

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

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

## Département Biologie

*Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et activité biologiques*

# MEMOIRE

Présenté par

**M<sup>elle</sup> Boufeldja Wafa**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme de MASTER**

En Biochimie appliquée

## Thème

**Détermination des CMI et SCMI de l'amphotéricine B modulée par son environnement physico-chimique envers les levures "*Candida spp*" isolées du CHU de Tlemcen**

Soutenu le 29/06/2016 devant le jury composé de :

Président	Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Encadreur	Sari-Belkharroubi Lamia	Mètre de conférences A	Université de Tlemcen
Examineur	Seddiki Sidi Mohammed Lahbib	Mètre de conférences A	Centre universitaire de Naâma
Invité	Lahfa Imane	Doctorante	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2015-2016

## **Remerciements**

Ce travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie synthèse et activité biologique (LapSab) sous la direction de madame Sari-Belkherroubi Lamia, Maître de conférences Classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Je la remercie pour son aide, ses précieux conseils et pour sa disponibilité.

Je tiens à remercier madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, Directeur du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique». Pour m'avoir accordé l'accès à son laboratoire et pour avoir accepté de présider le jury.

Je voudrais adresser mes remerciements à monsieur Seddiki Sidi Mohammed Lahbib Maître de conférences Classe A au Centre Universitaire de Naâma, pour avoir accepté de faire parti de ce jury.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire « LapSab », et en particulier Lahfa Imene, Ziane Hanane et Kherbouche Hanane pour leur aide continu tout au long du travail, je les félicite de leur esprit d'équipe et je leur souhaite une bonne continuation.

Pour n'oublier aucune personne, je formule mes sincères remerciements à tous les gens qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie,*

*A mes sœurs*

*A tout ma famille.*

*Wafaà*

## Sommaire

<b>Première partie: Synthèse bibliographique</b> .....	2
<b>Deuxième partie : Matériel et méthodes</b> .....	10
1. Matériel biologique .....	10
2. Préparation de la solution antifongique .....	10
3. Préparation de la solution de MgCl <sub>2</sub> .....	10
4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) .....	10
4.1 Préparation de l'inoculum .....	11
4.2. Préparation de la microplaque .....	11
5. Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI) .....	11
5.1. Préparation de l'inoculum .....	11
5.2. Formation de biofilms.....	12
5.3. Test antifongique .....	12
5.4. Test de réduction au XTT .....	12
<b>Troisième partie : Résultats et discussion</b> .....	15
1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des cellules planctoniques (CMI).....	15
1.1 Effet du préchauffage de la solution antifongique sur les CMI.....	15
1.2 Effet de l'addition du chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> ) sur les CMI. ....	17
1.3 Effet du préchauffage et de l'addition de MgCl <sub>2</sub> sur les CMI. ....	19
2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI).....	21
2.1 Effet du préchauffage de la solution antifongique sur les SCMI.....	21
2.2 Effet de l'addition de chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> ) sur les SCMI.....	23
2.3 Effet du préchauffage et de l'addition de MgCl <sub>2</sub> sur les SCMI.....	25

<b>Quatrième partie: Conclusion générale .....</b>	<b>28</b>
<b>Cinquième partie : Références bibliographiques.....</b>	<b>30</b>

L'augmentation du nombre d'immunodéficients au cours de ces dernières décennies a créé un terrain favorable au développement des infections fongiques (**Pappas et coll., 2015**). Le taux de mortalité dû à ces infections est très important (40 à 60%) (**Massou, 2013**).

Ces infections sont déterminées par deux types de micro-organismes, les champignons filamenteux et les levures. *Candida albicans* est l'espèce la plus fréquente dans les infections invasives quelle que soit la zone géographique, elle est responsable de 53% des mycoses systémiques en Europe [(**Toubas, 2013**) ; (**Pihet et Marot, 2013**)]. Cependant nous observons en Algérie l'émergence d'espèces non *albicans* tel que *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, et *Candida Krusei*. Ces dernières ont été isolées de différents dispositifs médicaux [(**Seddiki et coll., 2013**) ; (**Seghir et coll., 2014**)]. D'un autre côté, les candidoses acquises liées à l'implantation des cathéters occupent la quatrième place des infections nosocomiales (**Lortholary et coll., 2011**). Elles sont redoutables en raison de l'absence d'antifongiques efficaces et non toxiques d'une part. D'autre part, en raison de la résistance des levures aux agents antifongiques habituellement utilisés en milieu hospitalier (**Dannaoui, 2013**). Cette résistance est généralement liée à la capacité de ces levures à former des biofilms, qui sont des structures vivantes dynamiques, fixées à une surface vivante ou inerte par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice (**Espinasse et coll., 2010**).

Le biofilm est composé d'un réseau matriciel polysaccharidique excrété par les microorganismes et dans lequel ces derniers vont vivre en communauté (**Poissy, 2015**).

Le biofilm qui abrite *Candida albicans* se compose d'un réseau dense des levures et des formes filamenteuses (hyphes et pseudohyphes) (**Alem et coll., 2006**).

Il a été montré que les biofilms à *Candida* réduisent considérablement leur sensibilité aux différents antifongiques [(**Mathé et Van Dijck, 2013**) ; (**Seddiki et coll., 2013**) ; (**Mazari et coll., 2015**)]. En effet les cellules sessiles de *Candida albicans* sont plus résistantes au fluconazole ou à l'amphotéricine B, que les cellules planctoniques libres [(**Boucherit-Otmani et coll., 2011**) ; (**Uppuluri et coll., 2011**)].

Cependant, ces cellules planctoniques acquièrent des résistances envers les différents antifongiques mis sur le marché alors qu'ils restent toujours sensibles à l'amphotéricine B.

Or malgré que, l'amphotéricine B soit le traitement de référence des mycoses systémiques, son importante toxicité envers les cellules animales limite son utilisation, ce qui nécessite d'améliorer l'indexe thérapeutique de cette drogue (**Alanio et coll., 2014**). Dans ce cadre là, plusieurs stratégies de recherche ont été mises en œuvre. Il y a celles qui sont basées sur les modifications chimiques de la structure du macrolide [(**Szlinder-Richert et coll., 2004**); (**Hac- Wydro et coll., 2005**)]. D'autres qui associent l'antifongique aux agents solubilisants tels que les tensioactifs non ioniques, les lipides, les émulsions, les copolymères et les nanoparticules (**Sanchez et coll., 2014**). Et enfin celles qui modulent son environnement physico-chimique tels que la concentration de la solution mère, la température, le taux d'oxygène et la force ionique [(**Espada et coll., 2008**); (**Belkherroubi-Sari L, 2009**); (**Boucherit et coll., 2011**)].

Rappelons que l'amphotéricine B (AmB), chef de file des antifongiques polyéniques, appartient à la famille des macrolides non aromatiques (Tableau N°1). Elle est produite naturellement par fermentation d'un actinomycète tellurique, le *Streptomyces nodosus* (**Yasuda, 2001**).

**Tableau N°1 : Propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B (Grillot et Lebeau, 1999).**

<b>Formule empirique</b>	$C_{47}H_{73}NO_{17}$
<b>Masse moléculaire</b>	924 g/mole
<b>Solubilité</b>	- Poudre jaune, insoluble dans l'eau et peu soluble dans les alcools - Soluble dans les solvants organiques tels que le diméthyl sulfoxyde (DMSO)
<b>Stabilité</b>	Suspension colloïdale : -Stable seulement à + 4° C durant 24h -Dégradée par la lumière -Incompatibilité physique avec tous les solutés autres que le sérum glucose à 5%

Sa structure (figure N°1) comporte une partie polaire et une partie apolaire qui confèrent à la molécule le caractère amphiphile. La présence des groupes  $\text{NH}_2$  et  $\text{COOH}$  lui donne son caractère amphotère (Neumann et coll., 2013).

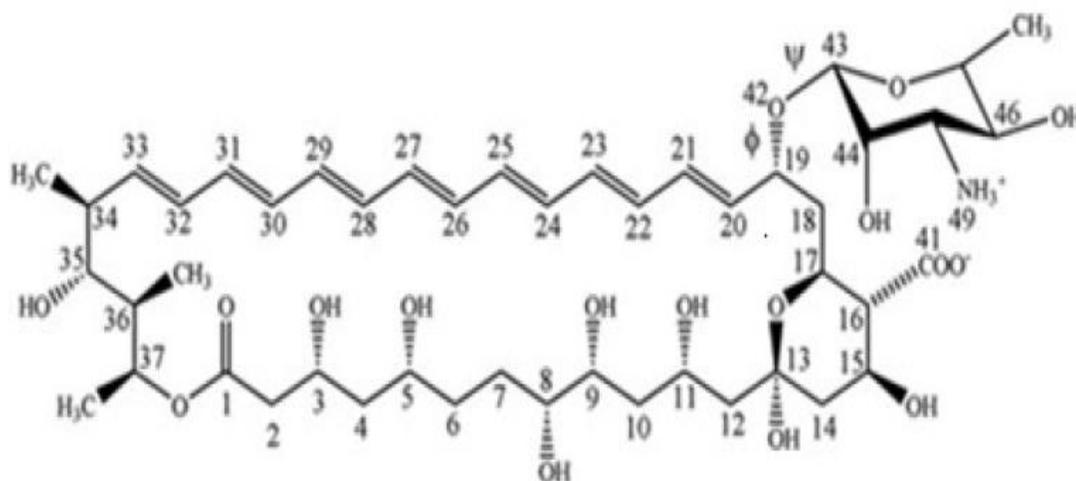


Figure N °1: Structure de l'amphotéricine B (Gagos et Arczewska, 2010).

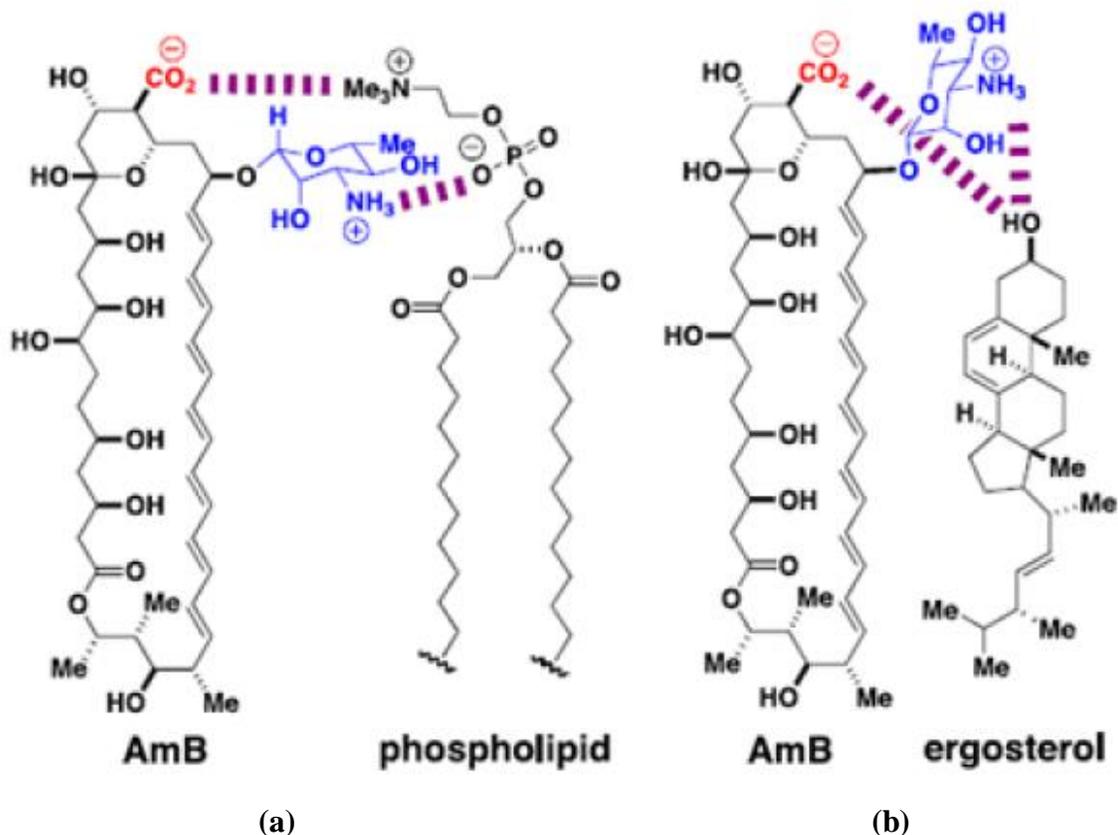
L'amphotéricine B interagit avec les cellules en se liant aux stérols membranaires ce qui perturbe l'organisation phasique des lipides et la perméabilité membranaires induisant ainsi la fuite des ions potassium ( $\text{K}^+$ ), des protons ( $\text{H}^+$ ) et des métabolites de petites tailles ce qui induit une lyse suivie de la mort cellulaire (Morales- Nava et coll., 2013).

La formation des canaux ioniques est un processus très rapide qui se prouduit en milisecondes selon un modèle dans lequel les molécules d'amphotéricine B sont entourées par les stérols membranaires (Romero et coll., 2009).

Deux types de pores se forment successivement lorsque la concentration en amphotéricine B augmente, le premier est perméable uniquement aux cations monovalents (Romero et coll., 2009). En revanche, le deuxième est perméable aux anions et aux grands électrolytes, comme le glucose (Cohen, 1992).

La formation des canaux transmembranaires dépend non seulement de la composition en lipides et en protéines membranaires mais aussi des liaisons phospholipides/AmB qui se forment par interaction entre le groupement  $\text{NH}_3^+$  de l'AmB et le groupement  $\text{PO}_4^-$  des phospholipides (figureN° 2a) [(Matsuoka et coll., 2003); (Mouri et coll., 2008)].

Les complexes stérol/AmB (figure N°2b) formés par le biais des liaisons hydrogènes entre le 3-β hydroxyle du stérol et le groupement NH<sub>2</sub> de l'AmB sont stabilisés par des interactions Van Der Waals entre le chromophore de l'AmB et la partie lipophile du stérol ainsi que par des forces de Colomb [(Barane *coll.*,2009); (Palacios et *coll.*,2011)].



**Figure N°2 :** Les différentes interactions chimiques entre la molécule d'amphotéricine B et les lipides membranaires (Palacios et *coll.*, 2011).

Cependant la sélectivité de l'amphotéricine B pour la cellule fongique est due à une affinité plus importante pour l'ergostérol que pour le cholestérol qui est liée aux propriétés structurales des deux stérols (Matsumori et *coll.*,2004). En effet, la présence de doubles liaisons supplémentaires au niveau de l'ergostérol, une dans le noyau stéroïdien en C<sub>7-8</sub> et une autre dans la chaîne alkyle en C<sub>22-23</sub>, augmente la densité d'électrons et diminue la flexibilité membranaire [(Baran et *coll.*,2009) ; (Mannock et *coll.*,2010)].

Outre la formation des pores transmembranaires, l'amphotéricine B agit sur la cellule à plusieurs niveaux (figure N°3). Elle induit la formation des radicaux libres d'O<sub>2</sub> responsables des peroxydations lipidiques et de la lyse cellulaires, augmente la concentration du calcium intracellulaire dans les cellules fongiques et inhibe l'action de l'ATPase à protons des cellules fongiques et l'ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> des cellules animales ainsi que la pénétration du phosphore minérale dans les cellules [(Sangalli- Leite et coll.,2011); (Gray et coll.,2012)]. Elle peut également altérer les protéines, les acides nucléiques et quelques organites entraînant ainsi la mort cellulaire (Mowat et coll.,2008).

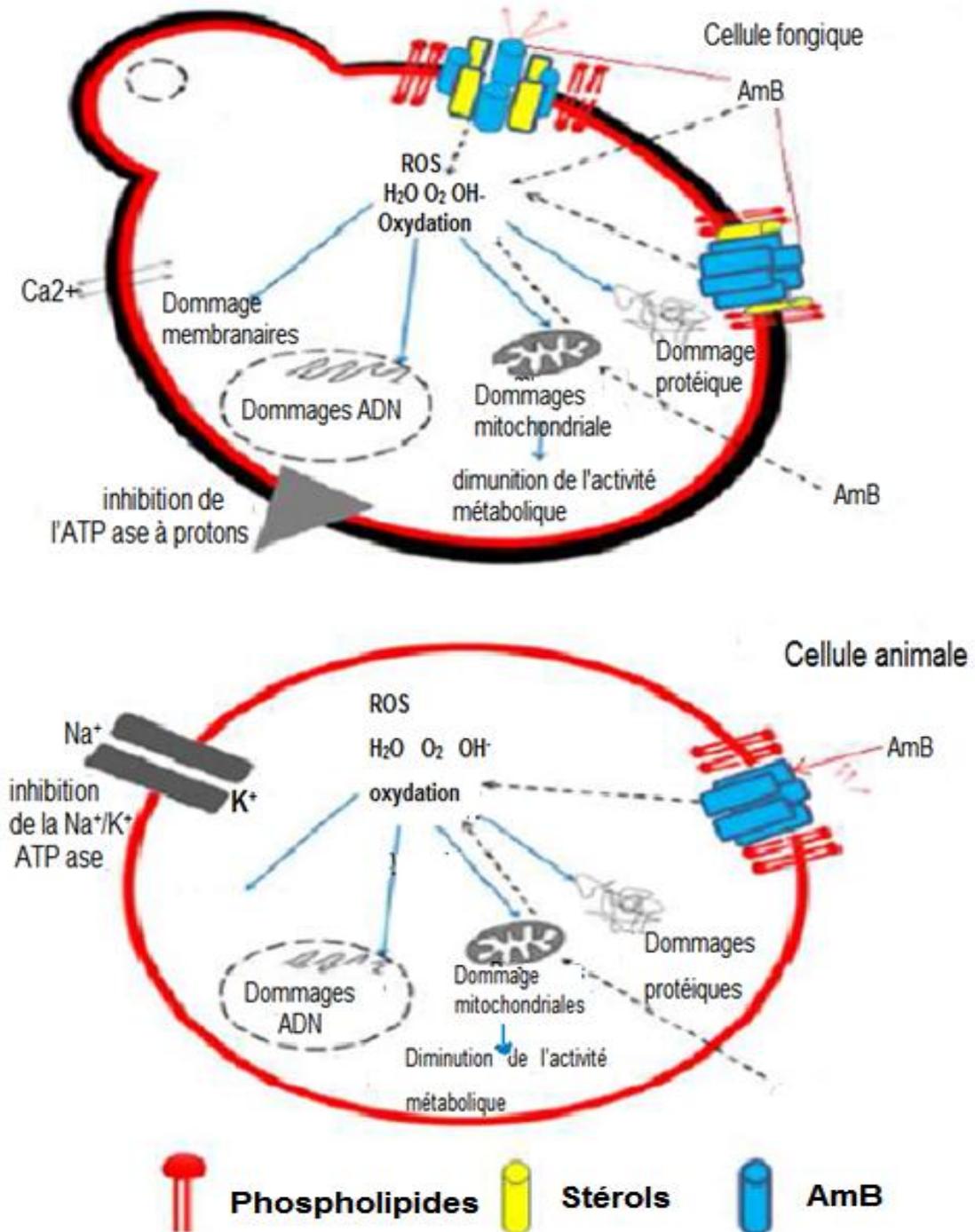


Figure N°3: Mécanismes d'action de l'amphotéricine B (Mesa et coll.,2012).

Au sein de notre laboratoire « antibiotiques antifongiques physicochimie synthèse et activité biologique » différentes formulations de l'amphotéricine B basées sur la modulation de son environnement physicochimique ont été préparées afin d'augmenter son index thérapeutique. Parmi elles, l'environnement ionique qui permet la modulation de la toxicité sélective de l'antifongique. En effet, une importante réduction de la toxicité de l'amphotéricine B envers les globules rouges est observée en présence de  $MgCl_2$  (**Boucherit et coll., 2011**). De plus divers travaux ont montré une importante réduction de la toxicité cellulaire lorsque l'on préchauffe la solution d'amphotéricine B à 70°C pendant 20minutes [(**Gaboriau et coll., 1998**), (**Petit et coll., 1998**)].

A partir de l'ensemble de ces travaux de recherche et afin de voir si ces formulations qui ont permis une augmentation de l'index thérapeutique de l'antifongique, sont plus efficaces que la solution d'amphotéricine B seule sur les cellules sessiles formant le biofilm fongique, nous avons déterminé les concentrations minimales inhibitrices planctoniques (CMI) et les concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI) de cette formulation envers les levures du genre *Candida sp* isolées des différents dispositifs médicaux du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen.

Ce travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physicochimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

### **1. Matériel biologique**

Nous avons utilisé une collection de souches de notre laboratoire. Ce sont des levures *Candida albicans* isolées d'endoscopes prélevés du CHU de Tlemcen. Ainsi qu'une souche de référence *C. albicans* ATCC10231. Ces souches sont maintenues par repiquages successifs sur gélose sabouraud et conservées à 4°C.

### **2. Préparation de la solution antifongique**

Nous avons utilisé de l'amphotéricine B pure provenant des laboratoires Sigma- Aldrich. La solution antifongique est préparée en extemporané dans du Diméthyl sulfoxide (DMSO) à une concentration de 1600 µg/mL.

La solution mère de l'amphotéricine B est divisée en deux :

- Une partie est maintenue à température ambiante avant son utilisation.
- L'autre partie est préchauffée 20 minutes à 70°C avant son utilisation.

Les concentrations finales en antifongique dans chaque puits sont comprises entre 0,03 et 16 µg/mL.

### **3. Préparation de la solution de MgCl<sub>2</sub> :**

A partir d'une solution mère de MgCl<sub>2</sub> (1M) nous avons préparé une solution fille par dilution dans le milieu RPMI. La concentration finale de MgCl<sub>2</sub> dans chaque puits de la microplaque est de 10 mM.

### **4. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI)**

Nous avons utilisé la méthode décrite par the *Clinical and Laboratory Standards Institute* M27- A3 (CLSI). C'est la méthode de référence qui permet de déterminer les CMI en antifongique.

Le milieu de culture préconisé pour cette technique est le bouillon RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institut) (Sigma). Ce milieu est tamponné à pH 7. C'est un milieu enrichi supplémenté en acide aminé, qui permet une meilleure croissance des levures.

### **4.1. Préparation de l'inoculum :**

A partir d'une culture jeune (16 à 18h) de *Candida albicans* en boîte sur milieu sabouraud gélose, nous avons prélevé quelques colonies et nous avons placée dans un tube à vice contenant 1mL d'eau physiologique stérile. L'inoculum est utilisé à une concentration finale allant de  $0,5 \times 10^3$  à  $2,5 \times 10^3$  cellules/mL.

### **4.2. Préparation de la microplaque:**

Pour étudier l'effet de  $MgCl_2$  (10mM) sur l'efficacité de l'amphotéricine B, nous avons déposé dans chaque puits de la microplaque 50 $\mu$ L de la solution antifongique (l'AmB préparée à température ambiante ou bien l'AmB préchauffée 20 min à 70°C) et 50 $\mu$ L de la solution de  $MgCl_2$  puis nous avons ajoutés 100 $\mu$ L de la suspension de levure dans chaque puits.

En parallèle, un témoin négatif et un témoin positif sont préparés. Le témoin négatif correspond à une incubation de 200 $\mu$ L de milieu de culture (RPMI) en absence de levures, alors que le témoin positif consiste à incuber 200 $\mu$ L de l'inoculum en l'absence d'agent antifongique. Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 35°C pendant 48 heures. Les CMI sont déterminées à l'œil nu.

Les tests sont réalisés en triplicata pour chaque souche.

## **5. Evaluation des Concentrations Minimales Inhibitrices Sessiles (SCMI) :**

Nous avons utilisés le protocole, décrit par Pierce et collaborateurs (2008), qui permet de mesurer l'activité métabolique des cellules sessiles après leurs expositions aux agents antifongiques. Cette méthode, précise et reproductible, est basée sur la réduction du tétrazolium.

### **5.1. Préparation de l'inoculum**

20 mL de précultures dans le milieu Sabouraud liquide sont réalisées à partir des souches de levures. Après 16 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130tours/minutes, la suspension est centrifugée à 3000g pendant 5 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec du PBS stérile (tampon phosphate salé) à pH 7,4 (0,1M) puis suspendu de nouveau dans le milieu de culture choisi pour former le biofilm (RPMI 1640 tamponné à pH 7) à raison de  $10^6$  cellules/mL.

La détermination des SCMI se déroule en trois étapes successives, la formation des biofilms, le test antifongique et le test de réduction du tétrazolium.

### **5.2. Formation de biofilms**

Les biofilms sont cultivés dans les puits des microplaques stériles, l'ensemencement des puits est réalisé après ajustement de la concentration cellulaire de départ à  $10^6$  cellules/mL. Après addition de 100  $\mu$ L de l'inoculum dans chaque puits, la microplaque est scellée puis placée dans une étuve à 37°C pendant 48 heures.

### **5.3. Test antifongique**

A l'aide d'une micropipette, le surnageant est aspiré soigneusement des puits pour éviter la destruction des biofilms formés.

Les puits sont ensuite rincés deux fois avec 200  $\mu$ L de PBS stérile afin d'éliminer les cellules planctoniques et les cellules non adhérentes aux surfaces des puits.

Un égouttage de la microplaque est réalisé en l'inversant. Le liquide résiduel du PBS est écarté en la tamponnant sur des serviettes stériles en papier buvard.

100  $\mu$ L du milieu RPMI 1640 sont ajoutées dans chaque puits de la microplaque. Ensuite nous avons incorporé 50  $\mu$ L de la solution d'amphotéricine B (préparée à température ambiante ou bien préchauffée 20 min à 70°C) et 50  $\mu$ L de la solution de  $MgCl_2$  à une concentration finale de 10mM.

En parallèle, un témoin négatif et un témoin positif sont préparés. Le témoin négatif correspond à une incubation du milieu de culture en l'absence de levures, alors que le témoin positif consiste à incuber les levures en l'absence d'agent antifongique.

Les microplaques sont convenablement scellées et incubées pendant 24h à 37°C. Après incubation, un lavage des puits à l'aide du PBS est réalisé comme décrit précédemment et la microplaque est prête au test de réduction du tétrazolium.

### **5.4. Test de réduction au XTT**

Le XTT est converti en formazane par une enzyme (déshydrogénase mitochondriale des levures) qui est un produit de couleur orange soluble dans l'eau. Le formazane peut être quantifié par un lecteur de microplaque. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de cellules viables.

La solution mère de XTT (0,5 mg/mL) a été préparée en dissolvant 5mg de XTT dans 10mL de PBS préchauffé à 25°C (au bain marie).

La solution mère de ménadione (Sigma- Aldrich) à 10mM a été préparée en dissolvant 0,0017g de ménadione dans 1mL d'acétone. Le ménadione joue un rôle de catalyseur et accélère la réaction précédant le test. Puis 10 mL de la solution mère du XTT est additionnée de 1 $\mu$ L de ménadione.

La solution XTT- ménadione a été stérilisée à travers un filtre poreux de diamètre de 0,22 $\mu$ m.

Le XTT est sensible à la lumière, et de ce fait, les tests ont été effectués dans l'obscurité.

Dans chaque puits de la microplaque, 100 $\mu$ L de la solution XTT/ ménadione sont ajoutés (y compris le contrôle positif et le contrôle négatif).

Les microplaques sont, ensuite, recouvertes avec du papier aluminium stériles puis placées dans une étuve à 37°C pendant 2 à 3 heures.

À ce stade, le tétrazolium est converti en formazane par les cellules viables. Après l'incubation des microplaques, 75 $\mu$ L du contenu de chaque puits sont transférés dans une nouvelle microplaque stérile. Celle-ci est placée dans un lecteur de microplaques pour mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 490 nm.

Depuis l'apparition de l'amphotéricine B en 1955, dont l'importante toxicité limite son utilisation en clinique, cette molécule reste l'antifongique de choix car très peu de cas de résistance sont observées (O'Shaughnessy et coll., 2009).

Plusieurs solutions ont été proposées, parmi elles le préchauffage de l'antifongique ou l'addition de  $MgCl_2$ , qui réduisent fortement cette toxicité cellulaire [(Gaboriau et coll., 1997) ; (Boucherit et coll., 2011)].

C'est pourquoi nous avons entrepris cette étude qui a pour objectif de déterminer les CMI et SCMI de ces nouvelles formulations d'AmB envers une collection de souches de *C.albicans*.

### **1. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des cellules planctoniques (CMI).**

#### **1.1.Effet du préchauffage de la solution antifongique sur les CMI.**

Dans un premier temps nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice en AmB préparée à température ambiante vis-à-vis de notre collection de souches. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°4.

Nous remarquons que pour 2 souches de *C. albicans* (S6 et S7) la CMI est de 0,25 $\mu$ g/mL, et pour 5 souches (S1 à S5) la CMI est de 0,5 $\mu$ g/mL. Cette dernière est identique à celle observée pour la souche de référence ATCC10231. Enfin, pour 3 souches de *C. albicans*, nous observons une CMI de 1 $\mu$ g/mL.

Dans un second temps, nous avons déterminé la concentration minimale inhibitrice en AmB préchauffée 20 minutes à 70°C vis-à-vis de nos souches. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°4. Nous remarquons que pour chaque souche de levure étudiée, la CMI en AmB non préchauffée est identique à la CMI en AmB préchauffée 20 minutes à 70°C. Les CMI sont comprises entre 0,25 $\mu$ g/mL et 1 $\mu$ g/mL aussi bien avec la solution antifongique préchauffée que non préchauffé.

D'après nos résultats le préchauffage de l'amphotéricine B à 70°C pendant 20 min ne modifie pas les CMI pour les levures *C. albicans*.

De plus les CMI que nous avons obtenus restent dans l'intervalle de sensibilité établies par Hammond en 1977 et les normes du CLSI (2008). Par conséquent, le préchauffage de l'amphotéricine B à 70°C pendant 20 min diminue fortement la toxicité cellulaire de l'antifongique.

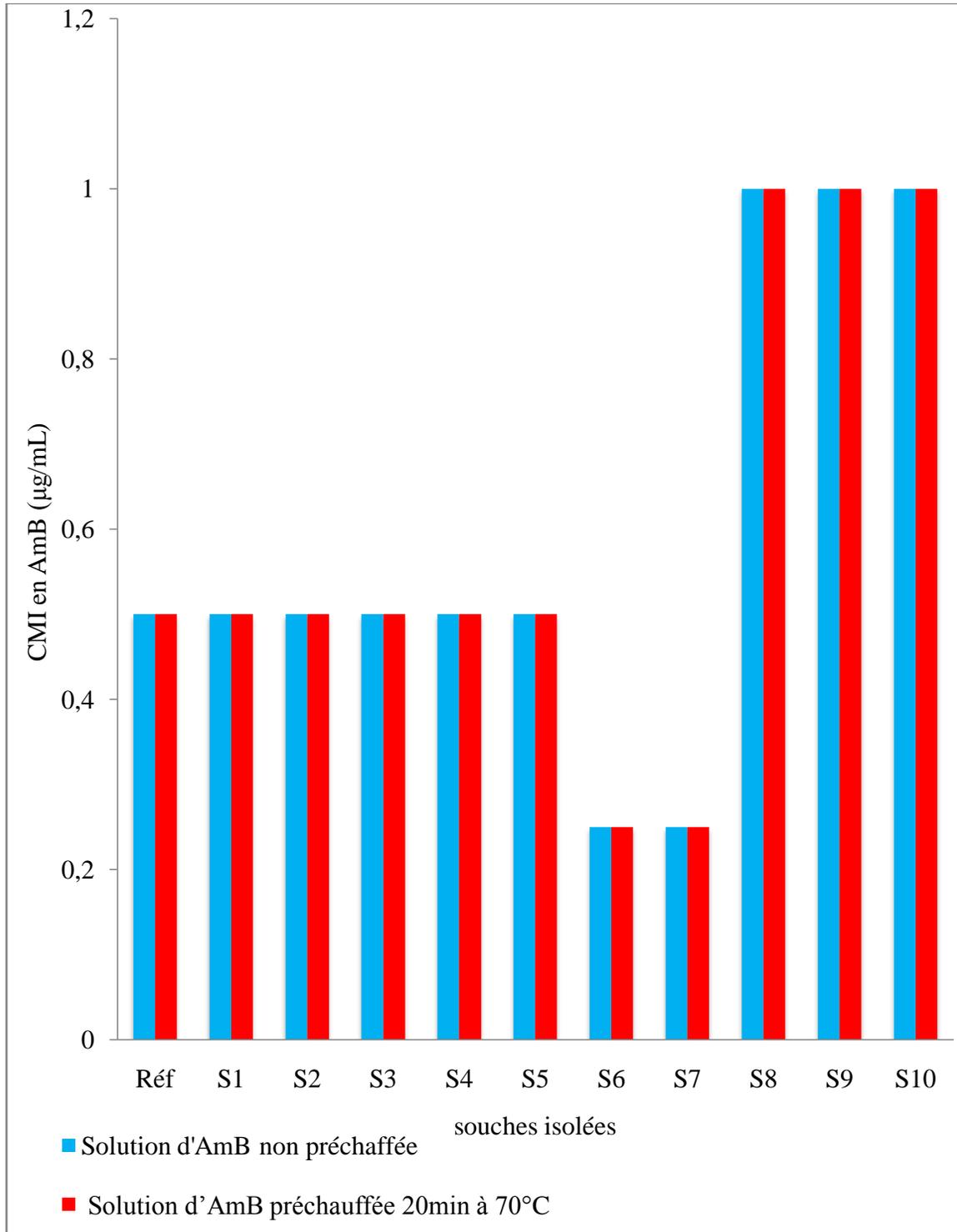


Figure N°4 : Effet du préchauffage de la solution antifongique sur les concentrations minimales inhibitrices vis-à-vis de *Candida albicans*.

S1 - S10 → des levures *Candida albicans* isolée du CHU de Tlemcen.

Réf → *Candida albicans* ATCC 10231.

### **1.2.Effet de l'addition du chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) sur les CMI.**

La figure N°5 regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'addition du MgCl<sub>2</sub> sur les CMI en amphotéricine B vis-à-vis des levures *Candida albicans*.

Les CMI en AmB non préchauffée et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub> sont de 0,25µg/mL pour 2 souches de levures (S6 etS7), de 0,5µg/mL pour 5 souches (S1 à S5) et de 1µg/mL pour 3 souches de *C. albicans*( S8-S10).

Nous remarquons que pour chaque souche de levure étudiée, la CMI en AmB non préchauffée est identique à la CMI en AmB non préchauffée et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub>. Les CMI sont comprises entre 0,25µg/mL et 1µg/mL. Par conséquent l'addition de MgCl<sub>2</sub> à 10 mM à la solution antifongique ne modifie pas la CMI envers les levures.

Ces résultats vont dans le même sens que les travaux de Boucherit et *coll.* (2011) qui montrent que dans ces conditions expérimentales le MgCl<sub>2</sub>, réduit la toxicité envers les globules rouges alors que l'activité antifongique est maintenue.

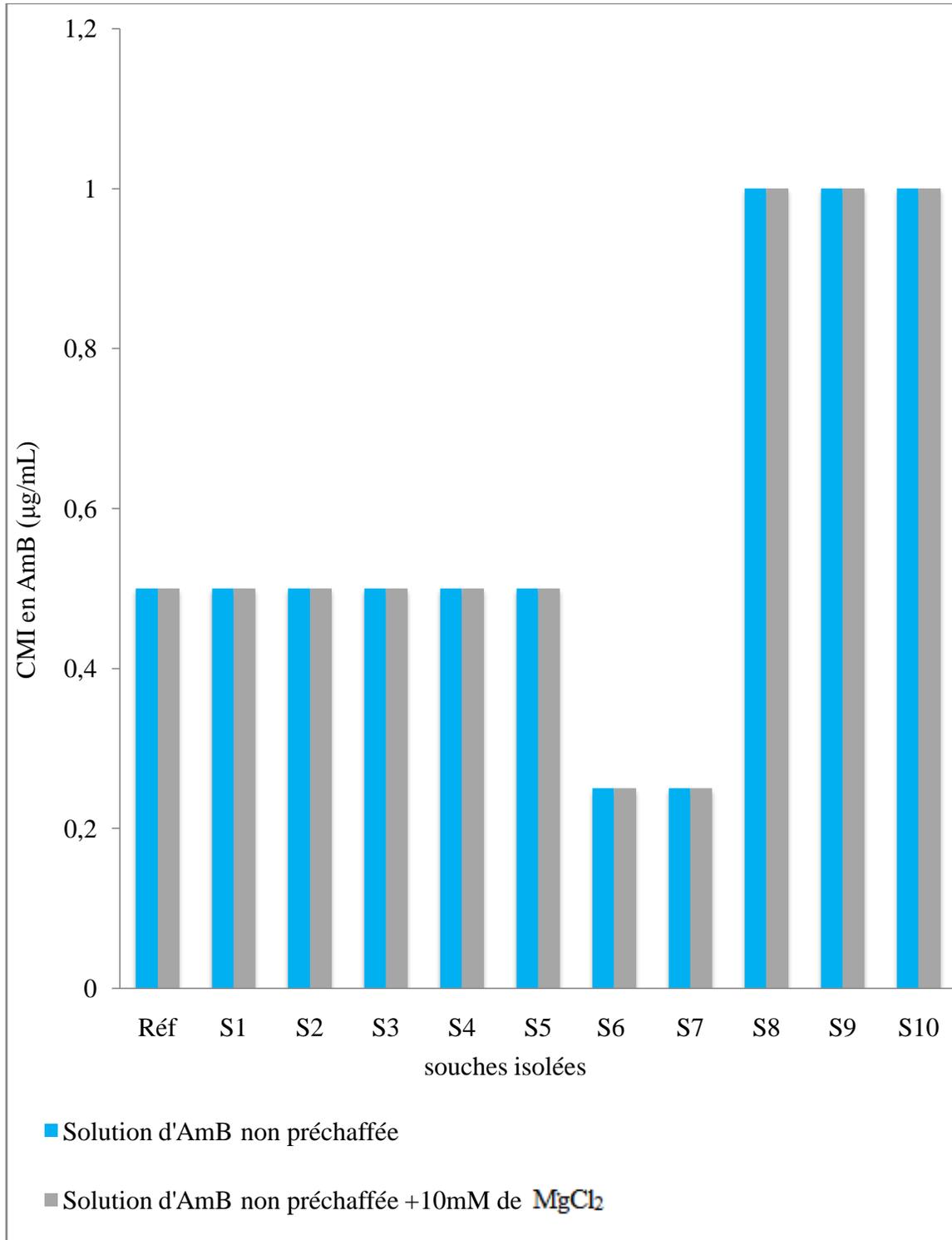


Figure N°5: Effet de l'addition du chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) sur les CMI vis-à-vis des levures *C. albicans*.

S1- S10 → des levures *Candida albicans* isolée du CHU de Tlemcen.

Réf → *Candida albicans* ATCC 10231.

### 1.3. Effet du préchauffage et de l'addition de MgCl<sub>2</sub> sur les CMI.

La Figure N°6 regroupe les résultats relatifs à l'effet du préchauffage et de l'addition de MgCl<sub>2</sub> (10mM) sur les concentrations minimales inhibitrices en AmB vis-à-vis des levures *Candida albicans*.

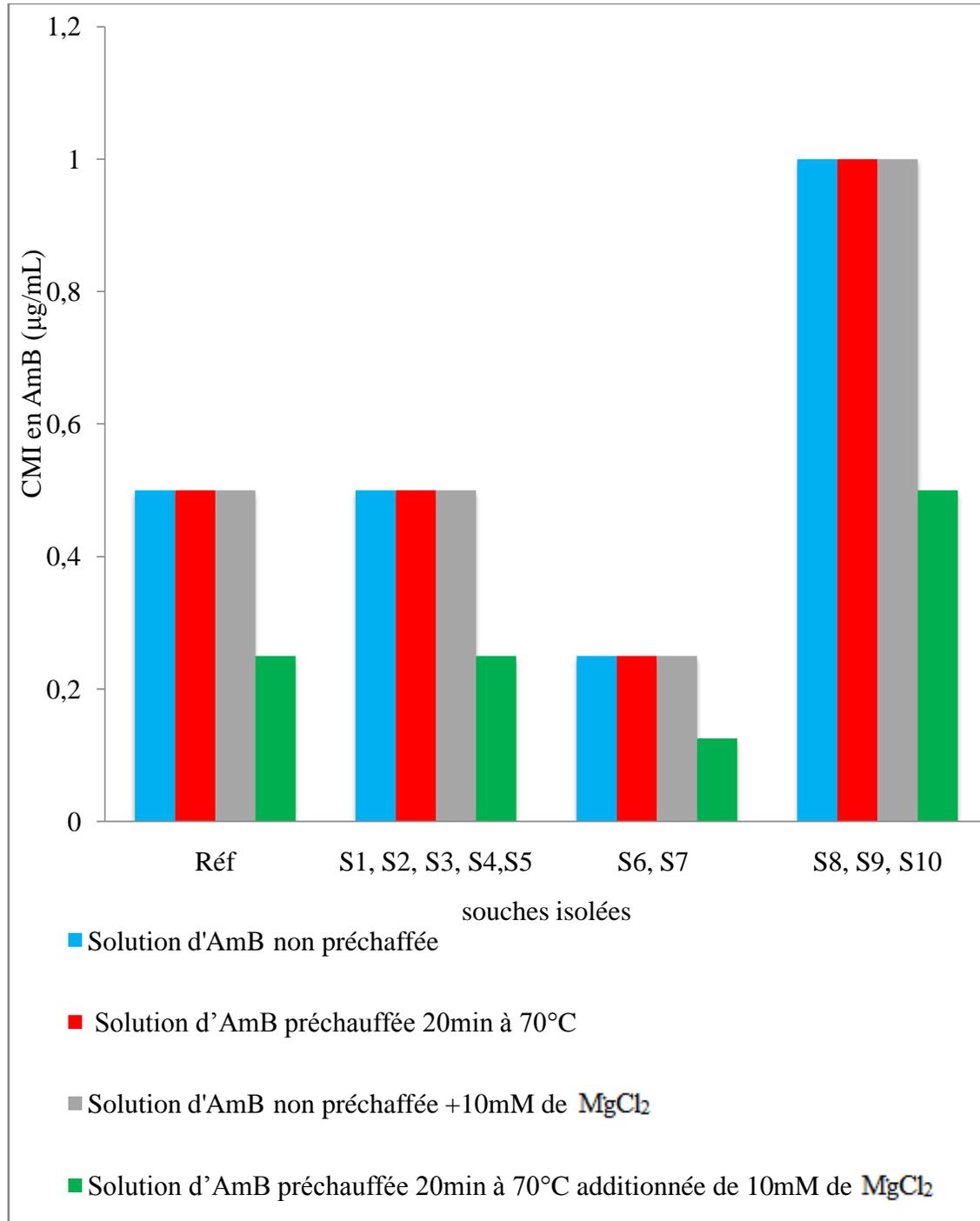
Pour 2 souches (S6 et S7) de *C. albicans* la CMI en AmB préchauffée à 70°C pendant 20minutes et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub> est de 0,125µg/mL alors qu'elle est de 0,25µg/mL avec la solution antifongique non préchauffée et additionnée de sel.

Pour 5 souches (S1 à S5) ainsi que pour la souche de référence *C. albicans* ATCC10231, la CMI en AmB préchauffée à 70°C pendant 20minutes et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub> est de 0,25µg/mL alors qu'elle est de 0,5µg/mL pour ces mêmes souches avec la solution antifongique non préchauffée et additionnée de sel.

Enfin, pour 3 souches de *C. albicans* (S8 à S10), nous observons une CMI de 0,5µg/mL en AmB préchauffée à 70°C pendant 20minutes et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub>, alors que la CMI en AmB non préchauffée et additionnée de sel est de 1µg/mL.

D'après les résultats obtenus, l'addition de 10mM de MgCl<sub>2</sub> à la solution d'AmB préchauffée 20minutes à 70°C permet de réduire de moitié la CMI envers les souches de levures étudiées.

Il semblerait que l'action combinée du préchauffage et du sel MgCl<sub>2</sub> permet de réduire la CMI de moitié ce qui implique une augmentation de l'efficacité antifongique.



**Figure N°6: Effet du préchauffage et de l'addition de MgCl<sub>2</sub> sur les CMI vis-à-vis les levures *Candida albicans*.**

S1- S10 → des levures *Candida albicans* isolée du CHU de Tlemcen.

Réf → *Candida albicans* ATCC 10231.

### 2. Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices des cellules Sessiles (SCMI) :

#### 2.1. Effet du préchauffage de la solution antifongique sur les SCMI.

Nous avons déterminé la SCMI<sub>80</sub> en AmB préparée à température ambiante vis-à-vis de notre collection de souches. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°7.

Nous remarquons que pour 7 souches de *C. albicans* (S1 à S7), la SCMI<sub>80</sub> est de 4µg/mL. Cette dernière est identique à celle observée pour la souche de référence ATCC10231.

Pour les 3 souches (S8 à S10), la SCMI<sub>80</sub> est de 8µg/mL.

Ensuite, nous avons déterminé SCMI<sub>80</sub> en AmB préchauffée 20minutes à 70°C vis-à-vis de nos souches. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°7. Nous remarquons que pour chaque souche de levure étudiée, la SCMI<sub>80</sub> en AmB non préchauffée est identique à la SCMI<sub>80</sub> en AmB préchauffée 20 minutes à 70°C. Les SCMI<sub>80</sub> sont comprises entre 4µg/mL et 8µg/mL aussi bien avec la solution antifongique préchauffée que non préchauffée. Par conséquent le préchauffage n'a aucun effet sur SCMI.

Les résultats de cette partie de notre travail montrent que les SCMI<sub>80</sub> de l'amphotéricine B sont nettement supérieures au CMI (figure N°7). Or selon Ramage et *coll.* (2001b), l'accroissement des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques témoigne de leur capacité à former des biofilms. Par conséquent toutes nos souches sont formatrices de biofilm.

D'autre part les SCMI<sub>80</sub> sont largement supérieur à l'intervalle de sensibilité. C'est-à-dire que les cellules sessiles sont plus résistantes à l'AmB que les cellules planctoniques. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Seddiki et *coll.* (2015), qui montrent que les cellules sessiles de *Candida sp* sont plus résistantes que leurs homologues planctoniques.

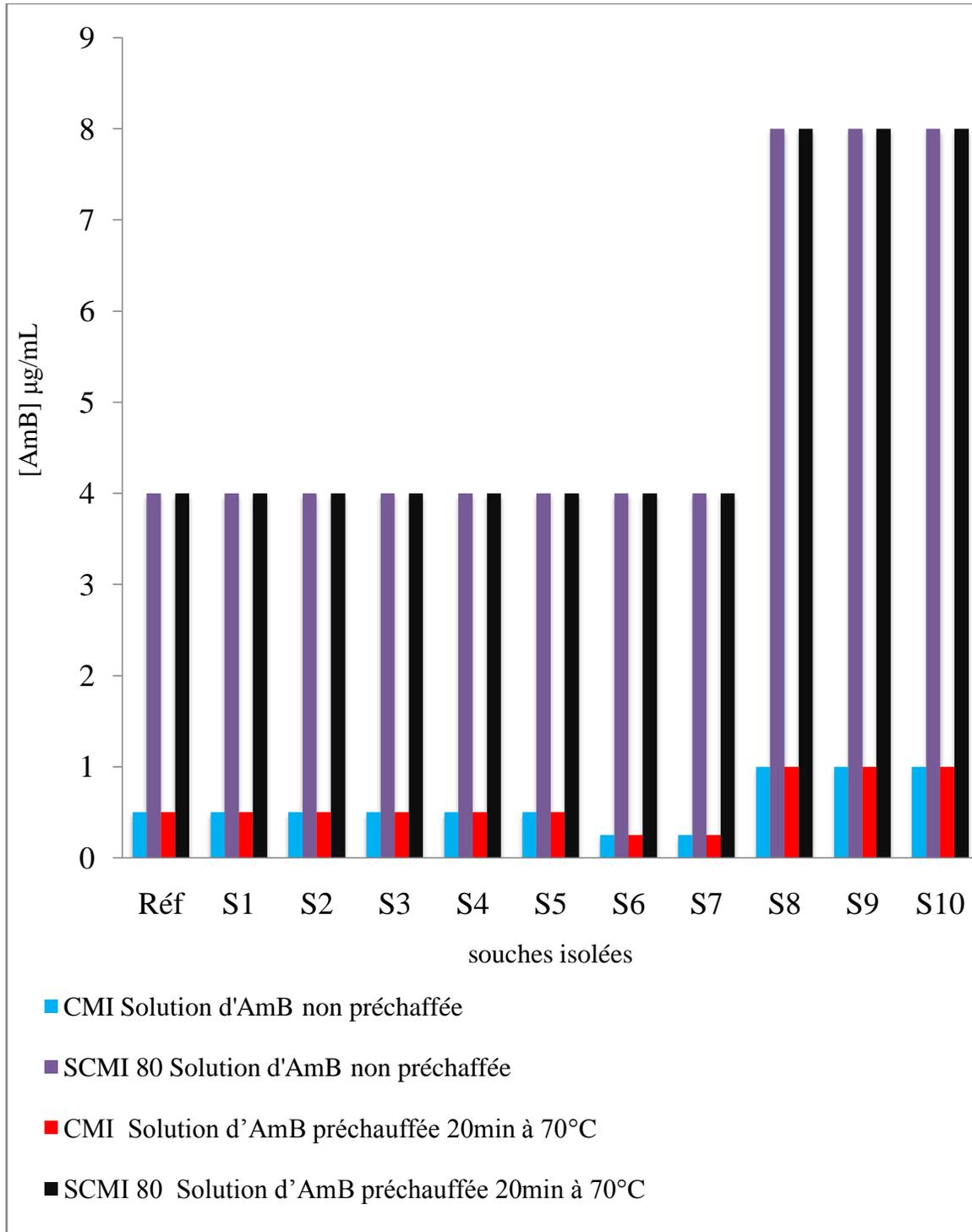


Figure N°7: Effet du préchauffage de la solution antifongique sur la SCMI<sub>80</sub> vis-à-vis de *Candida albicans*.

S1-S10 → des levures *Candida albicans* isolée du CHU de Tlemcen.

Réf → *Candida albicans* ATCC 10231.

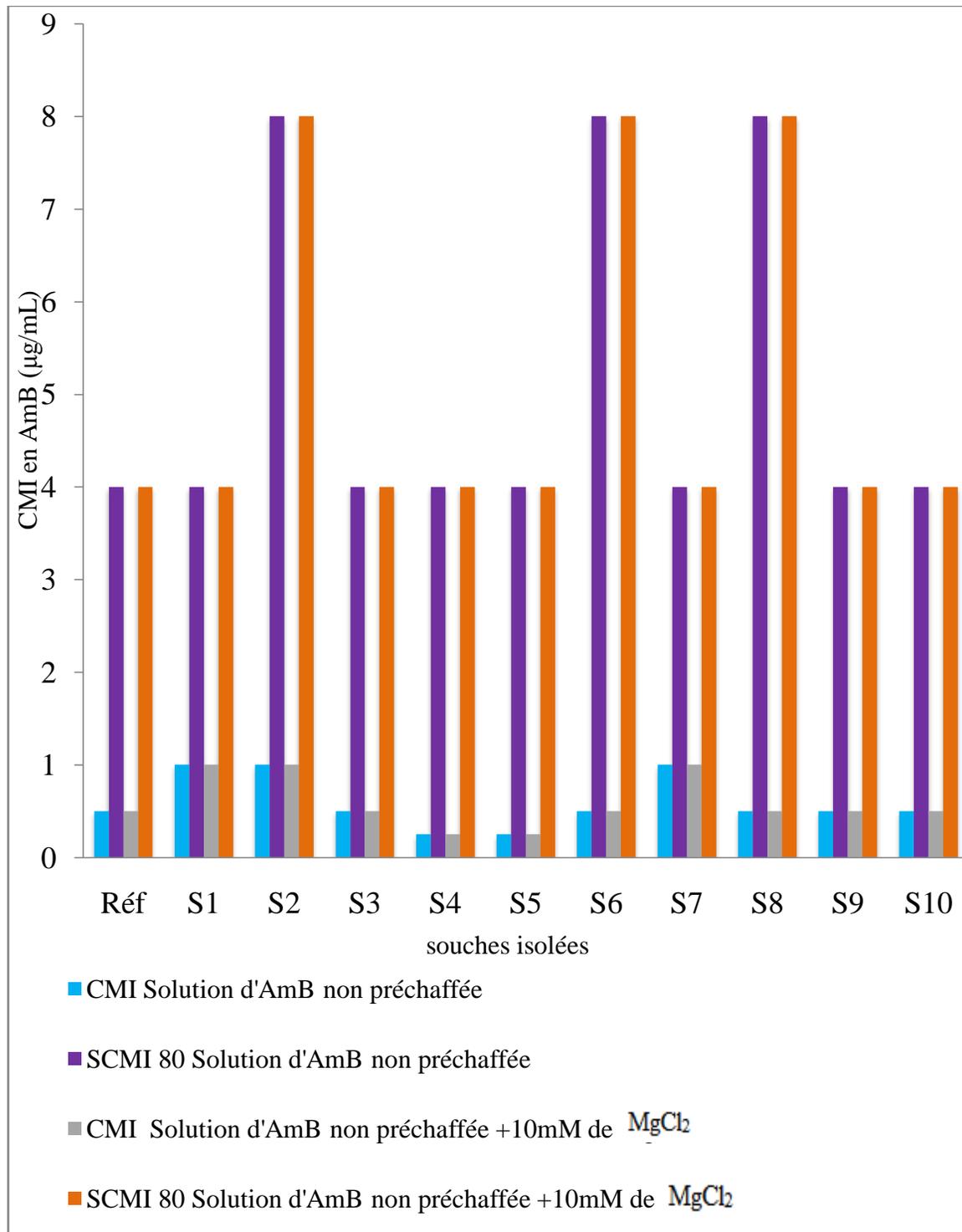
### **2.2. Effet de l'addition de chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) sur les SCMI :**

La figure N°8 regroupe les résultats relatifs à l'effet de l'addition du MgCl<sub>2</sub> sur les SCMI en amphotéricine B vis-à-vis des levures *Candida albicans*.

Les SCMI<sub>80</sub> en AmB non préchauffée et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub> sont de 4µg/mL pour 5 souches (S1 à S5). Cette dernière est identique à celle observée pour la souche de référence ATCC10231. Pour 3 souches (S8 à S10), la SCMI<sub>80</sub> est de 8µg/mL.

Nous remarquons que pour chaque souche de levure étudiée la SCMI<sub>80</sub> en AmB non préchauffée est identique à la SCMI<sub>80</sub> en AmB non préchauffée et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub>. Cela veut dire que l'addition de 10 mM de MgCl<sub>2</sub> ne modifie pas l'activité antifongique de l'AmB vis-à-vis les levures *Candida albicans*.

De plus d'après la figure N°8, nous remarquons un accroissement des concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles par apport à leur homologues planctoniques ce qui implique que même en présence de MgCl<sub>2</sub> les cellules sont toujours formatrices de biofilms.



**Figure N°8: Effet de l'addition du chlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>) sur les SCMI<sub>80</sub> vis-à-vis des levures *C. albicans*.**

S1 - S10 → des levures *Candida albicans* isolée du CHU.

Réf → *Candida albicans* ATCC 10231.

### 2.3. Effet du préchauffage et de l'addition de MgCl<sub>2</sub> sur les SCMI :

La Figure N°9 regroupe les résultats relatifs à l'effet du préchauffage et de l'addition de MgCl<sub>2</sub> (10mM) sur les concentrations minimales inhibitrices sessiles en AmB vis-à-vis des levures *Candida albicans*.

Pour 7 souches (S1 à S5) ainsi que pour la souche de référence *C. albicans* ATCC10231, la SCMI<sub>80</sub> en AmB préchauffée à 70°C pendant 20minutes et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub> est de 2µg/mL alors qu'elle est de 4µg/mL pour ces mêmes souches avec la solution antifongique non préchauffée et additionnée de sel. Pour 3 souches de *C. albicans* (S8 à S10), nous observons une SCMI<sub>80</sub> de 4µg/mL en AmB préchauffée à 70°C pendant 20minutes et additionnée de 10mM de MgCl<sub>2</sub>, alors que la SCMI<sub>80</sub> en AmB non préchauffée et additionnée de sel est de 8µg/mL.

De plus nous remarquons un accroissement des CMI avec la solution d'AmB préchauffée et additionnée de MgCl<sub>2</sub>, envers les cellules sessiles par rapport à leurs homologues planctoniques ce qui implique que malgré le préchauffage et l'addition de sel, nos souches sont toujours formatrices de biofilms. Cependant dans ces conditions expérimentales la SCMI est réduite de moitié par rapport aux autres conditions (température ambiante et addition de MgCl<sub>2</sub>). Ce qui implique une augmentation de l'efficacité de la molécule envers les levures d'une part. D'autre part cela a permis à 7 souches en mode sessile (biofilm) de revenir dans l'intervalle de sensibilité (2 µg/mL).

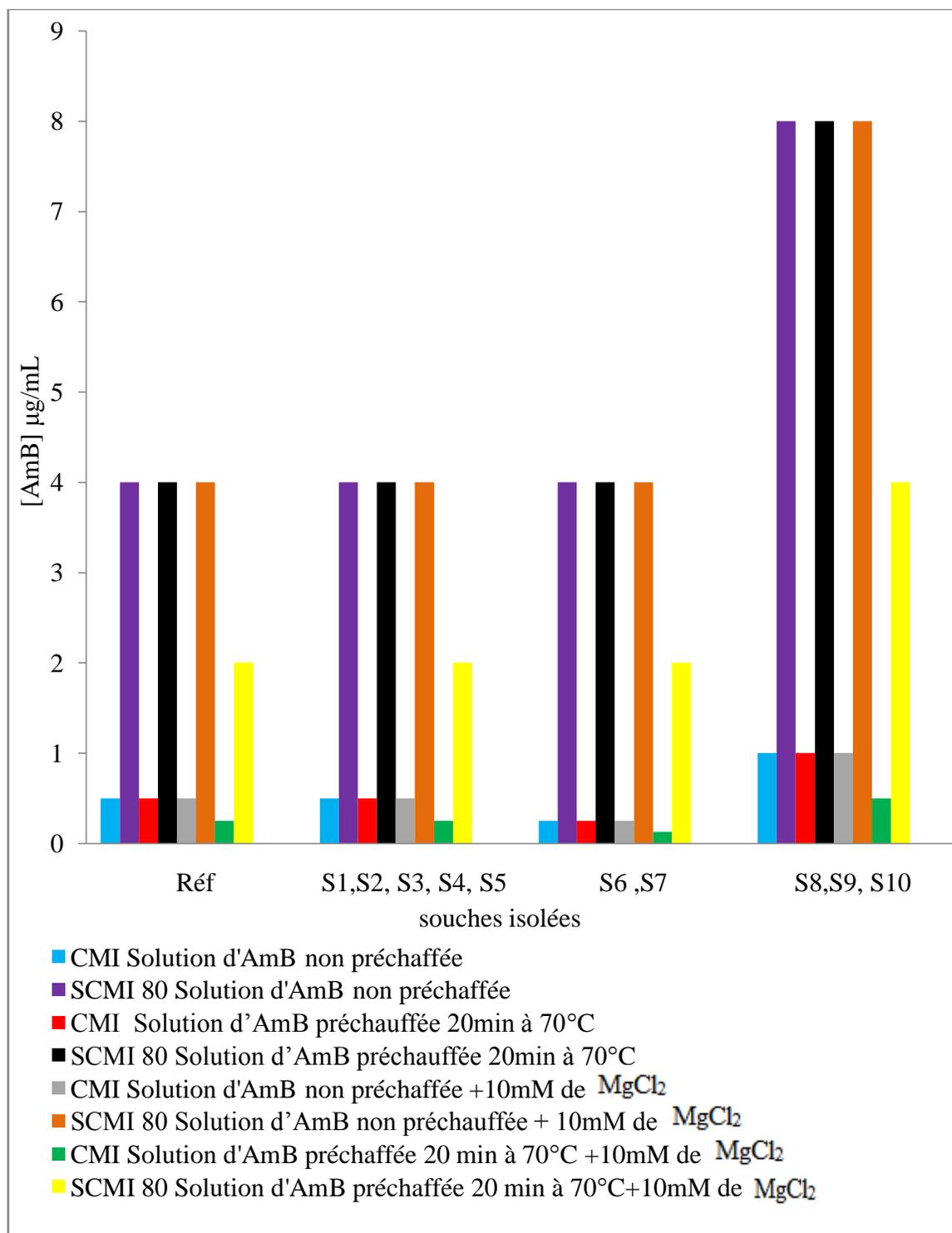


Figure N°9: Effet du préchauffage et de l'addition de MgCl<sub>2</sub> sur les SCMI<sub>80</sub> vis-à-vis les cellules sessiles de *Candida albicans*

S1 -S10 → des levures *Candida albicans* isolée du CHU

Réf → *Candida albicans* ATCC 10231.

## *Conclusion générale*

---

Dans le cadre des travaux de recherches entrepris au niveau du laboratoire « Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B et le traitement des biofilms fongiques nous avons entrepris cette étude qui a pour objectif de déterminer les CMI et SCMI des nouvelles formulations d'AmB (basées sur la modulation de leur environnement physicochimique) envers une collection de souches de *C. albicans*.

Il ressort de ce travail que:

- L'addition de  $MgCl_2$  au milieu réactionnel d'amphotéricine B à une concentration finale de 10mM, n'induit aucune modification dans l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* et ce aussi bien en mode planctonique (CMI) qu'en mode sessile SCMI. Il en est de même pour le préchauffage.
- Cependant l'addition de 10mM de  $MgCl_2$  à la solution d'AmB préchauffée 20 minutes à 70°C permet de réduire de moitié la CMI et la SCMI envers les souches de levures étudiées.

Il semblerait que cette nouvelle formulation d'AmB (préchauffée à 70°C et additionnée de 10mM de  $MgCl_2$ ) permet d'une part une réduction de la toxicité envers les cellules animales, d'autre part d'augmenter l'action antifongique envers les biofilms à *Candida albicans*. Par conséquent elle pourrait être une solution possible pour le traitement des biofilms fongiques qui sont connus pour être plus résistants que leurs homologues planctoniques.

Afin de compléter ce travail il serait intéressant :

- D'élargir l'étude à d'autres genres de levures.
- Tester d'autres formulations d'amphotéricine B.
- Et enfin utiliser ces solutions sur des cathéters contaminés par les biofilms fongiques.

1. Alanio A., Renaudat C., Bretagne S. (2014) Épidémiologie de la résistance des champignons : impact de nos prescriptions d'antifongiques. *Journal des Anti-infectieux*, 16: 2-7.
2. Alem M.A., Oteef M.D., Flowers T.H., Douglas L.J. (2006) Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5: 1770-1779.
3. Baran M., Borowski E., Mazerski J. (2009) Molecular modeling of amphotericin B – ergosterol primary complex in water II. *Biophysical Chemistry*, 141(2-3): 162-168.
4. Belkherroubi-Sari L. (2009) Effet de l'état physique des antifongiques polyéniques sur leur activité cellulaire: exemple de l'amphotéricine B. Thèse de Doctorat en biologie, Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.
5. Belkherroubi-Sari L., Boucherit K., Boucherit-Otmani Z., Belbraouet S. (2011) Study of Renal Toxicity in Wistar Rats Following the Action on Amphotericin B Solution Prepared under Extreme pH Conditions. *Food and Nutrition Sciences*, 2: 731-735.
6. Boucherit K., Belbraouet S., Boucherit-Otmani Z., Belkherroubi-Sari L. (2011) Effect of the ionic environment on the improvement of the therapeutic index of the Amphotericin B. *chemical technology, An Indian Journal. BMJ*, 22: 579-82.
7. Boucherit-Otmani Z., Seddiki S.M.L., Boucherit K., Sari-Belkherroubi L., Kunkel D. (2011) *Candida albicans* biofilms formed into catheters and probes and their resistance to amphotericin B. *Journal of Medical Mycology*, 21: 182-187.
8. CLSI. (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
9. Cohen B.E. (1992) A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochimica and Biophysica. Acta*, 1108: 49- 58.
10. Dannaoui É. (2013) Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2013: 71–77.

11. Espada R., Valdespina S., Alfonso C., Rivas G., Ballesteros M.P., Torrado J.J. (2008) Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, 361: 64- 69.
12. Espinasse F., Page B., Cottard-Boulle B. (2010) Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs. *Revue francophone des laboratoires*, 426 :51-63.
13. Gaboriau F., Cheron N., Leroy L., Bolarde J. (1997) Physical-chemical properties of heat-induced «superaggregats » of amphotéricin B. *Biophysicale chemistry*, 66: 1-12.
14. Gagos M and Arczewska M. (2010) Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers. *Biochimica and Biophysica. Acta*, 1798(11): 2124-2130.
15. Gray K. C., Palacios D. S., Dailey I., Endo M.M., Uno B.E., Wilcock B.C., Burke M.D. (2012) Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109: 2234 – 2239.
16. Grillot R et Lebeau B. (1999). Antifongiques systemiques. Antibiotiques: agents antibactériens et antifongique. *Editions-Ellipses* : 1104- 1114.
17. Hac-Wydro K., Atka D., Grzybowska J., Borowski E. (2005) N-(1-Piperidinepropionyl) amphotericin B methyl ester (PAME) - a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. *Journal of Colloid and interface Science*, 287: 476-484.
18. Hammond S.M. (1977) Biological activity of polyene antibiotics. *Progress in Medicinal Chemistry*, 14: 105 – 283.
19. Lortholary O., Taieb F., Méchaï F., Lefort A., Lanternier F., Bougnoux M.E. (2011) Prise en charge des infections systémiques à *Candida spp.* *La Revue de Médecine Interne*, 32: 173-180.
20. Mannock D.A., Lewis R.H., Elhancy R.N. (2010) A calorimetric and spectroscopic comparison of the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochimica and biophysica acta*, 1798: 376- 388.

21. Massou S., Ahid S., Azendour H., Bensghir M., Mounir K., Iken M., Lmimouni B.E., Balkhi H., Drissi K.N., Haimeur C. (2013) Les candidoses systémiques en réanimation médicale: analyse des facteurs de risque et intérêt de l'index de colonisation. *Pathologie Biologie*, 61: 108-112.
22. Matsuoka S., Matsuomori N., Murata M. (2003) Amphotericin B-phospholipid covalent conjugates: dependence of membrane-permeabilizing activity on acyl-chain length. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 1, 22: 3882- 3884.
23. Matsuomori N., Eiraku N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M., Aoki T., Ide T. (2004) An Amphotericin B-Ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chemistry and Biology*, 11: 673- 679.
24. Mathé L and Van-Dijck P. (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, 59(4):251-64.
25. Mazari W., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K. (2015) *In vitro* susceptibility of amphotericin-B, voriconazole and caspofungin against *Candida guilliermondii* biofilms, isolated from dentals units water pipes, under different growth phases. *Journal of Medical Mycology*, 25: 57-62.
26. Mesa A., Rango A.C., Scorzoni L., Zaragoza O. (2012) It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Microbiology*, 83: 286- 294.
27. Mouri R., Konoki K., Matsuomori N., Oishi T., Murata M. (2008) Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface Plasmon resonance. *Biochemistry*. 47: 7807- 7815.
28. Morales-Nava R., Amaya G., Ortega-Blake I. (2013) Activity of AmB along a Phase Diagram Presenting Micro and Nanodomains. *Biophysical journal*, 102(3): 524a.
29. Mowat E., Lang S., Williams C., McCulloch E., Jones B., Ramage G. (2008) Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms. *Antimicrobial Chemotherapy Journal*, 62: 1281- 1284.
30. Neumann A., Baginski M., Winczewski S., Czub J. (2013) The Effect of Sterols on Amphotericin B Self-Aggregation in a lipid Bilayer as Revealed by Free Energy Simulations. *Biophysical Journal*, 104: 1485- 1494.

31. O'Shaughnessy E.M., Lyman C.A., Walsh T.J. (2009) Amphotericin B: Polyene resistance mechanisms. In *Antimicrobial drug resistance* (pp. 295-305).
32. Palacios D.S., Dailey L., Siebert D.M., Wilcock B.C., Burke M.D. (2011) Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108: 6733-6738.
33. Pappas P.G., Kauffman C.A., Andes D.R., Clancy C.J., Marr K.A., Zeichner L.O., Reboli A.C., Schuster M.G., Vazquez A.J., Walsh T.J., Zaoutis E.T., Sobel D.J. (2015) Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Journal of Clinical Infectious Diseases*, 61 (2016): 97-148.
34. Petit C., Cheron M., Joly V., Rodrigues J.M., Gaboriau F. (1989) *In vivo* therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of amphotericin B- Deoxycholate obtained by mild heating. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 779-785.
35. Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L.J., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. (2008) A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms application to antifungal susceptibility testing, *Nature Protocols*, 3:1494-1500.
36. Pihet M et Marot A. (2013) Diagnostic biologiques des candidoses. *Revue Francophone des laboratoires*, 450 : 47- 61.
37. Poissy J. (2015). Physiopathologie des candidoses invasives. *Réanimation*, 24: 318-327.
38. Ramage G., Vande- Walle K., Wickes B.L., Lopez- Ribot J.L. (2001b) Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 2475- 2479.
39. Rogers P.D., Kramer R.E., Chapman S.W., Cleary J.D. (1999) Calcium-mediated signal-mediated of amphotericin b iduced interleukin-1 $\beta$  expression in human monocytic cells. *Journal of Infectious Diseases*, 180: 1259- 1266.

40. Romero E. A., Valdivieso E., Cohen B. E. (2009) Formation of two different types of ion channels by amphotericin B in human erythrocyte membranes. *Journal of Membrane Biology*, 230: 69 – 81.
41. Sanchez D.A., Schairer A., Tuckman-Vernon C., Chouake J., Kutner A., Makdisi J., Friedman J.M., Friedman J. (2014) Amphotericin B releasing nanoparticle topical treatment of *Candida spp.* In the setting of a burn wound. *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10: 269- 277.
42. Sangalli-Leite F., Scorzoni L., Mesa-Arango A. C., Casas C., Herrero E., Gianinni M.J., Rodriguez-Tudela J.L., Cuenca- Estrella M., Zaragoza O. (2011) Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes and infection*, 13: 457 – 467.
43. Seddiki S.M.L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Badsı-Amir S., Taleb M., Kunkel D. (2013) Assessment of the types of catheter infectivity caused by *candida species* and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria; *International Journal of General Medicine*, 6:1-7.
44. Seddik S. M. L., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Kunkel D. (2015) Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à *Candida sp.* Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 25: 130-135.
45. Seghir A., Boucherit-Atmani Z., Belkherroubi-Sari L., Boucherit K. (2014) Cathétérisme et risque infectieux fongique au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen : épidémiologie et sensibilité aux antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale*, 24 :179-184.
46. Szlinder-Richert J., Cybulska B., Grzybowska J., Bolard J., Borowski E. (2004) Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, - methyl – N- D- fructosylamphotericin B methyl ster, with fungal, mammalian and bacterial cells measured by the energy transfer method, *II Farmaco*. 59:289-296.
47. Toubas D. (2013) Epidémiologie des candidoses invasives. *Revue Francophone Des Laboratoires*. 450: 27-31.
48. Uppuluri P., Srinivasan A., Ramasubramanian A., Lopez-Ribot J.L. (2011) Effects of Fluconazole, Amphotericin B, and Caspofungin on *Candida albicans* Biofilms under Conditions of Flow and on Biofilm Dispersion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(7): 3591-3593.

## ***Références bibliographiques***

---

49. Yasuda J.M. (2001) An update on Antifungal Therapy: A Focus on Systemic Agents for Invasive Fungal Infections. *California Journal of Health System Pharmacy*, 321: 4-12.

# **Synthèse bibliographique**

# **Matériel et méthodes**

## **Résultats et discussion**

# **Conclusion générale**

## **Références bibliographiques**

## ملخص

العدوى المرتبطة بمراكز الرعاية الصحية هي مسؤولة عن معدلات المراضة والوفيات وخاصة لدى المرضى الذين يعانون من نقص المناعة في البيئة الخمائر من نوع *Candida* يمكنها تشكيل بنية متعددة الخلايا تسمى اغشية حيوية ذات مقاومة عالية للمضادات الحيوية مقارنة مع نظرائهم العوالق.

في هذا السياق قمنا بهذه الدراسة التي تهدف الى التحقق من اذا كانت الامفوترسين ب المطورة في مختبرنا اكثر فعالية من التراكيب القديمة في اطار القضاء على الاغشية الحيوية وذلك من خلال تحديد اقل تركيز مثبت للخلايا و الاغشية الحيوية من هذه المستحضرات ضد الخمائر صنف *Candida albicans*.

النتائج المتحصل عليها اظهرت ان التركيبة الجديدة للامفوترسين ب (مسخنة في 70 درجة مئوية ومضاف اليها 10 ميلي مول من  $MgCl_2$ ) قامت بتخفيض التركيز المثبط للاغشية الحيوية الى النصف.

**الكلمات المفتاحية :** الامفوترسين ب, الاغشية الحيوية,  $MgCl_2$ , *Candida albicans*, التسخين في 70 درجة مئوية.

## Résumé

Les infections associées aux soins sont responsables d'une morbi-mortalité élevée notamment chez les patients immunodéprimés. Dans l'environnement, les levures du genre *Candida* peuvent adhérer aux dispositifs médicaux et s'organiser en structures multicellulaires dite "biofilms", plus résistantes aux traitements antifongiques que leurs homologues planctoniques.

Dans ce contexte nous avons entrepris cette étude, qui consiste de voir si les formulations d'amphotéricine B élaborées au sein de notre laboratoire sont plus efficaces que la solution classique d'AmB dans le cadre de l'inhibition des biofilms fongiques, par la détermination des concentrations minimales inhibitrices planctoniques (CMI) et des concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI) de ces formulations envers les levures du genre *C. albicans*.

Les résultats obtenus montrent que la nouvelle formulation d'AmB (préchauffée à 70°C et additionnée de 10 mM de  $MgCl_2$ ) permet de réduire à moitié la SCMI envers les biofilms à *Candida albicans*.

**Mots clés :** Amphotéricine B, biofilms, *Candida albicans*,  $MgCl_2$ , préchauffage à 70°C.

## Abstract

The healthcare associated infections are responsible for high morbidity and mortality especially in immunocompromised patients. In the environment, the *Candida* yeasts can adhere to medical devices and organize into multicellular structures called "biofilms", more resistant to antifungal therapy than their planktonic counterparts.

In this context we undertook this study, which is to see if the amphotericin B formulations developed in our laboratory are more effective than conventional amphotericin B solution than the conventional formulation of amphotericin B solution as part of inhibition of fungal biofilms, by determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and sessile minimal inhibitory concentration (SMIC), of these formulations against yeasts *C. albicans*.

The results obtained show that the new formulation of AmB (preheated at 70°C and supplemented with 10 mM  $MgCl_2$ ) reduces to the half the SMIC to the biofilms of *Candida albicans*.

**Keywords:** Amphotericin B, *Candida albicans*, biofilm,  $MgCl_2$ , preheating to 70°C.