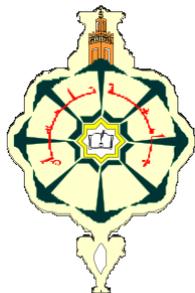


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



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

Mémoire
Présenté
En vue de l'obtention du diplôme de
Magister
En Biologie, Option: Biochimie Appliquée

Par
Mr BENBEKHTI Zineddine

Thème

**Modulation de la toxicité sélective de l'amphotéricine B
et dormance des levures**

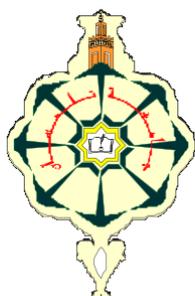
Soutenu le :

Devant le jury :

Président	Mr BOUCHERIT Kebir	Professeur, Centre Universitaire de Nâama
Promoteur	Mme BOUCHERIT - OTMANI Zahia	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Examinatrices	Mme HASSAÏNE Hafida	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
	Mme MOKHTARI Nassima	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Invitée	Mme SARI Lamia	Maître de Conférences B, Université Tlemcen

Année universitaire: 2011-2012

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

Mémoire

Présenté

En vue de l'obtention du diplôme de

Magister

En Biologie, Option: Biochimie Appliquée

Par

Mr BENBEKHTI Zineddine

Thème

**Modulation de la toxicité sélective de l'amphotéricine B
et dormance des levures**

Soutenu le :

Devant le jury :

Président	Mr BOUCHERIT Kebir	Professeur, Centre Universitaire de Nâama
Promoteur	Mme BOUCHERIT- OTMANI Zahia	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Examinatrices	Mme HASSAÏNE Hafida	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
	Mme MOKHTARI Nassima	Maître de Conférences A, Université Tlemcen
Invitée	Mme SARI Lamia	Maître de Conférences B, Université Tlemcen

Année universitaire: 2011-2012

Résumé

L'amphotéricine B reste l'antifongique de référence pour le traitement des mycoses systémiques, en dépit de sa toxicité rénale très sévère vis-à-vis des cellules de l'hôte qui conduit à l'arrêt et /ou à l'échec du traitement.

Le but de cette étude est de rechercher dans un premier temps de nouvelles formulations de cet antifongique basées sur l'effet combiné de quelques paramètres physico-chimiques (solvant, pH et température). Dans un deuxième temps, nous avons testé l'effet de ces formulations sur le phénomène de dormance des levures de *Candida albicans* ATCC10231.

Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner une formulation très intéressante. Il s'agit de l'amphotéricine B préparée dans le DMSO à une concentration de 10^{-3} M puis diluée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,4, 100 mM et préchauffée pendant 20 minutes à 70°C .

Pour cette formulation, l'efficacité de l'antifongique est améliorée de 17 % et la fuite de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains est réduite de 78 % par rapport à l'amphotéricine B préparée directement dans le DMSO.

Par ailleurs, l'utilisation de cette formulation à une concentration finale d'amphotéricine B égale à $0,4 \mu\text{M}$, qui correspond à sa CMI, induit un réveil des levures de *Candida albicans* ATCC10231 si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 24 heures. C'est le phénomène de dormance.

En revanche, pour une concentration finale supérieure ou égale à $1 \mu\text{M}$, aucune croissance des levures n'est observée. Ces dernières sont incapables de croître après transfert sur milieu solide. Il s'agit de la CMF.

Mots clés : amphotéricine B, toxicité sélective, *Candida albicans* ATCC10231, globule rouge humain, dormance, environnement physico-chimique.

Abstract :

Amphotericin B remains the antifungal of reference for the treatment of systemic mycoses. Unfortunately, very severe kidney toxicity vis-à-vis the host cells leads to the arrest and / or failure of treatment.

The aim of this study is to search as a first step of this new antifungal formulations based on the combined effect of several physicochemical parameters (solvent, pH and temperature). We have tested the effect of these formulations on the phenomenon of dormancy of yeasts *Candida albicans* ATCC10231.

The obtained results allowed us to select a very interesting formulation. This is amphotericin B prepared in DMSO at a concentration of 10^{-3} M and then diluted to 10^{-4} M in buffer sodium acetate / acetic acid pH 5.4, 100 mM and preheated for 20 minutes 70°C .

For this formulation, the efficacy of antifungal improved by 17 % and the leakage of intracellular hemoglobin from human red blood cells is reduced by 78 % compared with amphotericin B directly prepared in DMSO. Moreover, the use of this formulation to a final concentration of amphotericin B equal to $0,4 \mu\text{M}$, corresponding to its MIC, induced a revival of the yeast *Candida albicans* ATCC10231 if the incubation time is extended beyond 24 hours. This is the phenomenon of dormancy.

However, for a final concentration greater than or equal to $1 \mu\text{M}$, no yeast growth was observed. These are unable to grow after transfer to solid medium. This is the CMF.

Keywords : amphotericin B , *Candida albicans* ATCC10231, blood red cells, dormancy, physicochemical environment.

ملخص :

يعتبر الـ amphotéricine B المضاد الفطري المثالي لعلاج الاصابات الفطرية العميقة, رغم ذلك تبقى سميته تجاه خلايا الشخص المصاب وخاصة خلايا الكلى عاملا محددًا لاستمرارية و/أو فشل العلاج .

الهدف من هذه الدراسة البحث عن صيغ جديدة لهذا المضاد الفطري اعتمادا على دمج بعض العوامل الفيزيائية الكيميائية (المذيب, درجة الحموضة و الحرارة), ثم اختبار تأثير هذه الصيغ على ظاهرة النوم لخلايا *Candida albicans* ATCC10231 .
مكتنتنا النتائج المحصل عليها من اختبار صيغة اكثر أهمية يتعلق الأمر بالـ amphotéricine B المذاب في DMSO بتركيز 10^{-3} M ثم مخفض الى تركيز 10^{-4} M باستعمال المحلول العازل خلات الصوديوم/حمض الخل pH 5,4, 100 mM والتسخين مدة 20 دقيقة في درجة حرارة 70°C .

بالنسبة لهذه الصيغة, لاحظنا تحسنا في فعالية الـ amphotericin B بنسبة 17 % وانخفاض بنسبة 78 % في فقدان الهيموغلوبين من خلايا الدم الحمراء البشرية مقارنة بالـ amphotéricine B المحضر مباشرة في DMSO.

اضافة الى ذلك استعمال هذه الصيغة بتركيز نهائي $0,4 \mu\text{M}$ الـ amphotéricine B مكنت خميرة *Candida albicans* ATCC10231 من النمو في حالة اطالة زمن التجربة الى ما فوق 24 ساعة نتكلم اذا عن ظاهرة النوم الخلوي.
عكس ذلك من اجل تركيز نهائي يساوي أو يفوق $1 \mu\text{M}$ لم نلاحظ أي نمو لخلايا الخميرة بعد نقلها إلى وسط غذائي صلب. يتعلق الأمر بـ CMF.

الكلمات المفتاحية: *Candida albicans* ATCC10231, amphotéricine B, خلايا الدم الحمراء , النوم الخلوي, الوسط الفيزيائي الكيميائي.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique. Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme Boucherit-Otmani Zahia, Maître de conférences classe A, 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, directrice du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique », pour avoir accepté la charge de m'encadrer. Elle a su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présente pour discuter des problèmes rencontrés, des résultats obtenus et des orientations à suivre. Son enthousiasme, son dynamisme, sa générosité et sa grande patience m'ont chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles. Je la remercie vivement pour l'aide scientifique précieuse et tous les conseils qu'elle a pu me fournir pendant la durée de ce mémoire.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur Boucherit Kebir Professeur au Centre Universitaire de Nâama, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Mes remerciements s'adressent également à Mme Hassaine Hafida, Maître de Conférences classe A 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 l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ce travail.

Je suis très honorée que Mme Mokhtari Nassima, Maître de Conférences Classe A 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, ait accepté d'examiner ce travail.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à Madame Sari Lamia, Maître de conférences classe B, à la faculté de médecine. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury.

Je voudrais également remercier vivement Monsieur Rahmoun Mohammed Nadjib, Maître assistant classe B 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 l'effort fourni, son esprit scientifique, ses conseils, sa disponibilité et son amitié.

Je remercie également l'ensemble du personnel du laboratoire, en particulier :

Mrs Djaziri Rabah, Drissi Mourad, Azzi Rachid, Melles Benariba Nabila et Belkacem Nacéra.

Je remercie également toutes les personnes qui m'ont écouté, conseillé, aidé, avec patience, rigueur et sympathie, dans mes tâches quotidiennes : Mrs Belhachemi Habib, Elhaci Imad abd-elhamid, Mehaioui Samir, Mme Benhabib Ouassila, Melles Belmir Sara, Souna Djahida, Sefraoui Imen, Belakhder Wafa.

Je n'oublierais pas tous les autres avec qui j'ai pu travailler ou échanger de bons moments dans le laboratoire: Nouredine, Djamilia, Mohammed, Dounia, Rabiha, Meriem, Houria, Wafaa et Ismahane.

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce modeste travail.

Dédicaces

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

A mes chers parents sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de bénédiction durant toute ma vie ;

A toutes les personnes qui me sont chères ;

A mes chers frères, ma chère sœur et amis qui m'ont beaucoup soutenus et encouragé ;

A Boukhoubza Mohammed, Benbeliad Fethi ainsi que mes chers camarades de la promotion de biologie.

BENBEKHTI Zineddine

Liste des abréviations

AmB	Amphotéricine B
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
HDL	Hight-Density Lipoprotein
LDL	Low-Density Lipoprotein
PBS	Phosphate Buffered Saline
K_a	Constante d'affinité

Table des matières

Introduction	01
Premier chapitre : Synthèse bibliographique	
1. Propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B	05
2. Propriétés biologiques de l'amphotéricine B.....	07
3. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	08
3.1.Effets membranaires.....	08
3.2.Effets métaboliques	14
4. Différentes formulations de l'amphotéricine B.....	15
4.1.Modification de la structure chimique.....	15
4.2.Modification de la composition chimique.....	15
4.3.Modulation des paramètres physico-chimiques.....	17
Deuxième chapitre : Matériel et méthodes	
1. Matériel biologique	20
2. Antifongique.....	20
3. Méthodes	
3.1. Préparation des solutions antifongiques.....	20
3.2. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	20
3.3. Croissance des levures sur milieu liquide.....	20
3.4. Mise en évidence de la viabilité et de la cultivabilité des levures.....	21
3.5. Evaluation de la cytotoxicité de l'amphotéricine B vis à vis des globules rouges humains.....	21
Troisième partie : Résultats et discussion	
A- Effet de la nature du solvant sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B.....	25

1. Effet de la nature du solvant sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	25
1.1. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	25
1.2. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	28
2. Effet de la nature du solvant sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains.....	30
2.1. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	30
2.2. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	32
B- Effet du pH 5,4 sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B.....	35
1. Effet du pH 5,4 sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	35
1.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	35
1.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	37
2. Effet du pH 5,4 sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains.....	39
2.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	39
2.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	41
C- Effet du pH 5,4 et du préchauffage de la solution mère sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B.....	44
1. Effet du pH 5,4 et du préchauffage de la solution mère sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC10231.....	44
1.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	44
1.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	46
2. Effet du pH 5,4 et du préchauffage de la solution mère sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humain.....	48
2.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	48
2.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	50
Quatrième chapitre : Conclusion générale.....	53
Cinquième chapitre : Références bibliographiques.....	56

Introduction

Au cours de ces dernières années, l'incidence des infections fongiques ou mycoses systémiques a augmenté de façon dramatique. Ces affections constituent actuellement un vrai problème clinique et économique.

Elles sont en forte recrudescence, en raison de l'extension de la population à risque (immunodéprimés liés au virus du sida), aux avancées en transplantation et en oncologie, à l'utilisation de cathéters vasculaires, au recours fréquent à des antibiothérapies à large spectre et à une émergence de plus en plus fréquente des souches résistantes aux traitements antifongiques (**Carle S., 2003**)

Candida albicans est de loin l'espèce la plus fréquemment retrouvée, mais l'incidence des *Candida non albicans* comme *C. glabrata*, *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* est croissante dans les prélèvements cliniques.

L'amphotéricine B, antifongique polyénique, reste le traitement de choix pour les mycoses systémiques malgré qu'elle soit à l'origine de phénomènes toxiques très sévères mettant en jeu parfois le pronostic vital.

Le large spectre d'action couvrant presque la totalité des souches pathogènes rencontrées dans les diagnostics cliniques et certains protozoaires, la très faible fréquence d'apparition des souches résistantes et la large expérience clinique constituent les atouts majeurs de cet antifongique.

C'est pourquoi, plusieurs stratégies visant à augmenter l'index thérapeutique de cette drogue (préserver son efficacité vis-à-vis des levures et fongis tout en réduisant sa toxicité vis-à-vis des cellules animales) ont été développées. Il y a celles qui sont basées sur la modification de sa structure chimique et celles qui s'intéressent à la recherche de nouvelles formulations où plusieurs solutions ont été préconisées pour moduler la solubilité de l'amphotéricine B.

En effet, avec un faible index thérapeutique résultant d'une solubilité très réduite en milieu aqueux, il est important de moduler d'une part, l'état moléculaire de l'amphotéricine B au moyen d'un contrôle des concentrations molaires et des doses thérapeutiques administrées. D'autre part, diminuer les interactions moléculaires indésirables entre la molécule antifongique et les molécules biologiques, d'une façon directe via des modifications de la structure chimique ou indirecte par un changement des paramètres et des caractéristiques de l'environnement physico-chimique qui l'entoure.

Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence un autre phénomène par lequel certaines levures en culture en présence d'amphotéricine B, ressuscitent après un temps de contact supérieur à 24 heures. Il s'agit du phénomène de dormance (**Boucherit Z. et coll., 2007**)

Partant de ces données et en vue de l'élaboration de nouvelles formulations faciles à mettre en œuvre et très peu onéreuses, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur deux volets :

- Etude de l'effet combiné de quelques paramètres physico-chimiques du milieu de préparation de l'amphotéricine B (solvant de solubilisation, pH et température) sur la modulation de la toxicité sélective de cet antifongique vis-à-vis d'un modèle de levure à savoir *Candida albicans* ATCC10231 et d'un modèle de cellules animale, le globule rouge humain.
- Etude du phénomène de dormance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231 dans les conditions expérimentales précédentes avec la mise en évidence de la viabilité et de la cultivabilité des levures qui ressuscitent.

Premier chapitre
Synthèse bibliographique

1. Propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un antibiotique antifongique produit naturellement par culture d'un actinomycète du sol Vénézuélien, *Streptomyces nodosus* (Trejo W. H. et Bennett R. E., 1963). Il fut isolé pour la première fois en 1956 par Gold et ses collaborateurs mais sa structure chimique complète n'a été établie qu'en 1970, après plusieurs années d'études par des méthodes basées sur sa dégradation chimique [(Cope A. C. et coll., 1966) ; (Mechlenski W. et coll., 1970)] (figure N° 1).

L'amphotéricine B se présente sous forme de poudre jaune instable, peu soluble dans les milieux aqueux et dans les solvants organiques apolaires, la concentration minimale critique dans l'eau est de $6.10^{-7}M$, mais soluble dans certains solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF), elle se conserve à + 4°C à l'abri de la lumière [(Hammond S. M., 1977) ; (Tancrede P. et coll., 1990) ; (Cohen Y. et Jacquot C., 2008)].

La stéréochimie actuelle de la molécule, a été établie en 1971 à partir d'une analyse par cristallographie aux rayons X du dérivé N-iodoacétyle puis confirmée par RMN, avec un poids moléculaire de 924,11 et une formule chimique brute $C_{47}H_{73}NO_{17}$.

Cet antifongique fait partie de la classe des macrolides polyéniques comportant 47 atomes de carbone, il se présente sous une structure chimique complexe multifonctionnelle comportant un cycle macrolactone à 38 chaînons allongé dans un plan sous forme de bâtonnet presque totalement rigide, lié à une mycosamine par une liaison β -glycosidique au niveau du carbone C19. La lactone est constituée :

- D'un Cétal cyclique à six chaînons formés par interaction chimique entre la cétone en C13 et le groupement hydroxyle en C 17
- D'une partie apolaire hydrophobe, constituée essentiellement d'un système rigide composé de sept (07) doubles liaisons conjuguées en configuration *trans* entre le carbone N°20 et le carbone N°33 , responsable d'un intense spectre d'absorption U.V. dans l'intervalle 450-280 nm, ce qui permet de l'étudier par méthodes spectroscopiques ;
- D'une partie polaire hydrophile, caractérisée par la présence de sept (07) groupements hydroxyles portés par les atomes de carbone N° 3, 5, 8, 9, 11, 15 et 35), d'une mycosamine et une fonction carboxylique en C16 [(Ganis P. et coll., 1971) ; (Sowiński P. et coll., 1992) ; (Ross M., 2002)] (Figure N°2)

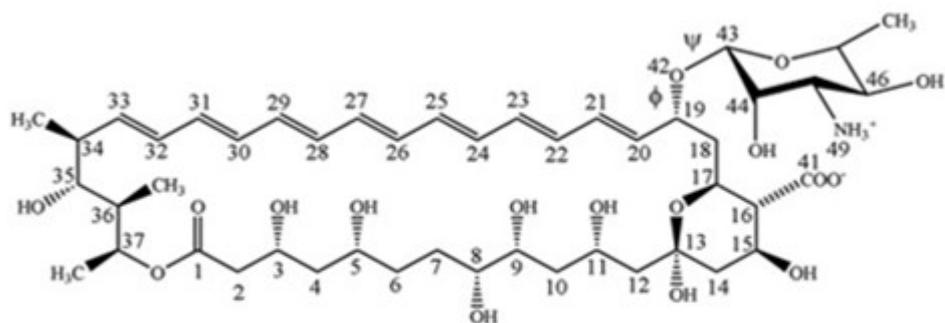


Figure N° 1 : Structure chimique de l'amphotéricine B (Gagos M. et Arczewska M., 2010).

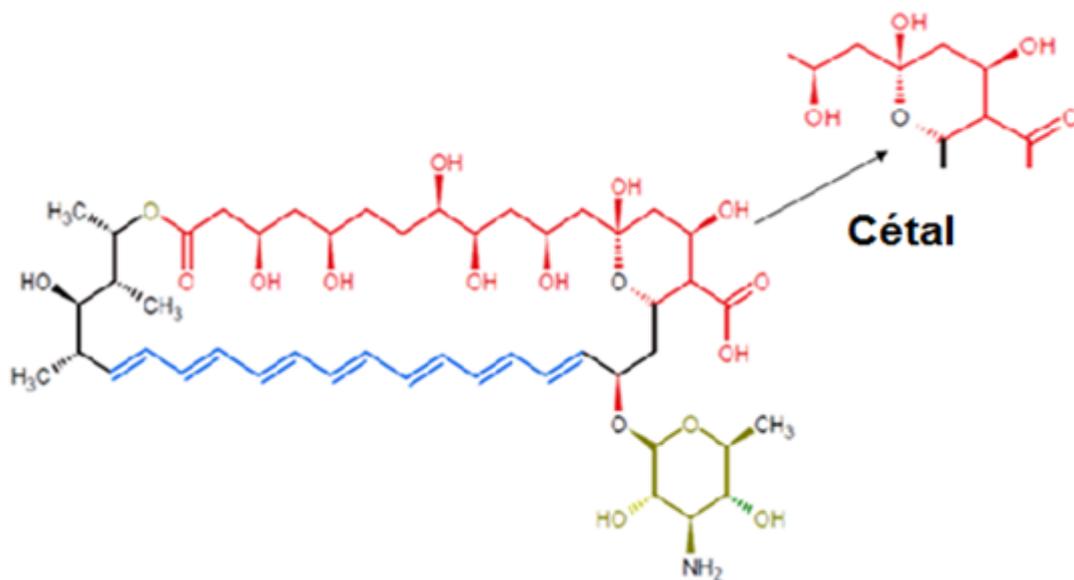


Figure N°2 : Présentation des différentes parties de la molécule d'amphotéricine B,
 En bleu: la partie polyène hydrophobe ; En rouge : la partie hydrophile ;
 En vert : la mycosamine (Logiciel acdlab Steckchem)

La répartition asymétrique de ces groupements chimiques confère à l'amphotéricine B un caractère amphiphile.

La présence du groupement carboxylique de la lactone et du groupement amine primaire sur l'aminosucrose, tous deux ionisables au pH physiologique avec des pKa respectifs de 5,5 et 10, confère le caractère amphotère à cet antifongique d'où son nom.

La longueur de cet antifongique estimée à environ 21 Å est approximativement égale à celle d'un phospholipide et donc à la moitié de l'épaisseur de la bicouche lipidique **(Holz R. W., 1974)**.

Il est à noter que ces deux caractères physico-chimiques (amphotère et amphiphile) jouent un rôle important dans le mécanisme d'action et la répartition de l'amphotéricine B dans les solutions aqueuses **(Hung C. T. et coll., 1988)**. En effet, en solution aqueuse, elle se trouve schématiquement sous trois formes :

- Agrégée responsable de la toxicité ;
- Oligomérique (essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité ;
- Monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique.

L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé, il varie selon la concentration de l'antifongique, le milieu dans lequel il est solubilisé et l'action des surfactants ou autres excipients. Nous comprenons alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion de la forme toxique de cette drogue **[(Legrand P. et coll., 1992) ; (Chavanet P. et coll., 1997) ; (Vandermeulen G. et coll., 2006)]**.

2. Propriétés biologiques de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B, chef de file incontesté des antifongiques polyéniques, reste le traitement de première ligne des mycoses profondes ou systémiques. Son spectre d'action inclut les espèces *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scedosporium* **[(Ellis D., 2002) ; (Enoch D. A. et coll., 2006) ; (Kleinberg M., 2006)]**.

La résistance à l'amphotéricine B est un événement relativement rare chez les isolats cliniques des levures ou des champignons pathogènes, elle est généralement liée à la différence du contenu en ergostérol membranaire des différents microorganismes **[(Ellis D., 2002) ; (Kanafani Z. A. et Perfect J. R., 2008)]**.

L'amphotéricine B est un antiparasitaire utilisé avec succès dans le traitement de la leishmaniose viscérale, elle est également active contre *Plasmodium falciparum* et les prions **[(Demaimay et coll., 1994) ; (Meyerhoff A., 1999) ; (Mange A. et coll., 2000) ; (Hatabu T. et coll., 2005)]**.

Sa posologie usuelle est de 0,5 à 0,6 mg/kg/jour ou de 1 à 1,2 mg/kg un jour sur deux sous forme de Fungizone®. Cette dose reste un traitement efficace dans la plupart des mycoses systémiques notamment chez les patients immunodéprimés (**Sugar A. M., 1990**). Après administration par voie intraveineuse, 95 % de l'amphotéricine B se lie fortement aux différents types de protéines et de lipoprotéines sériques en particulier ceux contenant une concentration élevée en cholestérol (LDL et HDL), les β -lipoprotéines, l'albumine sérique humaine et l' α 1-acide glycoprotéine [(**Wasan K. M. et Lopez-Berestein G., 1994**) ; (**Wasan K. M. et coll., 1994a**) ; (**Wasan K. M. et coll., 1994b**) ; (**Ayestaran A. et coll., 1996**) ; (**Sivak O. et coll., 2004**) ; (**Hartsel S. C. et coll., 2001**) ; (**Bekersky I. et coll., 2002**)].

La distribution suit un modèle tricompartmental avec un compartiment central et deux compartiments périphériques ; dont l'un est d'équilibration rapide et l'autre d'équilibration lente. La demi-vie pour le compartiment d'équilibration rapide est de 24 à 48 heures. Par contre, elle est de 15 jours pour le compartiment d'équilibration lente. Des concentrations élevées de l'amphotéricine B sont trouvées dans le foie (14 à 41 % de la dose administrée), les reins (0,3 à 2 %) et les poumons (1,2 à 6 %) (**Atkinson A. J., Jr. et Bennett J. E., 1978**).

L'administration de l'amphotéricine B est fréquemment accompagnée par des effets immédiats d'ordre général (nausées, frissons, fièvre, diarrhées, douleur abdominales, céphalée, une hypertension artérielle...etc). Mais c'est la toxicité rénale et hépatique ainsi que les troubles métaboliques (hyperkaliémie, hypomagnésimie et acidose métabolique) qui sont les plus préoccupants [(**Clements J. S., Jr. et Peacock J. E., Jr., 1990**) ; (**Gallis H. A., 1996**)].

3. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B

Bien que l'amphotéricine B soit utilisée en pratique clinique vers la fin des années 50 et malgré le nombre important des études réalisées sur cet antifongique, le mécanisme d'action par lequel elle exerce son activité n'est que partiellement élucidé. La littérature scientifique rapporte que l'amphotéricine B présente une multitude d'effets qui influent sur les cellules hôtes et les cellules fongiques.

Les actes biologiques de la molécule peuvent être regroupés en deux catégories :

3.1. Effets membranaires

Les études théoriques et/ou expérimentales réalisées sur des modèles membranaires montrent que cet antifongique forme au niveau des membranes plasmiques cellulaires des structures ordonnées, transmembranaires, poreuses, ioniques et/ou perméables, suite à une interaction surfacique avec des constituants membranaires présentant un caractère

hydrophobe et un potentiel électrique convenable (lipides). Il en résulte une altération de l'équilibre osmotique marqué par une fuite des ions de potassium (K^+), des protons (H^+) et des métabolites de petites tailles ce qui induit une lyse suivie de la mort cellulaire **[(Chen et Bittman, 1977) ; (Bolard et coll., 1980) ; (Jullien et coll., 1990)]**.

Il ressort de ces études que la formation des canaux ioniques nécessite l'établissement d'interactions chimiques intermoléculaires et intramoléculaires, entre les molécules d'amphotéricine B d'une part et entre l'antifongique et les constituants membranaires (stérois et les phospholipides) d'autre part **[(Baginski M. et coll., 1997) ; (Palacios D. S. et coll., 2011)]**.

D'autres travaux par modélisation moléculaire ont montré qu'après insertion de l'amphotéricine B dans la membrane cytoplasmique, différents types de liaisons sont mis en jeu. En effet, les molécules d'amphotéricine B adjacentes sont capables d'établir des liaisons hydrogènes intramoléculaires et des interactions électrostatiques entre le groupement NH_3^+ et le groupement COO^- d'une molécule antifongique adjacente **[(Khutorsky V. E., 1992) ; (Khutorsky V., 1996) ; (Baginski M. et coll., 1997)]**.

De plus, des liaisons hydrogènes sont également établies entre le groupement NH_3^+ de l'amphotéricine B et le groupement PO_4^- des phospholipides membranaires et aussi entre le groupement 3- β OH du stérol et le groupement NH_2 de la mycosamine. Des interactions sont également nécessaires pour la formation du complexe ternaire AmB/stérois/phospholipides **[(Clejan S. et Bittman R., 1985) ; (Umegawa Y. et coll., 2008) ; (Baran M. et coll., 2009)] (figure N°3)**.

Il s'agit d'interactions de type :

- Van Der Waals entre les atomes des noyaux stéroïdiens et la lactone de l'antifongique,
- π - π entre les doubles liaisons de la partie hydrophobe de l'amphotéricine B et les doubles liaisons de l'ergostérol
- Forces de Coulomb.

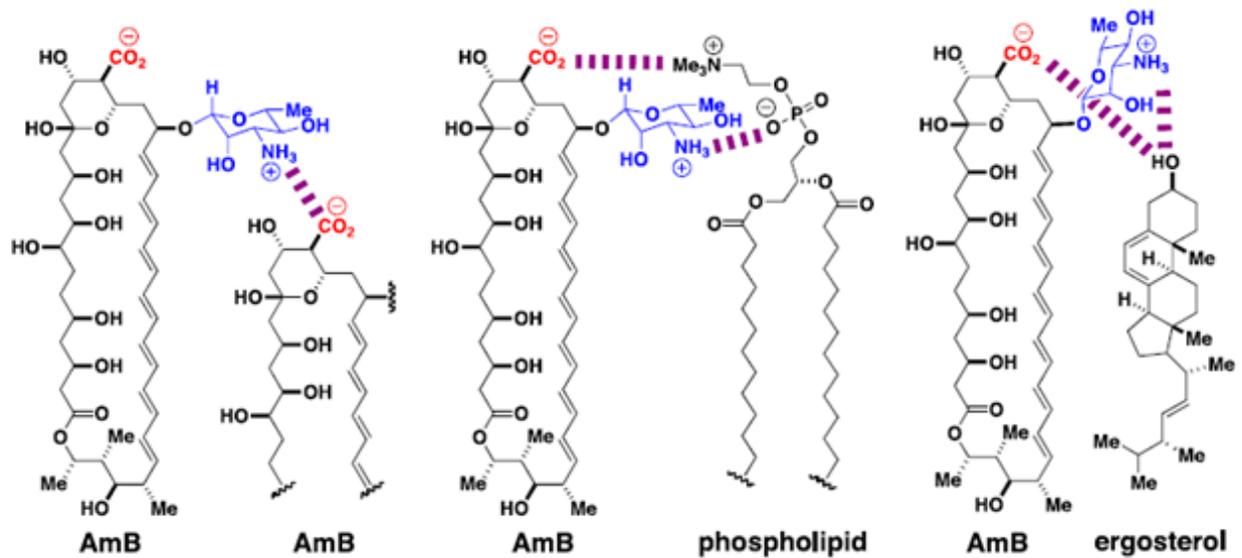


Figure N°3 : Les différentes interactions chimiques entre les molécules d'amphotéricine B et quelques constituants membranaires (Stérols, phospholipides) (Palacios D. S. et coll., 2011).

Rappelons que l'amphotéricine B a une plus grande affinité pour l'ergostérol (stérol dominant des membranes des levures et champignons) ($K_a = 6.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) que pour le cholestérol (stérol dominant des membranes des cellules animales) ($K_a = 5.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$) (**Readio J. D. et Bittman R., 1982**).

En 1977, **SAFE et ses collaborateurs** ont montré que les souches de *Candida albicans* résistantes à cet antifongique avaient un niveau d'ergostérol membranaire plus faible que les souches sensibles.

De plus, l'inhibition de la synthèse du cholestérol par un dérivé azolé le kétoconazole, permet une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B *vis-à-vis* des cellules rénales en culture (**Joly V. et coll., 1992**).

La composition en phospholipides membranaires joue aussi un rôle dans l'interaction amphotéricine B/Stérol (**Clejan et Bittman, 1985**). En effet, des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* enrichies en phospholipides de type phosphatidylcholine (**Cybulska B. et coll.**), phosphatidylsérine (PS) ou en phosphatidyléthanolamine (PE), acquièrent une résistance *vis-à-vis* de l'amphotéricine B (**Rao et coll., 1985**). De même, les travaux de **Matsuoka et ses collaborateurs (2003)**, ont montré que l'augmentation de la longueur de la chaîne acyle des phospholipides est inversement proportionnelle à la fuite du potassium (K^+) intracellulaire.

La première conséquence de ces interactions est l'apparition de pores ioniques et/ou hydroperméables transmembranaires. La formation de ces pores est soit :

- Direct, c'est-à-dire en une seule étape où un nombre critique de molécules d'amphotéricine B s'adsorbent à la membrane en formant des agrégats, et s'insèrent dans la bicouche lipidique. Le canal se forme après organisation des formes agrégées en structure ordonnée qui peut être stérol dépendante (le stérol intervient dans le maintien de la structure ouverte du canal), ou stérol indépendante, ce dernier sert à orienter et à entourer le complexe amphotéricine B/phospholipides [(**De Kruijff B. et Demel R. A., 1974**);(**Hartsel et coll., 1991**);(**Kasai Y. et coll., 2008**)] ;
- Un mécanisme séquentiel dans lequel **Cohen (1992)** suggère que les molécules d'amphotéricine B (monomères et dimères) pénètrent la bicouche lipidique séquentiellement et diffusent pour interagir avec les phospholipides et les stérols membranaires.

Quel que soit le mécanisme aboutissant à la formation du canal ionique, le modèle proposé par **De Kruijff et Demel en 1974** (modèle de demi-pore) reste le plus plausible.

Il s'agit de canaux de 8 Å formés de 8 à 12 molécules d'amphotéricine B agrégées. L'ensemble constitue un canal ancré à la surface membranaire par ses groupes chargés dont l'intérieur est tapissé de groupes hydroxyles (**Figure N° 4**).

Le problème posé par ce modèle vient du fait que les canaux n'étaient pas assez longs pour s'étendre sur l'épaisseur de la bicouche lipidique. Les longueurs de chaînes acyles des phospholipides rencontrés dans les membranes plasmiques étant d'environ 25 nm ce qui correspond à un seul feuillet.

L'observation comme quoi l'amphotéricine B avait une activité sélective maximale vis-à-vis des anions quand ils sont présents des deux côtés de la membrane plasmique d'une part. D'autre part, l'existence d'un groupement OH en C35, suggère que deux demi-pores pouvaient se superposer au sein de la membrane par des liaisons hydrogènes. C'est pourquoi, le modèle proposé par **Dekruiff et Demel (1974)**, constitué de demi-pores cations sélectifs et de doubles demi-pores anions sélectifs est resté la référence en matière de mécanisme d'action de cet antifongique.

Des études par modélisation moléculaire proposent que le canal ionique est formé par un nombre de molécule d'amphotéricine B compris entre 6 et 8 avec un diamètre entre 7-10 Å en présence d'ergostérol (**Baginski M. et coll., 2002**).

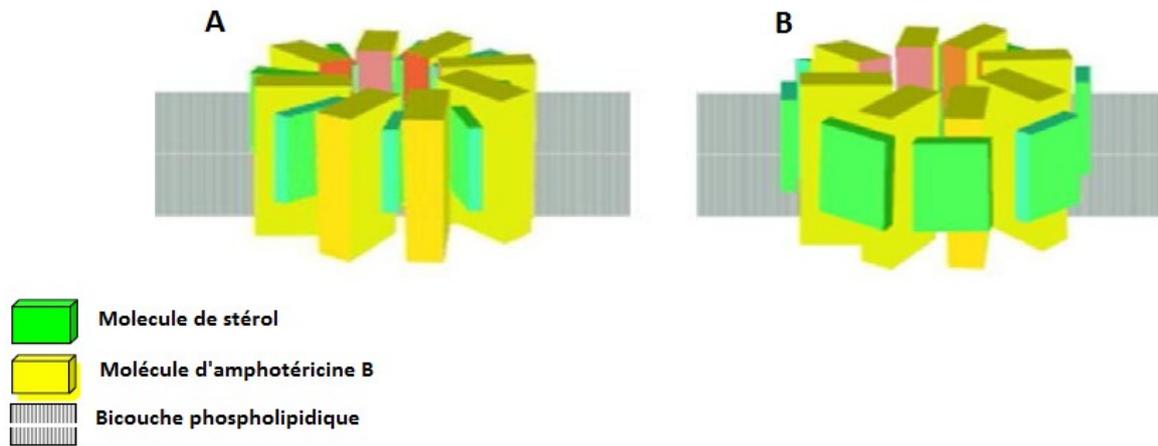


Figure N°4 : Représentation schématique du canal ionique formé par le complexe amphotéricine B /stérol.

(A) Les molécules de l'amphotéricine B sont intercalées par des molécules de stérol

(B) Les molécules de l'amphotéricine B sont entourées par les molécules de stérol

(Kasai Y. et coll., 2008)

3.2. Effets métaboliques

Les travaux de **Sokol-Anderson et ses collaborateurs (1986)** ont montré que la toxicité de l'amphotéricine B est fortement réduite en présence de la peroxyde dismutase et d'O₂ ou en absence d'O₂; nous pouvons supposer que l'amphotéricine B favorise la formation de radicaux libres responsables des peroxydations lipidiques et de la lyse cellulaire. De plus, l'induction de la perméabilité aux cations ne serait nullement influencée par la présence ou non d'O₂.

Par ailleurs, en **1994**, **Vertut-Doï et ses collaborateurs**, ont mis en évidence un autre mécanisme d'action de l'amphotéricine B, au niveau du processus d'endocytose chez une lignée cellulaire Chinese Hamster Ovary (CHO). A fortes doses, l'antifongique serait susceptible d'inhiber la fusion endosomes-lysosomes tout en stimulant son internalisation par la pinocytose.

L'amphotéricine B exerce également un effet inhibiteur sur plusieurs enzymes membranaires des cellules animales et des cellules fongiques par un changement de gradient de concentrations du sodium intracellulaire. Il s'agit de la phosphatase alcaline, l'ATPase Na⁺/K⁺ des érythrocytes et l'ATPase à protons des levures [(**Vertut-Doi A. et coll., 1988**) ; (**Brajtburg J. et Bolard J., 1996**)].

Elle stimule aussi l'immunité cellulaire de l'hôte par induction de la production d'interleukine-1 et du TNFα (Tumor Necrosis Factor α), la consommation d'oxygène et la phosphorylation oxydative (une altération de la transformation de ATP en ADP) et diminue la synthèse des composés azotés et les réserves glucidiques [(**Scott D. W. et coll., 2001**) ; (**Grooters A. M. et Taboada J., 2003**)].

L'amphotéricine B induit également des dommages oxydatifs par des espèces réactives d'oxygène libérées suite à son auto-oxydation ainsi qu'une accélération de l'oxydation des protéines, de la peroxydation des lipides, des lipoprotéines sériques et des membranes cellulaires ce qui provoque une augmentation de la sensibilité des cellules aux chocs osmotiques (**An M. et coll., 2009**).

4. Différentes formulations de l'amphotéricine B

En vue d'améliorer l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, différentes stratégies ont été adoptées et mises en œuvre. Nous pouvons les classer en deux catégories :

4.1. Modification de la structure chimique

Il s'agit d'une semi-synthèse qui aboutit à des dérivés solubles de l'amphotéricine B par substitution de groupements ionisables (NH_3^+ et COO^-). Les dérivés les plus intéressants restent le PAME (N-(1-Piperidinepropionyl) Amphotéricine B Méthyl Ester) qui est nettement moins toxique que l'amphotéricine B conventionnelle, le SAME (N-(N'-3-diméthyl aminopropyl-Succinimido) Amphotéricine B Méthyl Ester) qui favorise une bonne interaction hydrophobe avec les milieux apolaires et l'AMA (Amphotéricine B-3- (N'N'-diméthylamino) propylamide) utilisé dans la vectorisation d'oligonucléotides antisens (ODN) dans les cellules animales [(Hac-Wydro K. *et coll.*, 2005) ; (Czub J. *et coll.*, 2007) ; (Hianik T. *et coll.*, 2008) ; (Czub J. *et coll.*, 2009)] (figure N°5).

4.2. Modification de la composition chimique

C'est une voie qui consiste à créer un environnement d'inclusion ou d'adsorption pour l'amphotéricine B basée sur des mélanges sous forme de complexes, d'émulsions, ou de phases structurées (liposome, particules,...) entre l'antifongique et les molécules biologiquement tolérées.

En effet, les associations amphotéricine B /détergents ont donné des résultats très encourageants. Les dérivés hydrosolubles du cholestérol, des polyoxéthyléneglycols tel que le dérivé Myrg59 sont capables d'assurer une protection totale des globules rouges contre l'effet toxique de cette drogue. L'ester de sucrose augmente significativement la DL_{50} de la Fungizone® après une injection unique chez la souris [(Gruda I. *et coll.*, 1991) ; (Tasset C. *et coll.*, 1991)].

Par ailleurs, le complexe amphotéricine B / lipoprotéines sériques lourdes (HDL) protège les cellules animales jusqu'à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$ (10 fois la concentration minimal inhibitrice). Il est à noter que dans ces conditions, son efficacité vis-à-vis des levures reste inchangée [(Wasan *et coll.*, 1994a) ; (Boucherit-Otmani Z., 1995) ; (Bedran M. A., 1997) ; (Soulimane N., 2001)].

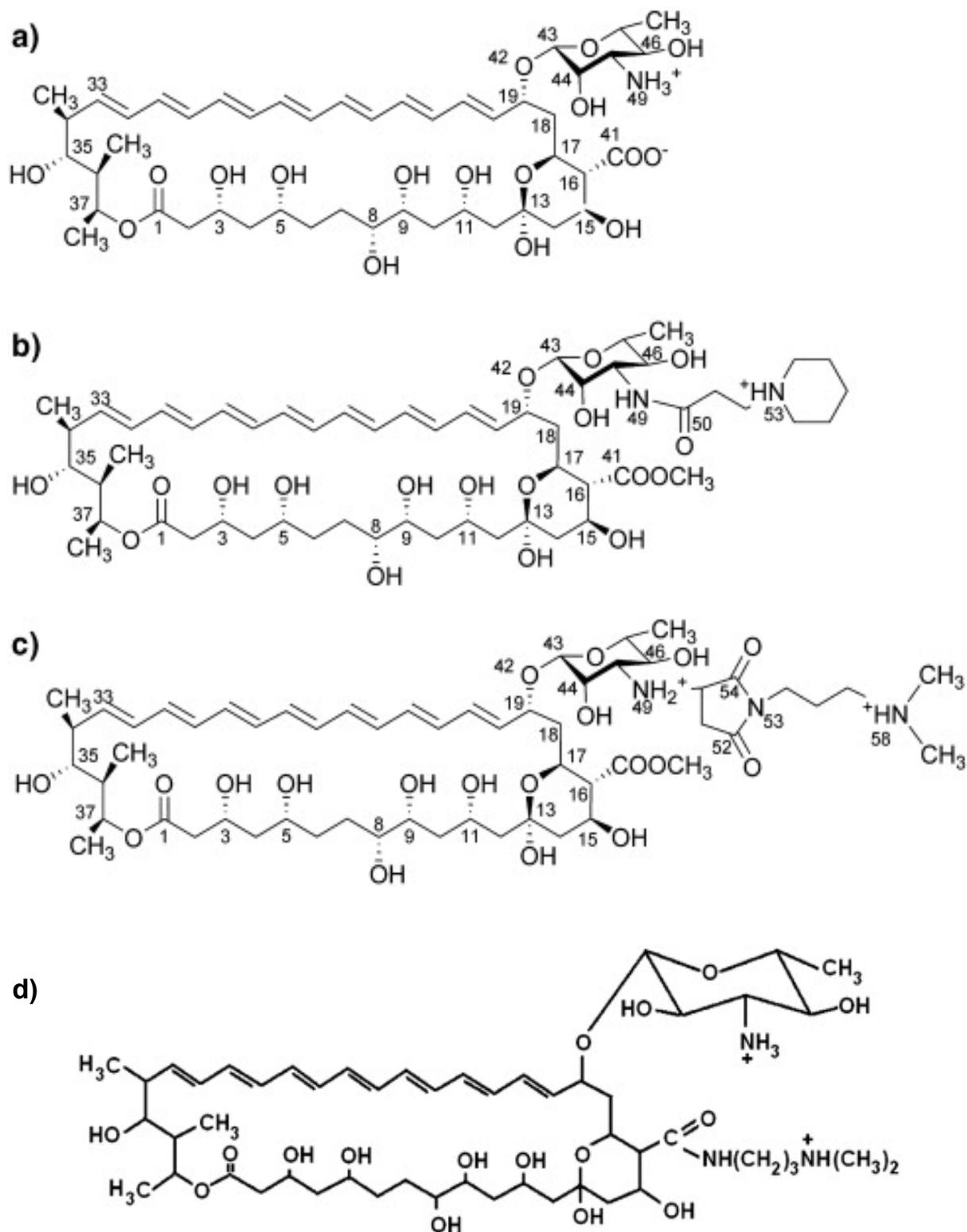


Figure N°5 : Structure de l'amphotéricine B (a) , et des trois dérivés semi synthétiques PAmE(b), SAmE (c) (Czub J. *et coll.*, 2009) et AMA (d) (Hianik T. *et coll.*, 2008).

Trois formulations lipidiques sont mises sur le marché :

- Abelcet[®] : l'association de l'amphotéricine B à deux molécules (Dimyristoylphosphatidylcholine et Dimyristoylphosphatidylglycérol) a permis d'avoir de l'amphotéricine B en complexe lipidique.
- Amphotec[®] ou Amphocil[®] : l'association de l'amphotéricine B au sulfate de cholestérol s'est révélée beaucoup moins toxique que l'amphotéricine B libre ou liée au désoxycholate, et ceci grâce au pouvoir solubilisant de ce dérivé de cholestérol.
- Ambisome[®] : l'incorporation de l'amphotéricine B dans des liposomes unilamellaires constitués de phosphatidylcholine hydrogéné, de cholestérol et de distéaroylphosphatidylglycérol a augmenté son index thérapeutique (**Andres E. et coll., 2001**).

Ces formulations restent les plus prometteuses malheureusement leur coût élevé reste un inconvénient majeur pour les pays en développement comme le notre.

4.3. Modulation des paramètres physico-chimiques

Selon **Legrand et coll., (1992)**, l'augmentation de la concentration d'amphotéricine B dans la solution antifongique conduit d'une part, à une prédominance des formes agrégées insolubles responsables d'une augmentation de sa cytotoxicité vis-à-vis des érythrocytes. D'autre part, pour une même quantité en amphotéricine B, le DMSO favorise plus de formes agrégées que le DMF.

Par ailleurs, les résultats obtenus par **Gaboriau et coll., (1997)** et **Petit et coll., (1998)** ont montré que le préchauffage d'une solution antifongique de Fungizone[®] à 70°C pendant 20 minutes provoque une super agrégation des molécules d'amphotéricine B. C'est une forme sous laquelle une forte diminution de la toxicité antifongique vis-à-vis des globules rouges est obtenue aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

En **2008**, **Belkherroubi-Sari L. et ses collaborateurs**, ont montré que l'efficacité de l'amphotéricine B utilisée à une concentration finale de 2 µM à pH 5,4 et 10,8, est maintenue vis-à-vis de *Candida albicans* IP444 avec une réduction de la toxicité vis-à-vis des globules rouges humains.

Torrado, Espada et coll. (2008) ont montré que la solubilité de l'amphotéricine B en milieu aqueux dépend de sa concentration, de la température, de la lumière, du taux d'oxygène et de la force ionique.

De plus, les travaux de **Boucherit K. et coll. (2011)** ont mis en évidence le rôle de l'environnement ionique de l'amphotéricine B sur la modulation de sa toxicité sélective. En effet, une bonne activité antifongique est obtenue suite à une augmentation de la concentration des sels (MgSO₄ et MgCl₂).

Par ailleurs, **Liao et coll., en 1999** ont étudié la relation entre viabilité, mortalité des cellules, intégrité membranaire et activité intracellulaire en présence et en l'absence d'amphotéricine B. Il apparaît que des cellules de *Candida albicans* exposées à des concentrations d'amphotéricine B comprises entre 0,5 et 1 μM sont incapables de se multiplier mais peuvent ressusciter.

En **2003**, ces mêmes auteurs, ont montré que les cellules fongiques traitées par l'amphotéricine B à une concentration de 0,5 μM et incubées à une température de 22°C, peuvent ressusciter après un temps d'incubation de 15 heures (**Liao R. S. et coll., 2003**). Il semblerait qu'il est possible de mettre en évidence, dans ces conditions expérimentales, la viabilité des cellules fongiques.

Plus récemment, **Boucherit Z. et coll. (2007)** ont montré que les cellules de *Candida albicans* ATCC10231 soumises à une concentration finale de 0,4 μM d'AmB, sont capables de ressusciter si le temps d'incubation est prolongé au delà de 24 heures. Dans ces conditions les levures sont viables et cultivables.

La toxicité sélective dépend non seulement de l'environnement physico-chimique à savoir la nature du solvant, le pH de la solution mère et la température mais aussi du temps d'incubation.

Partant des ces données, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur :

- L'étude de l'effet de l'amphotéricine B préparée dans différentes conditions physico-chimiques à savoir la nature du solvant (DMSO, DMF), la température (préchauffage des solutions mère d'antifongique à 70°C pendant 20 minutes), pH 5,4 et la concentration finale d'antifongique (0,4, 0,8, 1 et 1,2 μM) sur le phénomène de dormance des levures de *Candida albicans* ATCC10231,
- La vérification de la viabilité et la cultivabilité des cellules qui échappent à l'action de l'amphotéricine B.
- La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) et la Concentration Minimale Fongicide (CMF) de cet antifongique dans les différentes conditions expérimentales.
- L'évaluation de la toxicité des formulations élaborées vis-à-vis du globule rouge humain.

Deuxième chapitre
Matériel et méthodes

Le présent travail est réalisé au laboratoire : Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen.

1. Matériel biologique

Pour les tests sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B, nous avons utilisé :

- La levure *Candida albicans* ATCC10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD., USA.), cette souche est entretenue par repiquages successifs sur gélose Sabouraud et conservée à 4°C.
- Le globule rouge humain, (modèle universel de cellules animales), provenant d'un donneur unique sain.

2. Antifongique

Comme antifongique, nous avons utilisé l'amphotéricine B pure provenant des laboratoires Bristol-Meyer-Squibb France (Rueil-Malmaison, France).

3. Méthodes

3.1. Préparation des solutions antifongiques

Pour cette étude, nous avons utilisé deux solvants organiques : le Diméthyl sulfoxyde (DMSO) et le Diméthyl formamide (DMF). Des solutions stocks d'amphotéricine B sont préparées en extemporané à une concentration de 10^{-3} M puis ajustée à 10^{-4} M au spectrophotomètre à 407 nm selon la formule $A = \epsilon \cdot C \cdot L$ ($\epsilon_{407} = 150\ 000$) après une dilution au 1/100 dans le méthanol absolu (**Gaboriau F. et coll., 1997**).

Pour étudier l'effet du pH sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B, les solutions stocks sont diluées à 10^{-4} M dans le tampon acétate/acide acétique pH 5,4 à 100 mM.

3.2. Préparation de la suspension érythrocytaire

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec du tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10 mM, pH 7,4 contenant 150 mM de NaCl, puis suspendu à nouveau dans ce même tampon.

3.3. Croissance des levures sur milieu liquide

Les cultures sont menées dans des Erlenmeyers stériles de 100 mL.

Les Erlenmeyers sont ensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 24 heures. Cette préculture, elle-même obtenue dans les mêmes conditions par ensemencement des levures conservées sur le milieu Sabouraud gélosé à + 4°C. Les précultures et les cultures sont incubées dans un incubateur de paille

(Orbital shaker, Thermo-Forma) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute.

La mesure de la croissance est réalisée par numération cellulaire toutes les 60 minutes sur cellule de Thoma à l'aide d'un microscope binoculaire.

Pour étudier le phénomène de dormance des levures de *Candida albicans* ATCC10231 en présence d'amphotéricine B, la croissance est suivie sur une période de 40 heures. Il est à noter que la croissance des levures est réalisée à l'abri de la lumière afin de minimiser l'inactivation photodynamique de l'amphotéricine B (Koufen P. et coll., 1997).

3.4. Mise en évidence de la viabilité et de la cultivabilité des levures

A la deuxième heure de la phase stationnaire de la croissance, des aliquotes de 100µL sont prélevés de chaque culture et ensemencés sur des boîtes de Pétri contenant 10 mL de Sabouraud gélosé. Les boîtes de Pétri sont incubées à 35°C pendant 48 heures. Sont considérées positives, les cultures où il y a une croissance de levure visible à l'œil nu.

3.5. Evaluation de la cytotoxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

Les globules rouges humains sont suspendus dans le tampon PBS pH 7,4, 10 mM, à raison de 4000 cellules/mL.

La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 120 minutes. Dès l'addition de la solution antifongique à une concentration finale de 10 µM qui correspond au temps zéro de la réaction, des prélèvements de 500 µL à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalle régulier, auxquels nous avons ajouté 2 mL d'une solution de lavage glacée (NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes, nous avons récupéré le surnageant sur lequel nous avons dosé l'hémoglobine par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 548nm (Spectronic GenesysTM 2PC).

L'hémolyse totale est obtenue par la mise en suspension des globules rouges dans le tampon phosphate 10 mM pH 7,4 contenant de Triton X-100 à une concentration de 1 % (v/v).

Le taux d'hémolyse est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = 100 \frac{\text{DO en présence de Triton X-100} - \text{DO en présence d'AmB}}{\text{DO en présence de Triton X-100}}$$

(Murphy G. L. *et coll.*, 1995).

Troisième partie
Résultats et discussions

A partir des années 1980, le nombre de patients immunodéprimés a considérablement augmenté. Ainsi, les candidémies occupent entre la quatrième et la septième position des infections nosocomiales [(Marchetti O. *et coll.*, 2004) ; (Tortorano A. M. *et coll.*, 2004)].

Si *Candida albicans* est l'agent le plus fréquemment impliqué dans les mycoses systémiques, d'autres espèces fongiques naturellement peu sensibles à certains antifongiques ont émergées (Dannaoui E., 2004).

Certaines souches ont acquis des résistances, ce qui dans certains cas a pu être corrélé avec l'évolution clinique [(Redding S. W. *et coll.*, 1997) ; (Richet H. *et coll.*, 2002)].

Des variations de la distribution des espèces fongiques, tant sur le plan géographique que dans le temps ainsi que l'élargissement de l'arsenal thérapeutique compliquent le choix d'un traitement antifongique empirique et renforcent le besoin d'un outil de détection *in vitro* d'éventuelles résistances[(Rajagopalan N. *et coll.*, 1988) ; (Arikan S. *et Rex J. H.*, 2002) ; (Ostrosky-Zeichner *et coll.*, 2003) ; (Pfaller M. A. *et coll.*, 2004)].

Par conséquent, une meilleure compréhension du mécanisme d'action des antifongiques permet d'améliorer la prise en charge des mycoses systémiques chez les personnes immunodéprimées et de trouver une explication aux échecs thérapeutiques recensés dans le milieu hospitalier.

Notre étude s'inscrit dans cet ordre d'idée et consiste à étudier l'effet de quelques paramètres physico-chimiques (nature du solvant, pH et température) sur la modulation de la toxicité sélective de l'amphotéricine B. Nous nous sommes intéressés également à mettre en évidence, dans les conditions expérimentales précédentes, le phénomène de dormance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231 en présence d'amphotéricine B.

A- Effet de la nature du solvant sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B**1. Effet de la nature du solvant sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231****1.1. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMSO**

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMSO à une concentration de 10^{-4} M. L'antifongique est utilisé à des concentrations finales de 0,4 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration cellulaire de départ étant fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

La croissance des levures est suivie par dénombrement sur cellule de Thoma.

Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes pendant 40 heures.

Il est à noter que l'addition du DMSO seul à une concentration finale de 1,2 % (v/v) dans le milieu de culture, n'a aucun effet sur la croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N° 6** :

Nous remarquons que:

- La courbe témoin (cellules cultivées sur milieu Sabouraud liquide en l'absence d'amphotéricine B), montre qu'après incorporation de l'inoculum au temps zéro de la croissance à une concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL, les levures passent par une phase de latence de 3 heures caractérisée par un nombre constant de cellules. Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de $132 \cdot 10^6$ cellules/mL au bout de 8 heures d'incubation. Ce taux reste inchangé dans la phase stationnaire allant jusqu'à 11 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours/min. Ce nombre correspond à 100 % de croissance.
- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 μ M, la phase de latence se prolonge jusqu'à 26 heures, les cellules reprennent ensuite leur croissance d'une manière homologue au témoin. Le taux de croissance est de 87 % avec un degré d'inhibition de 13 %.
- En présence d'une concentration finale de 0,8 μ M d'amphotéricine B, les cellules passent par les trois phases de croissance. La phase de latence se prolonge jusqu'à 29 heures et le taux de croissance est de 42 % par rapport à la culture témoin. Le degré d'inhibition est de 58 %.
- L'addition de l'amphotéricine B à une concentration finale de 1 μ M, induit un prolongement de la phase de latence. Elle est de 32 heures, le taux de croissance est de 10 %.

- Par contre, aucune croissance n'est observée en présence d'une concentration finale d'amphotéricine B égale à 1,2 μM . Il est important de signaler que pour ces deux concentrations les levures sont incapables de croître après leur transfert sur milieu solide. La concentration minimale fongicide (CMF) de l'amphotéricine B préparée dans le DMSO vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 est de 1,2 μM .

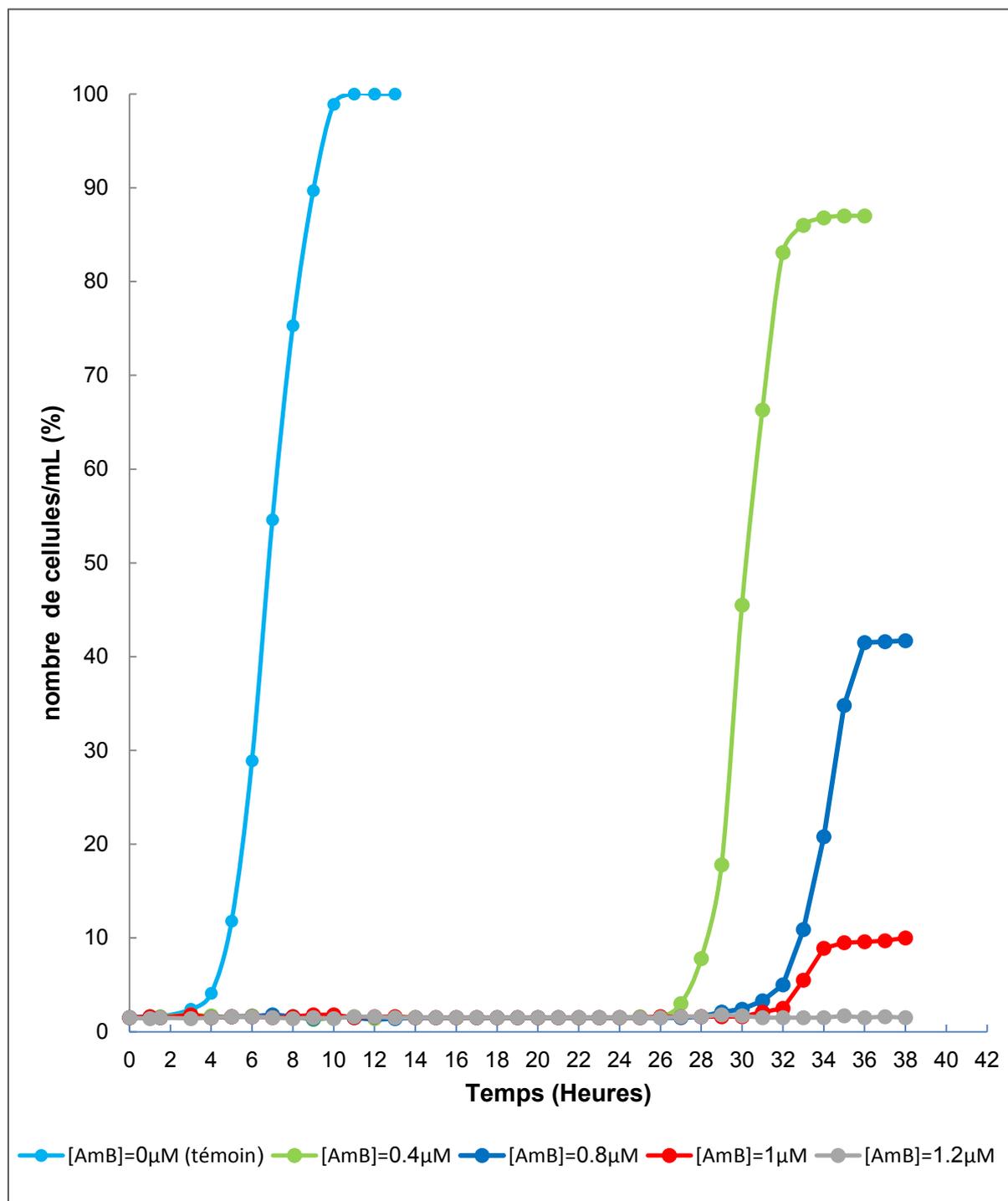


Figure N° 6: Effet des concentrations finales croissantes d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le DMSO sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

La croissance est menée sur Sabouraud liquide à 30°C .

La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

1.2. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMF

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMF à une concentration de 10^{-4} M. L'antifongique est utilisé à des concentrations finales de 0,4 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. La croissance des levures est suivie par dénombrement sur cellule de Thoma.

Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes pendant 40 heures.

Le DMF seul est incorporé dans le milieu à une concentration finale de 1,2 % (v/v). Cette concentration n'a aucun effet sur la croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N° 7** :

Nous remarquons que:

- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 μ M, la phase de latence se prolonge jusqu'à 24 heures de la culture, les cellules reprennent ensuite leur croissance d'une manière comparable au témoin (cellules incubées en l'absence d'amphotéricine B). Le taux de croissance est de 91,5 %. Le degré d'inhibition est estimé à 8,5 %.
- En présence d'une concentration finale de 0,8 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence est de 27 heures avec un taux de croissance maximum de 50 %.
- Aucune croissance n'est observée pour des concentrations finales en amphotéricine B supérieures ou égale à 1 μ M. Les cellules sont viables et non cultivables. 1 μ M correspond à la concentration minimale fongicide de l'amphotéricine B préparée dans le DMF vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

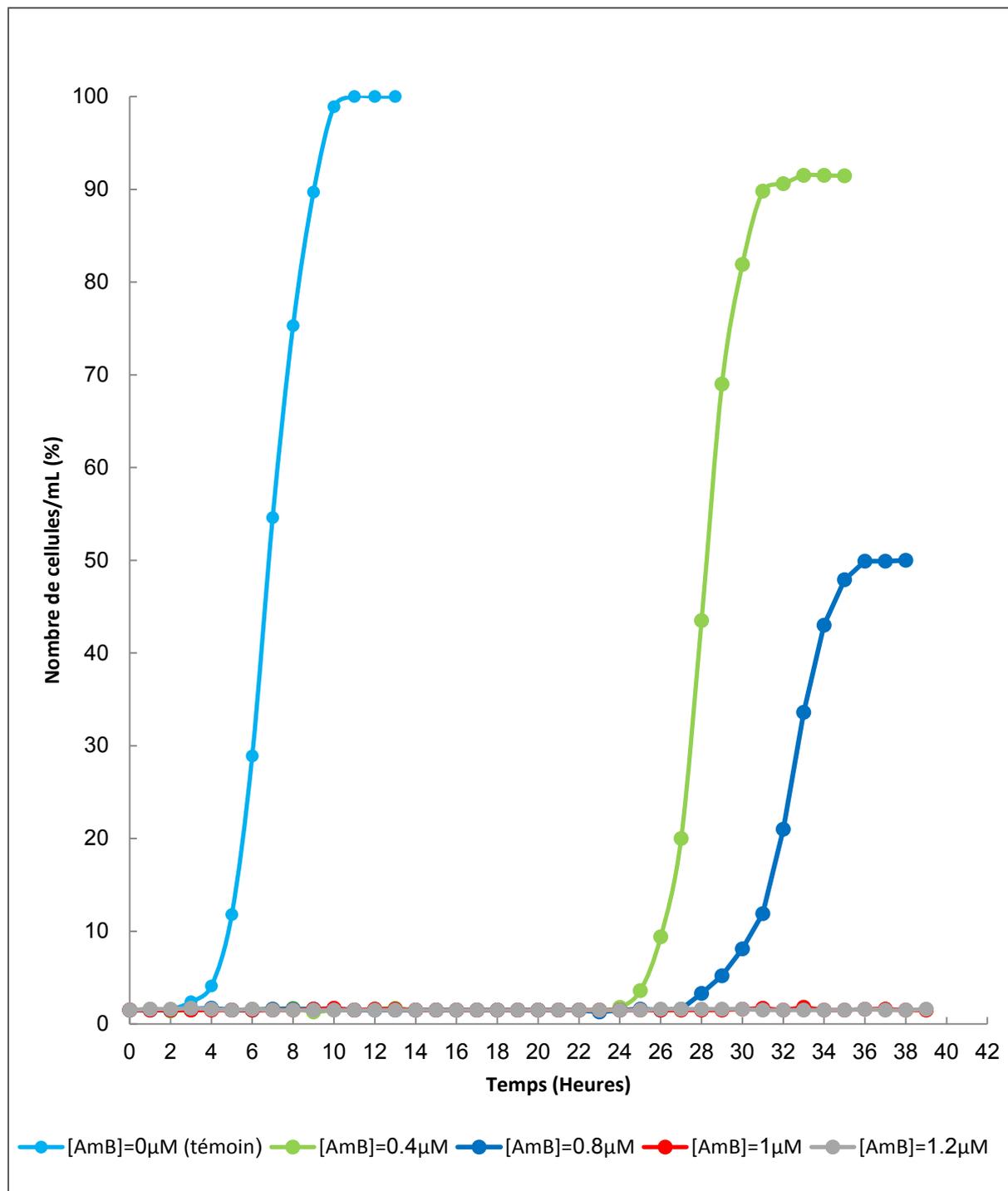


Figure N° 7: Effet des concentrations finales croissantes d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le DMF sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

La croissance est menée sur Sabouraud liquide à 30°C.

La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL

2. Effet de la nature du solvant sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

2.1. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMSO

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMSO à une concentration mère de 10^{-4} M et utilisée à une concentration finale de 10 μ M.

La **figure N° 8** représente les résultats relatifs à l'effet de l'amphotéricine B sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez le globule rouge humain (le temps d'incubation est de 120min).

- La courbe (a) représente le témoin sans aucune addition. Nous n'observons aucune fuite d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet du DMSO seul. Il faut signaler que le volume de DMSO incorporé est équivalent à celui utilisé en présence d'amphotéricine B. Nous remarquons que les globules rouges perdent 79 % de leur hémoglobine après seulement 5 minutes d'incubation. Ce taux atteint 85 % après 120 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue
- La courbe (c) représente la fuite de l'hémoglobine en présence d'amphotéricine B à 10 μ M. Les érythrocytes perdent près de 79 % de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Au bout de 120 minutes d'incubation, ils se vident complètement de leur hémoglobine (97 % de fuite).

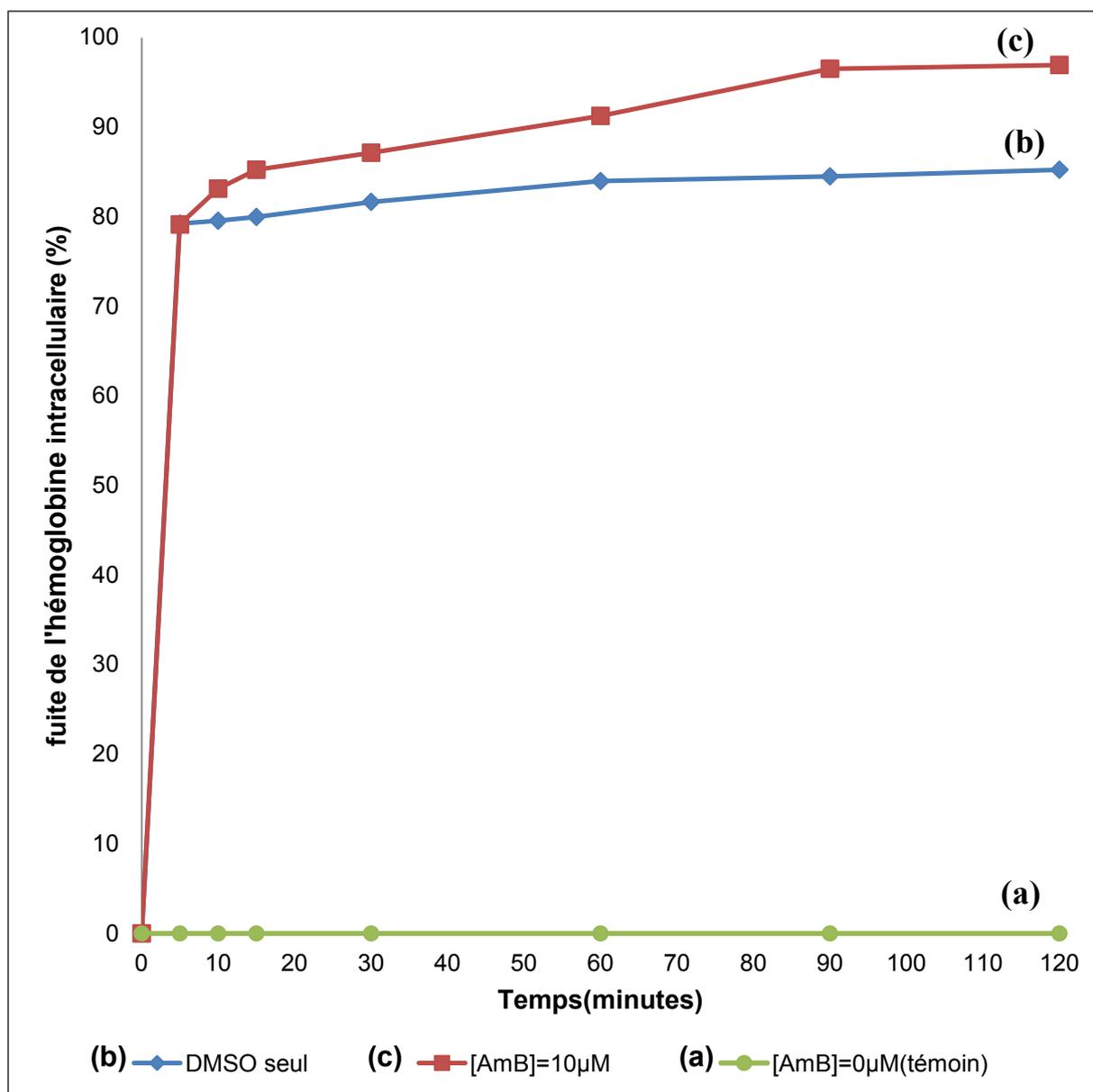


Figure N° 8 : Effet de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans du DMSO sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains.

La concentration finale d'amphotéricine B est de 10 µM.

2.2. Solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMF

Les résultats de l'effet de l'amphotéricine B sur la fuite de l'hémoglobine chez les globules rouges humains sont regroupés sur la **figure N° 9**.

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMF à une concentration mère de 10^{-4} M et utilisée à une concentration finale de 10 μ M.

Nous constatons que :

- La courbe (a) représente le témoin sans aucune addition. Aucune lyse n'est observée jusqu'à 120 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet du DMF seul à un volume équivalent à celui ajouté en présence d'amphotéricine B. Nous observons que les globules rouges perdent 8,5 % d'hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux atteint un maximum de 76 % au bout de 60 minutes. Ce dernier reste constant jusqu'à 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de l'amphotéricine B à 10 μ M. Les globules rouges perdent près de 83 % de leur hémoglobine après seulement 5 minutes d'incubation. Ce taux d'hémolyse se stabilise autour de 95 % à partir de 30^{ème} minute d'incubation.

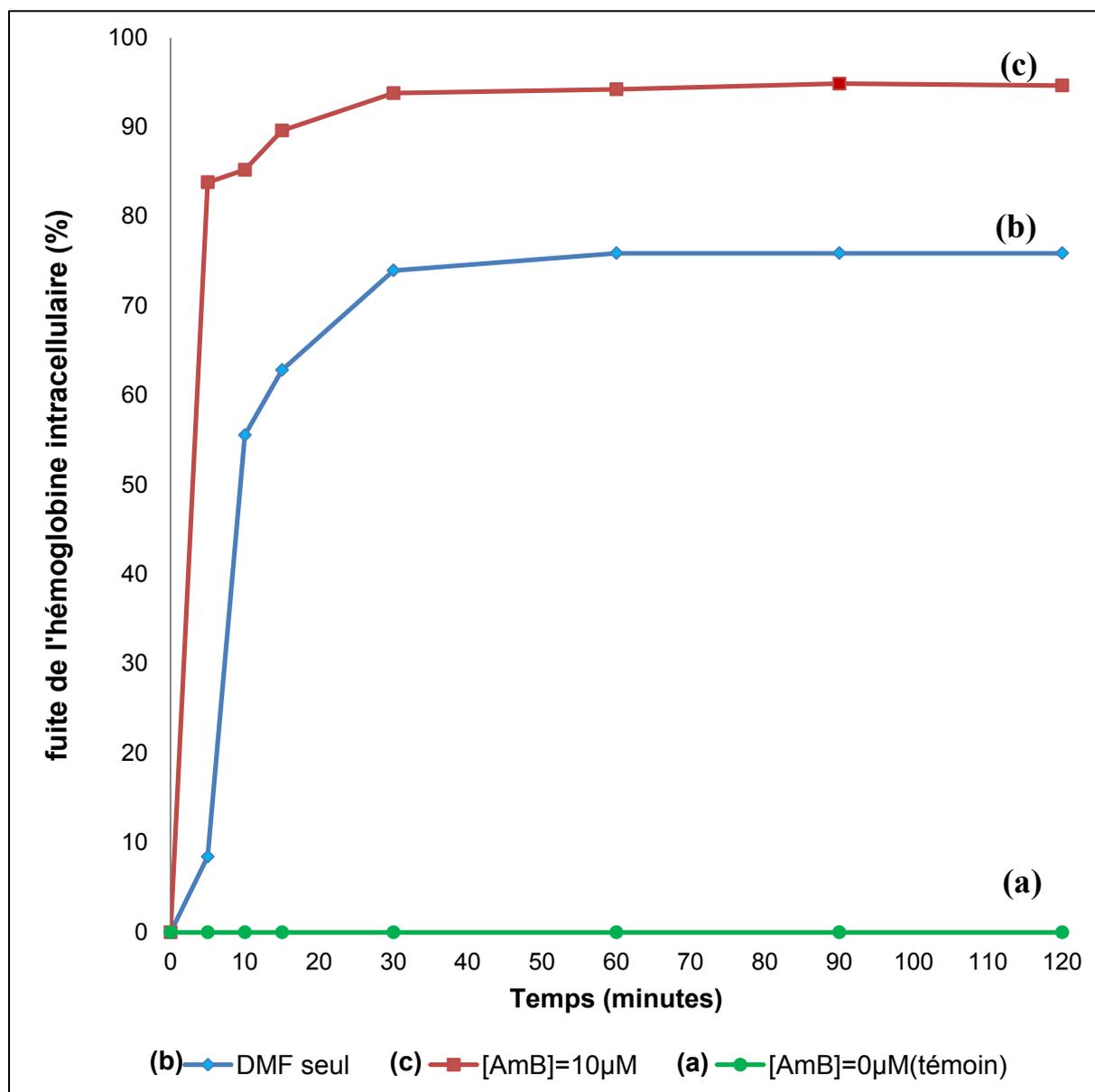


Figure N° 9 : Effet de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le DMF sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains. La concentration finale d'amphotéricine B est de 10 µM.

Il ressort de cette partie de l'étude que :

- Quelque soit le solvant utilisé pour la préparation de la solution mère d'amphotéricine B, les levures reprennent leur croissance à partir d'une concentration équivalente à 0,4 μM si le temps d'incubation est prolongé au delà de 24 heures. Nous parlons de phénomène de dormance des levures en présence d'amphotéricine B. La concentration de 0,4 μM correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Boucherit Z. et coll., 2007.**
- Le taux de croissance est inversement proportionnel à la concentration finale d'amphotéricine B additionnée au milieu de culture. Il est estimé à 87 %, 42 % et 10 % pour des concentrations finales respectives de l'amphotéricine B préparée dans le DMSO de 0,4 - 0,8 et 1 μM . En revanche, pour l'amphotéricine B préparée dans le DMF, le taux de croissance est de 8,5 % pour 0,4 μM et 50 % pour 0,8 μM .
- La CMF de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 est de 1,2 μM pour le DMSO et 1 μM pour le DMF.
- Pour les tests de cytotoxicité, il est important de signaler que le DMSO et DMF seuls, sont très toxiques vis-à-vis du globule rouge humain. En effet, les cellules perdent 85 % de leur hémoglobine intracellulaire pour le DMSO et 76 % pour le DMF.
- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 10 μM solubilisé dans le DMSO ou le DMF, les cellules se vident complètement de leurs contenus en hémoglobine.

B- Effet du pH 5,4 sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B**1. Effet du pH 5,4 sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231**

Les résultats de la première partie de ce travail ont révélé que l'amphotéricine B préparée dans le DMSO ou dans le DMF garde son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231. Malheureusement elle est très toxique vis-à-vis du globule rouge humain. Les travaux de **Belkherroubi-Sari L. et ses collaborateurs (2009)**, ont montré une amélioration de l'index thérapeutique de cette drogue à pH 5,4. C'est pourquoi, il nous a paru judicieux d'étudier l'effet simultané de ces deux paramètres (nature du solvant et pH) sur le phénomène de dormance et la toxicité sélective de cet antifongique.

1.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO

A partir d'une solution stock d'amphotéricine B, préparée en extemporané dans le DMSO à une concentration de 10^{-3} M, nous avons préparé la solution mère d'antifongique à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique pH 5,4, 100 mM.

L'antifongique est utilisé à des concentrations finales de 0,4 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration cellulaire de départ étant fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

La croissance des levures est suivie par dénombrement sur cellule de Thoma. Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes pendant 40 heures.

Le test d'innocuité montre que l'addition de 1,2 mL d'une solution de 1/10 (v/v) (DMSO / Tampon) n'a aucun effet sur la croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N° 10**

Nous remarquons que:

- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 μ M, nous obtenons un prolongement de la phase de latence. Cette dernière passe de 3 à 27 heures. Après 36 heures d'incubation, le taux de croissance est d'environ 80 % par rapport aux cellules témoins incubées sans aucune addition. Cette concentration correspond à la CMI.
- En présence d'une concentration finale de 0,8 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence se prolonge jusqu'à 32 heures. Le taux de croissance est 30 %.
- Pour les deux concentrations précédentes en antifongique (0,4 et 0,8 μ M), les levures qui ressuscitent sont viables et cultivables.
- En revanche, aucune croissance n'est observée pour des concentrations finales en amphotéricine B supérieures ou égales à 1 μ M. Les cellules sont incapables de croître sur milieu solide. Il s'agit de la CMF.

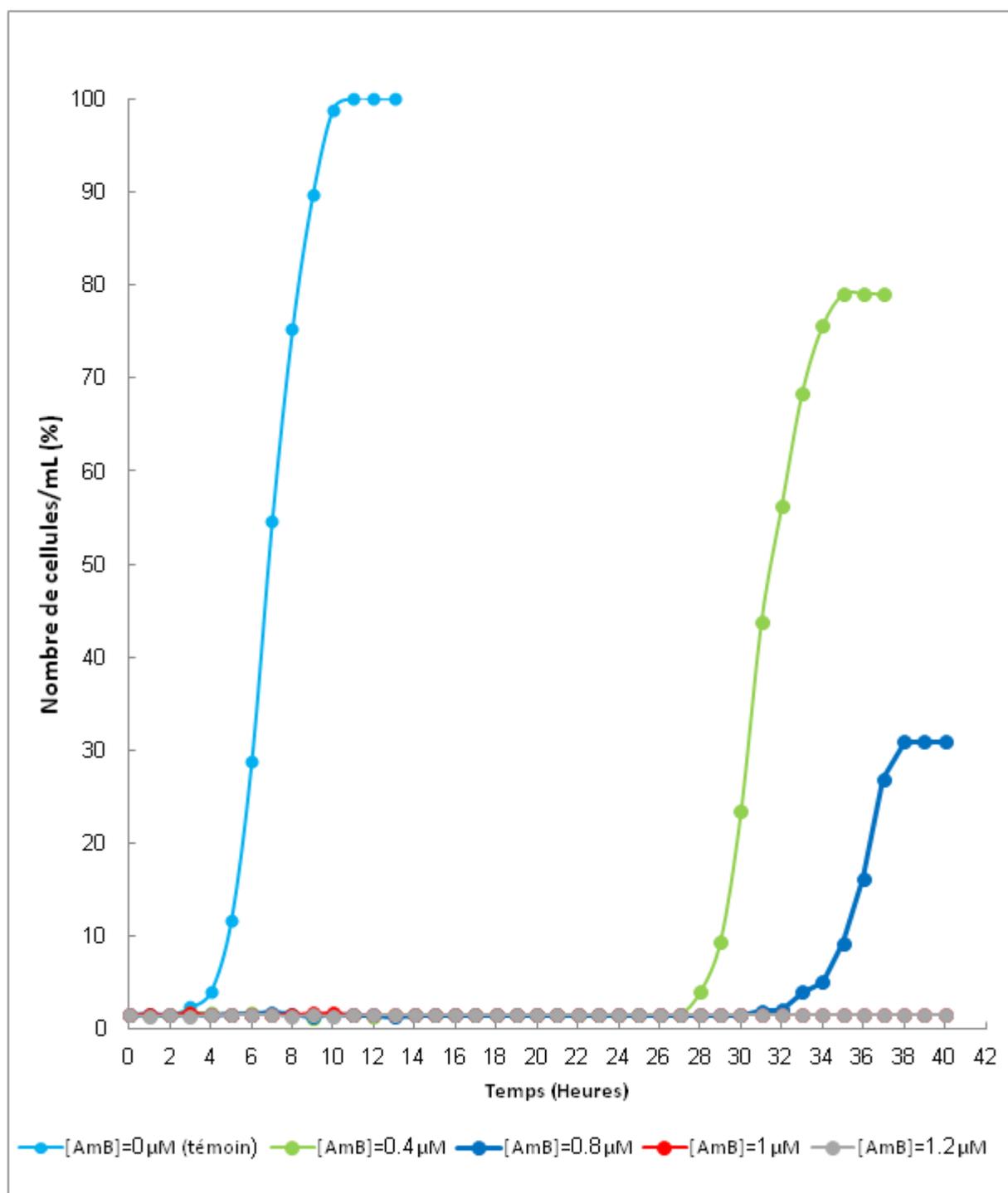


Figure N° 10: Effet des concentrations finales croissantes d'amphotéricine B préparée dans le DMSO puis diluée dans le tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,4, 100 mM, à 10^{-4} M sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

La croissance est menée sur Sabouraud liquide à 30°C.

La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

1.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF

Pour ces expériences, la solution stock d'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMF à une concentration de 10^{-3} M puis diluée et ajustée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique à pH 5,4, 100 mM. L'antifongique est utilisé à des concentrations finales de 0,4 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration cellulaire de départ étant fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

La solution qui a servie pour la préparation de la solution mère d'antifongique (DMF/tampon) n'a aucun effet sur la croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231.

La **figure N° 11** regroupe les résultats relatifs à cette partie de l'étude.

Nous remarquons que:

- Pour 0,4 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence se prolonge jusqu'à 24 heures par rapport à la culture témoin. Le taux de croissance est d'environ 82 %. Cette concentration correspond à la CMI de cette drogue vis-à-vis de la souche *Candida albicans* ATCC10231.
- A 0,8 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence est de 29 heures. Le taux de croissance est d'environ 30 %.
- Aucune croissance n'est observée ni en milieu liquide ni après le transfert des levures sur milieu solide en présence de concentrations finales supérieures ou égales à 1 μ M d'amphotéricine B. Cette concentration représente la CMF de cet antifongique vis-à-vis de la souche *Candida albicans* ATCC10231.

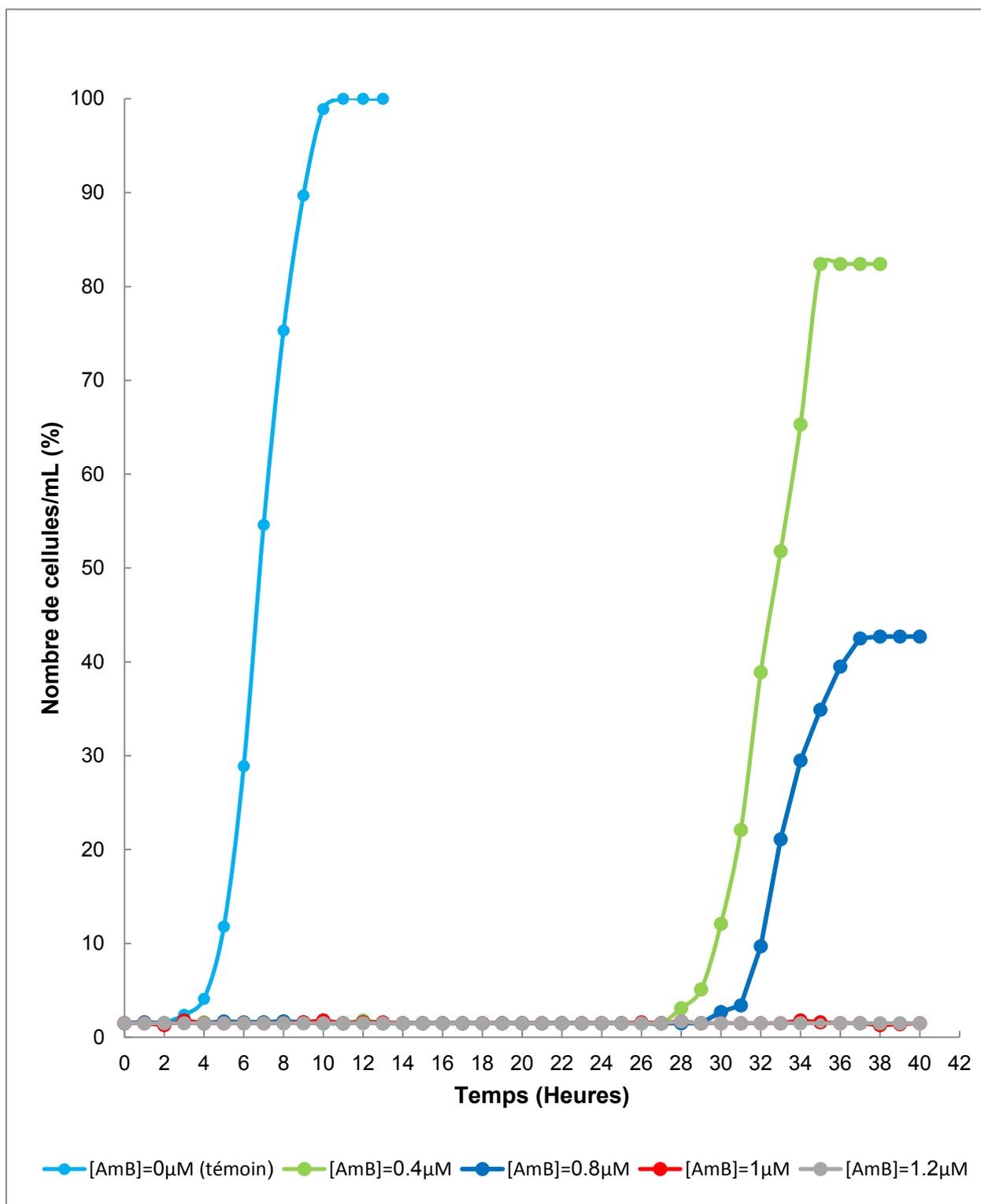


Figure N° 11: Effet des concentrations finales croissantes d'amphotéricine B préparée à 10^{-3} M dans le DMF puis diluée dans le tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,4, à 10^{-4} M sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

La croissance est menée sur Sabouraud liquide à 30°C.

La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

2. Effet du solvant et du pH 5,4 sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

2.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO

L'amphotéricine B est préparée selon le même protocole expérimental utilisé pour les tests d'efficacité. La concentration finale est de 10 μM .

Les résultats sont regroupés sur la **figure N° 12**.

- Les courbes (a) et (b) représentent respectivement le témoin sans aucune addition d'amphotéricine B et la courbe du test d'innocuité du solvant. Nous n'observons aucune lyse des globules rouges pendant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'amphotéricine B à 10 μM . Les globules rouges perdent près de 4 % de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation. Ce taux augmente rapidement pour atteindre 71 % après 15 minutes d'incubation et se stabilise autour de 87 % à partir de la 60^{ème} minute d'incubation.

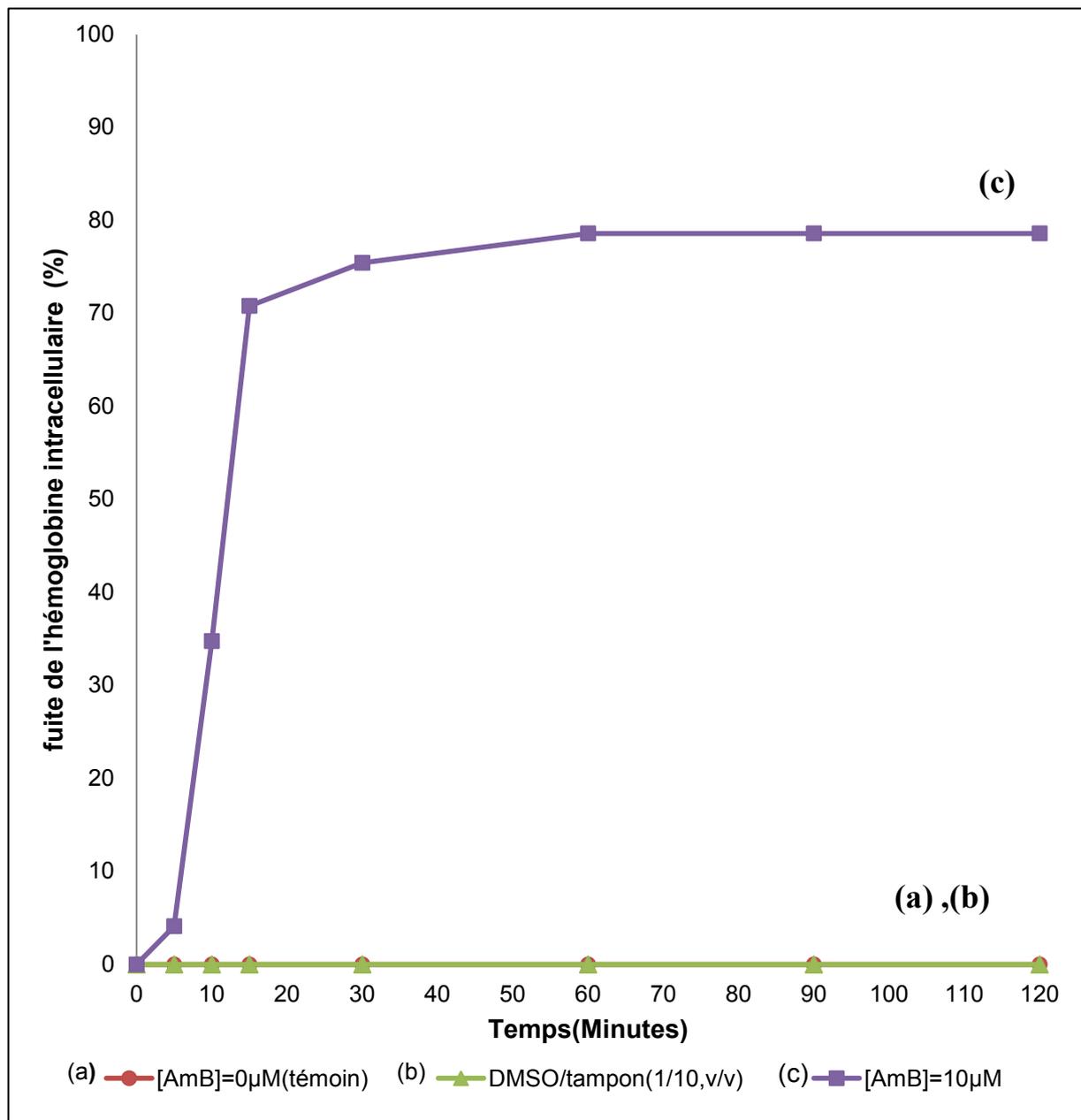


Figure N°12 : Effet de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium /acide acétique pH 5,4, 100 mM sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez les globules rouges humains.

La concentration finale d'amphotéricine B est de 10 µM.

2.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF

Les résultats relatifs à l'effet de la solution stock de l'amphotéricine B préparée dans le DMF à une concentration de 10^{-3} M puis diluée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium / acide acétique pH 5,4, 100 mM sur la lyse des érythrocytes sont rassemblés sur la **figure N°13**.

La concentration finale de l'antifongique est de 10 μ M.

Nous remarquons que :

- Les courbes (a) et (b) représentent respectivement le témoin (cellules incubées en l'absence d'antifongique) et les cellules incubées en présence d'une solution de 1/10 (v/v) de DMF dans le tampon (innocuité du solvant). Aucune lyse de cellules n'est observée jusqu'à 120 minutes d'incubation à 37°C.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'amphotéricine B à 10 μ M. La fuite de l'hémoglobine intracellulaire passe de 10 % après 5 minutes d'incubation à 62 % après 15 minutes d'incubation. Ce taux reste inchangé jusqu'à 120 minutes d'incubation.

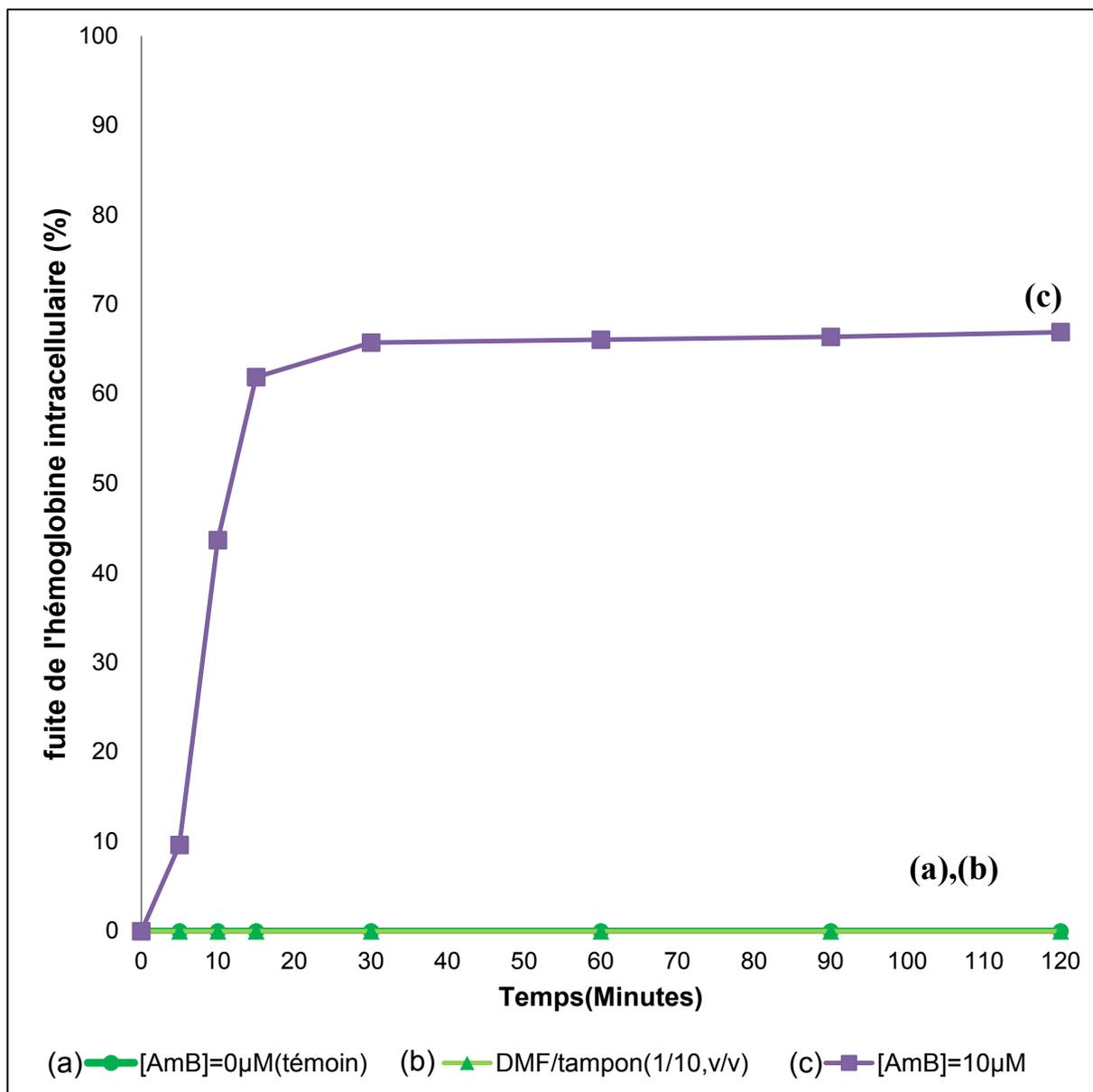


Figure N°13 : Effet de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium /acide acétique pH 5,4, 100 mM sur la fuite de l'hémoglobine chez les globules rouges.

La concentration finale d'amphotéricine B est de 10 µM.

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que :

- L'utilisation du tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,4, 100 mM, n'induit aucune modification du pH des solutions réactionnelles (le milieu Sabouraud liquide pour les levures et le PBS pour les globules rouges).
- Pour une concentration finale en antifongique égale à 0,4 μM , les cellules reprennent leur croissance si le temps d'incubation est prolongé au delà de 24 heures. C'est le phénomène de dormance des cellules.
- Le phénomène de dormance est observé pour des concentrations de 0,4 et 0,8 μM ce qui nous laisse supposer que certaines levures sont capables de rétablir les dommages exercés par cette drogue. En effet, **González-Párraga P. et coll. (2011)**, ont observé une activation remarquable de la réponse enzymatique anti-oxydative par activation de la catalase et de la glutathion réductase chez des cellules de *Candida albicans* exposées à 0,5 et 5 μM d'amphotéricine B. Ils ont montré aussi que l'augmentation de la concentration finale induit une diminution du pourcentage de cellules viables.
- 0,4 μM d'amphotéricine B est la plus faible concentration qui permet le ressuscitement des cellules. Il s'agit de la CMI.
- Quelque soit la formulation utilisée pour la préparation de la solution mère d'antifongique, la CMI est de 0,4 μM et la CMF est de 1 μM .
- De plus, pour 0,4 μM , l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis des levures *Candida albicans* ATCC10231 est augmentée respectivement de 7 % et de 10 % pour des solutions mères préparées dans le tampon acétate /acide acétique pH 5,4, 100 mM par rapport aux solutions dissoutes dans le DMSO et le DMF. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Belkherroubi-Sari L. et coll. (2009)** qui ont montré que l'amphotéricine B préparée dans le tampon acétate/acide acétique pH 5,4, 100 mM se reparti principalement sous forme d'agrégats solubles et insolubles (toxique).
- Il est intéressant de noter que dans ces conditions expérimentales, une diminution de la toxicité de cet antifongique vis-à-vis des globules rouges humains est observée. En effet, la préparation de la solution mère d'antifongique dans le tampon acétate de sodium /acide acétique pH 5,4, 100 mM, réduit sa toxicité de 10 % pour le DMSO et de 30 % environ pour le DMF.

Cette protection des cellules animales est probablement liée à la diminution de la concentration finale du solvant organique.

C- Effet du pH 5,4 et du préchauffage de la solution antifongique sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B

1. Effet du pH 5,4 et du préchauffage 20 minutes à 70°C sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231

1.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO

A partir d'une solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO à une concentration de 10^{-3} M, nous avons préparé la solution mère d'antifongique par dilution à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique pH 5,4, 100 mM. La solution mère est ensuite préchauffée pendant 20 minutes à 70°C.

Les concentrations finales en antifongiques sont fixées à 0,4 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration cellulaire de départ étant fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. La croissance des levures est mesurée par dénombrement sur cellule de Thoma.

Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes pendant 40 heures.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N° 14**.

Nous remarquons que :

- En présence de 0,4 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence se prolonge jusqu'à 31 heures. Le taux de croissance est d'environ 69,2 % par rapport à la culture témoin après 39 heures d'incubation. Le préchauffage de la solution mère augmente son efficacité d'environ 10 %. Il s'agit de la CMI.
- En présence d'une concentration finale de 0,8 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence est de 34 heures et le taux de croissance est de 28,5 %, par rapport au témoin. A cette concentration, l'amélioration de l'efficacité de cette drogue n'est que de 2 % par rapport à la solution mère non préchauffée (figure N°10). Les levures transférées sur milieu solide sont capables de former des colonies.
- Pour des concentrations finales d'AmB de 1 μ M ou de 1,2 μ M, aucune croissance n'est observée. Les cellules ne sont ni viables ni cultivables. 1 μ M d'amphotéricine B finale représente la CMF.

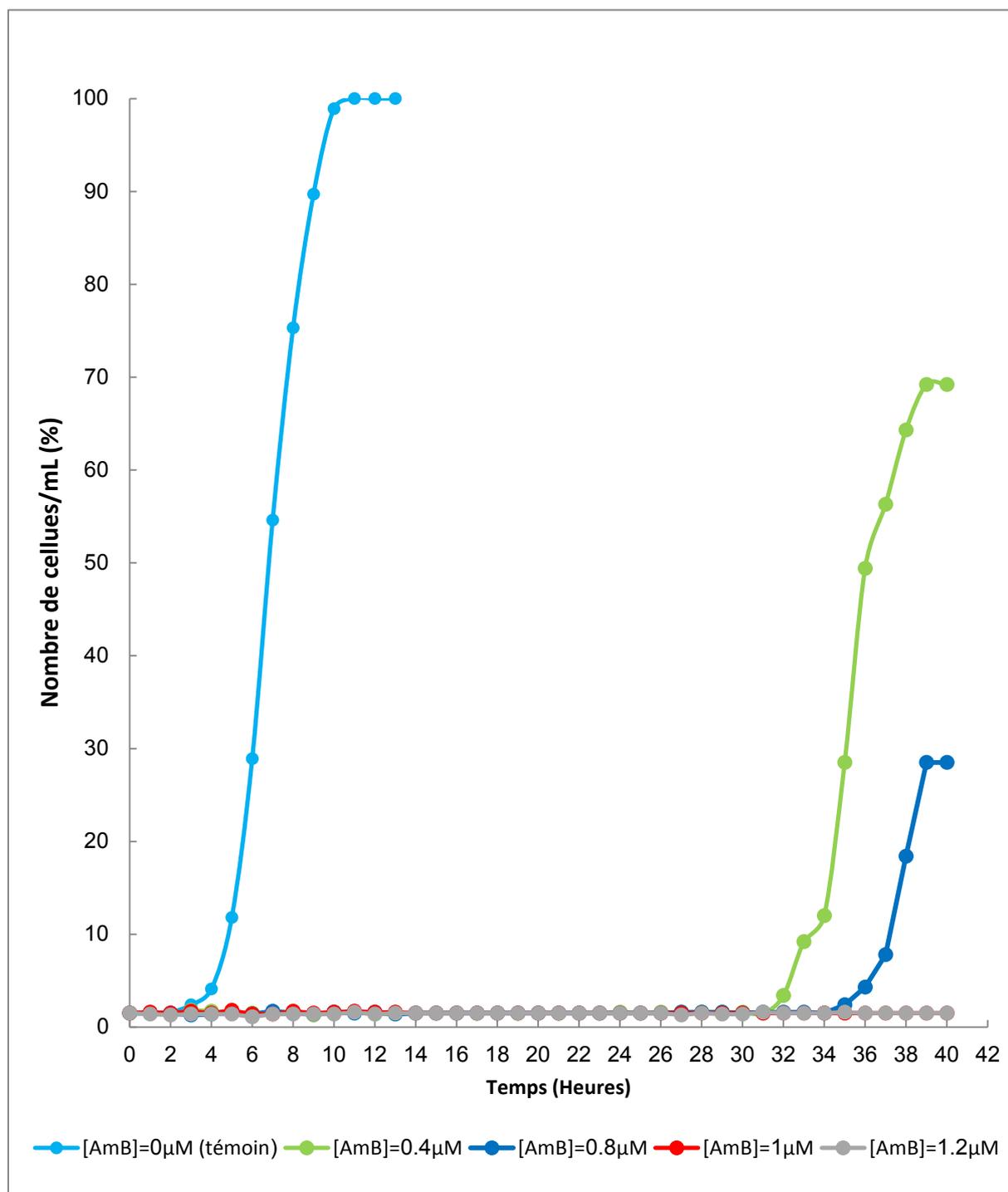


Figure N° 14: Effet des concentrations finales croissantes d'amphotéricine B préparée dans le DMSO puis diluée dans le tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,4, 100 mM à $10^{-4}\mu\text{M}$ et préchauffée 20 minutes à 70°C sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

La croissance est menée sur Sabouraud liquide à 30°C .

La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

1.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMF à une concentration de 10^{-3} M puis diluée et ajustée à 10^{-4} M dans le tampon (acétate de sodium/ acide acétique pH 5,4, 100 mM et préchauffée pendant 20 minutes à 70°C. L'antifongique est utilisé à des concentrations finales de 0,4 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration cellulaire de départ étant fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N° 15** :

Nous remarquons que:

- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 μ M, un prolongement de la phase de latence est observé. Elle est de 28 heures. Les cellules reprennent ensuite leur croissance et atteignent un taux maximum de 78,5 %.
- En présence d'une concentration finale de 0,8 μ M d'amphotéricine B, la phase de latence est de 33 heures et le taux de croissance est de 28 %.

Pour ces deux concentrations, les levures sont capables de former des colonies après leur transfert sur milieu solide. Elles sont donc viables et cultivables.

- Une amélioration respective de l'efficacité de 4 % et de 2 % est obtenue pour 0,4 μ M et 0,8 μ M d'amphotéricine B par rapport aux solutions non préchauffées.
- En revanche, la présence d'une concentration finale de 1 μ M ou de 1,2 μ M d'amphotéricine B, provoque une inhibition totale de la croissance. Le taux croissance reste nulle même si le temps d'incubation est prolongé jusqu'à 40 heures.

Le préchauffage des solutions mères n'améliore pas l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules de *Candida albicans* ATCC10231

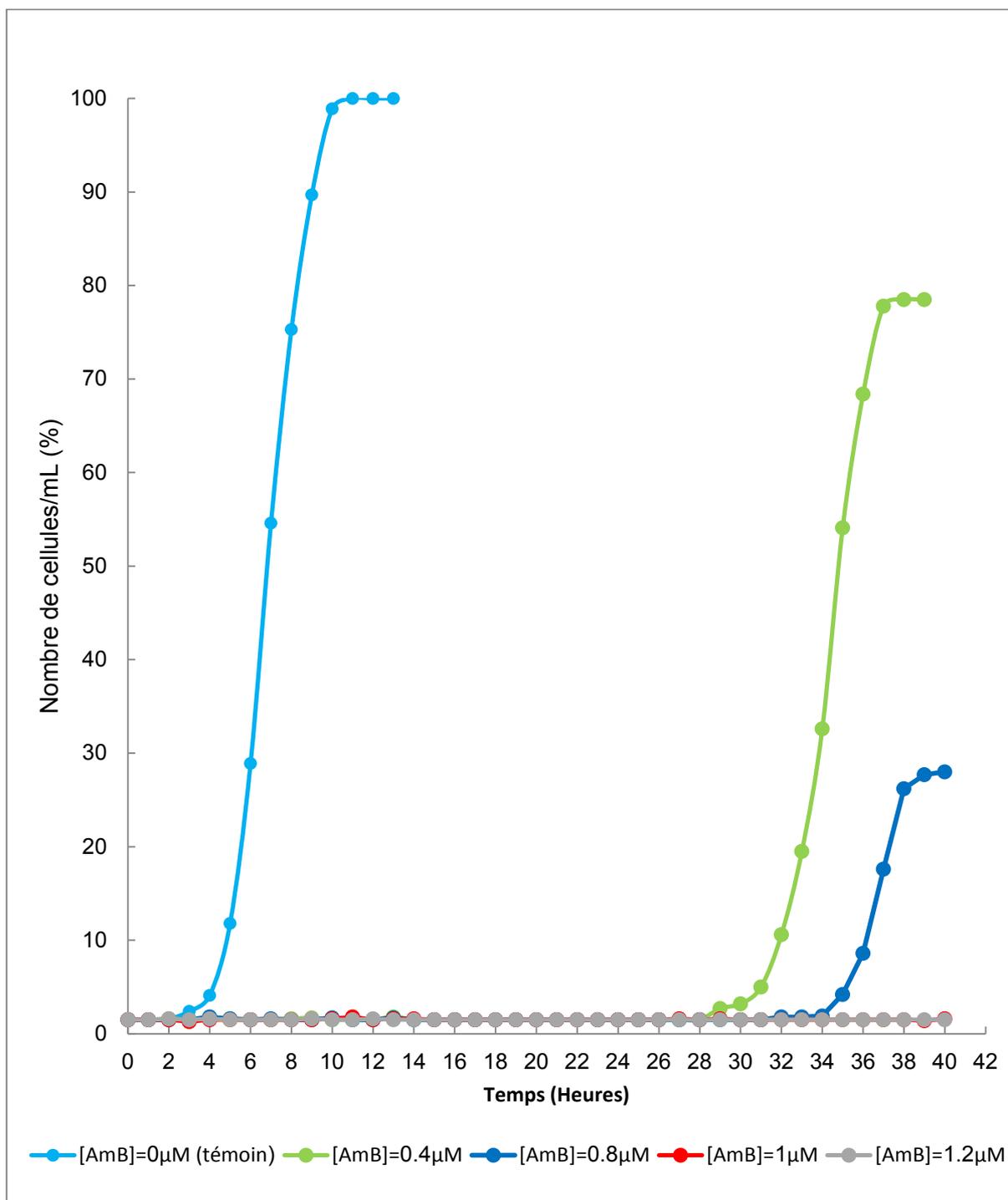


Figure N° 15: Effet des concentrations finales croissantes d'amphotéricine B préparée dans le DMF puis diluée dans le tampon acétate de sodium/acide acétique pH 5,4, 100 mM à 10^{-4} μ M et préchauffée 20 minutes à 70°C sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231.

La croissance est menée sur Sabouraud liquide à 30°C.

La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL.

2. Effet du pH 5,4 et du préchauffage 20 minutes à 70°C sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

2.1. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMSO

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMSO à une concentration de 10^{-3} M. Elle est ensuite diluée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique pH 5,4, 100 mM, préchauffée pendant 20 minutes à 70°C et utilisée à une concentration finale de 10 μ M.

La **figure N° 16** représente l'effet de l'amphotéricine B sur la fuite de l'hémoglobine des globules rouges humains.

- Les courbes (a) et (b) représentent respectivement, le témoin sans aucune addition et l'effet de l'ajout du DMSO/ tampon 1/10 (v/v) préchauffée à 20 minutes à 70°C à un volume équivalent à celui utilisé en présence d'amphotéricine B. Nous n'observons aucune lyse pendant toute la durée de l'expérimentation (120 minutes).

- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'amphotéricine B à 10 μ M. La fuite de l'hémoglobine est de 4,5 % après 10 minutes d'incubation et de 12,6 % après 15 minutes d'incubation. Au bout de la 120^{ème} minute, ce taux reste constant et est égale à 17 %.

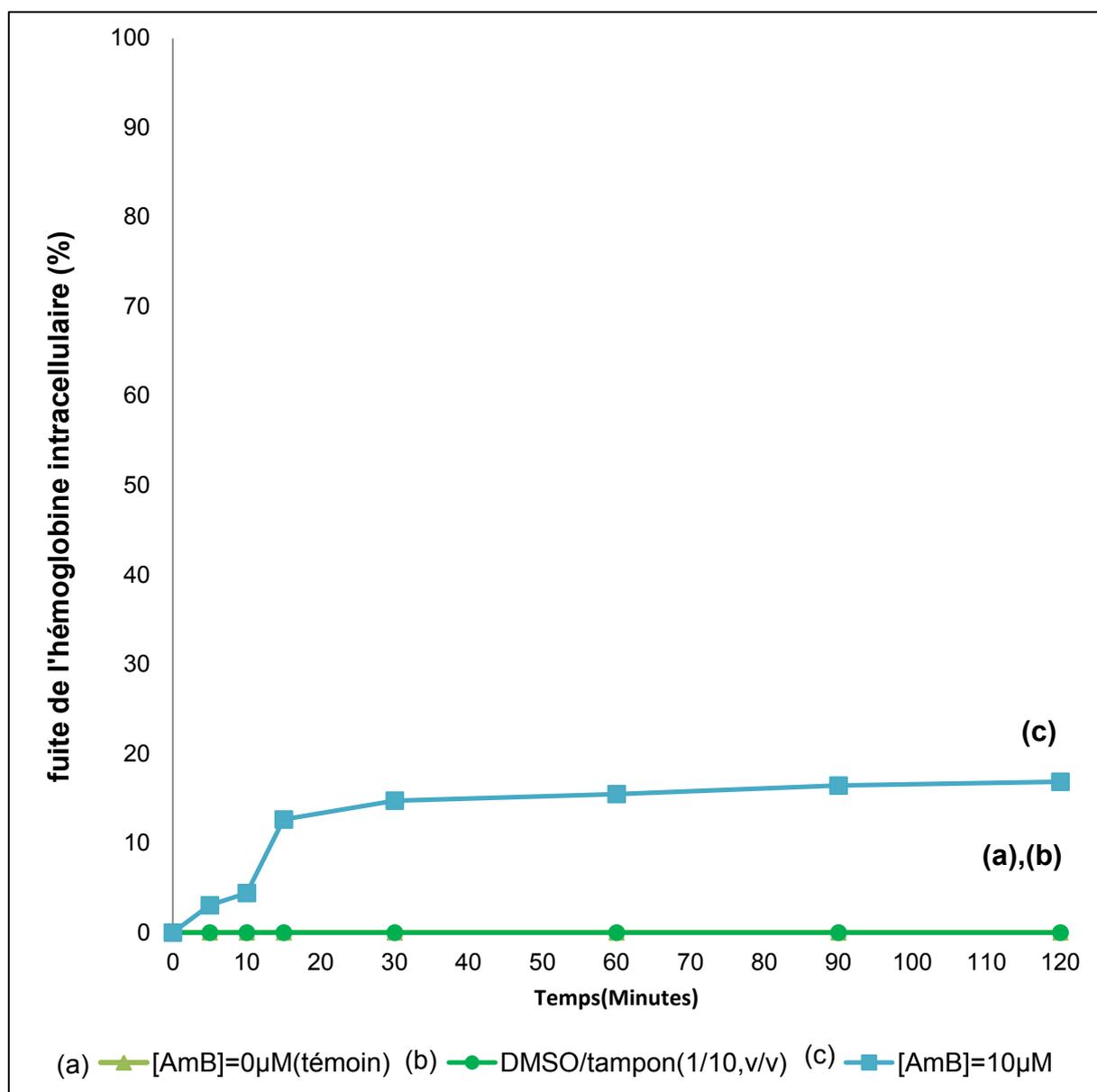


Figure N°16 : Effet de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium /acide acétique pH 5,4, 100 mM et préchauffée 20 minutes à 70°C , sur la perte de l'hémoglobine chez les globules rouges.

La concentration finale d'amphotéricine B est de $10\ \mu\text{M}$.

La solution stock d'amphotéricine B est préparée dans le DMSO à 10^{-3} M.

2.2. Solution stock d'amphotéricine B préparée dans le DMF

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMF à une concentration de 10^{-3} M. Elle est ensuite diluée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique pH 5,4, 100 mM, préchauffée 20 minutes à 70°C et utilisée à une concentration finale de $10\ \mu\text{M}$.

La **figure N° 17** représente l'effet de l'amphotéricine B, sur la perte de l'hémoglobine par le globule rouge humain (le temps d'incubation est de 120 minutes).

- Les courbes (a) et (b) représentent respectivement, le témoin sans aucune addition et l'effet de l'addition du DMF/tampon 1/10 (v/v) préchauffée pendant 20 minutes à 70°C à un volume équivalent à celui utilisé en présence d'amphotéricine B. Aucune lyse des cellules n'est observée jusqu'à la fin de l'expérimentation (120 minutes).

- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'amphotéricine B à $10\ \mu\text{M}$. Les globules rouges perdent 6 % de leur hémoglobine après 15 minutes d'incubation. Ce taux se stabilise à 13 % au bout de la 60^{ème} et reste inchangé jusqu'à la fin de l'expérience.

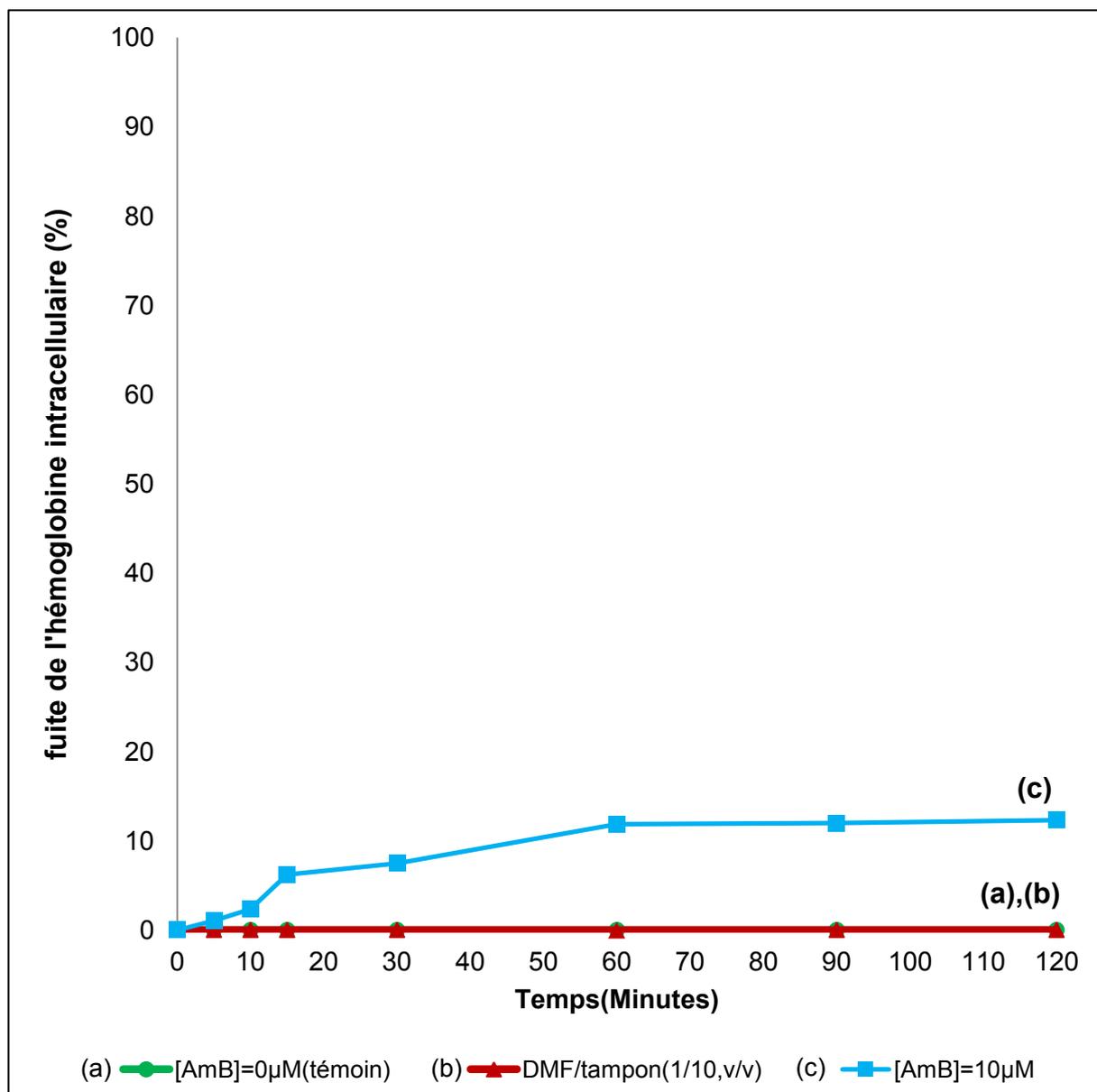


Figure N°17 : Effet de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M dans le tampon acétate de sodium /acide acétique pH 5,4, 100 mM et préchauffée pendant 20 minutes à 70°C , sur la perte de l'hémoglobine chez les globules rouges.

La concentration finale d'amphotéricine B est de $10\ \mu\text{M}$.

La solution stock d'amphotéricine B est préparée dans le DMF à 10^{-3} M.

Sur la base de ces résultats, nous pouvons dire que:

- A une concentration finale de 0,4 μM , le préchauffage de la solution mère d'amphotéricine B provenant d'une solution stock préparée dans le DMSO, améliore son efficacité d'environ 10 %. Aucune amélioration de l'efficacité n'est observée lorsque le DMF est utilisé pour la préparation de la solution stock.
- Quelque soit le solvant utilisé pour la préparation de la solution stock d'amphotéricine B (DMSO, DMF), la CMI et la CMF de cet antifongique vis-à-vis des cellules *Candida albicans* ATCC10231 restent inchangées.
- En revanche, une nette diminution de la cytotoxicité de l'amphotéricine B est obtenue par rapport aux formulations non préchauffées. Elle est de 60 % pour le DMSO et 50 % pour le DMF.
- Les résultats que nous avons obtenus vont dans le même sens que ceux de **Johnson B. et coll. (1978)** ainsi que ceux de **Kerridge D. (1986)** qui ont montré que l'activité de l'amphotéricine B est modulée par le pH du milieu. De plus, en **1997**, les travaux de **Gaboriau et coll.**, ont révélé que la formation de superagrégats par le préchauffage entraîne une réduction de la toxicité vis-à-vis des cellules animales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sans perte notable de l'efficacité de l'antifongique.

Quatrième chapitre
Conclusion générale

Le but de cette étude est de déterminer l'effet combiné de quelques paramètres physico-chimiques (solvant, pH et température) sur la modulation de la toxicité sélective de l'amphotéricine B et de mettre en évidence le phénomène de dormance des levures de *Candida albicans* ATCC10231 dans ces conditions expérimentales.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

- Quelque soit le solvant (DMSO, DMF) utilisé pour la préparation de la solution mère d'amphotéricine B, les levures reprennent leur croissance à partir d'une concentration équivalente à 0,4 μM si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 24 heures. Nous parlons de phénomène de dormance des levures en présence d'amphotéricine B. La concentration de 0,4 μM correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Boucherit Z. et coll., 2007**.

- La CMF de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 est de 1,2 μM pour le DMSO et 1 μM pour le DMF.

- Pour les tests de cytotoxicité, il est important de signaler que le DMSO et DMF seuls, sont très toxiques vis-à-vis du globule rouge humain. En effet, les cellules perdent 85 % de leur hémoglobine intracellulaire pour le DMSO et 76 % pour le DMF.

- Le pH 5,4 ne modifie pas la CMI et la CMF de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 pour les deux solvants ayant servi pour la préparation de la solution stock.

- A 0,4 μM d'amphotéricine B, l'efficacité de cette drogue vis-à-vis des levures *Candida albicans* ATCC10231 est augmentée respectivement de 7 % et de 10 % pour des solutions mères préparées dans le tampon acétate /acide acétique pH 5,4, 100 mM par rapport aux solutions dissoutes dans le DMSO et le DMF. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Belkherroubi Sari L. (2009)** qui a montré que l'amphotéricine B préparée dans le tampon acétate/acide acétique pH 5,4, 100 mM se repartit principalement sous forme d'agrégats solubles et insolubles.

- Dans ces mêmes conditions expérimentales, une diminution de la toxicité de cet antifongique vis-à-vis des globules rouges humains est observée. Cette protection des cellules animales est probablement liée à la diminution de la concentration finale du solvant organique.

- Le préchauffage de la solution mère d'amphotéricine B provenant d'une solution stock préparée dans le DMSO, améliore son efficacité d'environ 10 %. Aucune amélioration de l'efficacité n'est observée lorsque le DMF est utilisé pour la préparation de la solution stock

pour une concentration finale en antifongique égale à 0,4 μM . Par ailleurs, la CMI et la CMF de cet antifongique vis-à-vis des cellules *Candida albicans* ATCC10231 restent inchangées.

- En revanche, une nette diminution de la cytotoxicité de l'amphotéricine B est obtenue par rapport aux formulations non préchauffées. Elle est de 60 % pour le DMSO et 50 % pour le DMF.

- Les résultats que nous avons obtenus vont dans le même sens que ceux de **Johnson B. et coll. (1978)** ainsi que ceux de **Kerridge D. (1986)** qui ont montré que l'activité de l'amphotéricine B est modulée par le pH du milieu. De plus, en **1997**, les travaux de **Gaboriau et coll.**, ont révélé que la formation de superagrégats par le préchauffage entraîne une réduction de la toxicité vis-à-vis des cellules animales aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sans perte notable de l'efficacité de l'antifongique.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de :

- Tester ces formulations *in-vivo* (travail en cours)
- Etudier l'effet post antifongique de ces formulations.

Cinquième chapitre
Références bibliographiques

An M., Shen H., Cao Y., Zhang J., Cai Y., Wang R. and Jiang Y. (2009). "Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*." *Int J Antimicrob Agents* 33(3): 258-263.

Andres E., Tiphine M., Letscher-Bru V. and Herbrecht R. (2001). "[New lipid formulations of amphotericin B. Review of the literature]." *Rev Med Interne* 22(2): 141-150.

Arikan S. and Rex J. H. (2002). "New agents for the treatment of systemic fungal infections--current status." *Expert Opin Emerg Drugs* 7(1): 3-32.

Atkinson A. J., Jr. and Bennett J. E. (1978). "Amphotericin B pharmacokinetics in humans." *Antimicrob Agents Chemother* 13(2): 271-276.

Ayestaran A., Lopez R. M., Montoro J. B., Estibalez A., Pou L., Julia A., Lopez A. and Pascual B. (1996). "Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia." *Antimicrob Agents Chemother* 40(3): 609-612.

Baginski M., Resat H. and Mccammon J. A. (1997). "Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation." *Mol Pharmacol* 52(4): 560-570.

Baginski M., Resat H. and Borowski E. (2002). "Comparative molecular dynamics simulations of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels." *Biochim Biophys Acta* 1567(1-2): 63-78.

Baginski M., Gariboldi P., Bruni P. and Borowski E. (1997). "Conformational analysis of Amphotericin B." *Biophys Chem* 65(2-3): 91-100.

Baran M., Borowski E. and Mazerski J. (2009). "Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water II." *Biophys Chem* 141(2-3): 162-168.

Bedran M. A. (1997). Effet des lipoprotéines sériques sur la toxicité induite par les polyènes macrolides : exemple de l'amphotéricine B chez les cellules *Saccharomyces cerevisiae*. Magister en Biologie Moléculaire et cellulaire, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Bekersky I., Fielding R. M., Dressler D. E., Lee J. W., Buell D. N. and Walsh T. J. (2002). "Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate." *Antimicrob Agents Chemother* 46(3): 834-840.

Belkherroubi-Sari L., Boucherit Z., Cheron M., Boucherit K., Benyoucef M. and Belbraouet S. (2008). "Modulation of the polyene antibiotic amphotericin B selective toxicity by pH change of the stock solutions." *African Journal of Microbiology Research* 2(9): 242-246.

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 Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Boucherit-Otmani Z. (1995). Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée aux lipoprotéines du serum sanguin chez des cellules de globules rouges humains. Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.

Boucherit K., Belbraout S., Boucherit Z. and 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* 6.

Boucherit Z., Seksek O. and Bolard J. (2007). "Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry." *Med Mycol* 45(6): 525-533.

Brajtburg J. and Bolard J. (1996). "Carrier effects on biological activity of amphotericin B." *Clin Microbiol Rev* 9(4): 512-531.

Carle S. (2003). "les antifongiques dans le traitement des infections invasive." *Pharmacturl* 36(1): 25-41.

Chavanet P., Duong M., Buisson M., Hamel H., Dubois C., Bonnin A. and Portier H. (1997). "In-vivo activity and tolerance of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in experimental disseminated candidiasis in neutropenic rabbits." *J Antimicrob Chemother* 39(3): 427-430.

Clejan S. and Bittman R. (1985). "Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles." *J Biol Chem* 260(5): 2884-2889.

Clements J. S., Jr. and Peacock J. E., Jr. (1990). "Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity." *Am J Med* 88(5N): 22N-27N.

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." *Biochim Biophys Acta* 1108(1): 49-58.

Cohen Y. and Jacquot C. (2008). 39 - Macrolides. *Pharmacologie (6e édition révisée)*. Paris, Elsevier Masson: 374-377.

Cope A. C., Axen U., Burrows E. P. and Weinlich J. (1966). "Amphotericin B. I. Carbon Skeleton, Ring Size, and Partial Structure1." *J Am Chem Soc* 88(18): 4228-4235.

Cybulska B., Kupczyk K., Szlinder-Richert J. and Borowski E. (2002). "Comparative in vitro studies on liposomal formulations of amphotericin B and its derivative, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MFAME)." *Acta Biochim Pol* 49(1): 67-75.

Czub J., Borowski E. and Baginski M. (2007). "Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes--a molecular dynamics study." *Biochim Biophys Acta* 1768(10): 2616-2626.

Czub J., Neumann A., Borowski E. and Baginski M. (2009). "Influence of a lipid bilayer on the conformational behavior of amphotericin B derivatives - A molecular dynamics study." *Biophys Chem* 141(1): 105-116.

Dannaoui E. (2004). Intérêt des tests de sensibilité *in vitro* dans la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives.*in* : conférence de consensus commune SFAR, SPILF, Paris: SRLF: 52-59.

De Kruijff B. and Demel R. A. (1974). "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes." *Biochim Biophys Acta* 339(1): 57-70.

Ellis D. (2002). "Amphotericin B: spectrum and resistance." *J Antimicrob Chemother* 49 Suppl 1: 7-10.

Enoch D. A., Ludlam H. A. and Brown N. M. (2006). "Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options." *J Med Microbiol* 55(Pt 7): 809-818.

Gaboriau F., Cheron M., Petit C. and Bolard J. (1997). "Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its *in vitro* toxicity: a new way to improve its therapeutic index." *Antimicrob Agents Chemother* 41(11): 2345-2351.

Gaboriau F., Cheron M., Leroy L. and Bolard J. (1997). "Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B." *Biophys Chem* 66(1): 1-12.

Gagos M. and Arczewska M. (2010). "Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers." *Biochim Biophys Acta* 1798(11): 2124-2130.

Gallis H. A. (1996). "Amphotericin B: a commentary on its role as an antifungal agent and as a comparative agent in clinical trials." *Clin Infect Dis* 22 Suppl 2: S145-147.

Ganis P., Avitabile G., Mechlinski W. and Schaffner C. P. (1971). "Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative." *J Am Chem Soc* 93(18): 4560-4564.

González-Párraga P., Sánchez-Fresneda R., Zaragoza Ó. and Argüelles J.-C. (2011). "Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810(8): 777-783.

Grooters A. M. and Taboada J. (2003). "Update on antifungal therapy." *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33(4): 749-758.

Gruda I., Milette D., Brother M., Kobayashi G. S., Medoff G. and Brajtburg J. (1991). "Structure-activity study of inhibition of amphotericin B (Fungizone) binding to sterols, toxicity to cells, and lethality to mice by esters of sucrose." *Antimicrob Agents Chemother* 35(1): 24-28.

Hac-Wydro K., Dynarowicz-Latka P., Grzybowska J. and Borowski E. (2005). "How does the N-acylation and esterification of amphotericin B molecule affect its interactions with cellular membrane components-the Langmuir monolayer study." *Colloids Surf B Biointerfaces* 46(1): 7-19.

Hac-Wydro K., Dynarowicz-Latka P., Grzybowska J. and Borowski E. (2005). "Interactions of amphotericin B derivative of low toxicity with biological membrane components--the Langmuir monolayer approach." *Biophys Chem* 116(1): 77-88.

Hammond S. M. (1977). 3 Biological Activity of Polyene Antibiotics. Progress in Medicinal Chemistry. Ellis, G. P. and West, G. B., Elsevier. Volume 14: 105-179.

Hartsel S. C., Baas B., Bauer E., Foree L. T., Jr., Kindt K., Preis H., Scott A., Kwong E. H., Ramaswamy M. and Wasan K. M. (2001). "Heat-induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF-alpha." *J Pharm Sci* 90(2): 124-133.

Hatabu T., Takada T., Taguchi N., Suzuki M., Sato K. and Kano S. (2005). "Potent plasmodicidal activity of a heat-induced reformulation of deoxycholate-amphotericin B (Fungizone) against Plasmodium falciparum." *Antimicrob Agents Chemother* 49(2): 493-496.

Hianik T., Ostatnik L., Polohova V. and Bolard J. (2008). "Changes of conductance and compressibility of bilayer lipid membranes induced by oligonucleotide-cationic polyene antibiotic complexes." *Bioelectrochemistry* 74(1): 2-8.

Holz R. W. (1974). "The effects of the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B on thin lipid membranes." *Ann N Y Acad Sci* 235(0): 469-479.

Hung C. T., Lam F. C., Perrier D. G. and Souter A. (1988). "A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorial design." *Int J Pharm* 44(1-3): 117-123.

Johnson B., White R. J. and Williamson G. M. (1978). "Factors influencing the susceptibility of *Candida albicans* to the polyenoic antibiotics nystatin and amphotericin B." *J Gen Microbiol* 104(2): 325-333.

Joly V., Saint-Pierre-Chazalet M., Saint-Julien L., Bolard J., Carbon C. and Yeni P. (1992). "Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture." *J Infect Dis* 165(2): 337-343.

Kanafani Z. A. and Perfect J. R. (2008). "Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact." *Clin Infect Dis* 46(1): 120-128.

Kasai Y., Matsumori N., Umegawa Y., Matsuoka S., Ueno H., Ikeuchi H., Oishi T. and Murata M. (2008). "Self-Assembled Amphotericin B Is Probably Surrounded by Ergosterol: Bimolecular Interactions as Evidenced by Solid-State NMR and CD Spectra." *Chemistry – A European Journal* 14(4): 1178-1185.

- Kerridge D. (1986).** "Mode of action of clinically important antifungal drugs." *Adv Microb Physiol* 27: 1-72.
- Khutorsky V. (1996).** "Ion coordination in the amphotericin B channel." *Biophys J* 71(6): 2984-2995.
- Khutorsky V. E. (1992).** "Structures of amphotericin B-cholesterol complex." *Biochim Biophys Acta* 1108(2): 123-127.
- Kleinberg M. (2006).** "What is the current and future status of conventional amphotericin B?" *Int J Antimicrob Agents* 27 Suppl 1: 12-16.
- Koufen P., Zeidler U. and Stark G. (1997).** "Photodynamic inactivation of ion channels formed by the polyene antibiotic amphotericin B in lipid membranes." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 38(2-3): 129-135.
- Legrand P., Romero E. A., Cohen B. E. and Bolard J. (1992).** "Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes." *Antimicrob Agents Chemother* 36(11): 2518-2522.
- Liao R. S., Rennie R. P. and Talbot J. A. (2003).** "Sublethal injury and resuscitation of *Candida albicans* after amphotericin B treatment." *Antimicrob Agents Chemother* 47(4): 1200-1206.
- Mange A., Nishida N., Milhavet O., McMahon H. E., Casanova D. and Lehmann S. (2000).** "Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures." *J Virol* 74(7): 3135-3140.
- Marchetti O., Bille J., Fluckiger U., Eggimann P., Ruef C., Garbino J., Calandra T., Glauser M. P., Tauber M. G. and Pittet D. (2004).** "Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000." *Clin Infect Dis* 38(3): 311-320.
- Matsuoka S. and Murata M. (2003).** "Membrane permeabilizing activity of amphotericin B is affected by chain length of phosphatidylcholine added as minor constituent." *Biochim Biophys Acta* 1617(1-2): 109-115.
- Matsuoka S., Matsumori N. and Murata M. (2003).** "Amphotericin B-phospholipid covalent conjugates: dependence of membrane-permeabilizing activity on acyl-chain length." *Org Biomol Chem* 1(22): 3882-3884.
- Mechlenski W., Shaffner C. P., Ganis P. and Avitable G. (1970).** "Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B." *Tetrahedron Lett* 11(46): 3962.
- Meyerhoff A. (1999).** "U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis." *Clin Infect Dis* 28(1): 42-48; discussion 49-51.
- Murphy G. L., Whitworth L. C., Clinkenbeard K. D. and Clinkenbeard P. A. (1995).** "Hemolytic activity of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin." *Infect Immun* 63(8): 3209-3212.

Ostrosky-Zeichner L., Rex J. H., Pappas P. G., Hamill R. J., Larsen R. A., Horowitz H. W., Powderly W. G., Hyslop N., Kauffman C. A., Cleary J., Mangino J. E. and Lee J. (2003). "Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States." *Antimicrob Agents Chemother* 47(10): 3149-3154.

Palacios D. S., Dailey I., Siebert D. M., Wilcock B. C. and Burke M. D. (2011). "Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(17): 6733-6738.

Petit C., Cheron M., Joly V., Rodrigues J. M., Bolard J. and Gaboriau F. (1998). "*In vivo* therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of deoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating." *J Antimicrob Chemother* 42(6): 779-785.

Pfaller M. A., Diekema D. J. and For the International Fungal Surveillance Participant G. (2004). "Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*." *Clinical Microbiology and Infection* 10: 11-23.

Rajagopalan N., Dicken C. M., Ravin L., J. and Sternson L. A. (1988). "A Study of the Solubility of Amphotericin B in Nonaqueous Solvent Systems." *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 42(3): 97-102.

Rao T. V., Trivedi A. and Prasad R. (1985). "Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity." *Can J Microbiol* 31(4): 322-326.

Readio J. D. and Bittman R. (1982). "Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols." *Biochim Biophys Acta* 685(2): 219-224.

Redding S. W., Pfaller M. A., Messer S. A., Smith J. A., Prows J., Bradley L. L., Fothergill A. W. and Rinaldi M. G. (1997). "Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *Candida albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering one or more episodes of infection." *J Clin Microbiol* 35(7): 1761-1765.

Richet H., Roux P., Des Champs C., Esnault Y., Andreumont A. (2002). "Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics." *Clinical Microbiology and Infection* 8(7): 405-412.

Ross M. (2002). Systemic antifungal agents. Molecular Pathomechanisms and New Trends in Drug Research, CRC Press: 281-287.

Safe L. M., Safe S. H., Subden R. E. and Morris D. C. (1977). "Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*." *Can J Microbiol* 23(4): 398-401.

Scott D. W., Miller Jr W. H. and Griffin C. E. (2001). Chapter 6 - Parasitic Skin Disease. Muller & Kirk's Small Animal Dermatology (Sixth Edition). Philadelphia, W.B. Saunders: 423-516.

Sivak O., Lau B., Patankar N. and Wasan K. M. (2004). "Unidirectional inhibition of lipid transfer protein I-mediated transfer of cholesteryl esters between high-density and low-density lipoproteins by amphotericin B lipid complex." *Pharm Res* 21(12): 2336-2339.

Soulimane N. (2001). Etude *in vivo* de quelques nouvelles formulations de l'amphotéricine B chez les souris Wistar. Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.

Sowiński P., Pawlak J., Borowski E. and Gariboldi P. (1992). "1H NMR model studies of amphotericin B: Comparison of x-ray and NMR stereochemical data." *Magnetic Resonance in Chemistry* 30(4): 275-279.

Sugar A. M. (1990). "Empiric Treatment of Fungal Infections in the Neutropenic Host: Review of the Literature and Guidelines for Use." *Arch Intern Med* 150(11): 2258-2264.

Tancrede P., Barwicz J., Jutras S. and Gruda I. (1990). "The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B." *Biochim Biophys Acta* 1030(2): 289-295.

Tasset C., Preat V. and Roland M. (1991). "The influence of Myrj 59 on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B." *J Pharm Pharmacol* 43(5): 297-302.

Tortorano A. M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C. C., Faure O., Biraghi E., Canton E., Zimmermann K., Seaton S., Grillot R. and Candidaemia T. E. W. G. O. (2004). "Epidemiology of Candidaemia in Europe: Results of 28-Month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Hospital-Based Surveillance Study." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 23(4): 317-322.

Trejo W. H. and Bennett R. E. (1963). "*Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism." *J Bacteriol* 85: 436-439.

Umegawa Y., Matsumori N., Oishi T. and Murata M. (2008). "Ergosterol increases the intermolecular distance of amphotericin B in the membrane-bound assembly as evidenced by solid-state NMR." *Biochemistry* 47(51): 13463-13469.

Vandermeulen G., Rouxhet L., Arien A., Brewster M. E. and Preat V. (2006). "Encapsulation of amphotericin B in poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles." *Int J Pharm* 309(1-2): 234-240.

Vertut-Doi A., Hannaert P. and Bolard J. (1988). "The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the Na⁺/K⁺ pump of human erythrocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 157(2): 692-697.

Vertut-Doi A., Ohnishi S. I. and Bolard J. (1994). "The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B." *Antimicrob Agents Chemother* 38(10): 2373-2379.

Wasan K. M. and Lopez-Berestein G. (1994a). "The interaction of liposomal amphotericin B and serum lipoproteins within the biological milieu." *J Drug Target* 2(5): 373-380.

Wasan K. M., Morton R. E., Rosenblum M. G. and Lopez-Berestein G. (1994b). "Decreased toxicity of liposomal amphotericin B due to association of amphotericin B with high-density lipoproteins: role of lipid transfer protein." *J Pharm Sci* 83(7): 1006-1010.

Wasan K. M., Rosenblum M. G., Cheung L. and Lopez-Berestein G. (1994). "Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B." *Antimicrob Agents Chemother* 38(2): 223-227.

