg pour le complexe AmB/Vit E.

Il est important de signaler que l'indice de peroxyde permet d'évaluer le degré d'oxydation des acides gras insaturés dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et l'α tocophérol au cours de la phase initiale. Les produits formés représentés par des peroxydes sont des composés aldéhydiques volatils qui peuvent être reliés à un autre indice qui prend en compte les composés aldéhydiques non volatils.



**Figure n°22: Effet de l'addition de l'acide ascorbique et de l'α tocophérol dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B sur la formation des hydroperoxydes.**

## 6.2. Dosage des diènes conjugués

La **figure n°23** représente l'effet de l'addition de l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B sur l'absorbance des diènes conjugués en fonction du temps.

Nous observons que l'absorbance des diènes conjugués dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol augmente au cours du temps puis se stabilise au bout de 50 minutes. La valeur de l'absorbance enregistrée après 60 minutes représente l'absorbance spécifique ( $A_s$ ) pour chaque échantillon. Cette valeur permet de mesurer les concentrations des diènes conjugués formés dans le milieu réactionnel.

Les résultats relatifs à l'évaluation de la concentration des diènes conjugués formés dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B sous l'effet de l'addition de l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol sont représentés sur la **figure n°24**.

Nous remarquons que l'amphotéricine B sans aucune addition induit la formation de diènes conjugués à une concentration égale à  $2,491 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ .

La complexation de cet antifongique à l'acide ascorbique ou à l' $\alpha$  tocophérol provoque une diminution du taux de diènes conjugués avec des concentrations de  $2,325 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$  pour le complexe AmB/Vit C et de  $0,957 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$  pour le complexe AmB/Vit E. Ce résultat met en évidence l'intérêt de l'addition de l' $\alpha$  tocophérol et son effet sur l'inhibition de la formation des diènes conjugués dans le milieu réactionnel en présence d'amphotéricine B.

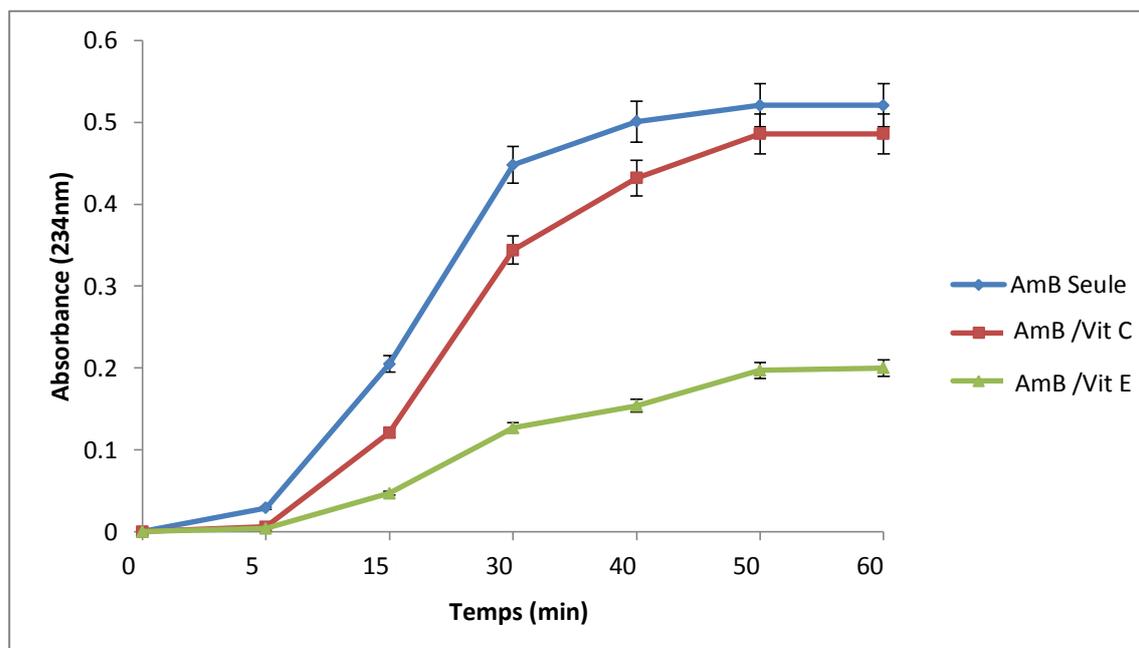


Figure n°23 : Effet de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol sur l'absorbance des diènes conjugués dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B.

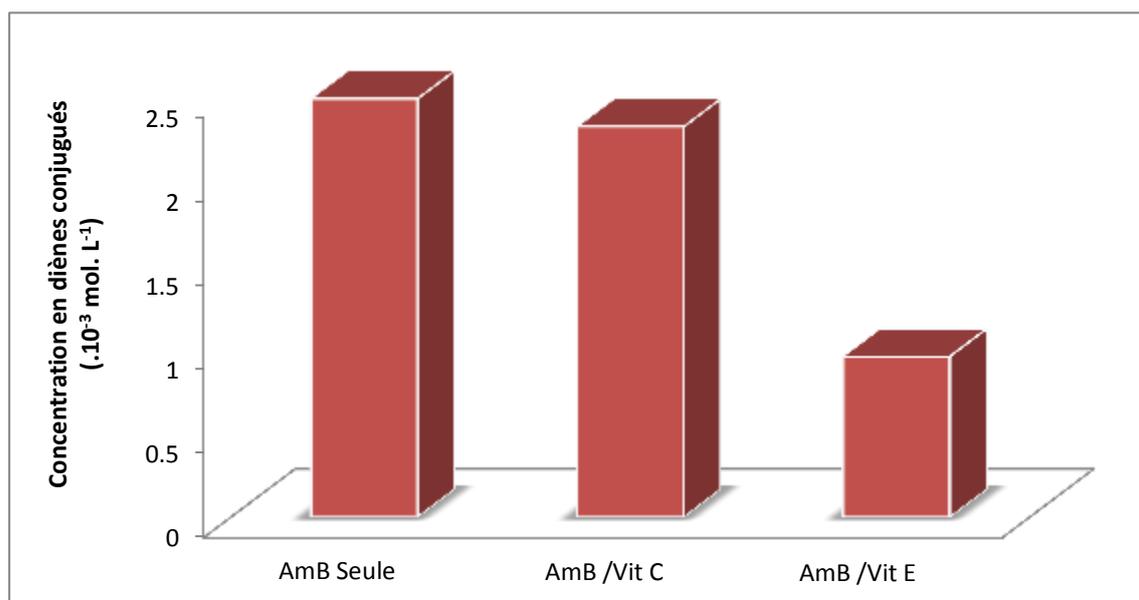


Figure n°24 : Concentrations des diènes conjugués formés dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol.

A l'issue de cette partie de notre étude, nous pouvons dire que l'amphotéricine B favorise la formation des espèces réactives d'oxygène telles que les hydroperoxydes et les diènes conjugués. Ces derniers représentent les produits primaires de la peroxydation lipidique, formés dans l'étape de propagation et sont impliqués dans la dégradation auto-oxydative de la molécule d'amphotéricine B, ainsi que dans son activité peroxydative au niveau des membranes cellulaires, ce qui explique sa cytotoxicité vis-à-vis des cellules animales (**Gaboriau et al., 1997**).

L'addition des molécules antioxydantes au milieu réactionnel de l'amphotéricine B que nous proposons semble être une approche efficace. En effet, ces molécules antioxydantes peuvent limiter la propagation de la réaction d'oxydation des lipides permettant ainsi une meilleure stabilité de l'amphotéricine B contre son auto-dégradation afin de prolonger son efficacité vis-à-vis des levures et des fungi.

Nos résultats montrent également que la complexation de cet antifongique à l'acide ascorbique et à l' $\alpha$  tocophérol lui confère un effet protecteur contre les dommages auto-oxydatifs. Cet effet protecteur se traduit par une diminution des taux d'hydroperoxydes et de diènes conjugués. Ce résultat va dans le même sens que celui de **Lamp-freund et al., (1985)** ainsi que celui de **Belenky et Collins, (2011)**.

Il est à noter que pour les produits instables tels que les hydroperoxydes et les diènes conjugués, ces mesures ne permettent pas de déterminer le niveau d'oxydation des lipides car ces produits intermédiaires sont rapidement décomposés en produits secondaires (**Eymard et Genot, 2003**). De ce fait, il nous a semblé nécessaire de quantifier les produits secondaires de l'oxydation des lipides, composés plus stables, qui permettent une estimation plus précise du degré d'oxydation des lipides.

### **6.3. Mesure des produits secondaires: dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (sr-TBA)**

Les produits secondaires de l'oxydation des lipides résultent de la décomposition des produits primaires. Les plus dosés sont les aldéhydes représentés essentiellement par le dialdéhyde malonique (MDA) qui est connu comme étant un biomarqueur de la peroxydation lipidique.

La **figure n°25** représente la courbe d'étalonnage réalisée à partir de la solution de 1,1,3,3-tetraethoxypropane (0 - 0,25mM), qui se décompose en malonaldéhyde dans l'eau.

D'après les résultats de l'absorbance mesurée à une longueur d'onde de 532nm, nous avons obtenu une courbe de tendance de type polynomial d'ordre 2 avec l'équation suivante :

$$y = -30,46x^2 + 11,99x + 0,097.$$

La teneur en substances réactives au TBA est mesurée par une lecture de l'absorbance à 532nm au spectrophotomètre.

La **figure n°26** représente la concentration en malonaldéhyde dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol en fonction des valeurs de l'absorbance mesurées.

Les résultats obtenus montrent que l'amphotéricine B présente une capacité de former le dialdéhyde malonique estimé à 0,035mM. Cette concentration diminue pour les formes complexées, elle est estimée à 0,015mM pour le complexe AmB/Vit C et à 0,028mM pour le complexe AmB/Vit E.

Ce résultat confirme les résultats précédents qui ont mis en évidence le rôle protecteur des vitamines contre les réactions d'auto-oxydation de l'amphotéricine B qui se traduisent par la formation des produits secondaires représentés essentiellement par le dialdéhyde malonique (MDA).

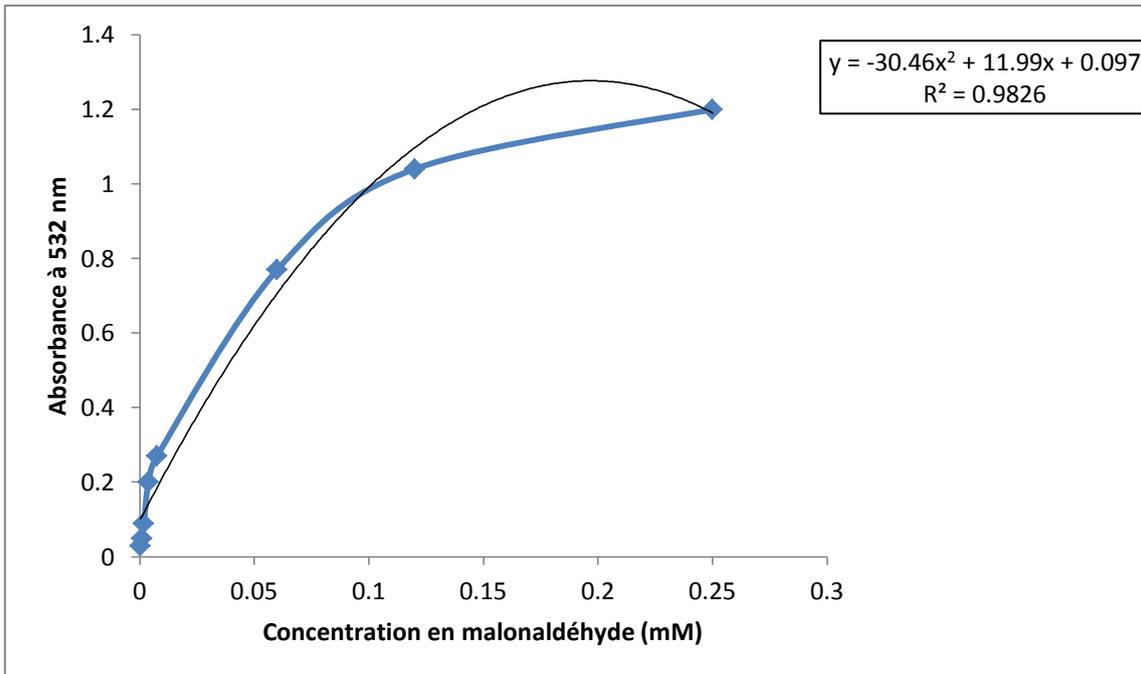


Figure n°25: Courbe d'étalonnage pour la détermination de la concentration de dialdéhyde malonique (MDA).

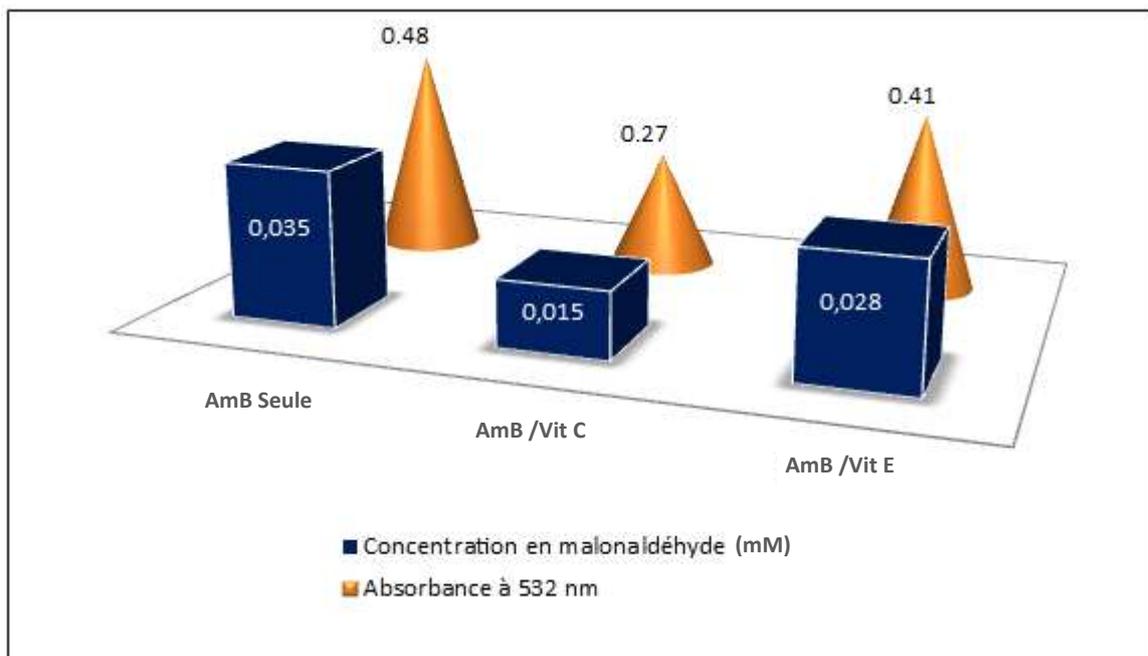


Figure n°26 : Concentrations en malonaldéhyde dans le milieu réactionnel d'amphotéricine B en l'absence et en présence de l'acide ascorbique et de l'α tocophérol.

Les résultats de cette partie ont montré que l'amphotéricine B favorise la réaction d'oxydation des lipides par la formation des espèces réactives d'oxygène quel que soit ces produits ; primaires ou secondaires.

Selon **Sokol-Anderson et al., (1986)** ainsi que **Brajtburg et al., (1985)**, l'effet toxique de l'amphotéricine B sur les sphéropastes de *Candida albicans* et les globules rouges est lié principalement à la formation de radicaux libres d'O<sub>2</sub> responsables des peroxydations lipidiques qui conduisent à la lyse cellulaire.

La complexation de l'amphotéricine B à des molécules antioxydantes permet de limiter les réactions d'oxydation des lipides et protéger cet antifongique contre les attaques radicalaires. Cet effet protecteur a été mis en évidence par une inhibition importante d'un marqueur précoce de la peroxydation lipidique (hydroperoxydes et diènes conjugués) et de produits terminaux (acide thiobarbiturique (sr-TBA)). Ces résultats sont en accord avec ceux de **Kovacic et Cooksy, (2012)**.

***Quatrième partie:***  
***Conclusion générale***

L'objectif que nous nous sommes fixés pour cette étude consiste à :

- Evaluer l'effet de la complexation de l'amphotéricine B à deux vitamines, l'acide ascorbique (vitamine C) et de l' $\alpha$  tocophérol (vitamine E) sur la modulation de sa toxicité sélective vis -à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 et des globules rouges humains.
- Etudier l'intérêt de cette complexation sur la stabilité moléculaire et l'activité peroxydative de cet antifongique.

Il ressort de cette étude que :

- L'addition de l'amphotéricine B seule au milieu de culture à une concentration finale de 0,4 $\mu$ g/mL, induit un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 heures à 24 heures avec un taux d'inhibition de 41% par rapport aux cellules témoins incubées sans aucune addition. Les levures qui reprennent leur croissance lorsque le temps d'incubation est prolongée au-delà de 24 heures, sont appelées les cellules dormantes.

Le phénomène de dormance des levures en présence d'amphotéricine B est encore mal connu et les questions concernant le ressuscitemment des cellules dormantes sont à prendre en compte. En effet, le phénomène de dormance pourrait être la conséquence du rétablissement des dommages induits par l'amphotéricine B au niveau de la membrane plasmique des cellules souches hématopoïétiques de souris [(Essers et al., 2009); (Trumpp et al., 2010)].

- La complexation de l'amphotéricine B à la vitamine C ou à la vitamine E, améliore son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 de 11% et de 19% respectivement. Cela est probablement lié au pouvoir antioxydant de ces deux vitamines. En effet, la complexation de l'amphotéricine B à la vitamine E ( $\alpha$  tocophérol) améliore son efficacité de 8% par rapport à la vitamine C (acide ascorbique).
- La complexation de l'amphotéricine B à l'acide ascorbique et à l' $\alpha$  tocophérol à des concentrations finales de 3.10<sup>2</sup> $\mu$ g/mL et 16 $\mu$ g/mL respectivement, protège les globules rouges humains contre la cytotoxicité induite par cet antifongique seul. Cette amélioration est de 17% pour la vitamine C et de 20% pour la vitamine E.

- L'analyse spectrale de l'amphotéricine B seule et complexée à l'acide ascorbique et l' $\alpha$  tocophérol a montré que l'addition des deux vitamines à des concentrations finales respectives de  $3.10^2 \mu\text{g/mL}$  et  $16 \mu\text{g/mL}$  au milieu réactionnel ne modifie pas la stabilité moléculaire et la valeur du pic caractéristique de la forme monomérique de cet antifongique qui reste fixe à 408nm. En revanche, les deux vitamines, génèrent un effet hyperchrome qui est meilleur pour la vitamine E. Cet effet se traduit par une augmentation de la concentration des formes monomériques de l'amphotéricine B responsable de son activité antifongique.

- L'amphotéricine B favorise la formation des espèces réactives d'oxygène telles que les hydroperoxydes et les diènes conjugués qui représentent les produits primaires de la peroxydation lipidique, formés dans l'étape de propagation et sont impliqués dans la dégradation auto-oxydative de cet antifongique.

- La complexation de cet antifongique à l'acide ascorbique et à l' $\alpha$  tocophérol lui confère un effet protecteur contre les dommages auto-oxydatifs. Cet effet se traduit par une diminution des taux d'hydroperoxydes et des diènes conjugués.

- L'amphotéricine B présente également une capacité à former les dialdéhydes maloniques estimés à 0,035mM. Cette concentration diminue pour les formes complexées, elle est estimée à 0,015mM pour le complexe AmB/Vit C et à 0,028mM pour le complexe AmB/Vit E.

- L'effet inhibiteur de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$  tocophérol sur la formation des produits primaires de la peroxydation lipidique (hydroperoxydes et diènes conjugués) et des produits terminaux (substances réactives à l'acide thiobarbiturique "sr-TBA") dans le milieu réactionnel de l'amphotéricine B, présente des conséquences directes sur la propagation des réactions d'auto-oxydation et sur l'activité antifongique de cette molécule.

Cette stratégie pourrait apporter une réponse aux problèmes de solubilité, de stabilité et de toxicité couramment rencontrés en chimiothérapie. De plus, il est possible de concevoir des schémas thérapeutiques à plus faible dose qui fournissent des niveaux de toxicité plus tolérables avec une meilleure efficacité.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Approfondir les études spectrales de nos formulations par la modulation de l'environnement physico-chimique.
- Tester l'activité biologique de nos formulations *in vivo*.
- Elargir cette étude à d'autres antioxydants et d'autres souches de levures.
- Réaliser des études comparatives avec d'autres molécules antifongiques.

***Cinquième partie:***  
***Références bibliographiques***

- Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Prasad, S., et Kannappan, R. (2010).** Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical pharmacology*, 80(11), 1613-1631.
- Alvarez, C., Shin, D. H., et Kwon, G. S. (2016).** Reformulation of fungizone by PEG-DSPE micelles: deaggregation and detoxification of amphotericin B. *Pharmaceutical research*, 33(9), 2098-2106.
- Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., Tuttle, M. D., . . . Wang, S. (2014).** Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology*, 10(5), 400-406.
- Andrade, J. C., Morais-Braga, M. F. B., Guedes, G. M., Tintino, S. R., Freitas, M. A., Menezes, I. R., et Coutinho, H. D. (2014).** Enhancement of the antibiotic activity of aminoglycosides by alpha-tocopherol and other cholesterol derivatives. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 68(8), 1065-1069.
- Andrews, F. A., Beggs, W. H., et Sarosi, G. A. (1977).** Influence of antioxidants on the bioactivity of amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 11(4), 615-618.
- Atmaca, S., et Çiçek, R. (1996).** Effects of ascorbic acid on amphotericin B and nystatine activities against *Candida albicans*. *Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter*, 15(1), 6-8.
- Baran, R., et Thomas, L. (2009).** Combination of fluconazole and alpha-tocopherol in the treatment of yellow nail syndrome. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 8(3), 276-278.
- Barriuso, B., Astiasarán, I., et Ansorena, D. (2013).** A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology*, 236(1), 1-15.
- Barwicz, J., Gruda, I., et Tancredi, P. (2000).** A kinetic study of the oxidation effects of amphotericin B on human low-density lipoproteins. *FEBS letters*, 465(1), 83-86.
- Beggs, W. H., Andrews, F. A., et Sarosi, G. A. (1978).** Synergistic action of amphotericin B and antioxidants against certain opportunistic yeast pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 13(2), 266-270.
- Belenky, P., et Collins, J. J. (2011).** Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*, 334(6058), 915-916.

- Benbella, I., Aich, F., Elkhiyat, M., Khalki, H., Khermach, A., Bergui, I., . . . Hassani, M. A. H. (2016).** La leishmaniose viscérale chez l'adulte à propos de douze cas. *Pan African Medical Journal*, 23(1).
- Benmansour, W., Boucherit-Otmani, Z., et Boucherit, K. (2014).** [Dormancy of *Candida albicans* ATCC10231 in the presence of amphotericin B. Investigation using the scanning electron microscope (SEM)]. *J Mycol Med*, 24(3), e93-100. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.02.007>
- Biémont, É. (2008).** *Spectroscopie moléculaire: Structures moléculaires et analyse spectrale*. De Boeck Supérieur.
- Boucherit, Z., Seksek, O., et Bolard, J. (2007).** Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. *Medical mycology*, 45(6), 525-533.
- Brajtburg, J., Elberg, S., Kobayashi, G. S., et Medoff, G. (1989).** Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 24(3), 333-337.
- Brajtburg, J., Elberg, S., Schwartz, D., Vertut-Croquin, A., Schlessinger, D., Kobayashi, G., et Medoff, G. (1985).** Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 27(2), 172-176.
- Brewer, M. (2011).** Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.
- Cirlini, M., Caligiani, A., Palla, G., De Ascentiis, A., et Tortini, P. (2012).** Stability studies of ozonized sunflower oil and enriched cosmetics with a dedicated peroxide value determination. *Ozone: Science et Engineering*, 34(4), 293-299.
- Czernel, G., Typek, R., Klimek, K., Czuryło, A., Dawidowicz, A. L., et Gagoś, M. (2016).** Catalytic effect of free iron ions and heme-iron on chromophore oxidation of a polyene antibiotic amphotericin B. *Journal of Molecular Structure*, 1111, 69-75.
- Della Pepa, R., Picardi, M., Sorà, F., Stamouli, M., Candoni, A., Delia, M., . . . Nosari, A. (2016).** Successful management of chronic disseminated candidiasis in hematologic patients treated with high-dose liposomal amphotericin B: a retrospective study of the SEIFEM registry. *Supportive Care in Cancer*, 24(9), 3839-3845.

- Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M. P., et Torrado, J. J. (2008).** Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International journal of pharmaceutics*, 361(1-2), 64-69.
- Essers, M. A., Offner, S., Blanco-Bose, W. E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M. A., et Trumpp, A. (2009).** IFN $\alpha$  activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*, 458(7240), 904-908.
- Eymard S, Genot C. (2003).** A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(9), 497-501.
- Falcón-González, J. M., Jiménez-Domínguez, G., Ortega-Blake, I., et Carrillo-Tripp, M. (2017).** A Multi-Phase Solvation Model for Biological Membranes: Molecular Action Mechanism of Amphotericin B. *Journal of Chemical Theory and Computation*.
- Farhoosh, R., Khodaparast, M. H. H., Sharif, A., et Rafiee, S. A. (2012).** Olive oil oxidation: rejection points in terms of polar, conjugated diene, and carbonyl values. *Food chemistry*, 131(4), 1385-1390.
- Ferreira, G. F., Baltazar, L. d. M., Santos, J. R. A., Monteiro, A. S., Fraga, L. A. d. O., Resende-Stoianoff, M. A., et Santos, D. A. (2013).** The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1801-1811.
- Gaboriau, F., Chéron, M., Leroy, L., et Bolard, J. (1997).** Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B. *Biophysical Chemistry*, 66(1), 1-12. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622\(96\)02241-7](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0301-4622(96)02241-7)
- Gagoś, M., et Czernel, G. (2014).** Oxidized forms of polyene antibiotic amphotericin B. *Chemical Physics Letters*, 598, 5-9.
- Gao, D., Gao, Z., et Zhu, G. (2013).** Antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* via activation of transcription factor Nrf2. *Food et function*, 4(6), 982-989.
- Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., et Burke, M. D. (2012).** Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2234-2239.

- Guzun-Cojocar, T., Guzun. (2010).** *Peroxidation of iron at the oil/water interface stabilized by milk proteins : influence of phosphate residues and stability of iron chelates*, Université de Bourgogne]. Star Univ-bourgogne Agreenium. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00567622>
- Kagan, L., Gershkovich, P., Wasan, K. M., et Mager, D. E. (2014).** Dual physiologically based pharmacokinetic model of liposomal and nonliposomal amphotericin B disposition. *Pharmaceutical research*, 31(1), 35-45.
- Kamiński, D. M. (2014).** Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. *European Biophysics Journal*, 43(10-11), 453-467.
- Karppi, J., Nurmi, T., Kurl, S., Rissanen, T. H., et Nyysönen, K. (2010).** Lycopene, lutein and  $\beta$ -carotene as determinants of LDL conjugated dienes in serum. *Atherosclerosis*, 209(2), 565-572.
- Kawabe, K., Takano, K., Moriyama, M., et Nakamura, Y. (2017).** Amphotericin B increases transglutaminase 2 expression associated with upregulation of endocytotic activity in mouse microglial cell line BV-2. *Neurochem Res*, 42, 1488-1495.
- Khalil, O. A. K., de Faria Oliveira, O. M. M., Velloso, J. C. R., de Quadros, A. U., Dalposso, L. M., Karam, T. K., . . . Khalil, N. M. (2012).** Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. *Food chemistry*, 133(3), 1001-1005.
- Knopik-Skrocka, A., et Bielawski, J. (2002).** The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7(1), 31-48.
- Koutsoumanis, K. P., et Sofos, J. N. (2005).** Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 104(1), 83-91.
- Kovacic, P., et Cooksy, A. (2012).** Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. *MedChemComm*, 3(3), 274-280.
- Laguerre, M., Lecomte, J., et Villeneuve, P. (2007).** Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in lipid research*, 46(5), 244-282.

- Legrand, M., Cordeiro, D. J., Ressaire, Q., Homyrda, L., Alanio, A., Cohen, S., . . . Moins-Teisserenc, H. (2015).** Immunodépression des brûlés graves et infections fongiques invasives : un rôle des cellules myéloïdes suppressives. *Anesthésie et Réanimation*, 1, A305-A306. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.anrea.2015.07.469>
- Łubkowski, J., Błazejowski, J., Czerwinski, A., et Borowski, E. (1989).** Thermal behaviour and stability of amphotericin B. *Thermochimica acta*, 155, 29-37.
- Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., et Zaragoza, O. (2012).** It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Mohamed-Ahmed, A. H., Les, K. A., Croft, S. L., et Brocchini, S. (2013).** Preparation and characterisation of amphotericin B-copolymer complex for the treatment of leishmaniasis. *Polymer Chemistry*, 4(3), 584-591.
- Nakagawa, Y., Umegawa, Y., Takano, T., Tsuchikawa, H., Matsumori, N., et Murata, M. (2014).** Effect of sterol side chain on ion channel formation by amphotericin B in lipid bilayers. *Biochemistry*, 53(19), 3088-3094.
- Neumann, A., Wieczor, M., Zielinska, J., Baginski, M., et Czub, J. (2016).** Membrane sterols modulate the binding mode of amphotericin B without affecting its affinity for a lipid bilayer. *Langmuir*, 32(14), 3452-3461.
- Poissy, J., Parmentier-Decrucq, E., Thieffry, C., Duburcq, T., et Mathieu, D. (2017).** «Nouvelles» molécules anti-infectieuses. Quelle place en médecine intensive/réanimation pour ceftolozane-tazobactam et la témocilline? *Médecine Intensive Réanimation*, 1-9.
- Rouessac, F., Rouessac, A., et Cruché, D. (2000).** Analyse chimique. *Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Paris: Dunod.
- Sakanaka, S., et Tachibana, Y. (2006).** Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food chemistry*, 95(2), 243-249.
- Serrano, D. R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M. P., . . . Torrado, J. J. (2013).** Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *International journal of pharmaceutics*, 447(1), 38-46.

- Sokol-Anderson, M. L., Brajtburg, J., et Medoff, G. (1986).** Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *Journal of Infectious Diseases*, 154(1), 76-83.
- Starzyk, J., Gruszecki, M., Tutaj, K., Luchowski, R., Szlajak, R., Wasko, P., . . . Gruszecki, W. I. (2014).** Self-association of amphotericin B: spontaneous formation of molecular structures responsible for the toxic side effects of the antibiotic. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(48), 13821-13832.
- Stone, N. R., Bicanic, T., Salim, R., et Hope, W. (2016).** Liposomal Amphotericin B (AmBisome®): A review of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, clinical experience and future directions. *Drugs*, 76(4), 485-500.
- Szlinder-Richert, J., Mazerski, J., Cybulska, B., Grzybowska, J., et Borowski, E. (2001).** MFAME, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self-association and effects on red blood cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1528(1), 15-24.
- Thomas, S., Vieira, C. S., Hass, M. A., et Lopes, L. B. (2014).** Stability, cutaneous delivery, and antioxidant potential of a lipoic acid and  $\alpha$ -tocopherol codrug incorporated in microemulsions. *Journal of pharmaceutical sciences*, 103(8), 2530-2538.
- Trumpp, A., Essers, M., et Wilson, A. (2010).** Awakening dormant haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 201-209.
- Wilcock, B. C., Endo, M. M., Uno, B. E., et Burke, M. D. (2013).** C2'-OH of amphotericin B plays an important role in binding the primary sterol of human cells but not yeast cells. *Journal of the American Chemical Society*, 135(23), 8488-8491.
- Yang, T.-S., Ou, K.-L., Peng, P.-W., Liou, B.-C., Wang, W.-T., Huang, Y.-C., . . . Su, C.-H. (2013).** Quantifying membrane permeability of amphotericin B ion channels in single living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(8), 1794-1801.
- Zielińska, J., Wieczór, M., Bączek, T., Gruszecki, M., et Czub, J. (2016).** Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. *Scientific reports*, 6, 19109.

***Sixième partie:  
Articles publiés***

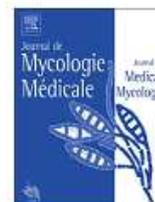
- Article n°1:

Journal de Mycologie Médicale (2014) 24, e137–e142



Available online at  
**ScienceDirect**  
[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
[www.em-consulte.com](http://www.em-consulte.com)



ORIGINAL ARTICLE/ARTICLE ORIGINAL

## Effects of ascorbic acid and $\alpha$ -tocopherol on the therapeutic index of amphotericin B



*Effet de l'acide ascorbique et de  $\alpha$ -tocophérol sur l'index thérapeutique de l'amphotéricine B*

M.H. Belhachemi\*, K. Boucherit, Z. Boucherit-Otmani,  
 S. Belmir, Z. Benbekhti

Laboratoire antibiotiques antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique, département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université de Tlemcen, Tlemcen, Algeria

Received 28 June 2013; received in revised form 15 February 2014; accepted 8 April 2014  
 Available online 16 October 2014

### KEYWORDS

Amphotericin B;  
 Ascorbic acid  
 (vitamin C);  
 $\alpha$ -Tocopherol  
 (vitamin E);  
*Candida albicans*;  
 Dormancy;  
 Antifungal activity;  
 Selective toxicity

**Summary** Amphotericin B (AmB) remains the antifungal polyene of choice in deep fungal infections, but its high toxicity to mammalian cells limits its use. This toxicity is partly due to lipid peroxidation exerted by amphotericin B in cell membranes. The work we have undertaken focused on the one part the evaluation of the efficacy of amphotericin B in the presence of some antioxidants vitamins (vitamin C "ascorbic acid" and vitamin E " $\alpha$ -tocopherol") against the yeast *Candida albicans* ATCC 10231. Secondly, we have tested the cytotoxicity of these formulations on human red blood cells. The results showed a significant improvement in the efficiency of our formulations tested from 7% to 12% compared with amphotericin B alone at therapeutic concentrations. Furthermore, the addition of vitamin C and vitamin E protects human red blood cells against the cytotoxicity induced by amphotericin B with 17%. This is due may be to the antioxidant power of vitamins which confer protection against the autoxidation of the molecule of amphotericin B. On the other hand, it is noticed that the yeast regrows after 24 h whatever in complex with vitamin C or vitamin E of the stock solution. On completion of this study, the incorporation of antioxidant vitamins that we propose to the reaction medium of antifungal improved the therapeutic index of amphotericin B.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

\* Corresponding author. Tel.: +21 3 79 76 07 501.  
 E-mail addresses: [asouatou@yahoo.fr](mailto:asouatou@yahoo.fr), [biologie555@yahoo.fr](mailto:biologie555@yahoo.fr) (M.H. Belhachemi).

**MOTS CLÉS**

Amphotéricine B ;  
Acide ascorbique  
(vitamine C) ;  
 $\alpha$ -Tocophérol  
(vitamine E) ;  
*Candida albicans* ;  
Dormance ;  
Activité antifongique ;  
Toxicité sélective

**Résumé** L'amphotéricine B (AmB) reste encore l'antifongique polyénique de premier choix dans la plupart des infections fongiques profondes, mais sa toxicité élevée envers les cellules de mammifères limite son utilisation. Cette toxicité est due partiellement à la peroxydation lipidique exercée par l'amphotéricine B au niveau des membranes cellulaires. Le travail que nous avons entrepris à porté, d'une part, sur l'évaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en présence de quelques molécules antioxydantes (vitamine C - acide ascorbique - et vitamine E -  $\alpha$ -tocophérol -) ; vis-à-vis la levure *Candida albicans* ATCC 10231. D'autre part, nous avons testé la cytotoxicité de ces formulations sur les globules rouges humains. Les résultats obtenus ont montré une nette amélioration de l'efficacité de nos formulations testées de 7 % à 12 % par rapport à l'amphotéricine B seule à la concentration thérapeutique. Par ailleurs, l'addition de la vitamine C et la vitamine E protège les globules rouges humains contre la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B avec un pourcentage de 17 %. Cela est dû au pouvoir antioxydant des vitamines qui confère une protection contre l'autoxydation de la molécule d'amphotéricine B. Par ailleurs, concernant la dormance des levures, après 24 heures d'incubation en présence des solutions antifongiques, les levures reprennent leur croissance. L'index thérapeutique de l'amphotéricine B supplémentée des vitamines est nettement amélioré, le meilleur résultat obtenu correspond à l'addition de la vitamine E au milieu réactionnel d'AmB.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Introduction**

Amphotericin B (AmB) remains the reference treatment for invasive fungal infections and the current guidelines for the treatment of haematogenous candidiasis recommend the use of AmB [11,14,20]. Despite the diversity of antifungal drugs to cure these infections, only the action of AmB spectrum covers most of the *Candida* organisms, which are pathogenic species to humans [9,13,22]. In addition to this, the cost of the treatment is an important element in the therapeutic strategy as fluconazole, voriconazole, and caspofungin, which are significantly more expensive than AmB [10,16,19,24].

While AmB is relatively cheaper, it has a large number of side effects, such as renal toxicity, which constitutes the main reason for its restricted use [4] and its autoxidation in the reaction medium limits their effectiveness against the yeast *Candida albicans*. This autoxidation induced the lipid peroxidation, which allows degradation of the molecule and consequently decrease the antifungal activity of this drug [5,6,21].

To overcome this problem, some solutions have been proposed, including two antioxidants vitamins: vitamin C "ascorbic acid" and vitamin E " $\alpha$ -tocopherol" [1,3] which allows a reduction of toxicity. However, after exposing yeast cells to AmB, they were in a dormant state for 24 h, then the cells re-grew [7]. Dormancy is one of the causes that reduce the effectiveness of the antifungal strategy. Furthermore, previous studies have showed that the complexation with antioxidant vitamins of stock antifungal solution can modulate the selective activity of the AmB [8,23].

The aim of this study was to evaluate both the selective toxicity of AmB and the phenomenon of "dormancy" of *C. albicans* cells with some antioxidant vitamins.

**Material and methods****Biological materials**

For the tests of selective toxicity, we used human red blood cells (universal model of animal cells membrane) coming

from a healthy single donor (presenting no apparent pathology). In addition to this, we used the yeast *C. albicans* ATCC10231 American Type Culture collection (Rockville, Mandelville, USA) coming from the Pasteur Institute of Paris. This stock is maintained by successive road repairs on gelose Sabouraud preserved at + 4 °C.

**Methods****Preparation of the human erythrocyte suspension**

Human venous blood (from one healthy donor) was collected in tubes containing heparin. The tubes were centrifuged at  $1500 \times g$  for 10 min to remove the plasma and buffy coat.

Erythrocytes were then washed three times with phosphate buffer saline PBS (150 mM NaCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4), suspended in PBS at a hematocrit of 40% and used on the same day.

**Preparation of antifungal solutions**

We used the amphotericin B pure from laboratories Bristol-Meyers-Squibb France. The stock solution is prepared by extemporaneous antifungal in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of  $10^{-3}$  M and then adjusted to  $10^{-4}$  M with a spectrophotometer at 416 nm according to the formula  $A = \epsilon \cdot Cl$  ( $\epsilon_{416} = 121,400$ ). From this stock solution, antifungal solutions were prepared at 20  $\mu\text{M}$  to measurement of antibiotic-induced hemolysis and at 0.4  $\mu\text{M}$  corresponding to the CMI against the yeast studied to measurement of antifungal activity [12].

The vitamins C and E were obtained from Sigma-Aldrich Co. LLC. Were prepared extemporaneously in dimethyl sulfoxide (DMSO) and added to the culture medium at time zero to a final concentration of  $1.4 \times 10^3 \mu\text{M}$  for vitamin C and 8  $\mu\text{M}$  for vitamin E.

Several vitamin concentrations were tested in order to choose the most effective concentration for the preparation of antifungal solutions [26,27]. The choice of these concentrations is related to the antioxidant power of each vitamin [1,3].

**Measurement of antibiotic-induced hemolysis**

Appropriate amounts of antifungal solutions were added to PBS at 37 °C at a final concentration of 20  $\mu$ M. The suspension was immediately mixed by vortexing and incubated during 5 min at the same temperature. The red blood cells were then added to a final concentration of 4000 cells/mL, which corresponds to time zero of measurement. Erythrocytes suspensions were incubated at 37 °C under continuous agitation for 120 min. For the kinetic measurements, aliquots of 500  $\mu$ L from the reactional solution were carried out at regular intervals, and 2 mL of a frozen solution of washing (150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) was added. The suspension was immediately centrifuged at 4000  $\times$  g for 5 min. Cellular hemolysis was determined on the supernatant by optical density at 548 nm (which correspond to DO548 nm sample). All experiments were performed three times in duplicate.

Five hundred microlitres of erythrocytes suspension (with no addition) was added to 2 mL of distilled water and after a strong agitation, the red blood cells were completely lysed which correspond to total hemoglobin.

The rate of hemolysis sample (%) = (DO548 nm supernatant of the sample/DO548 nm total hemoglobin)  $\times$  100.

**Measurement of antifungal activity against yeasts**

*C. albicans* ATCC10231 cultures were carried out in Sabouraud broth (pH 5.6  $\pm$  0.2) at 30 °C with continuous agitation at 130 rpm (revolution/min) in the presence and the absence

of the antifungal solution. The cellular starting concentration was 2  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL.

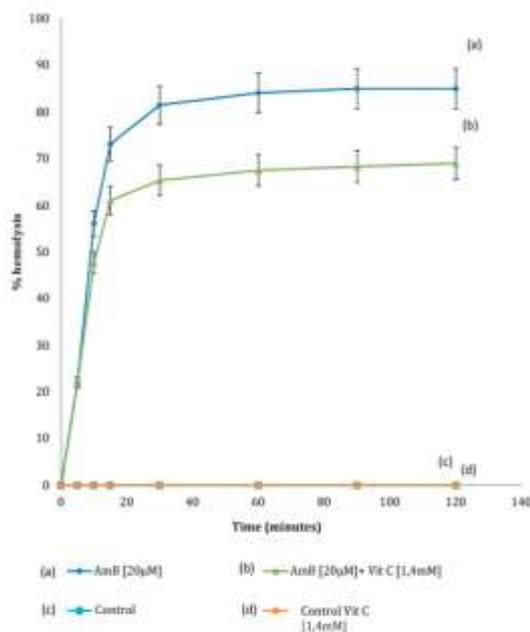
Antifungal solutions were added to the culture medium at a final concentration of 0.4  $\mu$ M at the same time as the inoculum, which corresponds to time zero of the growth. The culture was observed during 35 h. For kinetic growth measurements, samples of 100  $\mu$ L were taken each hour. The yeast cells were enumerated using a counting chamber. All experiments were repeated three times in duplicate.

**Results****Measurement of antibiotic-induced hemolysis**

The nature of the interaction of erythrocytes with polyene antibiotics has been widely addressed. This is because these cells provide a handy tool for many reasons:

- they are readily available;
- their intracellular metabolism is reduced;
- their membrane properties are well known;
- cell lysis is easy to monitor [17].

The erythrocyte suspension in the absence of AmB did not induce hemolysis during 120 min of incubation. Moreover, pH of the medium was maintained at 7.4. Similar results were obtained with control vitamins.

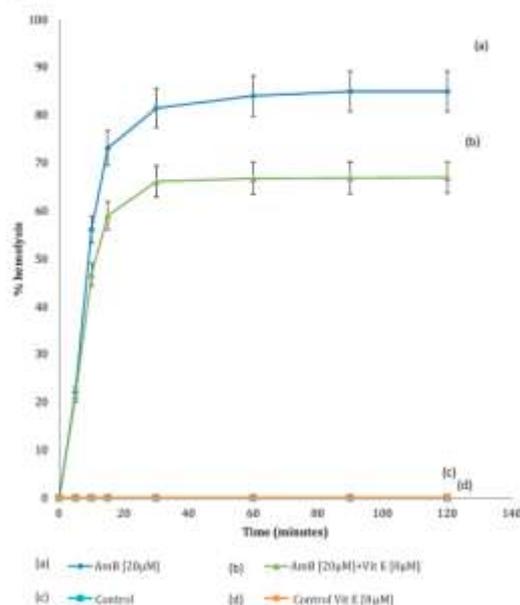


**Figure 1** Effect of ascorbic acid (vitamin C) (final concentration at 1.4  $\times$  10<sup>3</sup>  $\mu$ M) added with the stock solution of AmB (final concentration at 20  $\mu$ M) on kinetic of hemoglobin release from human erythrocytes. Cells suspensions at 4000 cells/mL. Incubation at 37 °C and pH 7.4.

*Effet de l'acide ascorbique (vitamine C) (la concentration finale est de 1,4  $\times$  10<sup>3</sup>  $\mu$ M) additionnée dans la solution mère de AmB (la concentration finale est de 20  $\mu$ M) sur la cinétique de la fuite de l'hémoglobine des érythrocytes humains. La concentration cellulaire de départ est de 4000 cellules/mL. Incubation est à 37 °C et à pH 7,4.*

e140

M.H. Belhachemi et al.



**Figure 2** Effect of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) (final concentration at  $8 \mu\text{M}$ ) added with the stock solution of AmB (final concentration at  $20 \mu\text{M}$ ) on kinetic of hemoglobin release from human erythrocytes. Cells suspensions at  $4000 \text{ cells/mL}$ . Incubation at  $37^\circ\text{C}$  and pH 7.4.

*Effet de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) (la concentration finale est de  $8 \mu\text{M}$ ) additionnée dans la solution mère de AmB (la concentration finale est de  $20 \mu\text{M}$ ) sur la cinétique de la fuite de l'hémoglobine des érythrocytes humains. La concentration cellulaire de départ est de  $4000 \text{ cellules/mL}$ . Incubation est à  $37^\circ\text{C}$  et à pH 7,4.*

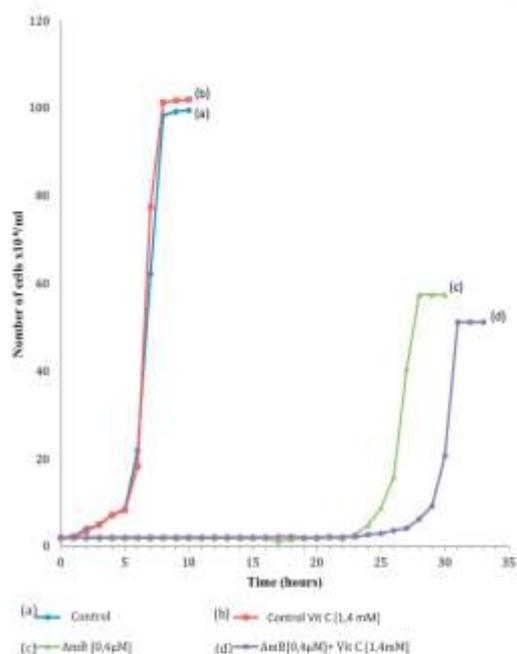
In the presence of  $20 \mu\text{M}$  of solutions of AmB, we observed an important hemolysis of erythrocytes ( $85\%$ ) after 120 min of incubation.

On the other hand, in the presence of  $20 \mu\text{M}$  of amphotericin B incorporated with vitamin C (Fig. 1) and vitamin E (Fig. 2), we observed that protective effect against hemolysis depends on the concentration and antioxidant power of each vitamin. The rate of hemolysis was reduced:  $69\%$  of hemoglobin leakage from erythrocytes with vitamin C at  $1.4 \times 10^3 \mu\text{M}$  and  $67\%$  with vitamin E at  $8 \mu\text{M}$  after 120 min of incubation.

#### Measurement of antifungal activity against yeasts

The addition of vitamins, used for the preparation of the antifungal solutions, to the medium cultures in the absence of amphotericin B did not affect the kinetic growth of yeasts.

Moreover, pH of the medium is maintained at 5.6. After exposing *C. albicans* to final concentration of  $0.4 \mu\text{M}$  of the stock solutions of AmB, the yeasts were in the latency phase for 24 h, then they multiplied in a way similar to the pilot cells in the absence of an antifungal solution to achieve



**Figure 3** Effect of ascorbic acid (vitamin C) (final concentration at  $1.4 \times 10^3 \mu\text{M}$ ) added with the stock solution of AmB (final concentration at  $0.4 \mu\text{M}$ ) on the growth of *C. albicans* ATCC10231. Inoculum of  $2 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ . Incubation at  $30^\circ\text{C}$  and pH 5.6 in continuous agitation.

*Effet de l'acide ascorbique (vitamine C) (la concentration finale est de  $1,4 \times 10^3 \mu\text{M}$ ) additionnée dans la solution mère de AmB (la concentration finale est de  $0,4 \mu\text{M}$ ) sur la croissance de *C. albicans* ATCC10231. Inoculum de départ  $2 \times 10^6 \text{ cellules/mL}$ . Incubation à  $30^\circ\text{C}$  et pH 5,6 sous agitation continue.*

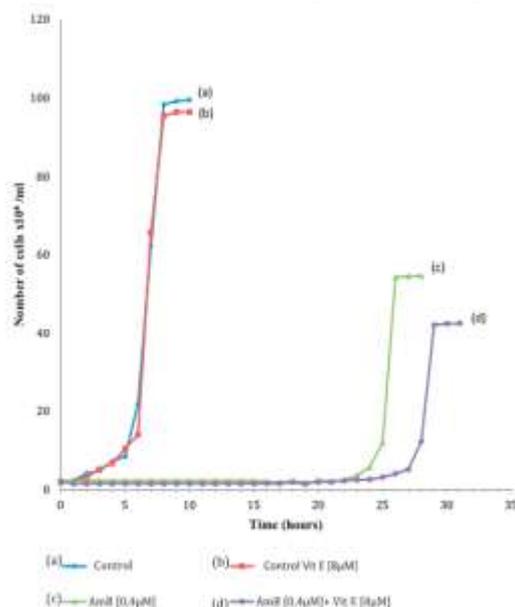
maximum growth equal to  $57.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  which corresponds an inhibition effect of  $42.5\%$ .

On the other hand, with  $0.4 \mu\text{M}$  of stock antifungal solutions prepared with vitamin C at  $1.4 \times 10^3 \mu\text{M}$  and vitamin E at  $8 \mu\text{M}$ , the yeasts were in the latency phase for 28 h, and then they grew to achieve maximum growth equal to  $50.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  for vitamin C and  $42.5 \times 10^6 \text{ cells/mL}$  for vitamin E.

Furthermore, in comparison with the growth of the pilot culture, the inhibition effect of stock antifungal solutions prepared with vitamin C attained  $49.5\%$  (Fig. 3) and  $57.5\%$  with vitamin E (Fig. 4).

#### Discussion

The unstable nature of amphotericin B probably reflects its susceptibility to autoxidative attack, as suggested for other members of the polyene group [15]. The conjugated carbon-carbon double-bond system in the polyunsaturated drug molecule possibly undergoes spontaneous oxidation by a light and heat stimulated free radical mechanism similar to that proposed for autoxidation of unsaturated lipids.



**Figure 4** Effect of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E) (final concentration at  $8 \mu\text{M}$ ) added with the stock solution of AmB (final concentration at  $0.4 \mu\text{M}$ ) on the growth of *C. albicans* ATCC 10231. Inoculum of  $2 \times 10^6$  cells/mL. Incubation at  $30^\circ\text{C}$  and pH 5.6 in continuous agitation.

*Effet de l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) (la concentration finale est de  $8 \mu\text{M}$ ) additionnée dans la solution mère de AmB (la concentration finale est de  $0,4 \mu\text{M}$ ) sur la croissance de *C. albicans* ATCC10231. Inoculum de départ  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Incubation à  $30^\circ\text{C}$  et pH 5,6 sous agitation continue.*

One might expect, therefore, that antioxidants would stabilize the agent and thereby preserve it in its native biologically active form for extended periods [6].

In this work, we have studied the effect of vitamins C and vitamins E on the therapeutic index of Amphotericin B. At the red blood cells, lyses result in the release of hemoglobin. AmB-induced hemolysis also seems to result from oxidative damage to the membrane [17].

Our results showed that the incorporation of vitamins in the reaction medium induces protection against the toxicity of AmB toward red blood cells, which is most probably due to antioxidant power of vitamins. The best result corresponds to the addition of vitamin E in the reaction medium.

It is generally admitted that cell sensitivity to polyene antibiotics is determined by the presence of sterol in the membrane and that the greater activity of AmB against fungi than against mammalian cells results from the drug's greater avidity for ergosterol containing membranes than for cholesterol containing membranes [17,25].

However, Boucherit et al. [7] show that AmB activity toward fungal cells develops in three steps. First, all cells sustain strong perturbations that result in a marked shrinking. Then, for a long period that can extend over 24 h, no change appears. Finally, a number of cells resume activity

and growth, and it may be assumed to have been in a "dormant" state. The remainder of cells without activity may be assumed to be dead cells. Dormancy is the term, which describes this intervening period. Dormancy is defined as a reversible state of low activity, where cells can persist for extended periods without division [2,18], which corresponds exactly to what we observed with our stock solutions of AmB prepared with vitamins. The logarithmic growth phase began between 24 and 28 h of incubation at  $30^\circ\text{C}$ . Furthermore, these stock solutions inhibited yeast growth between 49 and 57% after 32 h of culture growth. The better effect was observed of stock antifungal solutions prepared with vitamin E.

It follows from this result that the reaction medium of amphotericin B ( $0.4 \mu\text{M}$ ) supplemented with vitamin C and vitamin E at final concentration of  $1.4 \times 10^3 \mu\text{M}$  and  $8 \mu\text{M}$  respectively, increases the antifungal activity of amphotericin B against *C. albicans* ATCC 10231 to 7% in the case of vitamin C and 12% in the case of vitamin E. This is due probably to antioxidant potency of vitamins that provides protection against autoxidation of the molecule of amphotericin B [1,3].

According to study of Beggs et al., based on viability determinations, showed an apparent synergistic amphotericin B-antioxidant relationship. With a concentration of drug producing only transient fungistasis when used alone, there was fungicidal activity in the presence of an antioxidant [6].

Comparing the inhibition effect of amphotericin B associated with vitamins, we note that the antifungal activity in the presence of vitamin E is as high in comparison with vitamin C, which is probably related to the fact that according Zhang and Omaye [26,27], showed that the antioxidant power of vitamin E is higher than that vitamin C.

It would seem then that the improvement of therapeutic index of amphotericin B directly and parallel related to the antioxidant power of vitamins, which protect against the autoxidation of the molecule of amphotericin B.

## Conclusion

In conclusion, yeast dormancy was one of the causes in the failure of antifungal therapy. Our study fits in this light and consists of correct treatment failures of amphotericin B with antioxidant vitamins by improvement in antifungal activity.

These antioxidant vitamins could conceivably provide an answer to the toxicity problem commonly encountered in amphotericin B chemotherapy. With antioxidants vitamins, it may be possible to design lower-dose regimens that provide more acceptable levels of toxicity without compromising therapeutic effectiveness. Moreover, antioxidants might be used in commercial amphotericin B preparations to stabilize the drug and thereby prolong its shelf life. Finally, perhaps the greatest potential lies in the area of amphotericin B susceptibility testing.

## Disclosure of interest

The authors have not supplied their declaration of conflict of interest.

## References

- [1] Andrews FA, Beggs WH, Sarosi GA. Influence of antioxidants on the bioactivity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;11:615–8.
- [2] Arseny S, Kaprelyants AS, Mukamolova GV. Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin mysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution. *FEMS Microbiol Letts* 1994;115:347–52.
- [3] Atmaca S, Çiçek R. Effects of ascorbic acid on amphotericin B and nystatine activities against *Candida albicans*. *Antimicrob Infect Dis Newsl* 1996;15:6–8.
- [4] Barwicz J, Dumont I, Ouellet C, Gruda I. Amphotericin B toxicity as related to the formation of oxidatively modified low-density lipoproteins. *Biospectroscopy* 1998;4:135–44.
- [5] Beggs WH, Andrews FA, Sarosi GA. Synergistic action of amphotericin B and antioxidants against certain opportunistic yeast pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1977;13:266–70.
- [6] Beggs WH. Antioxidant-stabilized amphotericin b. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983;1:339–41.
- [7] Boucherit Z, Seksek O, Bolard J. Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. *Med Mycol* 2007;45:525–33.
- [8] Brajtburg J, Elberg S, Schwartz DR, Vertut-Croquin A, Schlesinger D, Kobayashi GS, et al. Involvement of oxidative damage in erythrocytes lysis induced by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:172–6.
- [9] Canuto MM, Rodero FG. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect Dis* 2002;2:550–63.
- [10] Carle S. Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel* 2003;36:25–41.
- [11] Chavanet P. Amphotéricine B désoxycholate (Fungizone) : vieux médicament, nouvelles versions. *Rev Med Interne* 1997;18:153–65.
- [12] Datry A, Thellier M, Traoré B, Alfa Cissé O, Danis M. Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques : antifongigramme, point sur les résistances, données pharmacologiques. *Ann Fr Anesth Reanim* 2001;20:389–93.
- [13] Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:7–10.
- [14] Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bola F, et al. In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:1125–31.
- [15] Hamilton-Miller JM. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriol Rev* 1973;37:166–96.
- [16] Hennequin C, Gauzit R, Wolff M, Cordonier C. Recommandations de stratégies thérapeutiques pour le traitement des candidoses et aspergilloses invasives chez l'adulte. *Antibiotiques* 2010;12:165–70.
- [17] Joly V, Bolard J, Yeni P. In vitro models for studying toxicity of antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1799–804.
- [18] Kaprelyants AS, Kell DB. Dormancy in stationary-phase culture of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:3187–96.
- [19] Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, Faroudy M, Ababou A, Lazreq C, et al. Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *J Mycol Med* 2006;16:16–25.
- [20] Mailié M, Bastide JM. Les nouveaux antifongiques et leur stratégie de recherche. *Rev Franc Lab* 2001;332:63–70.
- [21] Osaka K, Tyurina YY, Dubey RK, Tyurin VA, Ritov VB, Quinn PJ, et al. Amphotericin B as an intracellular antioxidant: protection against 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)-induced peroxidation of membrane phospholipids in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 1997;54:937–45.
- [22] Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2002;2:73–85.
- [23] Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. Amphotericin B induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis* 1986;154:76–83.
- [24] Vartivarian SE. Etudes comparatives fluconazole versus amphotéricine b dans le traitement des candidoses profondes. *Reanim Urgence* 1996;5:33–8.
- [25] Vertut-Croquin A, Bolard J, Chabbert M, Gary-Bobo C. Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochemistry* 1983;22:2939–44.
- [26] Zhang P, Omaye ST. Beta-carotene and protein oxidation: effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol. *Toxicology* 2000;146:37–44.
- [27] Zhang P, Omaye ST. Beta-carotene: interactions with alpha-tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. *J Nutr Biochem* 2001;12:38–45.

## • Article n°2:

**Current Medical Mycology**

2021, 7(1): ———

**Influence of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on the autoxidation and in vitro antifungal activity of amphotericin b**Mohammed Habib Belhachemi<sup>1,2\*</sup>, Zahia Boucherit-otmani<sup>1</sup>, Kebir Boucherit<sup>1</sup>, Sara Belmir<sup>1</sup><sup>1</sup> Antifungal Antibiotics Laboratory: Physical Chemistry, Synthesis, and Biological Activity, Department of Biology, Faculty of Natural and Life Sciences, Earth and Universe Sciences, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria<sup>2</sup> Department of Biology, Université de Ghardaïa, Ghardaïa, Algeria

## Article Info

**Article type:**  
Original article**Article History:**Received: 29 September 2020  
Revised: 20 November 2020  
Accepted: 09 January 2021**\* Corresponding author:****Mohammed Habib Belhachemi**  
Antifungal Antibiotics Laboratory:  
Physical Chemistry, Synthesis, and  
Biological Activity, Department of  
Biology, Faculty of Natural and Life  
Sciences, Earth and Universe  
Sciences, University of Tlemcen,  
Tlemcen, Algeria.  
Email: belhachemi@univ-ghardaia.dz,  
biologie555@yahoo.fr**> How to cite this paper**Belhachemi MH, Boucherit-otmani Z, Boucherit K, Belmir S. Influence of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on the autoxidation and in vitro antifungal activity of amphotericin b. *Curr Med Mycol.* 2021; 7(1): ----. DOI: ----

## A B S T R A C T

**Background and Purpose:** Amphotericin B (AmB) is the standard treatment for systemic fungal infections; however, the formation of reactive oxygen species reduces the efficacy and stability of this molecule. The present study aimed to evaluate the effect of the combination of AmB with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol on its autoxidation and antifungal activity.**Materials and Methods:** The antifungal activity against *Candida albicans* was evaluated by the viable cell counting method and checking their morphological changes with a scanning electron microscope. Monomer state of AmB was assessed by scanning the UV absorbance in the range of 300–450 nm and the lipid peroxidation was measured using quantification of thiobarbituric acid reactive-substances (TBARS).**Results:** Based on the findings, the addition of ascorbic acid ( $3 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ ) and  $\alpha$ -tocopherol ( $16 \mu\text{g/mL}$ ) to the reaction medium of AmB increased its antifungal activity while maintaining its molecular stability. Moreover, the level of TBARS formed in the reaction medium of AmB was significantly reduced after combination with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol.**Conclusion:** Given their availability, their anti-free radical activity, and their low toxicity, the incorporation of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol into the reaction medium of AmB seems to be a promising approach to obtain an effective antifungal formulation.**Keywords:**  $\alpha$ -tocopherol, Amphotericin B, Antifungal activity, Ascorbic acid, Autoxidation**Introduction**

The antifungal treatment has serious problems since there are no medications that are both effective and non-toxic; moreover, the increase in the resistance to antifungals can lead to treatment failure [1-3]. Among the most used antifungals, amphotericin B (AmB) is still the medication used against life-threatening systemic infections caused by various fungi, such as *Candida albicans* [4, 5]. Despite the fact that AmB is a very active molecule, its use is limited due to problems of solubility, stability, and absorption which induce high toxicity [5, 6]. This cytotoxicity is mainly due to the mechanism of action of AmB that is based on its interaction with membrane sterols and also to the production of reactive oxygen species [7].

Formation of these highly reactive intermediates would reduce the effective concentration of the medication in solution and also possibly contribute to its toxicity as has been reported for several unsaturated

lipids [8]. However, the unstable nature of AmB probably reflects its susceptibility to autoxidative attack as suggested for members of the polyene group [9-11]. Nevertheless, the addition of an antioxidant to a yeast culture treated with AmB should improve its stability and the biological activity of the antibiotic for extended periods [10, 11].

In this regard, the present study aimed to evaluate the effect of two antioxidant molecules, namely ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol, on the reaction medium of AmB in order to limit autoxidation reactions and increase its therapeutic efficacy.

**Materials and Methods**

This study was carried out in the Antifungal Antibiotics Laboratory: Physical Chemistry, Synthesis, and Biological Activity, Department of Biology, University of Tlemcen, Tlemcen, Algeria (decree: N°256 du, 11/04/2001).

**Yeast strain and growth conditions**

The yeast *C. albicans* ATCC10231 (American Type Culture Collection, Mendelevium, USA) coming from the Pasteur Institute of Paris. This stock was maintained by successive road repairs on Sabouraud dextrose agar (Sigma-Aldrich, Germany) and preserved at +4 °C.

**Preparation of antifungal solutions**

The pure AmB was obtained from the Bristol Myers Squibb laboratory in France. The stock solution was prepared by extemporaneously prepared antifungal in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, Germany). From this stock solution, antifungal solutions were prepared at 20 µg/mL to measure the level of the anti-lipid peroxidation activity at 0.4 µg/mL and evaluate the antifungal activity [12, 13]. The ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol (Sigma-Aldrich, Germany) were prepared extemporaneously in DMSO and added to the culture medium at time zero.

**Antifungal susceptibility testing**

The antifungal susceptibility testing of AmB alone and with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol was performed according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [14]. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (RPMI 1640) (Sigma-Aldrich, Germany) buffered with 3-(N-morpholino)-propane-sulfonic acid (pH 7.0 with 0.165 M) obtained from Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany.

Concentration of the *C. albicans* 10231 in the study was adjusted by measuring the absorbance in a spectrophotometer at a wavelength of 530 nm and adding sterile distilled water as required. A working suspension was prepared from a 1 in 10 dilution of the standardized suspension in sterile distilled water to yield  $1-5 \times 10^5$  colony-forming unit (CFU)/mL.

The antifungal stock solution was two-fold diluted with RPMI of 16-0.03 µg/mL for AmB. A volume of 100 µL of inoculum suspension was added to each well except the sterility control. It must be mentioned that sterile water was added to the well instead. The microtitre plates were incubated for 24 h at 35 °C and the MIC was determined visually.

The MIC was defined as the lowest concentration of the antifungal agent that produced no visible fungal growth, compared to the medication-free control well. The control wells included the well without the antifungal (i.e. growth control), without microorganisms (i.e. sterility control), and with the solvent.

In order to determine the MIC of AmB and the concentrations of the combined vitamins, they were manipulated in several ways according to the EUCAST protocol with some modifications to determine the effective concentrations against *C. albicans* strains. For this purpose, the range of concentrations of ascorbic acid ( $48 \times 10^2$  to 9.37 µg/mL) and  $\alpha$ -tocopherol

( $1.28 \times 10^2$  to 0.25 µg/mL) was reduced while the concentrations of the antifungals were kept fixed [15, 16]. At each manipulation, the concentration of AmB was reduced by a ratio of 1:2 until the achievement of the effective MIC of the antifungal which was compatible with one of the concentrations of the tested vitamins.

**Growth curves**

Antifungal activity of AmB with and without vitamins against *C. albicans* was evaluated by time kill curve using the viable cell counting according to the methodology described by Klepser et al. [17] with some modifications. This broth-based method was prepared at the starting inoculum of *C. albicans* 10231 at  $2 \times 10^6$  CFU/mL by sampling the tubes or flasks that contained the control (i.e., the organism with no medication) and antifungal agent groups. Concentrations of the AmB alone or in combination with ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol were tested in accordance with the MIC results.

At predetermined time points (i.e., 0, 6, 12, 18, 24, and 33 h), the samples were continuously shaken and incubated at 30 °C. A 50 µL aliquot from each dilution was spread on a microscopic slide to determine the survivor colony count (i.e., CFU/mL). The kill curves were constructed by evaluation of the percentage growth inhibition at each time point in the presence and absence of the antifungal agent [18].

**Scanning Electron Microscopy**

Morphological changes of *C. albicans* ATCC 10231 during growth by AmB alone and in combination with vitamins were observed by a TM-1000 scanning electron microscope (SEM) (Hitachi, Japan) with an accelerating voltage of 18 kV in the microscopy laboratory of the Physics Department at the University of Tlemcen.

For purposes of the study, 10 mL of the *C. albicans* cell suspension at the starting concentration of  $2 \times 10^6$  CFU/mL was incubated at 30 °C for 33 h on a broth Sabouraud containing AmB with and without vitamins and the control group (i.e., the medium containing no AmB).

To perform the SEM analyses on samples, they were fixed in ethanol, stained with methylene blue, and rinsed in a buffer. Afterward, the smears were spread on the microscope slide and kept in the sterile Petri dishes [19, 20]. The photomicrographs were processed and analyzed by Image J software (version 1.51a) to determine the charge and cell dimensions of *C. albicans* ATCC 10231 during the stationary phase in the absence and presence of antifungal agents [19].

**UV-visible absorbance**

The medication concentrations in dispersions were calculated based on absorbance at 406 nm after appropriate dilution in methanol. Monomer state of AmB was determined by scanning the UV absorbance of AmB within the range of 300-450 nm using the

Specord 200 PLUS spectrophotometer (Analytik Jena, Germany) [21].

For evaluation of the monomeric state of AmB formulations (with and without vitamins) at 37 °C, the samples were dissolved in phosphate buffer (pH 7.4/10 mM) and the spectroscopic measurements were carried out at  $10^{-5}$  M of AmB concentration after dilution of each AmB formulation with absolute methanol. Measurements were repeated in triplicate over a period of 1, 18, 24, and 33 h, and the samples were stored in a place protected from light at room temperature during the experiment [21, 22].

#### Lipid peroxidation assay

Lipid peroxidation activity was determined according to the method of Sakanaka S. and Tachibana Y. with some modifications [23]. Moreover, the formations of TBARS were determined by mixing 1 mL of the egg yolk solution and 0.5 mL of AmB alone (20 µg/mL) or in combination with vitamins (the concentrations were according to the MIC results). Subsequently, 2 mL of FeSO<sub>4</sub> at 0.01 mM was added to the prepared solution.

The mixture was shaken at 37 °C for 15 min; afterward, 1 mL of 2.5% trichloroacetic acid was added to it. The mixture was mixed well and centrifuged at 4000 ×g for 20 min. In addition, 3 mL of the supernatant was mixed with 2 mL of 0.8% 2-thiobarbituric acid and heated to 100 °C for 10 min. Absorbance of the mixture was measured at 532 nm in triplicate.

To evaluate the results of this experiment, a standard curve was prepared with malonyldialdehyde (MDA) from 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich, Germany).

#### Statistical analysis

Statistical analysis of the different experimental groups was performed using XLSTAT software (version 2019). Moreover, the significance of differences in the fungal activity and the monomeric state of AmB formulations was determined by the Mann-Whitney U test. It must be noted that a p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

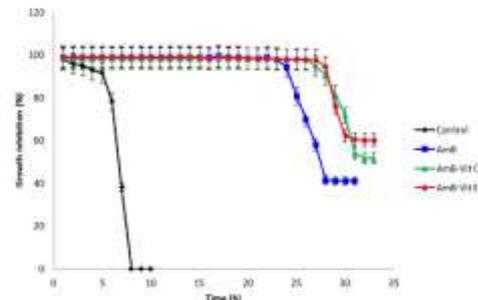
## Results

#### Antifungal susceptibility testing

To determine the MIC of AmB in combination with ascorbic acid and α-tocopherol, several microdilution tests were carried out by decreasing the MICs of the antifungal. According to the obtained results, a significant decrease (from 0.5 to 0.12 µg/mL) was observed in the MIC of AmB in combination with vitamins against *C. albicans* ATCC 10231. However, the concentrations compatible with ascorbic acid and α-tocopherol with the obtained MIC were  $3 \times 10^2$  µg/mL and 16 µg/mL, respectively.

#### Growth curves

Antifungal activity of AmB with and without



**Figure 1.** Effect of the addition of ascorbic acid (Vit C= $3 \times 10^2$  µg/mL) and α-tocopherol (Vit E=16 µg/mL) on the antifungal activity of amphotericin B (AmB=0.4 µg/mL) against *Candida albicans* ATCC 10231. The data are presented with mean values and standard errors of fungal counts. Each point represents an average of triplicate measurements (P=0.0368, AmB vs. AmB-Vit C; P=0.0237, AmB vs. AmB-Vit E; P=0.0589, AmB-Vit C vs. AmB-Vit E; Mann-Whitney U-test).

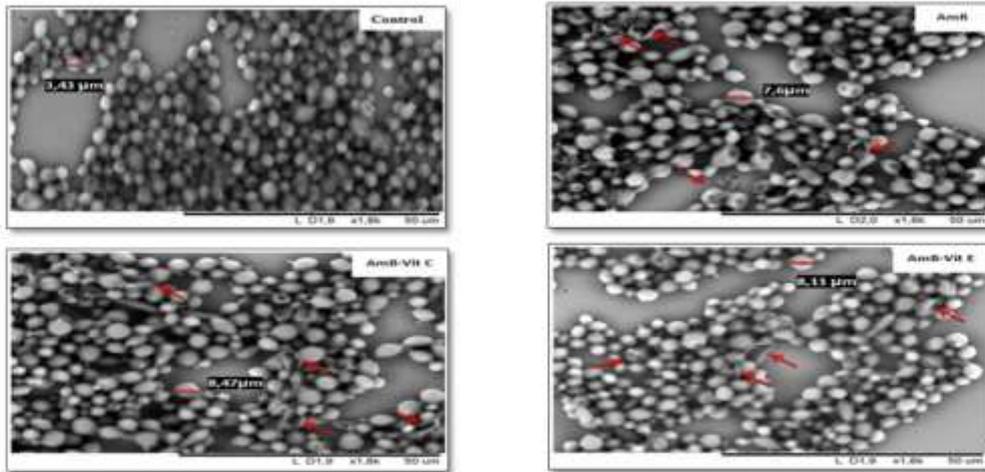
ascorbic acid and α-tocopherol against *C. albicans* ATCC 10231 is represented by the growth curves shown in Figure 1. According to the results, the addition of ascorbic acid ( $3 \times 10^2$  µg/mL) and α-tocopherol (16 µg/mL) to the reaction medium of AmB (0.4 µg/mL) increased the efficacy of the antifungal agent to 11% and 19%, respectively. Percentage of growth inhibition of fungal cells was estimated at 41% in the presence of AmB alone with a maximum growth of  $59 \times 10^6$  CFU/mL and a latency phase of 24 h.

On the other hand, it was noted that the addition of ascorbic acid and α-tocopherol to the reaction medium of AmB increased its antifungal activity against the strain of *C. albicans* ATCC 10231 with a percentage inhibition of 52% and 60%, respectively, which represents cell loads of  $48 \times 10^6$  CFU/mL and  $40 \times 10^6$  CFU/mL, respectively. This inhibition in growth is accompanied by a prolongation of the latency phase which goes from 24 h (AmB alone) to 27 h (AmB/Ascorbic acid) and 28 h (AmB/α-tocopherol).

#### Scanning electron microscopy

Figure 2 shows the morphological changes of *C. albicans* ATCC 10231 cultured in the absence and presence of the antifungal agents during the stationary phase using a SEM. There was an increase in the cell sizes of yeasts incubated in the presence of AmB alone (0.4 µg/mL) and in combination with ascorbic acid (AmB-Vit C;  $3 \times 10^2$  µg/mL) and α-tocopherol (AmB-Vit E; 16 µg/mL) after 33 h (which corresponds the stationary phase). Moreover, it must be noted that there was a burst in the *C. albicans* cells incubated in the presence of AmB alone.

Based on the results of the Image J software (version 1.51a), the mean values of the cell sizes of *C. albicans* ATCC 10231 were 7.60, 8.47, and 8.11 µm in the presence of AmB alone and AmB in combination with ascorbic acid and α-tocopherol, respectively. It is noteworthy that the same value was 3.43 µm in the control group.

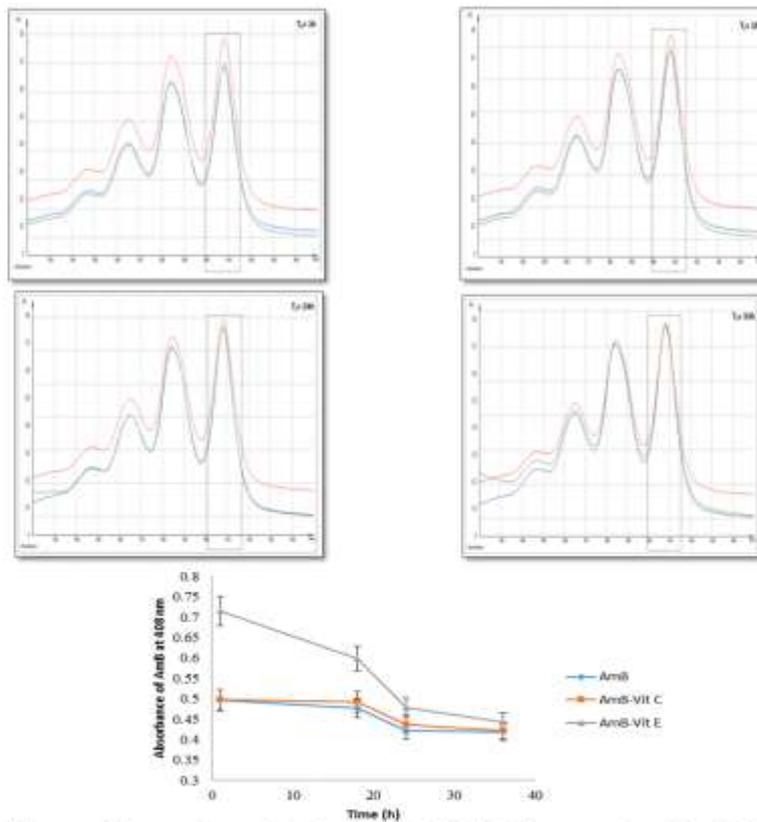


**Figure 2.** Results of scanning electron microscopy of *Candida albicans* ATCC 10231 cultured in the absence and presence of the antifungal agents during the stationary phase (amphotericin B [AmB]=0.4 μg/mL, ascorbic acid [Vit C]= $3 \times 10^2$  μg/mL, α tocopherol [Vit E]=16 μg/mL).

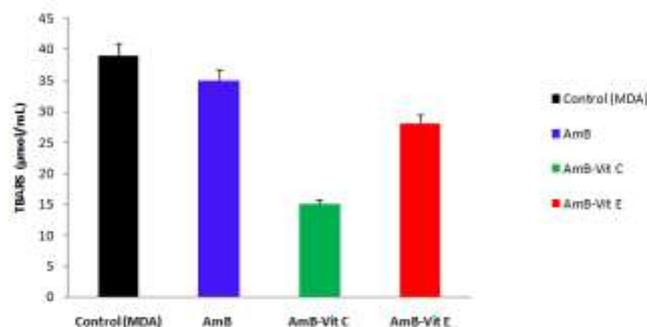
**UV-visible absorbance**

Monomeric state of AmB was evaluated by

measuring the UV-visible absorbance of them and the results are shown in Figure 3. Spectra of AmB with



**Figure 3.** Characteristic spectra of the monomeric state of amphotericin B (AmB= $10^{-4}$  M) in the presence of ascorbic acid (Vit C= $3 \times 10^2$  μg/mL) and α tocopherol (Vit E=16 μg/mL) as a function of time. Each point represents the mean of triplicate measurements (P=0.4189, AmB vs. AmB-Vit C; P=0.0002, AmB vs. AmB-Vit E; P<0.0001, AmB-Vit C vs. AmB-Vit E; Mann-Whitney U- test).



**Figure 4.** Concentration of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) in the reaction medium of amphotericin B in the absence and presence of ascorbic acid (Vit C=3×10<sup>2</sup> µg/mL) and α-tocopherol (Vit E=16 µg/mL), compared to malonaldehyde (MDA=20 µg/mL). Data represent the mean±SD values (n=3).

and without ascorbic acid and α-tocopherol displayed strong absorption in the 408 nm region with different intensities. Indeed, AmB keeps its molecular stability where the characteristic peak always retains its maximum value at 408 nm.

In contrast, a decrease was noted in the absorbance intensity of AmB over time. Spectral analysis of AmB (10<sup>-5</sup> M) in combination with ascorbic acid (3×10<sup>2</sup> µg/mL) and α-tocopherol (16 µg/mL) revealed a hyperchromic effect during 24 h in the combination of AmB and α-tocopherol.

#### Lipid peroxidation assay

Figure 4 represents the concentration of malonaldehyde in the reaction medium of AmB (20µg/mL) in the absence and presence of ascorbic acid (3.10<sup>2</sup>µg/mL) and α-tocopherol (16 µg/mL) as a function of the measured absorbance values.

Based on the obtained results, AmB had a great capacity to produce malonic dialdehyde in the reaction medium with a concentration of 35 µM. This concentration was significantly reduced by the addition of ascorbic acid and α-tocopherol in the reaction medium of AmB to 15 µM and 28 µM, respectively.

#### Discussion

A preliminary study based on data from the literature [11, 16, 24, 25] has indicated that the addition of ascorbic acid and α-tocopherol to the reaction medium of AmB reduces its toxicity to human red blood cells without affecting its antifungal activity [10]. In this regard, the present study aimed to determine the effective concentrations of vitamins which are compatible with the AmB molecule in order to limit the autoxidation reactions and increase its therapeutic effectiveness. These two molecules were selected due to their chemical nature, anti-radical activities, and low toxicities.

The MIC of AmB and concentrations of the combined vitamins were determined according to the EUCAST protocol. Based on the results, there was a decrease in the MIC of AmB from 0.5 to 0.12 µg/mL against *C. albicans* ATCC 10231 in combination

with ascorbic acid and α-tocopherol with final concentrations of 3×10<sup>2</sup> µg/mL and 16 µg/mL, respectively. This result showed an apparent synergistic AmB-antioxidant relationship according to Beggs WH [26].

Based on the results of the growth curves, the addition of ascorbic acid and α-tocopherol with final concentrations of 3×10<sup>2</sup> µg/mL and 16 µg/mL, respectively, to the reaction medium of AmB (0.4 µg/mL; corresponds to the MIC against *C. albicans* ATCC 10231 [13]) inhibited the growth of *C. albicans* ATCC 10231. Moreover, the latency phase was extended from 24 h in the presence of AmB alone to 28 h in its combination with the vitamins.

This result is in line with those of the studies performed by Atmaca and Çiçek [25], as well as Baran and Thomas [27] which have indicated that the addition of antioxidant molecules to AmB stabilizes this molecule against auto-degradation and prolongs its antifungal activity against a strain of yeast *C. albicans*.

In addition, the microscopic study (i.e., SEM) revealed that the incorporation of ascorbic acid (3×10<sup>2</sup> µg/mL) and α-tocopherol (16 µg/mL) to the reaction medium of AmB (0.4 µg/mL) reduces the cell load and increases the size of *C. albicans* ATCC 10231 cells, compared to the yeasts incubated in the presence of AmB alone [19]. Investigation of the effect of antioxidants on the reaction medium of AmB offers a simple way to solve the problem of therapeutic efficacy and stability of this antifungal molecule. Therefore, the addition of ascorbic acid and α-tocopherol to the reaction medium of AmB did not influence the molecular stability and value of the peak characteristic of the monomer state of AmB which remained constant at 408 nm.

According to Biémont [28], the study of the spectra of a large number of molecules has made it possible to establish correlations between structures and absorption maxima [29]. However, the hypochromic and hyperchromic effects caused a variation in the intensity of the maximum peak over time. Indeed, this variation can suggest the size of the AmB molecule and the capacity to form a molecular complex with

ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol.

Monomeric state of AmB is the most effective with less toxicity due to its solubility in the aqueous medium. According to Nielsen et al. [16], the addition of  $\alpha$ -tocopherol to mixed micellar solutions increases their solubilization which may explain the better efficiency and stability of the combination of AmB and  $\alpha$ -tocopherol [30].

According to Gaboriau et al. [31], AmB promotes the formation of reactive oxygen species, such as hydroperoxides, conjugated dienes, and certain aldehydes. Formation of these molecules is the result of the oxidation reaction of lipids that are added to the primary and secondary products [32, 33]. According to Eymard and Genot [34], in the case of unstable products, such as hydroperoxides and conjugated dienes (i.e., primary products), these measurements do not allow the determination of the exact level of lipid oxidation. The reason is that these intermediate products are quickly broken down into secondary products. The main stable aldehyde formed is MDA which is recognized as a biomarker of lipid peroxidation.

Addition of the antioxidant molecules to the AmB reaction medium appears to be an effective approach to limit the spread of the lipid oxidation reaction and stabilize the AmB molecule in order to increase its activity against *C. albicans*. Results of this study are consistent with those of a study performed by Kovacic and Cooksy [35] who concluded that ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol form a stable and active complex with AmB to increase their antifungal activity.

### Conclusion

Addition of ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol to the reactive medium of AmB could provide an answer to the solubility, stability, and toxicity problems commonly encountered in chemotherapy. These advantages are due to the antioxidant power of the added molecules; they protect AmB against oxidative damage and retain its molecular stability.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the members of the microscopy laboratory in the Department of Physics and the Antifungal Antibiotics Laboratory: Physical Chemistry, Synthesis, and Biological Activity in the Department of Biology at the University of Tlemcen, for their assistance, availability of chemicals, and accessibility to analysis equipment. Moreover, they would like to express their gratitude to Pr. Boucif Belhachemi who reviewed the English of this article.

### Authors' contribution

M.H.B. participated in the design study, performed experiments, interpreted the data, and contributed to the final editing of the manuscript. S.B. contributed to all steps of the experimental aspect of the study and data analysis. Z.B and K.B. analyzed data and prepared the draft of the manuscript.

### Conflicts of interest

The authors declare that there was no conflict of interest regarding the publication of this article.

### Financial disclosure

This work was supported by the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria. The authors declare no financial interests related to the materials of this study.

### References

1. Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013; 73(9):919-34.
2. Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci*. 2008; 97(7):2405-25.
3. Liu M, Chen M, Yang Z. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. *Drug Deliv*. 2017; 24(1):1-9.
4. An M, Shen H, Cao Y, Zhang J, Cai Y, Wang R, et al. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 33(3):258-63.
5. Espada R, Valdespina S, Molero G, Dea MA, Ballesteros MP, Torrado JJ. Efficacy of alternative dosing regimens of poly-aggregated amphotericin B. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32(1):55-61.
6. Khan MA, Owais M. Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 58(1): 125-32.
7. Falci DR, da Rosa FB, Pasqualotto AC. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. *Mycoses*. 2015; 58(2):104-12.
8. Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Roman E, Sanchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(11):6627-38.
9. Ferreira GF, Baltazar Lde M, Santos JR, Monteiro AS, Fraga LA, Resende-Stoianoff MA, et al. The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(8):1801-11.
10. Belhachemi MH, Boucherit K, Boucherit-Otmani Z, Belmir S, Benbekhti Z. Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on the therapeutic index of amphotericin B. *J Mycol Med*. 2014; 24(4):e137-42.
11. Brajtburg J, Elberg S, Kobayashi GS, Medoff G. Effects of ascorbic acid on the antifungal action of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*. 1989; 24(3):333-7.
12. Belmir S, Boucherit K, Boucherit-Otmani Z, Belhachemi MH. Effect of aqueous extract of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) on therapeutic index of amphotericin B. *Phytothérapie*. 2015; 14(2):97-101.
13. Boucherit Z, Seksek O, Bolard J. Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. *Med Mycol*. 2007; 45(6):525-33.
14. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST definitive document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(4):398-405.
15. Kubo I, Himejima M. Potentiation of antifungal activity of sesquiterpene dialdehydes against *Candida albicans* and two other fungi. *Experientia*. 1992; 48(11-12):1162-4.
16. Nielsen P, Müllertz A, Norling T, Kristensen H. The effect of  $\alpha$ -tocopherol on the in vitro solubilisation of lipophilic drugs. *Int J Pharm*. 2001; 222(2):217-24.
17. Klepser ME, Wolfe EJ, Jones RN, Nightingale CH, Pfaffer MA. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and

- amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(6):1392-5.
18. Juliano C, Marchetti M, Campagna P, Usai M. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Helichrysum microphyllum* Cambess. subsp. *tyrrhenicum* Bacch., Brullo & Giusso collected in South-West Sardinia. *Saudi J Biol Sci.* 2019; 26(5):897-905.
  19. Bennansour W, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K. Dormancy of *Candida albicans* ATCC10231 in the presence of amphotericin B. Investigation using the scanning electron microscope (SEM). *J Mycol Med.* 2014; 24(3):e93-100.
  20. Sangetha S, Zuraini Z, Suryani S, Sasidharan S. In situ TEM and SEM studies on the antimicrobial activity and prevention of *Candida albicans* biofilm by *Cassia spectabilis* extract. *Micron.* 2009; 40(4):439-43.
  21. Alvarez C, Shin DH, Kwon GS. Reformulation of fungizone by PEG-DSPE micelles: deaggregation and detoxification of amphotericin B. *Pharm Res.* 2016; 33(9):2098-106.
  22. Jung SH, Lim DH, Jung SH, Lee JE, Jeong KS, Seong H, et al. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 37(3-4): 313-20.
  23. Sakana S, Tachibana Y. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chem.* 2006; 95(2):243-9.
  24. Andrews FA, Beggs WH, Sarosi GA. Influence of antioxidants on the bioactivity of amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1977; 11(4):615-8.
  25. Atmaca S, Çiçek R. Effects of ascorbic acid on amphotericin B and nystatine activities against *Candida albicans*. *Antimicrob Infect Dis Newslett.* 1996; 15(1):6-8.
  26. Beggs WH. Antioxidant-stabilized amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1983; 1(4):339-41.
  27. Baran R, Thomas L. Combination of fluconazole and alpha-tocopherol in the treatment of yellow nail syndrome. *J Drugs Dermatol.* 2009; 8(3):276-8.
  28. Biémont E. Spectroscopie moléculaire: Structures moléculaires et analyse spectrale. Rosny-sous-Bois, France: De Boeck Supérieur; 2008.
  29. Rouessac F, Rouessac A, Ourisson G. Analyse chimique (méthodes et techniques instrumentales modernes). France: Enseignement de la Chimie; 1998.
  30. Thomas S, Vieira CS, Hass MA, Lopes LB. Stability, cutaneous delivery, and antioxidant potential of a lipoic acid and alpha-tocopherol codrug incorporated in microemulsions. *J Pharm Sci.* 2014; 103(8):2530-8.
  31. Gaboriau F, Chéron M, Leroy L, Boland J. Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B. *Biophys Chem.* 1997; 66(1):1-12.
  32. Brajtburg J, Elberg S, Schwartz D, Vertut-Croquin A, Schlessinger D, Kobayashi G, et al. Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985; 27(2):172-6.
  33. Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis.* 1986; 154(1):76-83.
  34. Eymard S, Genot C. A modified xylenol orange method to evaluate formation of lipid hydroperoxides during storage and processing of small pelagic fish. *Eur J Lipid Sci and Technol.* 2003; 105(9):497-501.
  35. Kovacic P, Cooksy A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyenedrugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autooxidation, toxicity, and antifungal action. *Med Chem Commun.* 2012; 3(3):274-80.