

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCCEN
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT

En Biologie Cellulaire et Moléculaire

par

Mme SARI née BELKHERROUBI Lamia

Thème

**Effet de l'état physique des antifongiques polyéniques
sur leur activité cellulaire : exemple de l'amphotéricine B**

Soutenu le : 06 juillet 2009

Devant le jury suivant :

Présidente : Mme Boucherit Zahia Maître de conférences, Université Tlemccen

Directeur de thèse : Mr Benyoucef Mohamed Professeur, Université Tlemccen

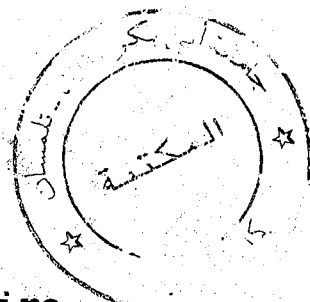
Examineurs : Mme Merzouk Haféda Professeur, Université Tlemccen

Mr Belbraouet Sliman Professeur, Université Moncton Canada

Mr Benallaoua Saïd Professeur, Université Béjaïa

Mme Chéron Monique Maître de conférences, Université Paris11

Année Universitaire : 2008-2009



Doc:

04031
17/10/09



Vertical line

Vertical line

Vertical line

Vertical line

A la mémoire de ma très chère mère et à mon très cher père, qui m'ont toujours soutenu et encouragé avec amour et patience.

A mon époux pour son soutien et ses constants encouragements.

A mon fils.

A mon frère et à ma sœur.

Ainsi qu'à mes beaux parents.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » dirigé par Monsieur Boucherit Kébir Maître de conférences à l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour la confiance qu'il m'a accordée, sa disponibilité, ses constants encouragements, et ses conseils avisés tout au long de mon travail.

Mes remerciements vont à Monsieur Benyoucef Mohamed Professeur à l'Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui m'a inspiré le sujet de mon travail, et m'a guidé dans son élaboration. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame Boucherit Zahia Maître de Conférences au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, m'a prodigué ses conseils avisés et son aide précieuse. Qu'elle trouve ici le témoignage sincère de ma gratitude pour ses encouragements, son optimisme inaltérable et sa constante disponibilité. Je la remercie également pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury.

Madame Chéron Monique, Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Université Paris 11 France, m'a apporté une aide inestimable dans la réalisation de ce travail, et m'a toujours témoigné une amicale bienveillance. Qu'elle trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de ma profonde gratitude, ainsi que mes remerciements pour avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur Belbraouet Sliman Professeur à l'Université de Moncton Canada, pour m'avoir apporté une aide inestimable et pour avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

Je tiens à remercier Madame Merzouk Hafida, Professeur au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour avoir accepté de juger ce travail.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur Benallaoua Saïd Professeur à l'Université Abderrahmane Mira de Bejaia pour sa disponibilité à juger ce travail.

J'ai eu le privilège d'être accueillie par Monsieur Bolard Jacques, Directeur de recherche au CNRS, au laboratoire « Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi) » Paris. Sa disponibilité, ses précieux conseils et nos discussions m'ont été d'un très riche enseignement. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie très sincèrement Monsieur Benjedid Abdelkader Professeur à l'Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen, pour ses encouragements et sa constante disponibilité.

J'adresse l'expression de mon amitié à Rahmoun Nadjib, Brahim Ali, Khouani Habib, Belkacem Nacéra, ainsi qu'à tous les membres du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique », pour l'aide permanente qu'ils m'ont prodigué au cours de la réalisation de ce travail.

Enfin, je remercie tous ceux et celles qui, de près ou de loin, se sont intéressés à mon travail et m'ont encouragés durant toutes ces années.

SOMMAIRE

<u>PREMIERE PARTIE</u> : INTRODUCTION.....	1
<u>DEUXIEME PARTIE</u> : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L' AMPHOTERICINE B.....	8
2. MECANISMES D' ACTION DE L' AMPHOTERICINE B.....	9
3. LES DIFFERENTES FORMULATIONS DE L' AMPHOTERICINE B.....	14
<u>TROISIEME PARTIE</u> : MATERIEL ET METHODES.....	20
A- EXPERIMENTATION <i>IN VITRO</i>.....	21
1. Etude de la modulation du pH sur la toxicité sélective de l' amphotéricine B.....	21
1.1. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	21
1.2. Préparation des solutions antifongiques.....	21
1.3. Evaluation de la toxicité de l' AmB vis-à-vis des globules rouges.....	21
1.4. Evaluation de l' activité antifongique de l' AmB.....	22
2. Etude spectroscopique de l' AmB.....	22
2.1. Absorption électronique.....	22
2.2. Dichroïsme circulaire.....	23
2.3. Détermination des proportions des différentes formes de l' AmB.....	23
B- EXPERIMENTATION <i>IN VIVO</i>.....	24
1. Matériel biologique.....	24
2. Préparation des solutions antifongiques.....	24
3. Tests de toxicité.....	24
3.1. Injection unique.....	24
3.2. Injections répétées.....	25
3.3. Traitement des prélèvements.....	25
4. Tests d' efficacité.....	26
4.1. Infection des rats par <i>Candida albicans</i>	26
4.2. Traitement des rats après infection.....	26
4.3. Traitement des prélèvements.....	27
5. Dosage des paramètres sériques.....	27
6. Etude statistique.....	27

QUATRIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	28
A- ETUDE <i>IN VITRO</i>	29
1. EFFET DU pH SUR LA TOXICITE SELECTIVE DE L'AMPHOTERICINE B.....	30
Effet de la variation du pH sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge humain.....	31
Solutions d'AmB préparées aux pH < 7,4.....	31
Solutions d'AmB préparées aux pH ≥ 7,4 :.....	36
Effet de la concentration croissante de l'AmB.....	42
Effet de la variation du pH sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis des levures <i>Candida albicans</i>	46
1.2.1. Solutions d'AmB préparées aux pH < 7,4.....	46
1.2.2. Solutions d'AmB préparées aux pH ≥ 7,4.....	49
1.2.3. Effet de la variation du pH sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B à une concentration finale de 2×10^{-7} M.....	51
a- Solutions d'AmB préparées aux pH < 7,4.....	51
b- Solutions d'AmB préparées aux pH ≥ 7,4.....	53
2. EFFET DE LA VARIATION DU pH SUR L'ETAT PHYSIQUE DE LA MOLECULE D'AMPHOTERICINE B.....	56
2.1. Etat physique de l'AmB dans des conditions acides (pH < 7,4).....	58
2.1.1. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 3,8.....	58
2.1.2. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 4.....	60
2.1.3. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 4,4.....	62
2.1.4. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5.....	64
2.1.5. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,2.....	66
2.1.6. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,4.....	68
2.2. Etat physique de l'AmB dans des conditions alcalines (pH ≥ 7,4).....	74
2.2.1. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du PBS pH 7,4.....	74
2.2.2. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH 9,5.....	76
2.2.3. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.....	78

2.2.4. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,5.....	80
2.2.5. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,8.....	82
2.3. Etude des pics de dichroïsme circulaire en fonction du pH de la solution mère d'AmB.....	88
2.4. Détermination des proportions des différentes formes de l'amphotéricine B	90
DISCUSSION.....	95
B- ETUDE <i>IN VIVO</i>	104
1. EVALUATION DE LA TOXICITE RENALE CHEZ LES RATS WISTAR.....	108
Evaluation de la toxicité rénale aiguë suite à une injection unique.....	109
1.1.1. Evaluation de la toxicité rénale aiguë de la solution d'AmB préparée à pH 10,8 chez les rats Wistar sains.....	110
1.1.2. Evaluation de la toxicité rénale aiguë de la solution d'AmB préparée à pH 5,4 chez les rats Wistar sains.....	112
1.2. Evaluation de la toxicité rénale aiguë suite à des injections répétées.....	115
2. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA SOLUTION D'AMPHOTERICINE B PREPAREE A pH 5,4 CHEZ LES RATS WISTAR INFECTES PAR <i>Candida albicans</i>	119
2.1. Détermination du temps d'incubation des levures avant traitement chez les rats Wistar.....	119
2.2. Les tests d'efficacité.....	122
DISCUSSION.....	126
<u>CINQUIEME PARTIE</u> : CONCLUSION GENERALE	128
<u>SIXIEME PARTIE</u> : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133

Liste des abréviations

AmB : Amphotéricine B.

[AmB] : Concentration en amphotéricine B.

[COO⁻] : Concentration en COO⁻.

[CH₃COO⁻] : Concentration en CH₃COO⁻.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

[hémoglobine] : Concentration en hémoglobine.

inj : Injection.

[K⁺] : Concentration en potassium.

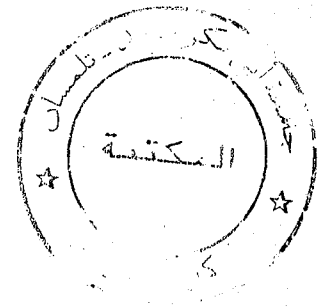
[NH₃⁺] : Concentration en NH₃⁺.

p : Probabilité.

PBS : Phosphate buffer sodium.

[SM] : Concentration de la solution mère.

ufc : Unité formant colonie



INTRODUCTION

Les infections fongiques systémiques restent des affections graves et leur incidence est en progression significative ces dix dernières années. A côté de l'apparition des mycoses d'importation dues à la multiplication des voyages, la cause principale de cette croissance réside dans l'augmentation considérable des facteurs de risques et plus particulièrement du nombre croissant de patients immunodéprimés liés au virus du SIDA, aux avancées en transplantation et en oncologie, à l'utilisation de cathéters vasculaires et au recours fréquent à des antibiotiques à large spectre. Ces infections sont associées à une élévation significative de la morbidité et de la mortalité des patients hospitalisés (Blanchet B. et coll., 2004).

La fréquence des infections nosocomiales à *Candida* a connu, elle aussi, une nette augmentation au cours de la dernière décennie. Leur gravité est principalement liée à la difficulté du diagnostic, responsable d'une prise en charge tardive. De plus, ces dix dernières années ont connu l'émergence d'infections dues à des souches habituellement saprophytes et à l'apparition de résistances aux antifongiques classiques. Les moyens diagnostiques sont limités et peu fiables (Kettani A. et coll., 2006).

Les antifongiques habituellement utilisés en thérapeutique appartiennent à trois familles :

- Les antifongiques polyéniques, dont le chef de file est l'amphotéricine B (Fungizone[®]). Cette molécule a longtemps été le « gold standard » dans le traitement des infections fongiques systémiques. Cela est dû à son large spectre qui couvre la quasi-totalité des espèces de *Candida*. Des formulations lipidiques de cette molécule sont utilisées afin de réduire sa toxicité. La solubilisation en milieu lipidique permet de diminuer la toxicité, principalement rénale. Le principal inconvénient de ces formulations est le coût, nettement supérieur à celui des autres traitements.
- Les analogues nucléosidiques, représentés par la 5-Fluorocytosine (Ancotil[®]). Leur utilisation a toujours été limitée du fait de leur toxicité médullaire potentielle et par le développement rapide de résistances, surtout en cas d'utilisation en monothérapie.
- Les dérivés azolés. Les seuls utiles dans les candidoses profondes sont les triazolés ; principalement le fluconazole (Triflucan[®]) et l'itraconazole (Sporanox[®]) vu leur faible toxicité et leur large spectre.

- Deux autres molécules sont utilisées : le voriconazole, nouveau triazolé et la caspofungine, représentant d'une nouvelle classe d'antifongiques : les inhibiteurs des constituants de la paroi fongique (Kettani A. et coll., 2006).

Si le spectre antifongique de l'amphotéricine B couvre la plupart des espèces de *Candida* pathogènes pour l'homme [(Sanglard D. et Odds F.C., 2002), (Canuto M.M. et Rodero F.G., 2002)], on observe des souches résistantes à la 5-fluorocytosine (Groll A.H. et Gea-Banacloche J.C., 2003) et au fluconazole [(Nguyen M.H. et coll., 1996), (Abi Said D. et coll., 1997)].

D'un autre côté, malgré la diversité des médicaments antifongiques, leur pharmacocinétique complexe et variable, rend difficiles les études cliniques proposant des recommandations. Si le suivi thérapeutique de l'amphotéricine B n'est pas nécessaire, celui de la flucytosine et de l'itraconazole est indispensable. Dans le cas du voriconazole et de la caspofungine, de nouvelles études sont attendues afin de préciser les recommandations notamment chez les neutropéniques ou les patients de réanimation. Par ailleurs, il conviendra de suivre leur pharmacocinétique car la sensibilité des souches de champignons risque d'évoluer défavorablement (Blanchet B. et coll., 2004).

Le coût du traitement est lui aussi, un élément important dans la stratégie thérapeutique. Le coût de revient par le fluconazole est nettement plus élevé que celui de l'amphotéricine B. Quand au voriconazole et à la caspofungine, ils coûtent trois fois plus cher que le fluconazole mais la résistance à ce dernier peut justifier leur utilisation (Kettani A. et coll., 2006).

C'est pourquoi, jusqu'à l'heure actuelle, le traitement de référence de ces mycoses invasives, reste l'amphotéricine B (Asandei A. et Luchian T., 2008)

L'amphotéricine B déoxycholate (Fungizone[®]) a été commercialisé depuis 1958. Pendant toutes ces années d'utilisation, cette molécule a sauvé des vies mais elle s'est révélée toxique. Avec les critères actuels elle n'aurait peut-être pas l'autorisation de mise sur le marché. Elle est encore la molécule de référence pour son large spectre contre les mycoses invasives et le faible risque d'émergence de résistance. C'est la molécule utilisée comme comparateur dans des essais cliniques testant de nouveaux antifongiques (Antaniadou A. et Dupont B, 2005).

L'amphotéricine B désoxycholate est une suspension colloïdale d'amphotéricine B qui a un nombre important d'effets secondaires ; la toxicité rénale étant la principale cause qui limite son utilisation (Adler-Moore J.P. et coll., 2004). Cette toxicité est partiellement réduite avec des formulations lipidiques de cet antifongique. Trois de ces préparations sont actuellement sur le marché. Elles sont issues de la recherche visant à réduire la toxicité de la Fungizone[®] (néphrotoxicité et réactions générales pendant la perfusion) et représentent un progrès galénique important. Elles ont des propriétés physico-chimiques et pharmacocinétiques différentes dont la traduction clinique n'est pas encore établie. Cliniquement elles ne sont pas plus efficaces que la molécule mère malgré l'avantage de pouvoir administrer des doses plus fortes mais elles sont significativement moins toxiques (Antaniadou A. et Dupont B., 2005). Cependant, leur important coût de revient (jusqu'à 90 fois plus chère que la Fungizone[®]) limite énormément leur utilisation en clinique et plus particulièrement dans les pays pauvres (Mariné M. et coll., 2008).

Notre pays est lui aussi touché par les mycoses invasives dues aux raisons citées plus haut, mais en pratique, nous ne pouvons pas utiliser les formulations lipidiques de l'amphotéricine B car elles sont trop onéreuses.

C'est pourquoi, dans le cadre d'une stratégie de développement de cette molécule d'amphotéricine B, nous nous sommes intéressés au moyen le moins onéreux d'augmenter l'index thérapeutique de cette molécule antifongique ; c'est-à-dire réduire sa toxicité tout en maintenant son efficacité antifongique.

L'amphotéricine B est insoluble dans l'eau (Andrès E. et coll., 2001). En effet, en solution aqueuse l'antifongique se répartit schématiquement en trois états (Bolard J., 1986) : une forme agrégée responsable de la toxicité, une forme oligomérique (essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité et une forme monomérique, peu toxique, responsable de l'activité antifongique. L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé. Il varie selon la concentration d'amphotéricine B et le solvant (Legrand P. et coll., 1992). On comprend alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion des formes toxiques d'amphotéricine B. L'amélioration de la sélectivité de l'action de l'amphotéricine B en solution lipidique donnée sera fonction du ou des lipides supports (Legrand P. et coll., 1996).

D'autre part, la proportion des différentes formes de l'amphotéricine B en milieu aqueux dépend de l'environnement physico-chimique de cette molécule [(Cybulska B. et coll., 1995), (Dupont G. et coll., 1977)]. L'état d'agrégation de la molécule d'amphotéricine B peut être modulé par la lumière, le taux d'oxygène, la température, la force ionique et le pH (Gruda I. et coll., 1988). C'est ainsi qu'en favorisant la formation de super agrégats par la modulation de l'environnement physico-chimique, la toxicité vis-à-vis des cellules animales a pu être réduite (Ernst C. et coll., 1978). De plus, le préchauffage de la Fungizone® à 70°C pendant 20 minutes permet d'obtenir des formes super agrégées de l'amphotéricine B de toxicité vis-à-vis des cellules animales hôtes significativement réduite, l'efficacité antifongique étant préservée[(Gaboriau F. et coll., 1997b), (Petit C. et coll., 1998)].

Par ailleurs, les travaux de Dupont G. et coll. 1977, ont montré que le pH module l'état d'agrégation de l'amphotéricine B ; lorsque le pH de la solution antifongique augmente de 7 à 9, l'amphotéricine B forme de gros agrégats dont la forme est plus expansée que celle des super agrégats de Fungizone® préchauffée.

D'autre part, lorsque le pH du milieu diminue, jusqu'à pH5, l'efficacité de l'amphotéricine B aussi bien vis à vis de *Candida spp*, de *Cryptococcus neoformans* que d'*Aspergillus*, est réduite. En effet, la concentration minimale inhibitrice est plus élevée à pH5 qu'à pH 7 [(Te Dorsthorst D.T.A. et coll., 2004), (Te Dorsthorst D.T.A et coll., 2005)].

Il semblerait alors, que le pH du milieu dans lequel se trouve l'amphotéricine B joue un rôle important dans l'activité de cette drogue. C'est pourquoi, nous avons entrepris d'évaluer l'impact de la modulation du pH de la solution antifongique sur la toxicité sélective de la molécule d'amphotéricine B. Dans cette perspective, nous avons étudié l'effet de la variation du pH des solutions d' amphotéricine B, du plus acide (pH3,8) au plus alcalin (pH10,8), sur son activité aussi bien vis-à-vis des cellules animales hôtes que vis-à-vis des levures appartenant à l'espèce *Candida albicans*.

Le plan de travail que nous avons adopté est le suivant :

- 1- Réalisation de tests *in vitro*, ayant permis l'étude de l'effet de la variation du pH sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B vis-à-vis des érythrocytes humaines et vis-à-vis du *Candida albicans*.
- 2- Etude spectroscopique de l'état d'agrégation de l'amphotéricine B.
- 3- Mise en œuvre de tests *in vivo* de toxicité et d'efficacité chez les rats Wistar.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

La découverte en 1950 par Hazen et Brown de la Nystatine, polyène à activité antifongique synthétisé par les *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique (Drouhet E., 1978). Depuis, plus de 200 antibiotiques polyéniques furent découverts, mais des problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité n'ont permis l'utilisation que d'un nombre restreint de ces composés en thérapeutique (amphotéricine B, nystatine, Pyramicine...) (Bolard J. 1986).

L'amphotéricine B est la plus connue des antifongiques polyéniques. Introduite en pratique clinique en 1958, elle est le traitement de choix des infections fongiques systémiques (Hartsel S. et Bolard J., 1996). Elle présente une activité fongistatique à faible concentration et fongicide pour des concentrations élevées (0,5 à 2 fois la concentration minimale inhibitrice « CMI »). L'amphotéricine B est active sur la plupart des *fungi* pathogènes (Blanchet B. et coll., 2004). Elle est utilisée actuellement dans le traitement d'un grand nombre de mycoses profondes (cryptococcose, candidose, aspergillose, histoplasmoses, coccidioidomycoses, sporotrichoses....). Rares sont les souches résistantes à l'amphotéricine B (Kleinberg M., 2006).

Son spectre d'action s'étend aux *Leishmania* [(Hartsel S. et Bolard J., 1996), (Petit C. et coll., 1998)] et aux prions [(Demaimay R. et coll., 1994), (Mangé A. et coll 2000)].

De plus, l'amphotéricine B augmente la cytotoxicité de différents agents antitumoraux [(Kikkawa F. et coll., 1993), (Masuda H. et coll., 1991), (Medoff G. et coll., 1981)]. Il semble aussi qu'à des doses subléthales, cet antifongique stimule la réponse immunitaire. L'incubation des monocytes et des macrophages avec de faibles doses d'amphotéricine B permet l'accumulation de la drogue dans ce type de cellules, ce qui augmente remarquablement la capacité des cellules à tuer les souches de *Candida albicans* sensibles à l'amphotéricine B (Martin E. et coll., 1994).

Cependant, ces 50 années d'expérience ont aussi prouvé l'importante toxicité de l'amphotéricine B, limitant ainsi son utilisation. Cette toxicité se manifeste en clinique par : fièvre, nausées, vomissements, diarrhées et arythmie [(Antaniadou A. et Dupont B., 2005), (Bourin M. et coll., 1993), (Clement J.S. et coll., 1990)]. Des toxicités pulmonaires et neurologiques ont été rapportées dans certains cas, mais la toxicité rénale reste la complication majeure du traitement dont elle limite souvent la durée [(Antaniadou A. et Dupont B., 2005) (Bolard J. et coll., 1997)].

Dans le cadre du développement de la molécule d'amphotéricine B, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre ; il y a celles qui sont basées sur la modification de sa structure chimique (dérivés d'amphotéricine B) et celles qui sont basées sur des formulations nouvelles. Plusieurs solutions ont été préconisées visant à moduler la solubilité de l'amphotéricine B (formulations lipidiques, association micelles mixtes amphotéricine B-détergents, vectorisation par les lipoprotéines).

Mais avant d'aller plus loin, il est nécessaire de connaître les mécanismes de base de la toxicité qui rejoignent les mécanismes d'action de l'amphotéricine B ; qui sont connus pour être liés aux caractéristiques physico-chimiques de la molécule d'amphotéricine B.

1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMPHOTERICINE B :

L'amphotéricine B est un antibiotique isolé à partir d'une culture de *Streptomyces nodosus* dont la structure a été établie en 1970. Elle fait partie de la famille des macrolides (molécule cyclique fermée par une liaison ester interne) polyéniques (Hammond S., 1977).

Son poids moléculaire est de 960 (Carbon C. et coll., 1994). Elle comprend une partie apolaire rigide constituée de 7 doubles liaisons conjuguées responsables de la lipophilie de la molécule et d'un intense spectre d'absorption qui permet des études spectroscopiques. Une partie polaire rigide constituée de 7 groupes hydroxyles. Elle comprend aussi un aminosucre ; la mycosamine (figure N°1), (Hammond S., 1977).

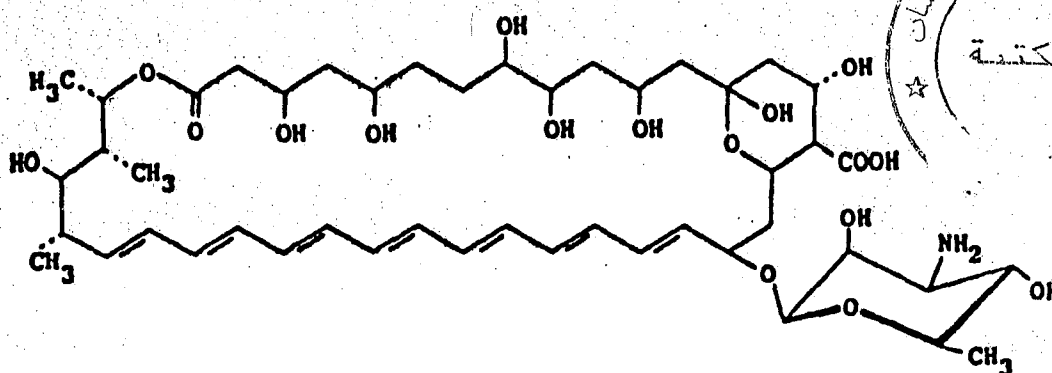


Figure N°1 : Structure de l'amphotéricine B (Hammond S., 1977).

La chaîne rigide impose à la molécule une structure en bâtonnets dont une face est hydrophile et l'autre face est hydrophobe, limitant considérablement la solubilité de la molécule en milieu aqueux. Elle est peu soluble dans les solvants organiques non polaires tels que les alcools et les esters, mais soluble dans les solvants organiques polaires tels que le

diméthyl sulfoxyde(DMSO) et le diméthyl formamide(DMF) ou encore les solutions hydroalcooliques(Hammond S., 1977). L'insolubilité de cette molécule en milieu aqueux est responsable des phénomènes de base de toxicité, d'où la nécessité de trouver des formulations plus solubles (Cybulska B. et coll., 1995).

2. MECANISMES D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B :

Le mécanisme d'action de l'amphotéricine B le plus largement accepté est celui proposé par de De Kruijff B. et Demel R.A. (1974). D'après leur modèle, l'amphotéricine B a une importante affinité avec les stérols membranaires (aussi bien l'ergostérol des cellules fongiques que le cholestérol des cellules animales) d'où la formation de complexes AmB/stérols.

En effet, il existe des liaisons hydrogènes entre le 3- β OH des stérols (qui jouent un rôle d'accepteurs de protons) et le groupe aminé de l'amphotéricine B (qui joue le rôle de donneur de protons) [(Mazerski J. et coll., 1990), (Lance M.R. et coll., 1996)].

Chaque complexe est associé à la formation de canaux transmembranaires d'où fuite d'ions et de métabolites, ce qui provoque la mort cellulaire [(Seoane R. et coll., 1999), (Mazerski J. et coll., 1995)].

Cependant, l'affinité de l'amphotéricine B pour l'ergostérol est plus importante que pour le cholestérol (Seoane R. et coll., 1998). La conformation stérique de l'ergostérol(figure N°2b) est plus favorable que celle du cholestérol (figure N°2a) pour établir des liaisons entre ce type de stérol et la molécule d'amphotéricine B [(Bratjburg J. et coll., 1990a), (Bratjburg J. et coll., 1990b), (Herve M. et coll., 1989)].

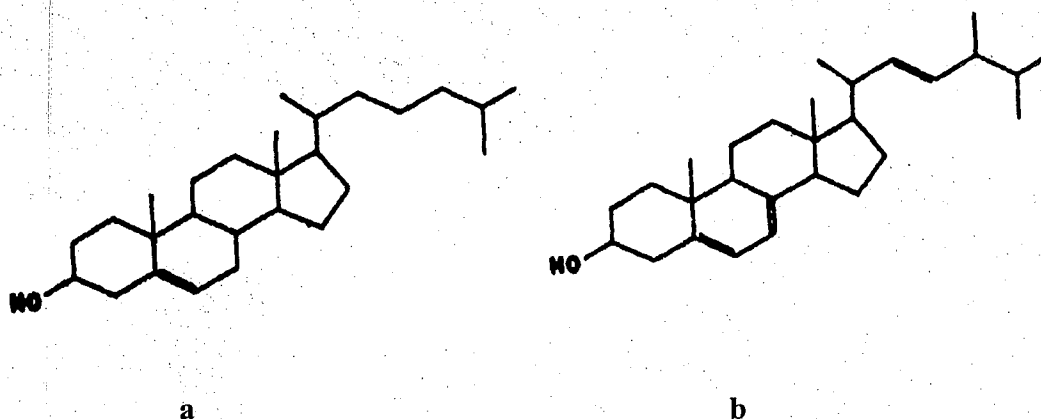


Figure N°2 : Structure du cholestérol (a) et de l'ergostérol (b)

(Bratjburg J. et coll., 1990a).

Par ailleurs, il est apparu que l'amphotéricine B n'induisait de perméabilité aux ions potassium au travers des membranes contenant du cholestérol qu'à partir d'un certain seuil de concentration (Bolard J. et coll., 1997).

Bolard J. et coll.(1991) démontrent que l'équilibre entre monomères et agrégats joue un rôle important dans l'activité de la drogue. La toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des membranes contenant de l'ergostérol est observée à des concentrations auxquelles l'amphotéricine B est entièrement sous forme monomérique. Elle serait alors capable de s'associer aux molécules d'ergostérol présentes dans la membrane (cellules fongiques), ce qui conduirait à la formation de canaux. En revanche, il apparaît que la fuite de potassium induite par l'amphotéricine B chez les membranes à cholestérol et plus particulièrement chez le globule rouge, survient uniquement lorsque l'amphotéricine B est sous forme d'oligomères dans le milieu (figure N°3).

Le mécanisme lytique de l'amphotéricine B est alors basé sur la formation de canaux ioniques dans la membrane, ces canaux sont formés de 4 à 12 unités de monomères d'amphotéricine B (Gruszeki W.I. et coll., 2003). Ces oligomères insolubles d'amphotéricine B sont dus à l'interaction électrostatique entre le NH^{3+} et le COO^- des molécules d'antifongiques adjacentes d'une part, et aux liaisons hydrogènes intramoléculaires d'autre part [(Baginski M. et coll., 1997), (Khutorsky V., 1996)].

D'autres études mettent en évidence le rôle des phospholipides membranaires. En effet, l'interaction amphotéricine B-stérol dépend de la composition membranaire en phospholipides (Clejan S. et Bittman R., 1985). Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* enrichies en phospholipides de type phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS), acquièrent une résistance envers l'amphotéricine B (Rao T.V.G. et coll., 1985). Selon Hac-Wydro K. et Dynarowicz-Latka P. (2006) l'interaction entre les phospholipides et l'amphotéricine B réduit la concentration libre de l'antifongique ce qui réduit son action thérapeutique.

D'autre part, le NH^{3+} de l'amphotéricine B forme des liaisons hydrogènes avec le PO^4 du Dimiristoyl phosphatidyl choline des bicouches lipidiques. Chacune de ces interactions est responsable de la création d'un complexe amphotéricine B/phospholipide. Dans ce cas de figure, les stérols ne servent qu'à modifier la fluidité de la membrane et aide l'amphotéricine B à prendre l'orientation appropriée nécessaire à la formation des canaux. [(Asandei A. et Luchian T., 2008), (Czub J. et Baginski M., 2006)].

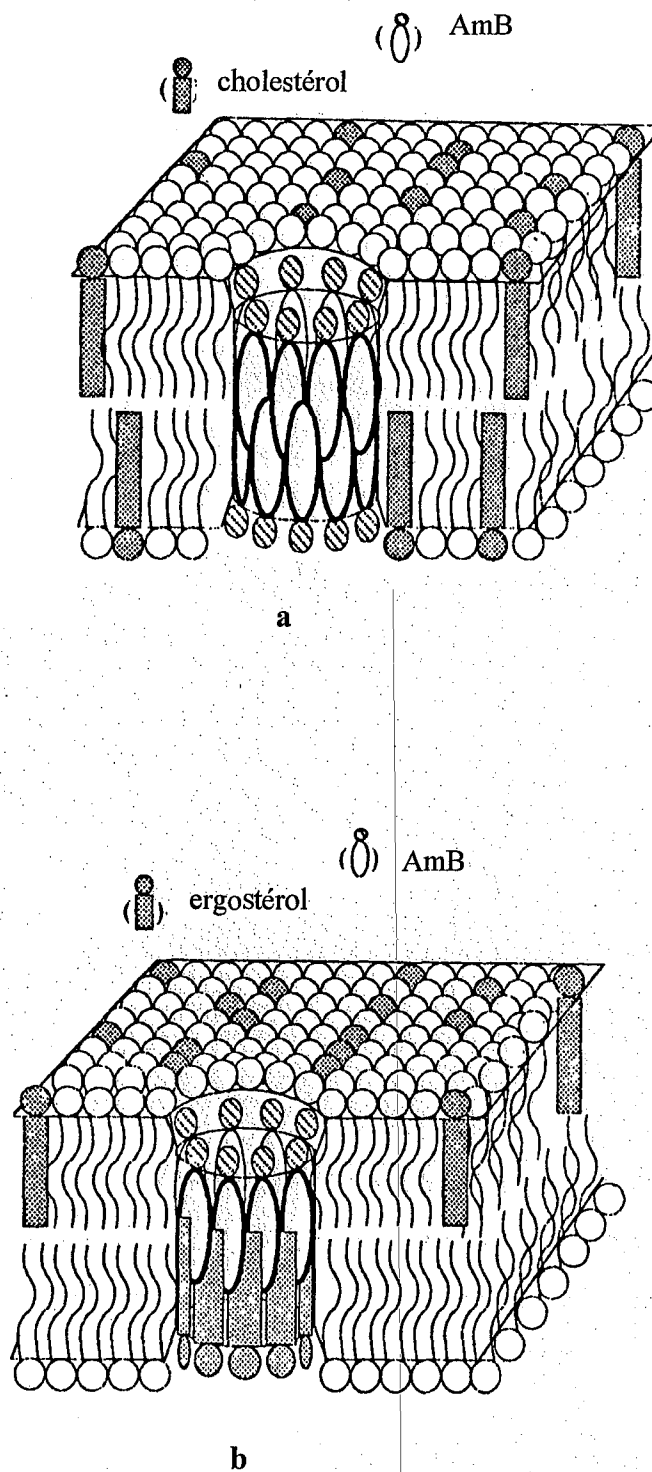


Figure N°3 : Modèles hypothétiques illustrant les différentes possibilités de formation de canaux transmembranaires :
(a): membranes à cholestérol,
(b): membranes à ergostérol (Bratjburg J. et Bolard J., 1996).

Outre la faculté de former des pores au travers de la membrane plasmique, l'amphotéricine B peroxyde les lipides [(Bratjburg J. et coll., 1985), (Sokol-Anderson M. L. et coll., 1986)], et inhibe l'action d'enzymes membranaires telles que l'ATPase à proton de *Candida* ou la Na^+/K^+ ATPase des érythrocytes (Bolard J. et Vertut-Doï A., 1995).

Dans le sérum, l'amphotéricine B est essentiellement sous une forme liée aux lipoprotéines (Bratjburg J. et coll., 1984) et très peu sous forme libre. Dans ce cas, l'amphotéricine B va non seulement se lier aux membranes des cellules mammifères mais aussi être internalisée par endocytose (Vertut-Doï A. et coll., 1994). Des études ont montré que c'est par la fixation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines de faible densité(LDL) qui possèdent des récepteurs membranaires qui leur sont spécifiques, que l'internalisation de l'amphotéricine B va se faire[(Koldin M.K. et coll., 1985), (Wasan K.M. et coll., 1994)].

D'autre part, l'amphotéricine B induit une augmentation de la consommation du glucose et de la production du glycérol et du tréhalose chez *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, on note la réduction de l'activité de la pyruvate carboxylase dans les mitochondries (Tran-Dinh S. et coll., 1991).

La figure N°4 résume schématiquement les principaux mécanismes d'action de l'amphotéricine B.

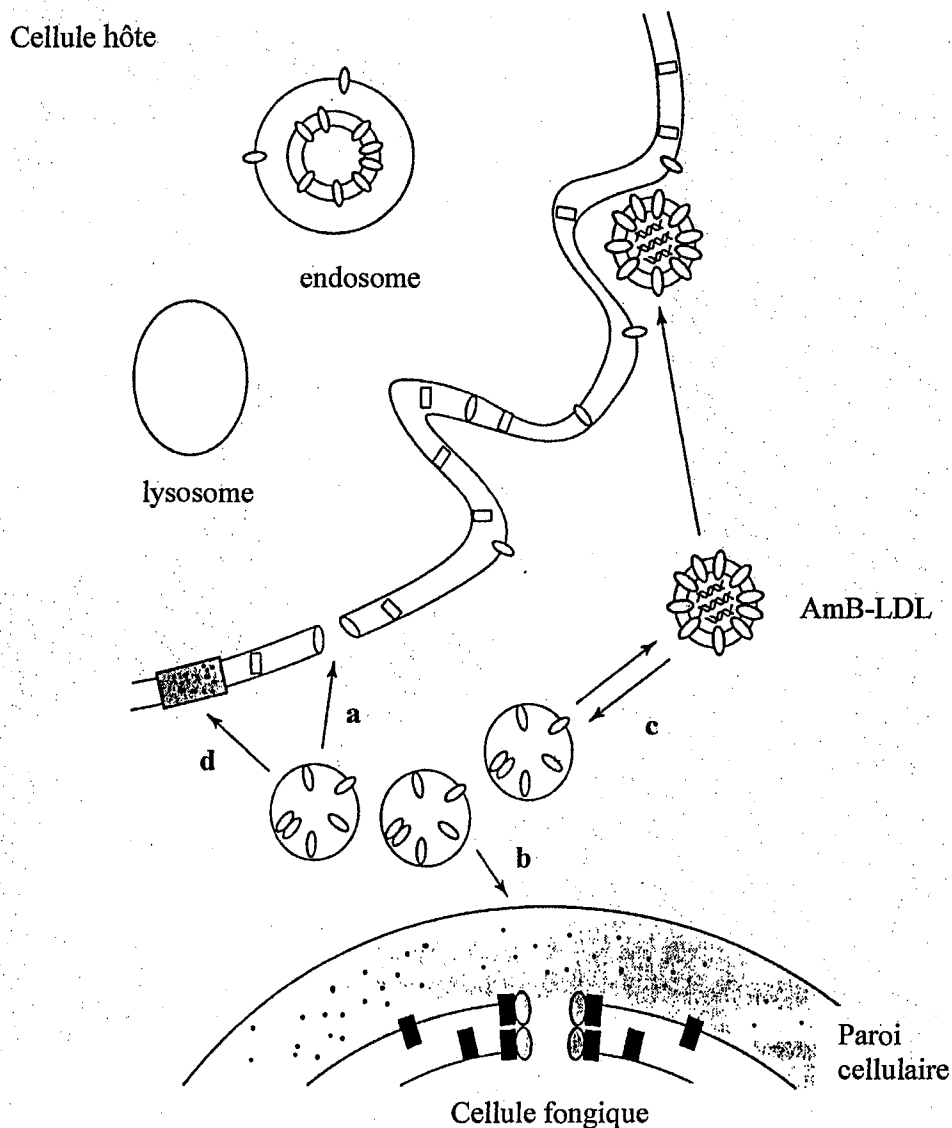


Figure N°4 : Mécanismes d'action anticellulaire de l'amphotéricine B.

- a- Formation de canaux transmembranaires avec les cellules animales.
- b- Formation de canaux transmembranaires avec les cellules fongiques.
- c- Internalisation de l'amphotéricine B par liaison aux LDL.
- d- Peroxydation des membranes (Hartsel S. et Bolard J., 1996).

O, amphotéricine B ; □ cholestérol ; ■ ergostérol

3. LES DIFFERENTES FORMULATIONS DE L'AMPHOTERICINE B :

L'amphotéricine B habituellement administrée, commercialisée sous le nom de Fungizone[®], est une suspension aqueuse associée au désoxycholate de sodium. Cependant, son utilisation reste délicate en raison de sa néphrotoxicité dose dépendante et de sa toxicité aiguë liée à la perfusion à type de nausées, vomissements ou encore fièvre (Kleinberg M., 2006).

Depuis ces 10 dernières années, les progrès réalisés dans le développement des nouvelles formules galéniques, ont permis de réduire sa toxicité tout en conservant son efficacité clinique (Dupont B., 2002).

Citons tout d'abord les dérivés d'amphotéricine B, ils sont obtenus en apportant des modifications chimiques sur la molécule mère afin d'augmenter sa solubilité en milieu aqueux. Environ 20 dérivés d'amphotéricine B ont été préparés. Le groupement carboxyle du macrolide sert de base pour la préparation d'esters et d'amides, alors que le groupement amine du mycosamine est employé pour la préparation du N-acyl, N-guanidine, N-méthyl, N-glycosyl et N-aminocyl [(Bolard J., 1991), (Chéron M. et coll., 1988), (Jarzebsky A. et coll., 1982)].

L'un des dérivés d'amphotéricine B le plus prometteur, récemment synthétisé, est le N-(1-Piperidinepropionyl) amphotéricine B méthyl ester (PAME). Il est obtenu par substitution chimique du groupement amine et du groupement carboxylique de la molécule mère (figure N°5). Alors que 50% d'hémolyse est obtenu à une concentration d'amphotéricine B de 2µg/mL, il en faut 300µg/mL de PAME pour obtenir ce même taux d'hémolyse. Cela est dû à une interaction importante entre le PAME et le Dipalmitoyl phosphatidylcholine, ce qui réduit fortement la toxicité de ce dérivé d'amphotéricine B. De plus, l'efficacité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans* est maintenue dans ces conditions, la concentration inhibitrice à 50% est de 0,15µg/mL pour le PAME (Hac-Wydro K. et coll., 2005).

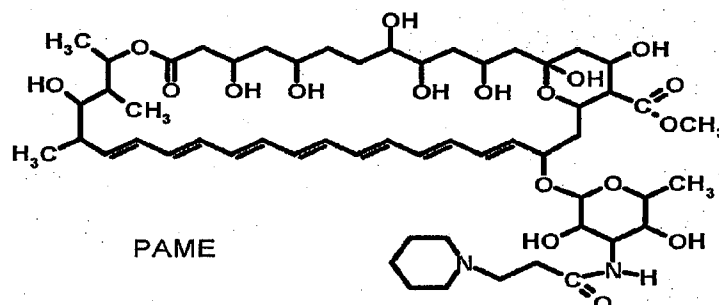


Figure N° 5: Structure du N-(1-Piperidinepropionyl) amphotéricine B méthyl ester (Hac-Wydro K. et coll., 2005).

Les formulations les plus prometteuses sont les formes lipidiques. Le principe des amphotéricine B lipidiques repose sur le captage préférentiel par le système réticulo-endothélial avec libération progressive d'amphotéricine B, plus particulièrement au site de l'infection. Ce mode de transfert de l'amphotéricine B protège les cellules de l'organisme, en particulier les cellules rénales. Ces composés sont différents en terme de structure physico-chimique (tableau N°1), de taille, de pharmacocinétique, de comportement en milieu biologique et de toxicité (Germaud P. et coll, 2001). Les formulations lipidiques d'amphotéricine B commercialisées actuellement dans le monde sont (Andrès E. et coll, 2001):

- **Amphotéricine B en complexe lipidique (Abelcet®) :**

L'amphotéricine B en complexe lipidique (*amphotericin B lipid complex* [ABLC]), commercialisée sous le nom d' Abelcet®, est une suspension d'amphotéricine B et de phospholipides (dimyristoyl phosphatidylcholine et dimyristoyl phosphatidylglycérol, selon un ratio de 1 : 3). Les particules forment des rubans de 1 600 à 6 000 nm de long.

- **Amphotéricine B incorporée dans des liposomes (Ambisome®) :**

L'Ambisome® correspond à une formulation lipidique d'amphotéricine B incorporée dans des liposomes unilamellaires. Ces liposomes sont constitués de phosphatidylcholine hydrogénée, de cholestérol et de distéaroyl phosphatidylglycérol, selon un rapport de 2/1/0,8. Ils forment des sphères de 80 nm de diamètre.

- **Amphotéricine B en dispersion colloïdale (Amphocil®) :**

L'amphotéricine B en dispersion colloïdale (*amphotericin B colloidal dispersion* [ABCD]), commercialisée sous le nom d'Amphocil® en Europe et d'Amphotec® aux États-Unis, est composée d'amphotéricine B liée à du sulfate de cholestérol, selon un mélange équimolaire. Les particules ont une forme de disque de 120 à 140 nm de diamètre et de 4 nm d'épaisseur.

Tableau N°1 : Caractéristiques des formulations lipidiques de l'amphotéricine B (Bolard J. et coll., 1997).

Nom	Composition (rapport molaire)	Forme (diamètre en μ)	%moles d'AmB
Fungizone[®]	Désoxycholate	Micelles < 0,4	34
AmBisome[®]	NSPC/Chol./DSPG (2/1/0,8)	Small unilamellar vesicules (SUVs) 0,08	10
Abelcet[®] (ABLC)	DMPC/DMPG (1/3)	Rubans (1,6-11)	35
Amphocil[®] (ABCD)	Cholestérylsulfate	Disques (0,12 x 0,004)	50
Chol. : cholestérol ; DMPC : dimyristoyl phosphatidylcholine ; DMPG : dimyristoyl phosphatidylglycérol ; DSPG : distéaroyl phosphatidylglycérol ; NSPC : phosphatidylcholine hydrogénée.			

Malheureusement, ces formulations lipidiques ont un coût de revient important ce qui limite significativement leur utilisation en clinique.

Toutes ces différentes formulations (lipidiques et dérivés) induisent une réduction de la toxicité de l'amphotéricine B envers les cellules hôtes. Cette réduction de la toxicité est liée d'une part à une augmentation de la solubilité de la molécule d'amphotéricine B, d'autre part, elle est essentiellement liée à l'état d'agrégation de l'antifongique dans ces différentes formulations.

Quel que soit le mécanisme d'action mis en jeu, l'activité pharmacologique et la toxicité de l'amphotéricine B dépendent fortement de l'organisation moléculaire de l'amphotéricine B dans les différentes formulations (Gagos M. et coll, 2008).

Rappelons qu'en solution aqueuse l'amphotéricine B se trouve sous trois formes différentes (Bolard J., 1991) :

- une forme monomérique soluble non toxique pour les cellules animales.
- Une forme oligomérique soluble toxique pour les cellules animales.
- Une forme agrégée insolubles toxique pour les cellules animales hôtes.

Selon Hargreaves P.L. et coll. (2006), les nanodisques, renfermant les oligomères d'amphotéricine B, sont moins actifs chez *Saccharomyces cerevisiae* que ceux renfermant les monomères. Ces oligomères sont moins aptes à reconnaître et interagir avec l'ergostérol membranaire, alors que les formes monomériques de l'amphotéricine B s'orientent perpendiculairement aux chaînes d'acides gras des phospholipides de la bicouche lipidique du nanodisque. Ce qui permet l'insertion de la chaîne hydrophobe de l'amphotéricine B entre les têtes polaires des phospholipides d'une part, et de maintenir les groupements hydroxyles et le cycle de la mycosamine exposé au milieu aqueux d'autre part.

Par ailleurs, les formes lipidiques de l'amphotéricine B servent à véhiculer les formes les moins toxiques de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules animales hôtes [(Legrand P. et coll., 1996), (Ridente Y. et coll., 1999)].

D'où l'importance de trouver de nouvelles formulations d'amphotéricine B ayant le moins de formes toxiques pour les cellules animales.

L'état d'agrégation de la molécule peut être modulé par son environnement physico-chimique (Hung C.T. et coll., 1988). Selon Legrand P. et coll. (1992) la concentration de la solution mère et la nature du solvant favorisent la prédominance des différentes formes d'amphotéricine B. D'après leur étude, plus la concentration de la solution mère augmente plus le taux d'agrégats augmente. D'autre part, le diméthyl sulfoxide (DMSO) favorise plus de formes agrégées que le diméthyl formamide (DMF).

D'un autre côté, le préchauffage des solutions d'amphotéricine B induit la formation de super agrégats, qui sont de loin les formes les moins toxiques envers les cellules animales. Il s'agit d'une condensation entre les formes monomériques et les agrégats qui donnent cet état super agrégé de la molécule. Ces super agrégats restent actifs envers les cellules fongiques cibles [(Gaboriaud F. et coll., 1997a), (Gaboriau F. et coll., 1997b), (Petit C. et coll., 1998)].

Par ailleurs, l'augmentation de la force ionique diminue la concentration des monomères de l'AmA (amphotéricine B 3-diméthylaminopropylamide) (Blanc I. et coll., 2000) et du MFAME (N-méthyl-N-D-fructosyl amphotéricine B méthylester) (Szlinder-Reichert J. et coll., 2001).

De plus selon Toledo-Grijalba M. et coll. (2006), les anions sulfates, citrate et phosphate, réduisent la solubilité de l'amphotéricine B ce qui augmente la proportion des agrégats insolubles. Alors que les anions thiocyanate et trichloracétate solubilisent complètement l'amphotéricine B et ses dérivés.

Il est à noter que le pH module lui aussi l'état d'agrégation de l'amphotéricine B. En milieu alcalin, l'agrégat passe d'une forme plus compacte à une forme plus expansée à partir de pH 9, puis se dissocie pour des pH supérieurs à 10 (Dupont G. et coll., 1977).

D'autre part, l'activité de l'antifongique est modulée en fonction du pH du milieu. A pH acide la CMI (concentration minimale inhibitrice) de l'amphotéricine B pour le *Candida*, le *Cryptococcus* et l'*Aspergillus*, est plus élevée que celle observée à des pH plus élevés [(Te Dorsthorst D.T.A et coll., 2004), (Te Dorsthorst D.T.A et coll., 2005)].

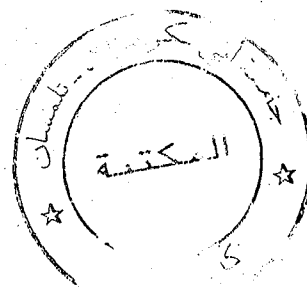
Récemment, Asendei A. et Luciahian T. (2008) ont montré qu'en solution alcaline proche du pK_b(autour de 9,5) de l'amphotéricine B, l'énergie des liaisons hydrogènes entre les molécules d'amphotéricine B voisines diminue ce qui réduit l'interaction entre les groupements NH³⁺ de l'amphotéricine B d'une part et les groupements PO⁴⁻ des phospholipides et OH des stérols d'autre part. Ceci soutient le modèle selon lequel aux pH élevés, il y a une déstabilisation de l'ouverture des pores à amphotéricine B. Par ailleurs, à pH acide, les canaux à amphotéricine B sont sélectifs pour les anions alors qu'à pH plus élevés, les canaux sont sélectifs pour les cations. De plus, selon Gagos M. et coll. (2008), les monomères apparaissent aux pH supérieurs à 10 alors que les agrégats apparaissent aux 3 < pH < 10.

De l'ensemble de ces différentes études, il ressort que le pH joue un rôle dans l'activité de l'amphotéricine B.

Mais le problème qui reste posé est de savoir comment le pH peut moduler l'état d'agrégation de l'amphotéricine B, et par conséquent son activité sélective vis-à-vis des cellules cibles.

Notre travail s'inscrit dans cette problématique. L'objectif de notre recherche est de trouver une solution peu onéreuse qui permet l'augmentation de l'index thérapeutique.

C'est ainsi que nous avons entrepris d'étudier l'effet de la variation de pH des solutions d'amphotéricine B sur sa toxicité sélective d'une part, d'autre part sur son état d'agrégation.



**MATERIEL
ET METHODES**

A- EXPERIMENTATION *IN VITRO*

1. Etude de la modulation du pH sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B :

Pour réaliser les tests de toxicité sélective de l'amphotéricine B, nous avons utilisé d'une part le globule rouge humain, provenant d'un donneur unique sain, d'autre part, une souche de la levure *Candida albicans* (la 444 IP Institut Pasteur de Paris), qui est maintenue par repiquages successifs sur gélose Sabouraud et conservée à 4°C.

1.1. 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 pH 7,4 10mM (Na Cl 150mM), puis suspendue à nouveau dans ce même tampon.

1.2. Préparation des solutions antifongiques :

Pour la préparation des solutions antifongiques, nous avons utilisé :

- de l'amphotéricine B (AmB) pure provenant des laboratoires SIGMA.
- Le tampon carbonate/bicarbonate 10mM aux pH allant de 9,5 à 10,8.
- Le tampon acétate / acide acétique 100mM aux pH allant de 3,8 à 5,4.
- Le tampon phosphate salé pH 7,4 10mM (Na Cl 150mM) (PBS).

A partir d'une solution stock d'AmB à 10^{-2} M solubilisée dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde), on prépare des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, dans les différents tampons aux différents pH. Les solutions ainsi préparées sont gardées à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 minutes avant leur utilisation pour assurer une meilleure stabilité et une bonne solubilisation de l'AmB.

1.3. Evaluation de la toxicité de l'AmB vis-à-vis des globules rouges :

Les globules rouges sont suspendus dans du tampon isotonique PBS pH 7,4, à raison de 4000 cellules/ml.

La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 90 minutes, dès l'addition de la solution antifongique à une concentration finale de 10^{-5} M.

Des prélèvements de 500µl à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalle régulier. A ces prises d'essai, on ajoute 2ml d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes sur centrifugeuse JOUAN, on récupère le surnageant sur lequel on dose le K^+ intracellulaire et l'hémoglobine qui ont fuit de la cellule. Le K^+ est déterminé par photométrie de flamme (JENWAY/PFP7) et l'hémoglobine sur le spectrophotomètre SHIMADZU à une longueur d'onde $\lambda=750\text{nm}$

1.4. Evaluation de l'activité antifongique de l'AmB :

Les cultures de *C. albicans* sont réalisées sur milieu Sabouraud liquide (pH $5,8 \pm 0,2$) en présence et en absence des solutions antifongiques. La concentration cellulaire de départ est de 12×10^6 cellules/ml.

Les solutions antifongiques sont ajoutées au milieu de culture en même temps que l'inoculum, la concentration finale utilisée est de $2 \times 10^{-6} \text{M}$. L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation continue.

La mesure de la croissance se fait par numération cellulaire, sur cellule de Thoma, toutes les 90 minutes.

2. Etude spectroscopique de l'AmB :

L'étude spectroscopique de l'AmB a été réalisée au laboratoire « Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi) » Université Pierre et Marie Curie Paris IV.

La détermination des différentes formes de l'AmB a été réalisée par dichroïsme circulaire sur dichrographe JASCO J-810 et par absorption électronique sur CARY/1^E/UV visible.

2.1. Absorption électronique :

L'absorption électronique d'une solution est exprimée par la loi de Beer-Lambert

$$A_{(\lambda)} = \log I_0/I = \epsilon_{(\lambda)}lc$$

Où :

- I_0 et I sont respectivement les intensités lumineuses incidente et transmise,
- c la concentration molaire de la solution traversée.
- l (cm) l'épaisseur de la cuve contenant la solution.
- ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) le coefficient d'extinction molaire.

2.2. Dichroïsme circulaire :

Le dichroïsme circulaire est l'étude de la différence d'absorption d'un composé chiral entre une lumière polarisée circulairement à droite et une lumière polarisée circulairement à gauche. Il est utilisé depuis environ 1960 et a eu un développement très rapide. Il présente l'avantage d'être sensible à de petites variations conformationnelles, souvent impossibles à détecter par une autre technique.

$\Delta\epsilon$ ($M^{-1}.cm^{-1}$) est le coefficient d'extinction molaire du dichrographe.

La cuve utilisée est en quartz de taille $e=0,1cm$.

2.3. Détermination des proportions des différentes formes de l'AmB :

Les solutions mères préparées à 10^{-4} M aux différents pH sont maintenues à température ambiante pendant 20 minutes. Après 5 minutes d'incubation à $37^{\circ}C$, chacune des solutions antifongiques est divisée en deux parties ; l'une est incubée à nouveau à $37^{\circ}C$ pendant 10 minutes (l'échantillon a), l'autre est centrifugée à $12000g$ pendant 10 minutes à $37^{\circ}C$ à partir de laquelle on récupère le surnageant (échantillon b).

On détermine la concentration totale en AmB, A_t en lisant l'absorbance à $407nm$ de l'échantillon (a) dilué 100 fois dans du méthanol.

La lecture de l'absorbance de l'échantillon (b) à une longueur d'onde $\lambda=409nm$, nous permet de déterminer la concentration des formes monomériques A_m de l'AmB. Ensuite, ce même échantillon b est dilué 100 fois dans le méthanol et on lit l'absorbance à $407nm$ ce qui nous donne la concentration des formes monomériques (A_m) et oligomériques (A_s).

La proportion des formes insolubles agrégées (A_{ns}) est obtenue par l'équation :

$$A_{ns} = A_t - (A_m + A_s).$$

B- EXPERIMENTATION *IN VIVO*

1. Matériel biologique :

Notre étude a porté sur une souche de rats Wistar, provenant de l'institut Pasteur d'Alger et reproduits au sein de l'animalerie du département de biologie cellulaire et moléculaire, de la faculté des Sciences, université de Tlemcen.

Nous avons isolé des mâles âgés de trois mois, de poids moyen de 200g. La nourriture (aliment Aelf pour rats) et l'eau leur sont fournies *ad libitum*. Ils sont maintenus à une température moyenne de 25°C et soumis à un cycle lumière / obscurité de 12heures /12heures.

La souche de levure utilisée pour les tests d'efficacité est le *Candida albicans* (la 444 IP Institut Pasteur de Paris) qui est maintenue par repiquages successifs sur gélose Sabouraud et conservée à 4°C.

2. Préparation des solutions antifongiques :

Pour la préparation des solutions antifongiques, nous avons utilisé :

- de l'amphotéricine B (AmB) pure provenant des laboratoires SIGMA.
- Le tampon acétate / acide acétique 100mM pH 5,4.
- Le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10,8.

Les solutions tampon sont stérilisées par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

A partir d'une solution stock d'AmB à 10^{-2} M préparée dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde), les solutions d'AmB sont préparées à 10^{-4} M dans les différents tampons. Une fois les solutions préparées, elles sont maintenues à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 minutes avant leur utilisation pour assurer une meilleure stabilité et une bonne solubilisation de l'AmB.

3. Tests de toxicité :

3.1. Injection unique :

Nous avons pris des lots de 6 rats Wistar, répartis dans des cages en plastique comme suit :

- un lot témoin qui n'a subi aucun traitement.
- Un lot contrôle recevant la solution tampon acétate/acide acétique 100mM pH 5,4 en absence d'AmB.
- Un lot contrôle recevant la solution tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10,8 en absence d'AmB

- Un lot test recevant la solution d'AmB solubilisée à pH 5,4.
- Un lot test recevant la solution d'AmB solubilisée à pH 10,8.

Les solutions antifongiques sont injectées à raison de 1mg/Kg au niveau de la veine caudale. Les rats subissent une injection unique.

Les prélèvements de sang se font à partir de la veine orbitale sur tubes secs, après 6 heures, 24 heures, 48 heures, 1 semaine et 15 jours de l'injection.

Les sérums sont récupérés sur tubes Eppendorf après centrifugation à 2000 tours/minutes pendant trois minutes.

3.2. Injections répétées :

Nous avons pris des lots de 6 rats Wistar, répartis dans des cages en plastique comme suit :

- un lot témoin qui n'a subi aucun traitement.
- Un lot contrôle qui reçoit la solution tampon acétate/acide acétique 100mM pH 5,4 en absence d'AmB.
- Un lot test qui reçoit la solution d'AmB solubilisée à pH 5,4.

Les solutions antifongiques sont injectées à raison de 1mg/Kg au niveau de la veine caudale, toutes les 48 heures.

Les prélèvements de sang se font à partir de la veine orbitale sur tubes secs, 24 heures après chaque injection.

Les sérums sont récupérés sur tubes Eppendorf après centrifugation à 2000 tours/minutes pendant trois minutes.

3.3. Traitement des prélèvements :

Des dosages d'urée et de créatinine sur sérum sont effectués à partir de chaque prélèvement.

4. Tests d'efficacité :

La répartition des lots de 6 rats Wistar se fait comme suit :

- Un lot de rats infectés non traités.
- Un lot de rats infectés recevant des injections de tampon seul acétate/acide acétique 100mM pH5,4.
- Un lot de rats infectés traités à la solution d'AmB à pH5,4.

4.1. Infection des rats par *Candida albicans* :

Les cultures de *C. albicans* sont menées en milieu Sabouraud liquide (pH 5,8 ± 0,2). La concentration cellulaire de départ est de 12×10^6 cellules/ml. Une numération cellulaire, sur cellule de Thoma, est réalisée après 18 heures d'incubation à 37°C.

La culture levurienne est centrifugée à 4000 tours/minutes pendant 15 minutes. Le surnageant est rejeté, les cellules sont ensuite lavées deux fois avec une solution de lavage glacée (MgCl₂ 2mM, NaCl 150mM). Les levures sont suspendues dans du PBS (tampon phosphate pH7,4 10mM, NaCl 150mM) stérile (Souza L.C. et coll., 1993).

Nous ramenons ensuite le nombre de levures à 10^8 cellules/mL dans le PBS stérile.

Sachant que le volume sanguin d'un rat de poids moyen (200g) est de 10mL, l'infection des rats se fait par voie intra-péritonéale par l'injection de 0,2mL de la suspension levurienne, pour atteindre une concentration circulante finale de 2×10^6 cellules/mL (Espada R et coll., 2008).

L'infection est suivie par hémoculture. Nous ensemençons par étalement les suspensions érythrocytaires préparées, sur gélose de Sabouraud (incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures) afin de suivre le nombre de levures viables, exprimées en unités formant colonies (ufc).

4.2. Traitement des rats après infection :

Les rats infectés sont traités par une injection d'AmB préparée à pH5,4 à raison de 1mg/kg toutes les 48 heures, au niveau de la veine caudale.

Le premier prélèvement sanguin (à partir de la veine orbitale) se fait sur tube sec, 24 heures après la première injection.

Le traitement se poursuit jusqu'à une stérilité des rats ou bien alors jusqu'à la mort de ces rats.

4.3. Traitement des prélèvements :

A partir de chaque prélèvement, une hémoculture sur gélose sabouraud (incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures) et des dosages d'urée et de créatinine sur sérum sont effectués.

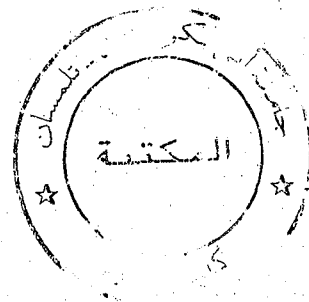
5. Dosage des paramètres sériques :

Afin d'évaluer la toxicité induite par la solution antifongique, nous effectuons des dosages des paramètres rénaux, à partir du sérum collecté.

Le dosage de l'urée et de la créatinine a été effectué sur auto analyseur BECKMAN CX9. La concentration d'urée est mesurée par méthode colorimétrique enzymatique UV à l'uréase. Quant au dosage de la créatinine, il est effectué par la méthode de Jaffé basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique.

6. Etude statistique :

Nous avons utilisé le logiciel Minitab version 12.2 pour une analyse de la variance (ANOVA 1) et le test de Student (test t). Les différences entre les moyennes sont considérées significatives lorsque le $p < 0,05$.



RESULTATS
ET
DISCUSSION

A- ETUDE *IN VITRO*

1. EFFET DU pH SUR LA TOXICITE SELECTIVE DE L'AMPHOTERICINE B.

Depuis plusieurs années, des solutions visant à augmenter l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, sont recherchées. Dans le cadre du développement de cette molécule, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre. Il y a celles qui sont basées sur la modification de sa structure chimique telles que les dérivés d'amphotéricine B (Bolard J., 1991), et celles qui sont basées sur des formulations nouvelles où plusieurs solutions ont été préconisées pour moduler la solubilité de l'amphotéricine B [(Dotis J. coll., 2006), (Hung C.T. et coll., 1988), (Legrand P. et coll., 1992), (Smith S.E. et Rawlins M.D., 1973), (Vertut-Doï A. et coll., 1994), (Wasan K.M. et coll., 1994), (Wong-Beringer A. et coll., 1998)].

Malheureusement, ces différentes formulations ont un coût de revient élevé, ce qui est un inconvénient majeur pour les pays pauvres.

En solution aqueuse, l'amphotéricine B est un mélange de différentes espèces : monomères solubles, oligomères solubles et agrégats insolubles (Lopez-Berestein G. et coll., 1984).

Plusieurs études ont montré que ce sont les super agrégats d'amphotéricine B qui sont les moins toxiques vis-à-vis des cellules animales hôtes [(Lasic D.D., 1992), (Toledo Grijalba M. et coll., 2006)]. D'autre part, la proportion des différentes formes de l'amphotéricine B en milieu aqueux dépend de l'environnement physico-chimique de cette molécule [(Cybulska B. et coll., 1995), (Dupont G. et coll., 1977)]. En effet, l'état d'agrégation de la molécule d'amphotéricine B peut être modulé par la lumière, le taux d'oxygène, la température, la force ionique et le pH (Gruda I. et coll., 1988). Par conséquent, en favorisant la formation de super agrégats par la modulation de l'environnement physico-chimique, la toxicité vis-à-vis des cellules animales est réduite (Ernst C. et coll., 1978). D'un autre côté, la formation de super agrégats par élévation de la température entraîne une réduction de la toxicité vis-à-vis des cellules animales aussi bien *in vitro* (Gaboriau F. et coll., 1997b) que *in vivo* (Petit C. et coll., 1998) sans perte notable de l'activité antifongique.

Sur la base de ces résultats, il nous a paru intéressant d'étudier dans un premier temps l'effet de la modulation du pH du milieu sur l'activité biologique de la molécule d'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge et de la levure *Candida albicans*.

1.1. Effet de la variation du pH sur la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge humain.

En se fixant aux stérols membranaires l'amphotéricine B induit une perturbation de la perméabilité des cellules. Le premier élément indicateur de la perturbation des cellules animales est la fuite du K^+ intracellulaire. Cette fuite est suivie par celle des autres métabolites cellulaires et de la lyse (Bolard J. et coll., 1991). C'est pourquoi, afin d'évaluer la toxicité des solutions d'amphotéricine B chez le globule rouge humain, nous avons d'abord dosé le K^+ intra érythrocytaire. Ensuite, lorsque la membrane est fortement endommagée par l'action de l'antifongique, il s'ensuit une lyse. Cette dernière se traduit par la libération de l'hémoglobine chez le globule, c'est pourquoi nous avons dosé le taux d'hémoglobine extracellulaire après l'addition des différentes préparations antifongiques.

1.1.1. Solutions d'AmB préparées aux pH < 7,4 :

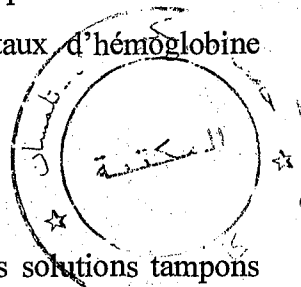
Dans un premier temps, nous avons testé l'innocuité des différentes solutions tampons utilisées pour la solubilisation de l'amphotéricine B.

L'addition des solutions tampons, tampon acétate de sodium/acide acétique 100mM aux pH allant de 3,8 à 5,4, au milieu réactionnel tamponné à pH 7,4 en quantités équivalentes à celle de la solution antifongique à ajouter, n'induit aucune modification du pH du milieu. Ce dernier reste constant à pH 7,4.

De plus, nous n'observons ni fuite de K^+ intracellulaire, ni hémolyse après l'addition de ces solutions tampons qui ne contiennent pas d'AmB.

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet des solutions mères d'AmB préparées à différents pH acides (3,8, 4, 4,4, 5, 5,4). Les résultats obtenus sont regroupés sur les figures N°6 et 7.

Pour déterminer le contenu cellulaire total en hémoglobine et en K^+ , 500 μ l de la solution érythrocytaire témoin (où aucune addition n'a été faite) et 2mL d'eau distillée sont additionnés, et suite à une forte agitation les cellules sont totalement lysées, ce qui correspond au 100% de K^+ et d'hémoglobine.



La figure N°6 représente l'effet des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) préparées à des pH acides, sur la fuite du K^{+} intracellulaire chez le globule rouge (la concentration finale en AmB est de 10^{-5} M).

- La courbe (a) représente la courbe témoin où aucune addition n'a été faite. Le K^{+} intra érythrocytaire reste constant. Nous n'observons aucune fuite de K^{+} vers le milieu extracellulaire au cours des 90 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution d'AmB préparée dans du DMSO sur le globule rouge. Elle montre qu'en 5 minutes d'incubation les globules rouges ont perdu 80% de leur K^{+} et au bout de 30 minutes les cellules n'ont plus que 5% de K^{+} intracellulaire.
- Les courbes (c), (d), (e) et (f) représentent respectivement, l'effet des solutions mères d'AmB préparées dans les tampons à différents pH acides (pH 3,8 ; 4 ; 4,4 et 5). Nous remarquons que les érythrocytes perdent 80% de leur K^{+} intracellulaire après 5 minutes d'incubation et autour de 90% au bout de 90 minutes.
- La courbe (g) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 5,4. les globules rouges perdent 20% de leur K^{+} intracellulaire après 5 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue. Ce taux reste constant durant 90 minutes.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les solutions mères d'AmB préparées à pH 3,8 ; 4 ; 4,4 et 5 induisent une fuite très importante du K^{+} intra érythrocytaire (75 à 80% du total) en 5 minutes d'incubation. Il en est de même avec la solution d'AmB préparée dans le DMSO. D'autre part, avec la solution mère d'AmB préparée à pH 5,4, nous n'observons que 20% de fuite de K^{+} intracellulaire. Il semble qu'il y a une protection du globule rouge de 80% par rapport aux solutions d'AmB préparées aussi bien dans le DMSO que dans des tampons de pH 3,8 ; 4 ; 4,4 et 5.

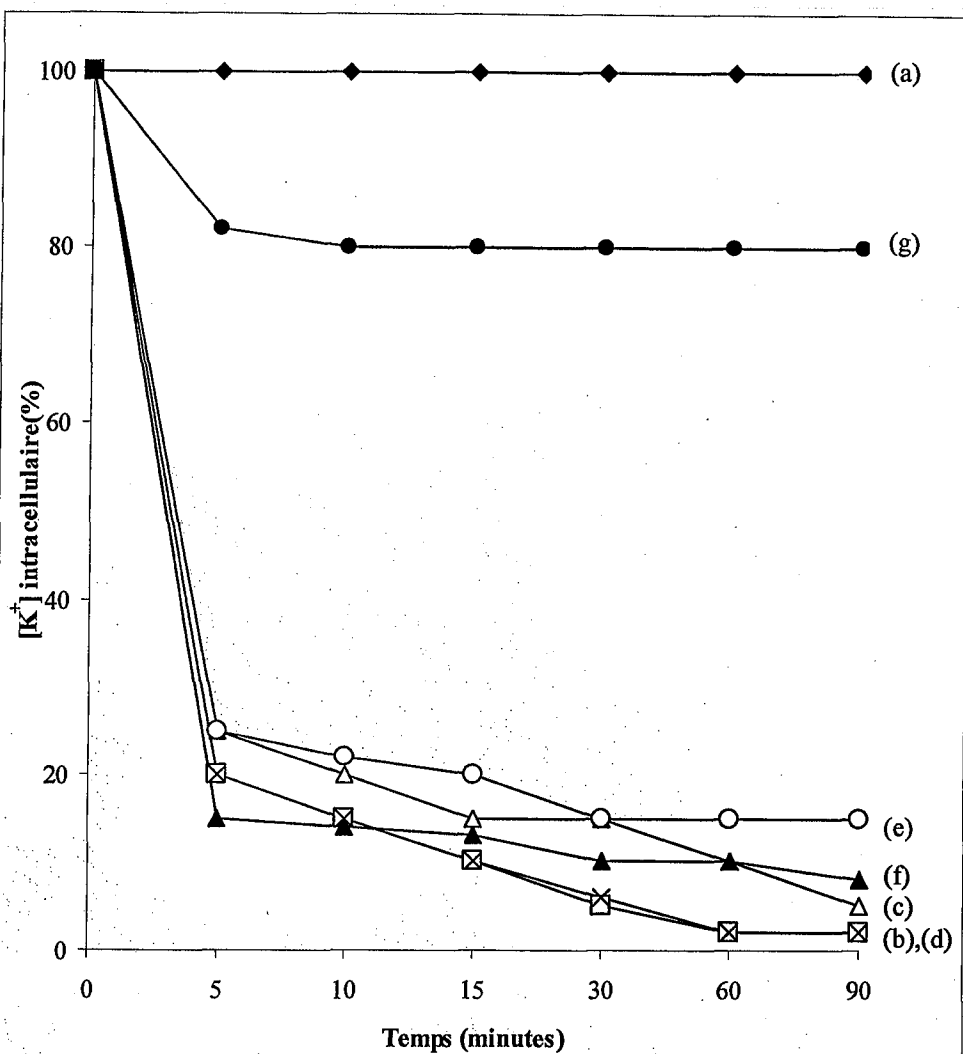


Figure N°6: Effet des solutions mères d'AmB(10^{-4} M) préparées à des pH acides sur la fuite de K^+ chez le globule rouge (la concentration finale est de 10^{-5} M).

- ◆ courbe (a): Témoin
- courbe (b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO
- △ courbe (c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/pH3,8
- × courbe (d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/pH4
- courbe (e): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/pH4,4
- ▲ courbe (f): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/pH5
- courbe (g): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/pH5,4

La figure N°7 représente à 37°C l'effet des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) préparées à des pH acides, sur la libération de l'hémoglobine par le globule rouge (la concentration finale en AmB est de 10^{-5} M).

- La courbe (a) représente la courbe témoin où il n'y a aucune addition d'antifongique. Nous n'observons pas d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire durant les 90 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4} M dans du DMSO. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 70% après 5 minutes d'incubation et atteint un taux de 90% au bout de 90 minutes, 100% représentant la lyse totale des globules rouges.
- Les courbes (c), (d) et (e) représentent respectivement, l'effet des solutions mères d'AmB préparées aux pH 3,8 ; 4 et 4,4. Les globules rouges perdent en 5 minutes près de 30% de leur hémoglobine et autour de 50% après 15 minutes d'incubation. Cette perte est autour de 80% au bout de 90 minutes d'incubation.
- La courbe (f) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH5. Après 30 minutes d'incubation, les globules rouges perdent 50% de leur hémoglobine. Cette perte est estimée à 70% au bout de 90 minutes d'incubation.
- La courbe (g) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 5,4. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 20% au bout de 90 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les solutions mères d'AmB préparées à pH 3,8 ; 4 ; 4,4 et 5 induisent une libération massive de l'hémoglobine au bout de 90 minutes d'incubation. Il en est de même avec la solution d'AmB préparée dans le DMSO. En effet, nous observons une lyse totale des érythrocytes. D'autre part, avec la solution mère d'AmB préparée à pH 5,4, la libération de l'hémoglobine n'est que de 20% en 90 minutes d'incubation. Il semble qu'à ce pH le globule rouge soit mieux protégé de l'action de l'AmB qu'aux solutions d'AmB préparées aussi bien dans le DMSO qu'aux pH 3,8 ; 4 ; 4,4 et 5. De plus, cette perte d'hémoglobine est parallèle à la fuite de K^+ intra érythrocytaire.

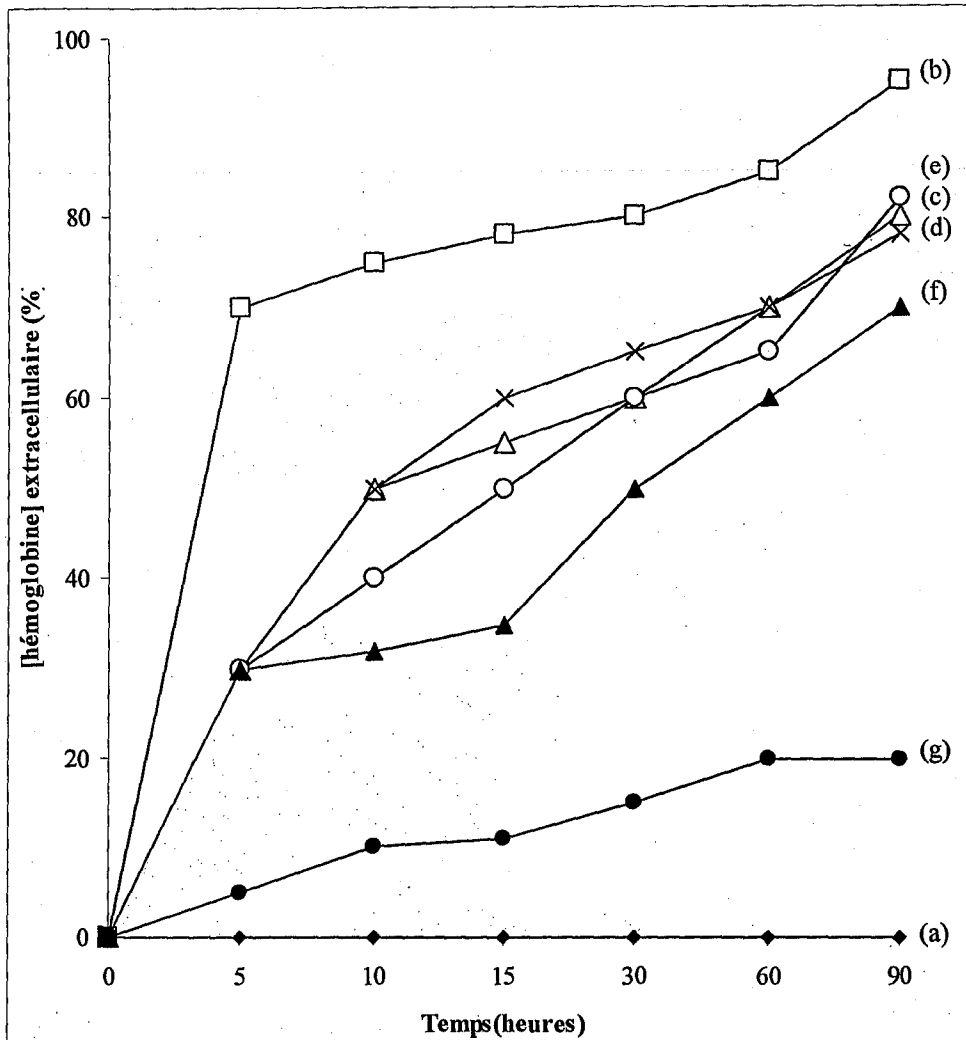


Figure N°7: Effet des solutions mères d'AmB(10^{-4} M) préparées à des pH acides sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge (la concentration finale est de 10^{-5} M)

- ◆ courbe (a): Témoin
- courbe (b): [SM] à 10-4M d'AmB/DMSO
- △ courbe (c): [SM] à 10-4M d'AmB/pH3,8
- × courbe (d): [SM] à 10-4M d'AmB/pH4
- courbe (e): [SM] à 10-4M d'AmB/pH4,4
- ▲ courbe (f): [SM] à 10-4M d'AmB/pH5
- courbe (g): [SM] à 10-4M d'AmB/pH5,4

1.1.2. Solutions d'AmB préparées aux pH $\geq 7,4$:

Comme précédemment fait aux pH $< 7,4$, nous avons tout d'abord, testé l'innocuité des différentes solutions tampons de pH $\geq 7,4$ utilisées pour la solubilisation de l'amphotéricine B.

L'addition des solutions tampons carbonate/bicarbonate (10mM) aux pH 10 et 10,8 au milieu réactionnel en quantités équivalentes à celle de la solution antifongique à ajouter, n'induit aucune modification du pH du milieu. Ce dernier reste constant à pH 7,4.

De plus, nous n'observons ni fuite de K^+ intracellulaire, ni hémolyse suite à l'addition de ces solutions tampons en absence d'AmB. Il en est de même avec le PBS (10mM) pH7,4.

Ensuite, nous avons évalué l'effet des solutions mères d'AmB préparées à des pH alcalins. Les résultats obtenus sont regroupés sur les figures N°8 et 9.

La figure N°8 représente l'effet des solutions mères d'AmB ($10^{-4}M$) préparées à des pH alcalins, sur la fuite du K^+ intracellulaire chez le globule rouge (la concentration finale en AmB est de $10^{-5}M$).

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition. Le K^+ intra érythrocytaire reste constant. Nous n'observons aucune fuite vers le milieu extracellulaire au cours des 90 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution d'AmB préparée dans du DMSO. Les globules rouges perdent 80% de leur K^+ en 5 minutes d'incubation. Les cellules sont totalement vidées de leur K^+ au bout de 90 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'AmB préparée à pH 7,4. Nous remarquons que les érythrocytes perdent 80% de leur K^+ intracellulaire après 5 minutes d'incubation. Au bout de 60 minutes d'incubation, cette fuite est estimée à 90%.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 10. Il y a une fuite massive du K^+ intra érythrocytaire (90%) après 5 minutes d'incubation. Au bout de 60 minutes d'incubation la fuite est totale.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 10,8. Le taux de K^+ extracellulaire est estimé à 25% après 5 minutes d'incubation. Ce taux reste constant durant les 90 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, la solution mère d'AmB préparée à pH 10,8 permet une protection des érythrocytes. En effet, alors qu'avec les solutions d'AmB préparées aussi bien dans du DMSO qu'à pH 10 ou 7,4 il y a une fuite quasi-totale de K^+ intra érythrocytaire, avec la solution mère d'AmB préparée à pH10,8 il n'y a qu'une fuite de 20% du K^+ intra érythrocytaire.

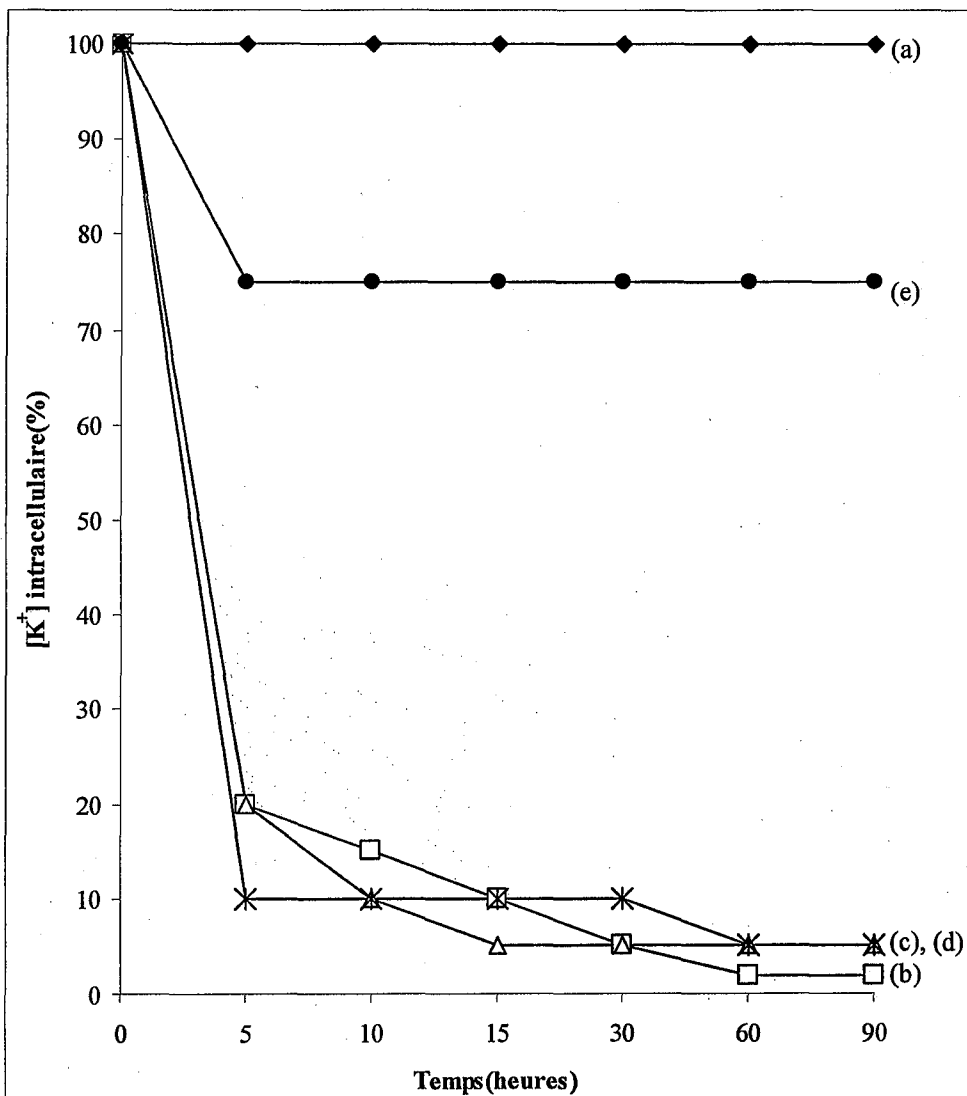


Figure N°8: Effet des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) préparées à des pH alcalins sur la fuite de K^+ chez le globule rouge (la concentration finale est de 10^{-5} M).

- ◆— courbe (a): Témoin
- courbe (b): [SM] à 10-4M d'AmB/DMSO
- △— courbe (c): [SM] à 10-4M d'AmB/pH7,4
- *— courbe (d): [SM] à 10-4M d'AmB/pH10
- courbe (e): [SM] à 10-4M d'AmB/pH10,8

La figure N°9 représente l'effet des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) préparées à des pH alcalins, sur la perte de l'hémoglobine par le globule rouge (la concentration finale en AmB est de 10^{-5} M).

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition d'AmB. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 90 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4} M dans du DMSO. Il y a une libération massive de l'hémoglobine près de 70% après 5 minutes d'incubation et atteint un taux de 95% au bout de 90 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'AmB préparée à pH 7,4. Les globules rouges perdent près de 80% de leur hémoglobine après 5 minutes et près de 90% après 15 minutes d'incubation. Cette perte est autour de 95% au bout de 90 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 10. Les globules rouges perdent 60% de leur hémoglobine après 5 minutes d'incubation, et près de 75% après 15 minutes. L'hémolyse est estimée à 80% au bout de 90 minutes d'incubation.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 10,8. Les globules rouges perdent 10% de leur hémoglobine au bout de 5 minutes d'incubation et 15% après 15 minutes. Ce taux d'hémoglobine est de 20% au bout de 90 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les solutions mères d'AmB préparées à pH 7,4 et 10 induisent une totale hémolyse au bout de 90 minutes d'incubation. Il en est de même avec la solution d'AmB préparée dans le DMSO. D'autre part, avec la solution mère d'AmB préparée à pH 10,8 la perte d'hémoglobine n'est que de 20%. Il semble qu'il y a une protection du globule rouge à pH 10,8 par rapport aux solutions d'AmB préparées aussi bien dans le DMSO qu'à pH 10 ou 7,4.

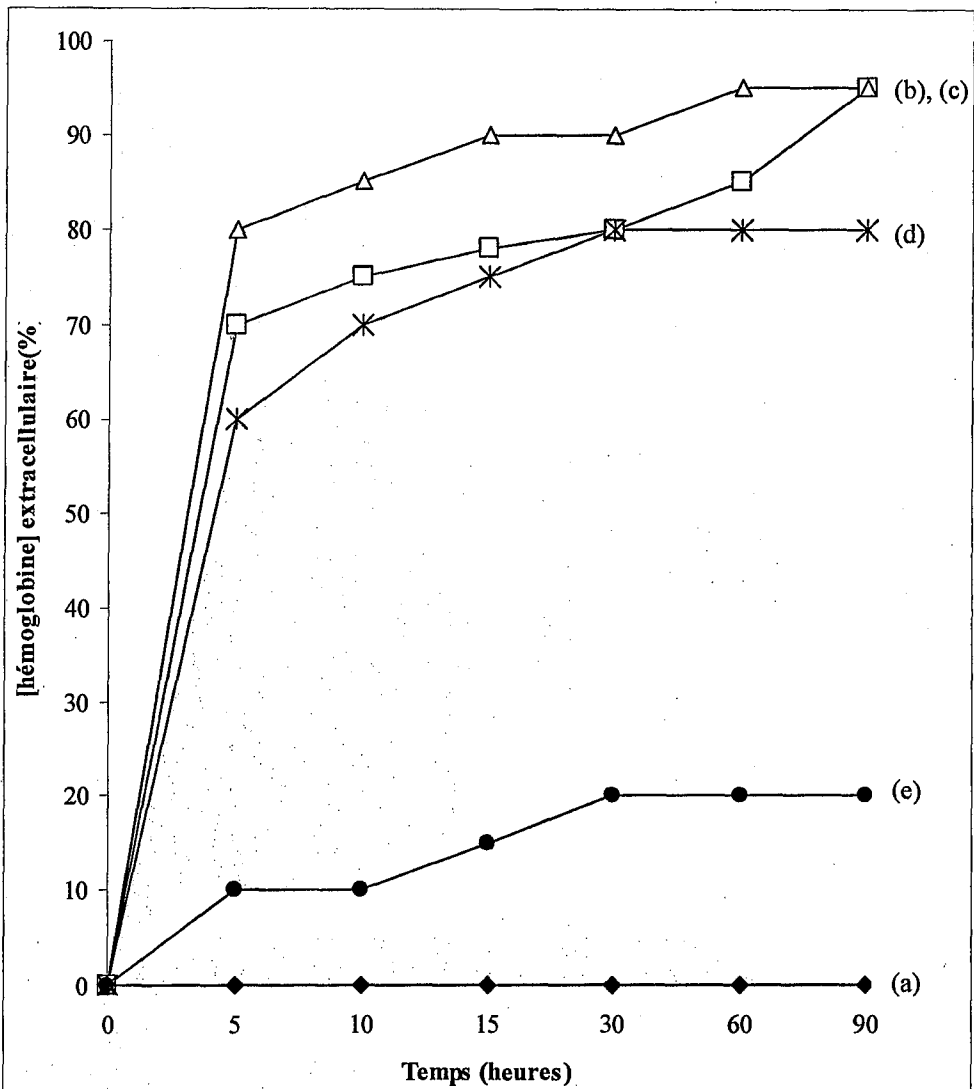


Figure N°9: Effet des solutions mères d'AmB(10^{-4} M) préparées à des pH alcalins sur la perte de l'hémoglobine chez le globule rouge (la concentration finale est de 10^{-5} M)

- ◆ courbe (a): Témoin
- courbe (b): [SM] à 10-4M d'AmB/DMSO
- △ courbe (c): [SM] à 10-4M d'AmB/pH7,4
- * courbe (d): [SM] à 10-4M d'AmB/pH10
- courbe (e): [SM] à 10-4M d'AmB/pH10,8

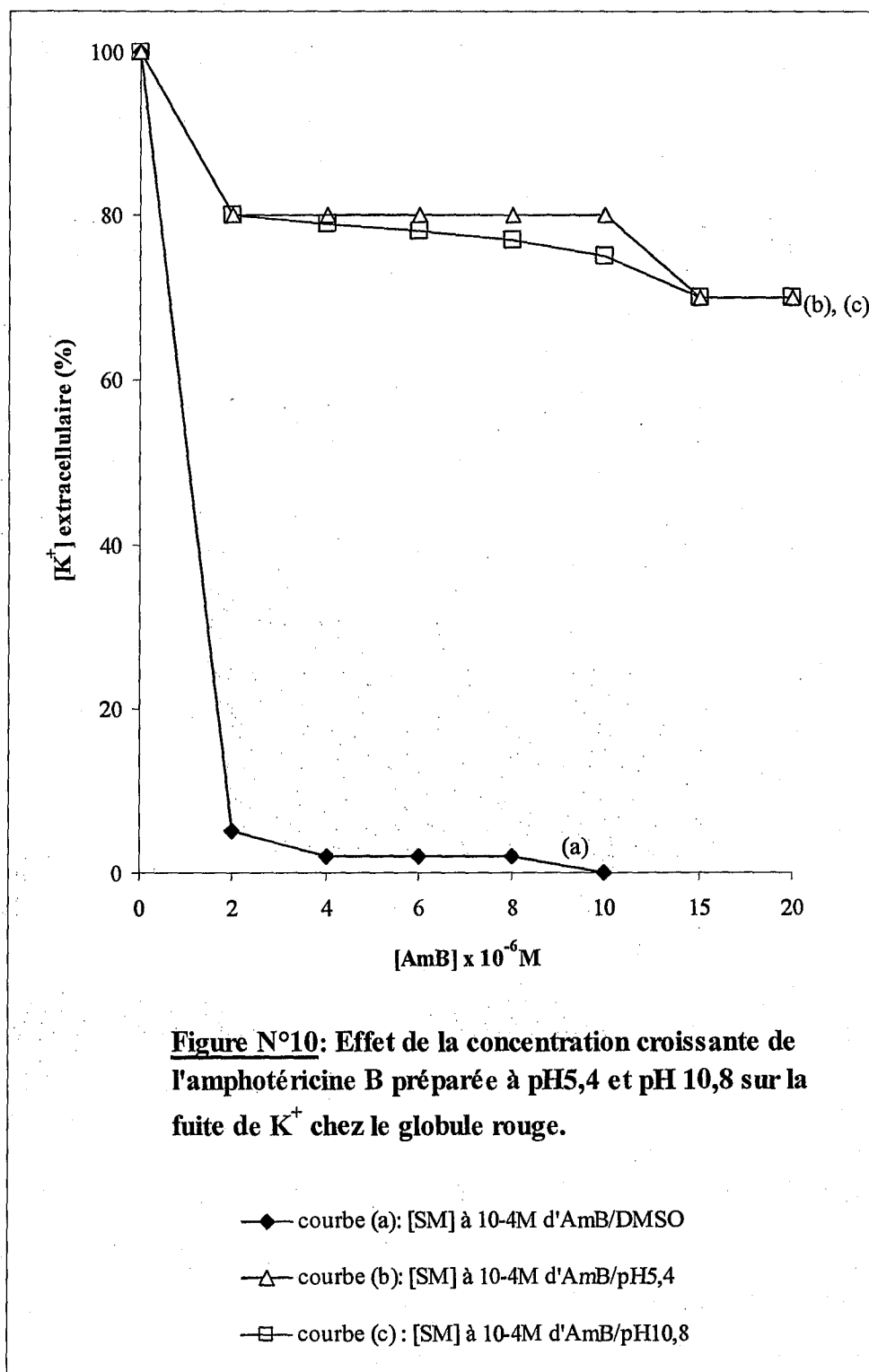
De l'ensemble des résultats, il ressort clairement que la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge est modulée par le pH de la solution mère. En effet, dans les mêmes conditions expérimentales (concentration de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M, la concentration finale est à 10^{-5} M), les solutions stock d'antifongiques préparées aux pH 3,8, pH 4, pH 4,4, pH 5 et pH 10 induisent une fuite totale de K^+ intracellulaire et entre 70% et 80% d'hémolyse. Cette toxicité est presque de même amplitude en présence des solutions préparées dans le DMSO qui induisent une lyse complète des globules rouges en 10 minutes d'incubation. En revanche, les solutions d'AmB préparées aux pH 5,4 et pH 10,8 n'induisent qu'une fuite partielle de K^+ intracellulaire (20%) et d'hémolyse (perte de 20% d'hémoglobine) en 90 minutes d'incubation, la toxicité de l'AmB est réduite de 80%. Il semble qu'avec la solution mère de 10^{-4} M d'AmB préparée dans le tampon acétate/acide acétique (100mM) pH 5,4 ou dans le tampon carbonate/bicarbonate (10mM) pH 10,8 qu'il y a protection du globule rouge.

1.1.3. Effet de la concentration croissante de l'AmB :

Sur la base des résultats obtenus il apparaît que c'est à pH 5,4 et à pH 10,8 qu'il y a une protection du globule rouge humain. C'est pourquoi, nous avons envisagé de faire des courbes dose/réponse à ces pH. Nous avons fait varier la concentration finale d'AmB de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ à $20 \times 10^{-6} \text{M}$.

La figure N°10 représente l'effet de concentrations croissantes d'AmB sur la fuite de K^+ intracellulaire chez le globule rouge (le temps d'incubation est de 90 minutes). Les solutions mères utilisées de 10^{-4}M ont été préparées dans des tampons de pH 5,4 ou 10,8.

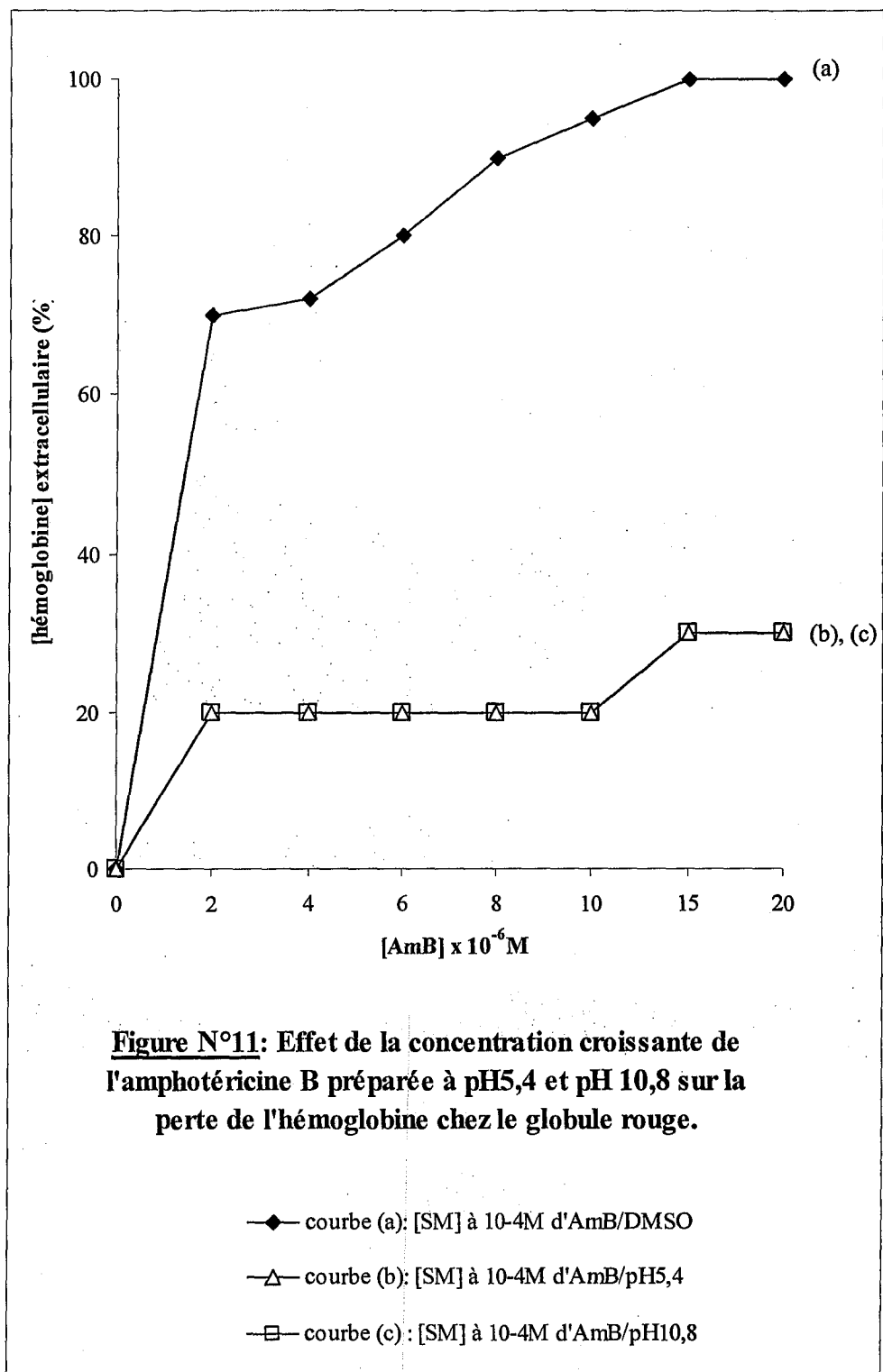
- La courbe (a) montre l'effet de la concentration croissante de l'AmB pour les solutions mères préparées à 10^{-4}M dans le DMSO. Les globules rouges perdent tout leur K^+ intracellulaire pour une concentration finale d'AmB égale à $2 \times 10^{-6} \text{M}$.
- Sur la courbe (b) est porté l'effet de la concentration croissante de l'AmB pour les solutions mères préparées à 10^{-4}M à pH 5,4. La fuite de K^+ intra érythrocytaire est de 20% pour des concentrations finales d'AmB allant de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ à $10 \times 10^{-6} \text{M}$. Ce taux est de 30% pour des concentrations finales de $15 \times 10^{-6} \text{M}$ et $20 \times 10^{-6} \text{M}$.
- La courbe (c) représente l'effet de la concentration croissante de l'AmB pour les solutions mères préparées à 10^{-4}M à pH 10,8. Les globules rouges perdent 20% de leur K^+ intracellulaire pour des concentrations finales allant de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ à $10 \times 10^{-6} \text{M}$. Ce taux est de 30% pour des concentrations finales de $15 \times 10^{-6} \text{M}$ et $20 \times 10^{-6} \text{M}$.



Sur la figure N°11 est porté l'effet de concentrations croissantes d'AmB sur la perte de l'hémoglobine par le globule rouge (le temps d'incubation est de 90 minutes). Les solutions mères de 10^{-4} M d'AmB ont été préparées dans deux tampons différents l'un à pH 5,4 l'autre à pH 10,8.

- La courbe (a) représente l'effet de la concentration croissante de l'AmB pour les solutions préparées dans du DMSO. Les globules rouges perdent 70% de leur hémoglobine pour une concentration finale d'AmB égale à 2×10^{-6} M. Cette hémolyse est presque totale à partir d'une concentration finale égale à 8×10^{-6} M.
- Les courbes (b) et (c) représentent respectivement l'effet de la concentration croissante de l'AmB pour les solutions préparées à pH 5,4 et 10,8. La perte de l'hémoglobine est estimée à 20% pour des concentrations d'AmB allant de 2×10^{-6} M à 10×10^{-6} M. L'hémolyse est estimée à 30% pour les concentrations finales d'AmB de 15×10^{-6} M à 20×10^{-6} M.

Il ressort de l'ensemble des résultats obtenus, qu'en augmentant la concentration finale d'AmB jusqu'à 20×10^{-6} M, la toxicité vis-à-vis du globule rouge est largement réduite en utilisant des solutions mères d'AmB à pH 5,4 et 10,8 ; nous n'observons que 30% d'hémolyse dans ces conditions expérimentales alors que les solutions mères préparées dans le DMSO induisent une lyse totale des érythrocytes à une concentration finale de 2×10^{-6} M.



1.2. Effet de la variation du pH sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis des levures *Candida albicans*.

Les résultats obtenus jusqu'à présent, montrent que la toxicité de l'AmB envers les globules rouges dépend du pH de la solution stock, c'est pourquoi il nous a paru nécessaire de faire le parallèle entre les effets toxiques décrits plus haut et l'activité antifongique sur *C. albicans* dans les mêmes conditions expérimentales.

Dans un premier temps, nous avons testé l'innocuité du solvant. L'addition des différentes solutions tampons aux différents pH (pH de 3,8 à 10,8) en absence d'AmB en quantités équivalentes à celle de la solution antifongique à ajouter, n'induit pas de modification du pH du milieu de culture (pH5,8), les croissances sont réalisées à $\text{pH}5,8 \pm 0,2$, et nous n'observons aucune inhibition de la croissance chez les levures *C. albicans*.

De plus quel que soit le pH de la solution mère, pour une concentration finale d'AmB de 10^{-5}M , la croissance des levures est inhibée durant les 10 heures de suivi. C'est pourquoi afin de mieux apprécier l'effet du pH des solutions stock d'AmB sur l'activité antifongique de la molécule, nous avons réduit la concentration finale à $2 \times 10^{-6}\text{M}$.

1.2.1. Solutions d'AmB préparées aux pH < 7,4 :

La figure N°12 représente l'effet de la variation du pH (de 3,8 à 5,4) de la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4}M sur son activité antifongique vis-à-vis des levures, la concentration finale d'AmB est de $2 \times 10^{-6}\text{M}$.

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Après une phase de latence de 2 heures, les levures sont en phase exponentielle de croissance ; le nombre de cellules augmente pour atteindre le maximum au bout de 8 heures d'incubation. Les levures atteignent la phase stationnaire qui va jusqu'à 10 heures d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans du DMSO. Le nombre de cellules de départ reste constant durant les 10 heures d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 3,8 sur la croissance de *C. albicans*. Après une phase de latence de 2 heures, le nombre de cellules augmente et atteint un maximum de 50% par rapport à la culture témoin au bout de 8 heures d'incubation.

- Les courbes (d), (e), (f) et (g) représentent respectivement l'effet des solutions mères d'AmB préparées à pH 4 ; 4,4 ; 5 et 5,4. Nous observons un prolongement de la phase de latence durant les 10 heures d'incubation.

D'après les résultats obtenus, il ressort clairement qu'en faisant varier le pH des solutions mères d'AmB préparées à 10^{-4} M de pH 4 à pH 5,4, l'activité antifongique est maintenue vis-à-vis de la levure *C. albicans* durant les 10 heures de suivi. En effet, la croissance des levures semble être totalement inhibée dans ces conditions de culture. Par contre, pour les solutions mères d'AmB préparées à pH 3,8, nous observons une perte de l'efficacité estimée à 50%.

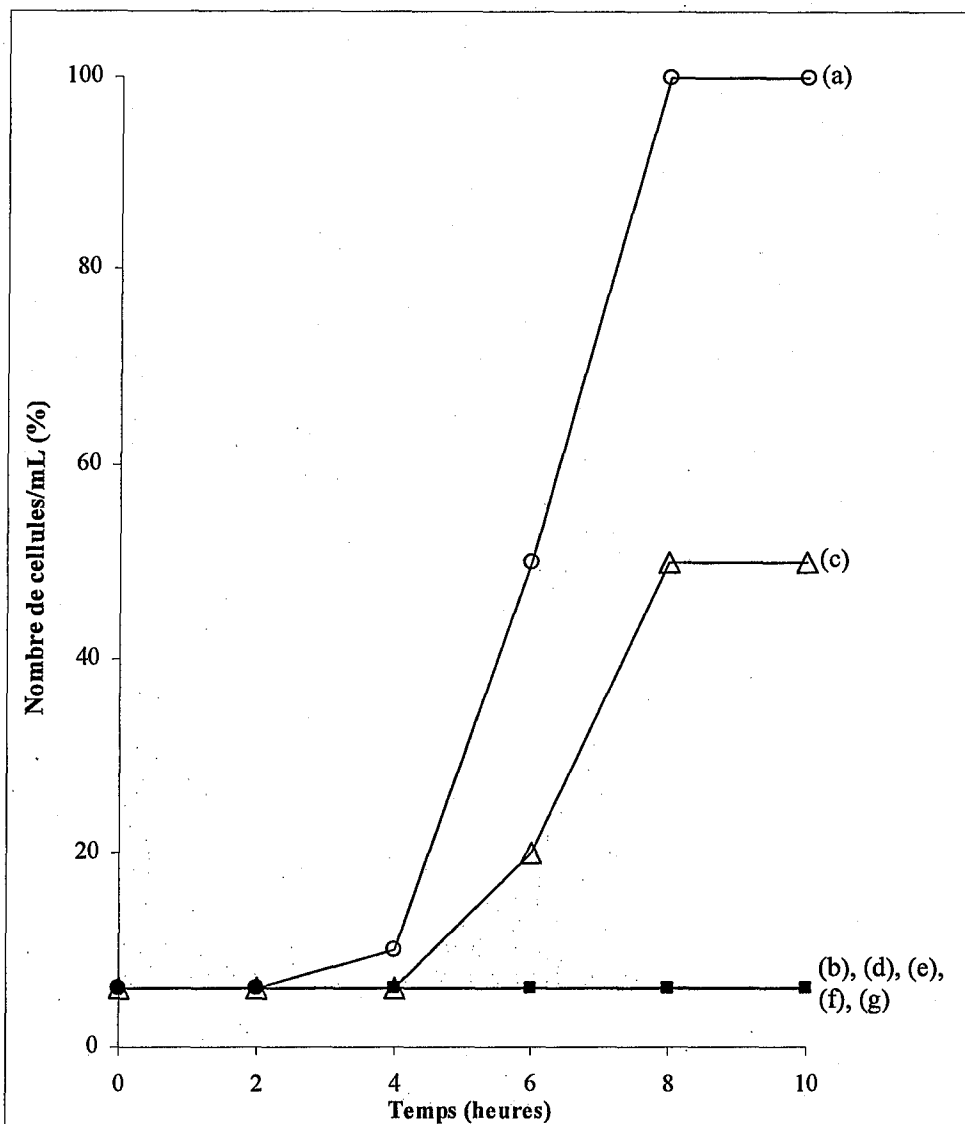


Figure N°12: Effet des pH acides des solutions mères d'AmB solubilisées à 10^{-4} M (la concentration finale à 2×10^{-6} M) sur son activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans*.

—○— courbe(a): Témoin

—■— courbe (b)-(d)-(e)-(f)-(g):[SM] à 10^{-4} M d'AmB préparées dans du DMSO et dans des tampons de pH4 - pH4,4 - pH5 et pH5,4

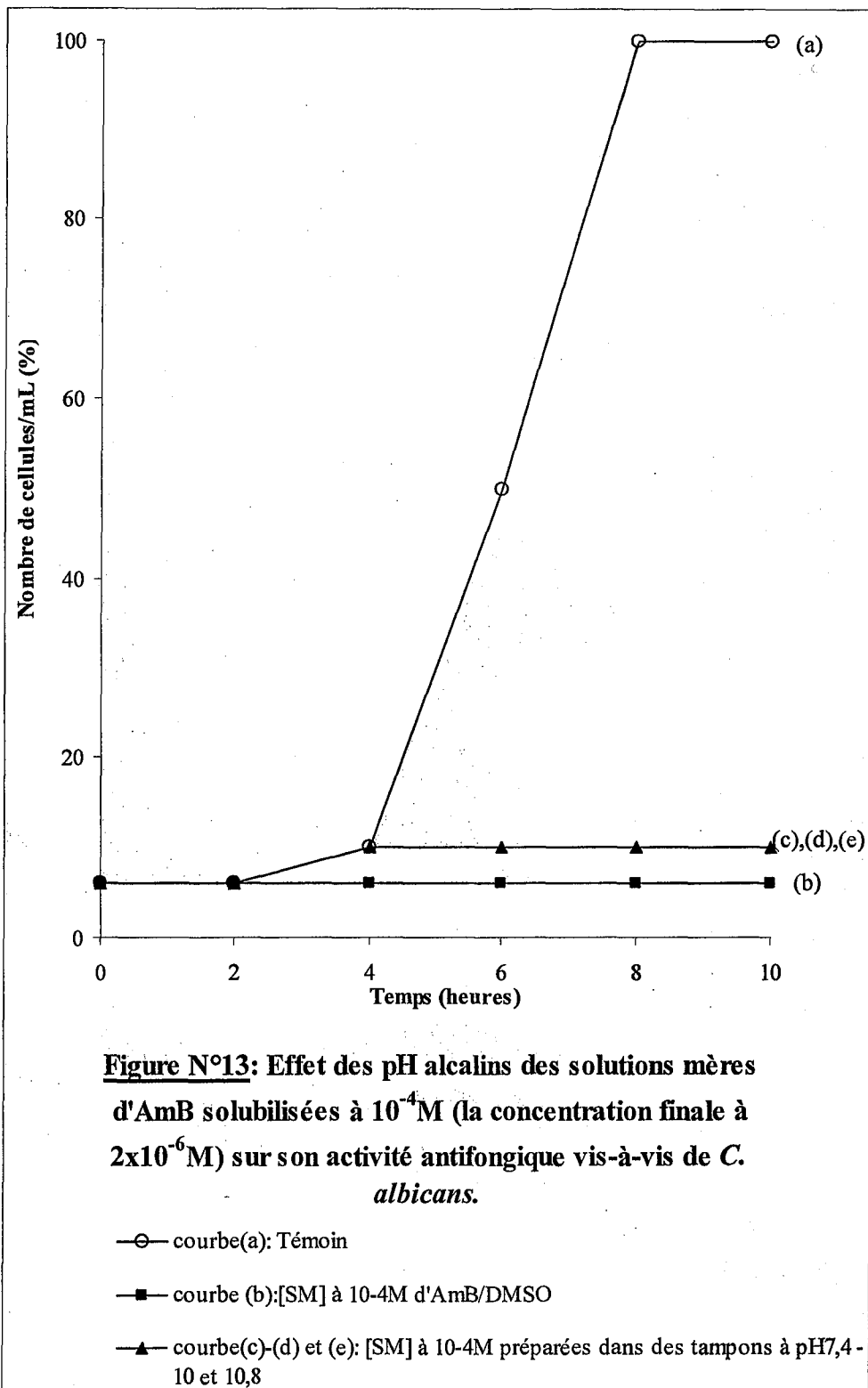
—△— courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB à pH3,8

1.2.2. Solutions d'AmB préparées aux $\text{pH} \geq 7,4$:

La figure N°13 représente l'effet de la variation du pH (de 7,4 à 10,8) de la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4}M sur son activité antifongique vis-à-vis des levures, la concentration finale d'AmB est de $2 \times 10^{-6}\text{M}$.

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Après une phase de latence de 2 heures, les levures sont en phase exponentielle de croissance ; le nombre de cellules augmente pour atteindre le maximum au bout de 8 heures d'incubation. Les levures atteignent la phase stationnaire qui va jusqu'à 10 heures d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans du DMSO. Le nombre de cellules de départ reste constant durant les 10 heures d'incubation.
- Les courbes (c), (d) et (e) représentent respectivement l'effet des solutions mères d'AmB préparées à pH 7,4 , 10 et 10,8. Après une phase de latence de 6 heures, le nombre de cellules augmente très peu, en effet le maximum atteint est de 10% par rapport à la culture témoin au bout de 10 heures d'incubation. La croissance est inhibée à 90%.

D'après les résultats obtenus, il ressort clairement qu'en faisant varier le pH des solutions mères à 10^{-4}M d'AmB de pH 7,4 à pH 10,8, l'activité antifongique est maintenue vis-à-vis de la levure *C. albicans*. En effet, la croissance des levures semble être totalement inhibée dans ces conditions de cultures.



1.2.3. Effet de la variation du pH sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B à une concentration finale de $2 \times 10^{-7} \text{M}$:

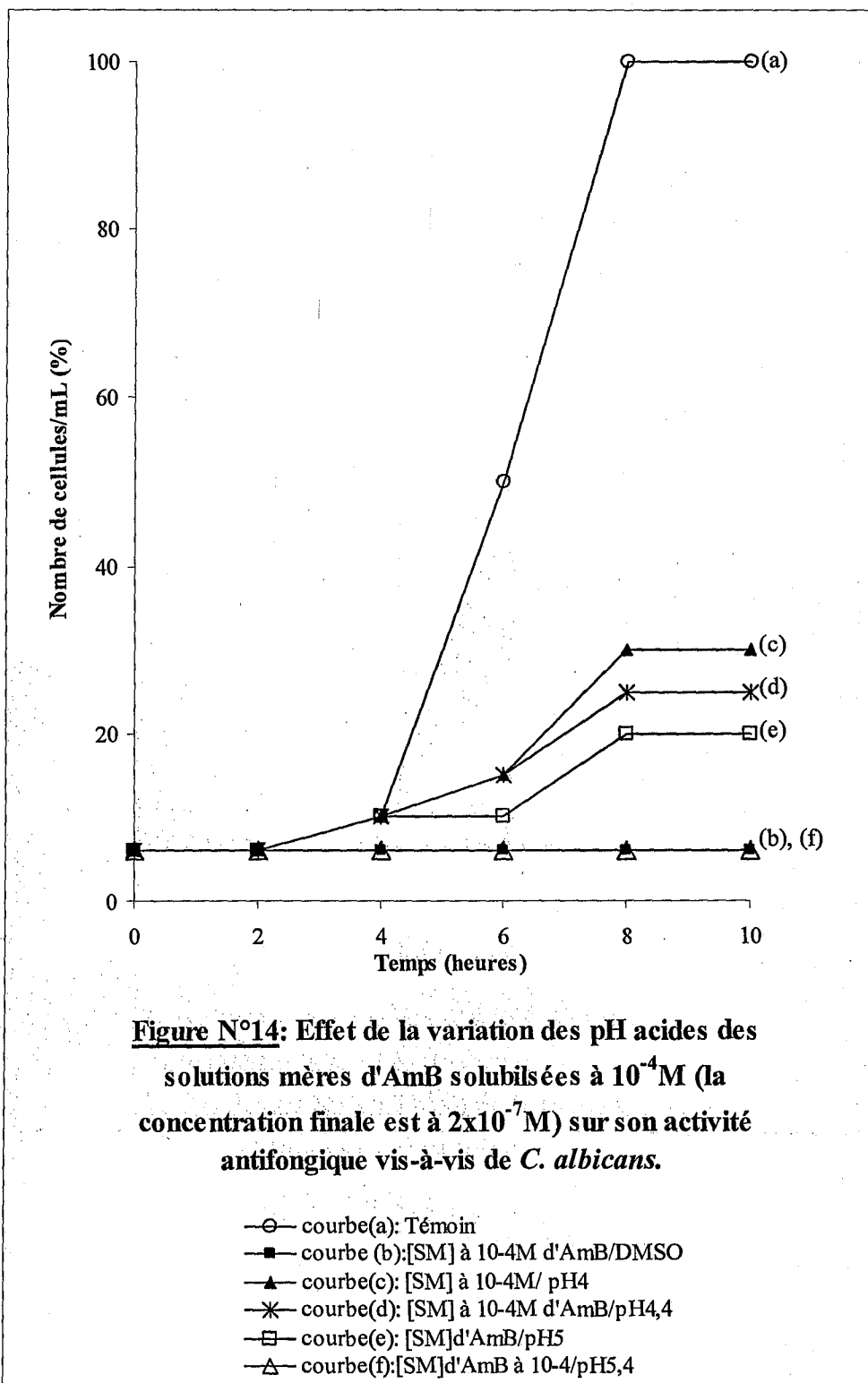
Suite aux résultats que nous avons obtenus, il semble que la souche de levure que nous avons utilisée est sensible à l'action de l'AmB pour une concentration finale de $2 \times 10^{-6} \text{M}$ quel que soit les conditions de pH de la solution antifongique excepté à pH 3,8 où l'AmB perd son activité vis-à-vis de la levure.

C'est pourquoi, afin d'avoir une meilleure appréciation de l'effet de la modulation du pH sur l'activité antifongique de la molécule, nous avons réduit la concentration finale de l'AmB à $2 \times 10^{-7} \text{M}$.

a- Solutions d'AmB préparées aux $\text{pH} < 7,4$:

La figure N°14 représente l'effet de la variation du pH (de 4 à 5,4) de la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4}M sur son activité antifongique vis-à-vis des levures, la concentration finale d'AmB est de $2 \times 10^{-7} \text{M}$.

- Sur la courbe (a) est porté le nombre de cellules obtenues par unité de volume de la culture témoin sans aucune addition. Elle représente la référence 100% de croissance.
- La courbe (b) montre l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans du DMSO. Le nombre de cellules de départ reste constant durant les 10 heures d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution d'AmB préparée à pH 4. Après une phase de latence de 4 heures, le nombre de cellules augmente et atteint un maximum de 30% par rapport à la culture témoin au bout de 8 heures d'incubation. Les levures sont ensuite en phase stationnaire. La croissance est inhibée à 70%.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution d'AmB préparée à pH 4,4. Après une phase de latence de 4 heures, les cellules entrent en phase exponentielle où le maximum atteint est 25% par rapport à la culture témoin au bout de 8 heures d'incubation, le taux d'inhibition est estimé à 75%.
- Sur la courbe (e) est porté l'effet de la solution d'AmB préparée à pH 5. Nous remarquons suite à une phase de latence de 4 heures, que la croissance atteint un maximum de 20% par rapport à la culture témoin au bout de 8 heures d'incubation. L'inhibition est estimée à 80%.
- La courbe (f) montre l'effet de la solution mère d'AmB préparée à pH 5,4. Le nombre de cellules de départ reste constant durant les 10 heures d'incubation.



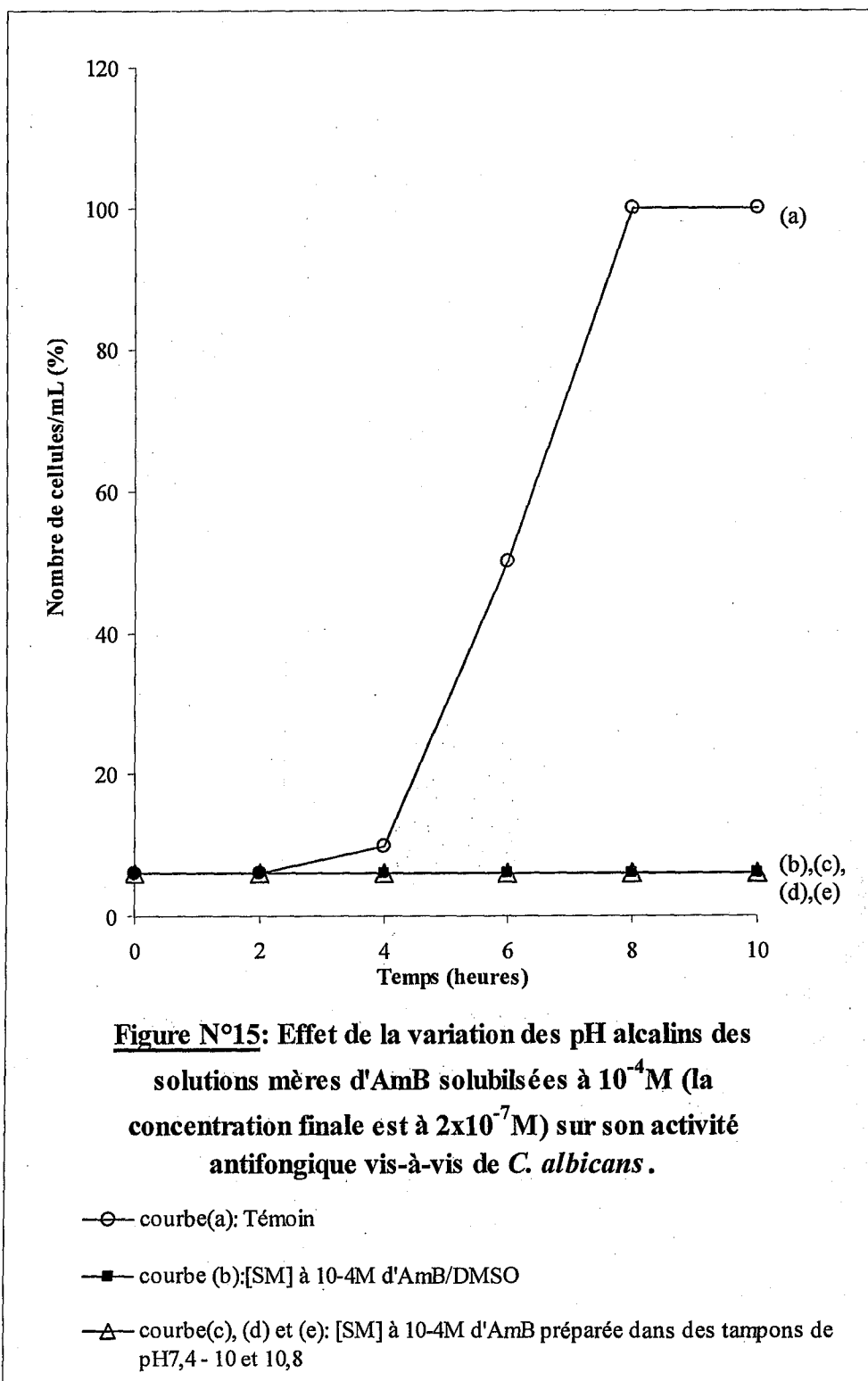
Les résultats obtenus montrent que la modulation du pH des solutions mères d'AmB modifie l'activité de l'antifongique vis-à-vis de la levure *C. albicans*. Aux pH 4, 4,4 et 5, l'AmB perd jusqu'à 30% de son activité antifongique en comparaison à une solution témoin, préparée dans du DMSO (pour une concentration finale de $2 \times 10^{-7} \text{M}$). En revanche, à pH 5,4 la molécule reste pleinement active envers la levure durant les 10 heures de suivi.

b- Solutions d'AmB préparées aux pH $\geq 7,4$:

La figure N°15 représente l'effet de la variation du pH (de 7,4 à 10,8) de la solution mère 10^{-4}M d'AmB sur son activité antifongique vis-à-vis des levures, la concentration finale d'AmB dans le milieu de culture est de $2 \times 10^{-7} \text{M}$.

- La courbe (a) représente la culture témoin sans addition d'antifongique, c'est la référence 100% de croissance.
- Sur la courbe (b) est porté l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans du DMSO ; le nombre de cellules de départ reste constant durant les 10 heures d'incubation.
- Les courbes (c), (d) et (e) représentent respectivement l'effet de la solution d'AmB préparée à pH 7,4, 10 et 10,8. Le nombre de cellules de départ reste constant durant les 10 heures d'incubation.

Les résultats obtenus montrent qu'en présence de solutions mères d'AmB préparées aux pH 7,4, 10 et 10,8, l'antifongique est pleinement actif envers les levures *C. albicans*.



Les résultats obtenus montrent que la variation de pH des solutions mères d'AmB module la toxicité sélective de cette molécule aussi bien vis-à-vis du globule rouge humain, que vis-à-vis de la levure *Candida albicans*. En effet, les solutions mères d'AmB (10^{-4} M) préparées au pH 3,8, 4, 4,4, 5, 7,4 et 10, induisent une fuite totale du K^+ intracellulaire et une lyse cellulaire. Il en est de même pour les solutions d'AmB préparées dans le DMSO. En revanche, à pH 5,4 et 10,8, la toxicité vis-à-vis du globule rouge est fortement réduite puisque dans ces conditions l'AmB n'induit que 20% de fuite de K^+ intraérythrocytaire et comparativement aux solutions mères habituellement préparées dans du DMSO qui induisent une totale hémolyse chez le globule rouge, les solutions mères d'AmB préparées dans des tampons de pH 5,4 ou 10,8 n'entraînent qu'une libération d'hémoglobine limitée (20% de l'hémoglobine totale) tout en maintenant son activité vis-à-vis de la levure *Candida albicans*.

3. EFFET DE LA VARIATION DU pH SUR L'ETAT PHYSIQUE DE LA MOLECULE D'AMPHOTERICINE B :

En solution aqueuse, l'amphotéricine B est un mélange de différentes espèces : monomères solubles, oligomères solubles et agrégats insolubles (Mazerski J. et coll., 1982).

Quel que soit le type de formulation utilisée et quel que soit le mécanisme d'action mis en œuvre, la toxicité de l'amphotéricine B est liée à l'interaction entre un certain type de forme de la molécule présente dans le milieu, avec les cellules cibles.

Cette information a orienté les investigations vers la détermination de la forme d'amphotéricine B qui est responsable de la toxicité cellulaire.

Bolard J. et coll.(1991) démontrent que l'équilibre entre monomères et agrégats joue un rôle important dans l'activité de la drogue. La toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des membranes contenant de l'ergostérol est observée à des concentrations auxquelles l'amphotéricine B est entièrement sous forme monomérique. Elle serait alors capable de s'associer aux molécules d'ergostérol présentes dans la membrane (cellules fongiques), ce qui conduirait à la formation de canaux. En revanche, il apparaît que la fuite de potassium induite par l'amphotéricine B chez les membranes à cholestérol et plus particulièrement chez le globule rouge, survient uniquement lorsque l'amphotéricine B est sous forme d'oligomères dans le milieu.

Alors que les monomères d'amphotéricine B sont trop courts pour être toxiques vis-à-vis des cellules animales, ils peuvent en s'associant tête-bêche former des dimères ayant une plus grande longueur (Bolard J. et coll., 1997). Par conséquent, le seuil de concentration au-delà duquel l'oligomère apparaît semble déterminer l'activité de l'amphotéricine B.

Par ailleurs, le préchauffage des solutions d'amphotéricine B permet d'augmenter la taille des agrégats (Ernst C. et coll., 1978). La formation de ces super agrégats survient dans les solutions mères à faibles concentrations où il y a un maximum de monomères. Les agrégats vont se combiner aux monomères formant ainsi les super agrégats (Gaboriau F. et coll., 1997a). La formation de ces super agrégats diminue fortement la toxicité aussi bien *in vitro* envers le globule rouge (Gaboriau F. et coll., 1997b) que *in vivo* chez les souris (Petit C. et coll., 1998).

De ces études, il ressort clairement que c'est sous la forme de super agrégats insolubles que l'amphotéricine B est de moindre toxicité vis-à-vis des cellules animales. Cette découverte a été d'un intérêt fondamental, puisque la recherche de nouvelles formulations s'est orientée vers les moyens de favoriser cet état super agrégé de la molécule.

Toutes ces études montrent que l'activité de l'amphotéricine B est fortement liée à son état physique.

C'est pourquoi, sur la base des résultats que nous avons obtenus jusqu'à présent qui montrent que l'activité de la molécule d'amphotéricine B aussi bien vis-à-vis du globule rouge humain que vis-à-vis des levures, semble être fonction du pH de la solution mère, nous avons voulu voir sous quelle forme se trouve l'amphotéricine B en fonction de chaque condition de pH.

Dans un premier temps nous avons voulu voir si les différentes formes de l'AmB présentes dans les solutions antifongiques sont fonction du pH de ces dernières. C'est pourquoi nous avons préparé les différentes solutions mères d'antifongiques à une concentration de 10^{-4} M à différents pH (3,8 ; 4 ; 4,4 ; 5 ; 5,2 ; 5,4 ; 7,4 ; 9,5 ; 10 ; 10,5 et 10,8) et nous avons analysé ces solutions mères par le dichroïsme circulaire (DC) et par spectroscopie d'absorbance.

Le dichroïsme circulaire nous permet de mieux apprécier les formes agrégées alors que la spectroscopie d'absorbance nous permet de mieux apprécier les formes monomériques. Les solutions sont préparées le jour même de leur utilisation et maintenues 20 minutes à température ambiante avant analyse.

Rappelons que le pic du coefficient d'extinction molaire des super agrégats est observé aux longueurs d'ondes autour de 322nm, celui des agrégats autour de 339nm, alors que les monomères absorbent à des longueurs d'ondes autour de 409nm (Gaboriau F. et coll., 1997a).

Selon Legrand P. et coll. (1992), l'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans le DMSO présente un pic d'extinction molaire du dichroïsme circulaire autour de 330nm (centré à 340nm), ce qui correspond à la présence de formes agrégées. La spectroscopie d'absorbance met quant à elle en évidence les formes monomériques et oligomériques solubles, où des pics d'absorption moléculaire d'intensité décroissante sont observés à 413nm, 390nm, 369nm et 350nm.

2.4. Etat physique de l'AmB dans des conditions acides (pH<7,4)

2.4.1. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 3,8 :

La figure N°16A représente le spectre de dichroïsme circulaire d'une solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 3,8. Nous remarquons un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 409,372 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à une longueur d'onde de 328nm. En effet, le doublet excitonique est centré à 342nm, dont la composante positive à 328nm est de $\Delta\epsilon = 409,372 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, et la composante négative à 352nm est de $\Delta\epsilon = -277,75 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, ce qui suggère la présence des formes agrégées insolubles. Nous observons aussi, trois autres bandes négatives à 366nm ($\Delta\epsilon = -277,99 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), à 390nm ($\Delta\epsilon = -166,032 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et à 421nm ($\Delta\epsilon = -99,71 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption de la solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 3,8 sont regroupés sur la figure N°16B. Nous observons des pics d'absorption de 0,83 et 0,85 pour des longueurs d'ondes de 417nm et 422nm respectivement. Ils sont très faibles par rapport au pic observé à une longueur d'onde autour de 336nm, qui est estimé à 1,45, ce qui nous laisse supposer qu'il y a peu de formes monomériques solubles.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) suggère que l'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 3,8 est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles.

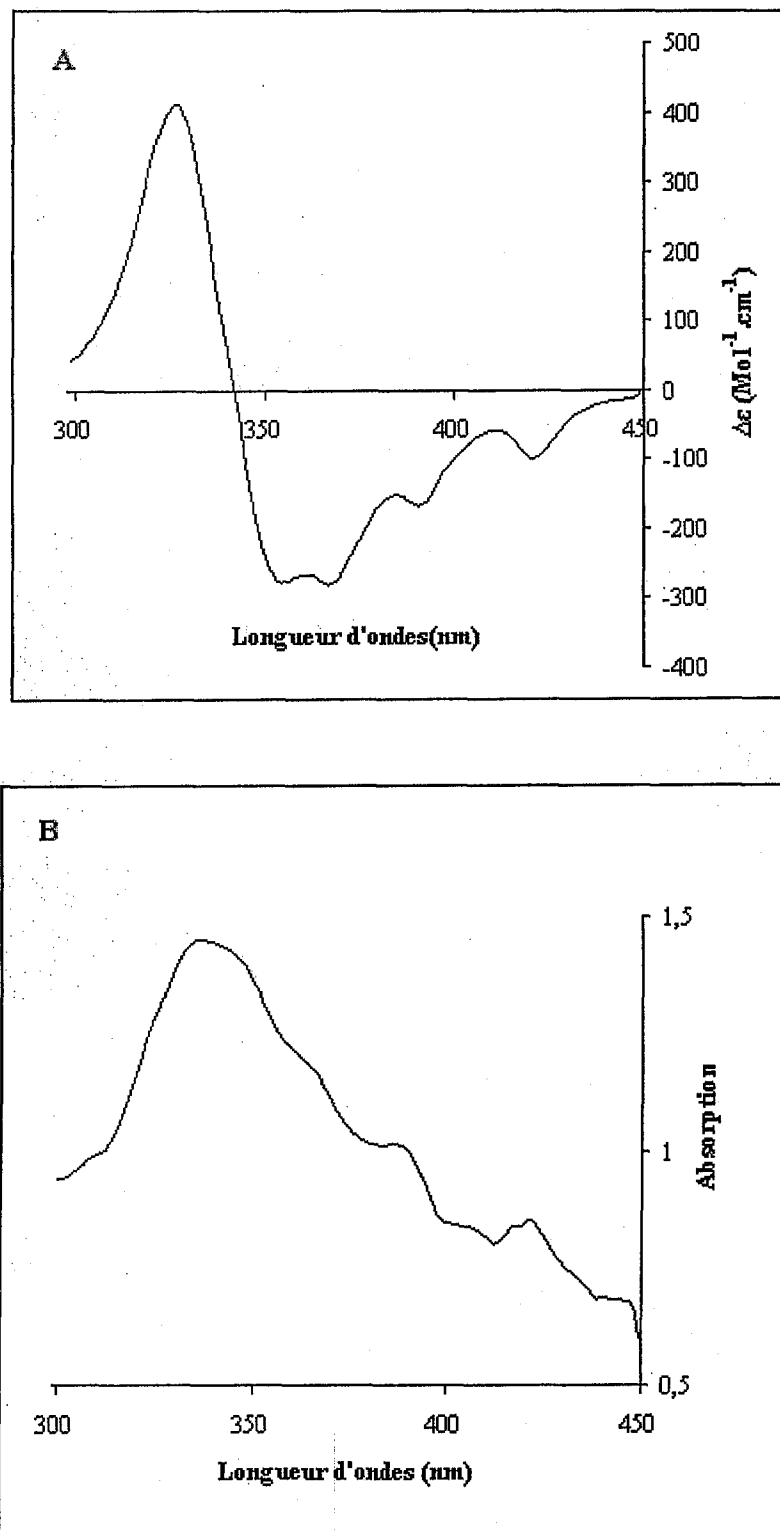


Figure N°16 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 3,8.

2.4.2 Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH4 :

La figure N°17A représente le spectre de dichroïsme circulaire d'une solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH4. On note à une longueur d'onde de 328nm un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 385,803 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le doublet excitonique est centré à 346nm, dont la composante positive à 329nm est de $\Delta\epsilon = 385,803 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, et la composante négative à 357nm est de $\Delta\epsilon = -239,015 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, ce qui nous laisse supposer la prédominance des formes agrégées insolubles. On observe aussi trois bandes négatives ; à 369nm ($\Delta\epsilon = -280,90 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), à 391nm ($\Delta\epsilon = -181,217 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et à 421nm ($\Delta\epsilon = -108,36 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption d'une solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH4 sont regroupés sur la figure N°17B. Les pics d'absorption sont de 0,92 et 0,93 pour des longueurs d'ondes de 419nm et 421nm respectivement. Ils sont très faibles par rapport au pic observé à une longueur d'onde autour de 341nm, qui est estimé à 1,56, ce qui laisse supposer une faible présence de monomères solubles.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) suggère que la solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH4 est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles.

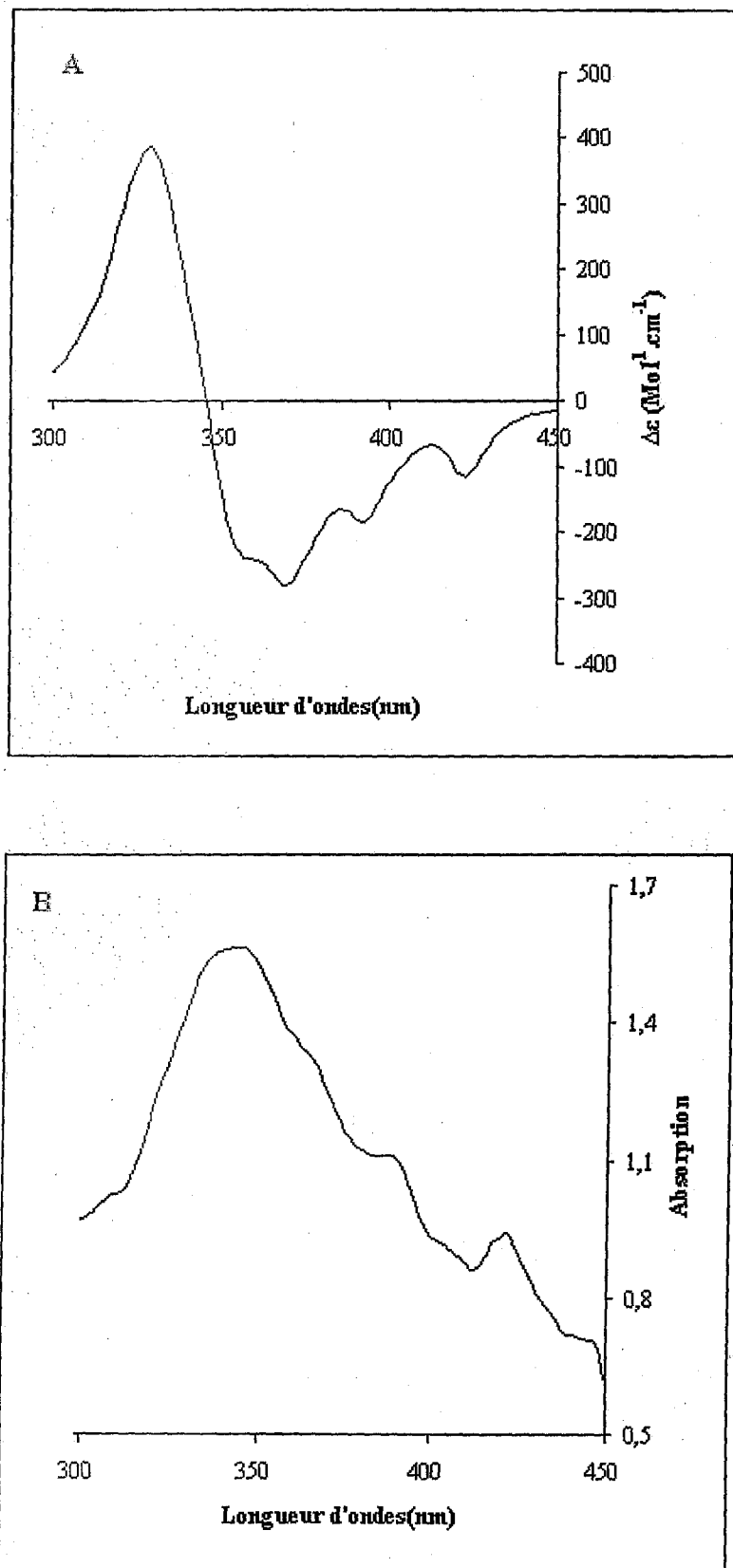


Figure N°17 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 4.

4.3. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH4,4 :

La figure N°18A représente le spectre de dichroïsme circulaire d'une solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH4,4. Nous remarquons à une longueur d'onde $\lambda=329$ nm, un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 243,729 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ce qui suggère la présence des formes agrégées insolubles. En effet, le doublet excitonique est centré à 346nm, dont la composante positive à 329nm est de $\Delta\epsilon=385,803 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, et la composante négative à 356nm est de $\Delta\epsilon = -135,22 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. On note aussi trois bandes négatives ; à 369nm ($\Delta\epsilon=-181,106 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), à 393nm ($\Delta\epsilon=-132,07 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à 422nm ($\Delta\epsilon = -83,53 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption d'une solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate / acide acétique à pH 4,4 sont regroupés sur la figure N°18B. Les pics d'absorption sont de 0,86 et 0,88 pour des longueurs d'ondes de 419nm et 422nm respectivement. Ils sont plus faibles que le pic observé à une longueur d'onde autour de 344nm, qui est estimé à 1,34 ce qui suggère une faible présence de monomères solubles.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) nous laisse penser que l'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/ acide acétique à pH 4,4 est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles.

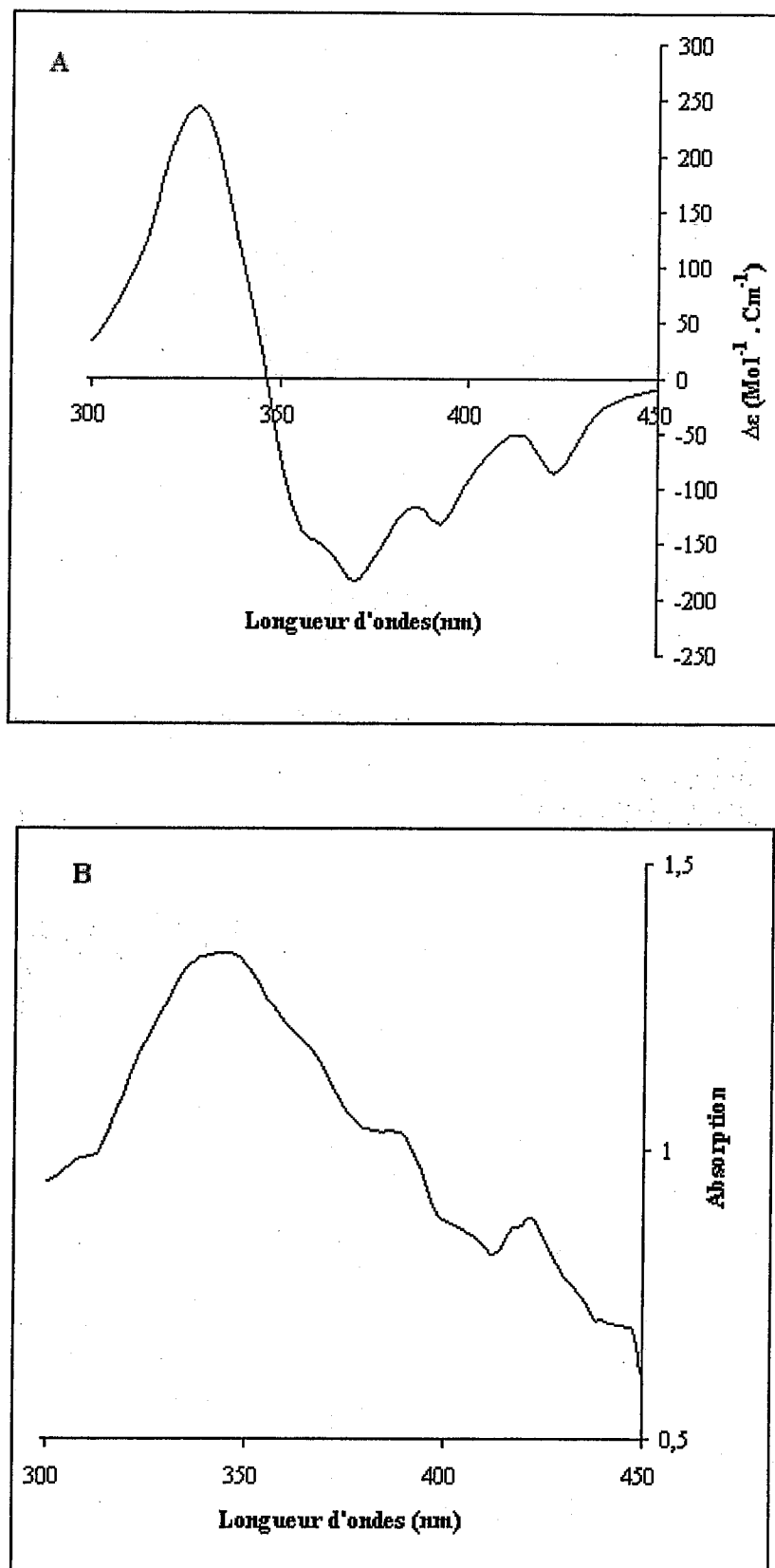


Figure N°18 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 4,4.

2.1.4 Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH5:

La figure N°19A représente le spectre de dichroïsme circulaire de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH5. Nous remarquons à une longueur d'onde $\lambda=328$ nm, un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon=157,778\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, qui serait dû à la présence des formes agrégées insolubles. En effet, le doublet excitonique est centré à 347nm, dont la composante positive à 328nm est de $\Delta\epsilon=157,778\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, et la composante négative à 357nm est de $\Delta\epsilon = -86,389\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. On note également trois bandes négatives ; à 370nm ($\Delta\epsilon = -120,67\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), à 390nm ($\Delta\epsilon = -93,44\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et à 422nm ($\Delta\epsilon = -62\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH5 sont regroupés sur la figure N°19B. Les pics d'absorption sont de 0,81 et 0,82 pour des longueurs d'ondes de 418nm et 421nm respectivement. Ils sont beaucoup plus faibles que le pic observé à une longueur d'onde autour de 342nm, qui est estimé à 1,16 ce qui est probablement dû à une faible proportion de monomères solubles.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) suggère que la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH5 est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles.

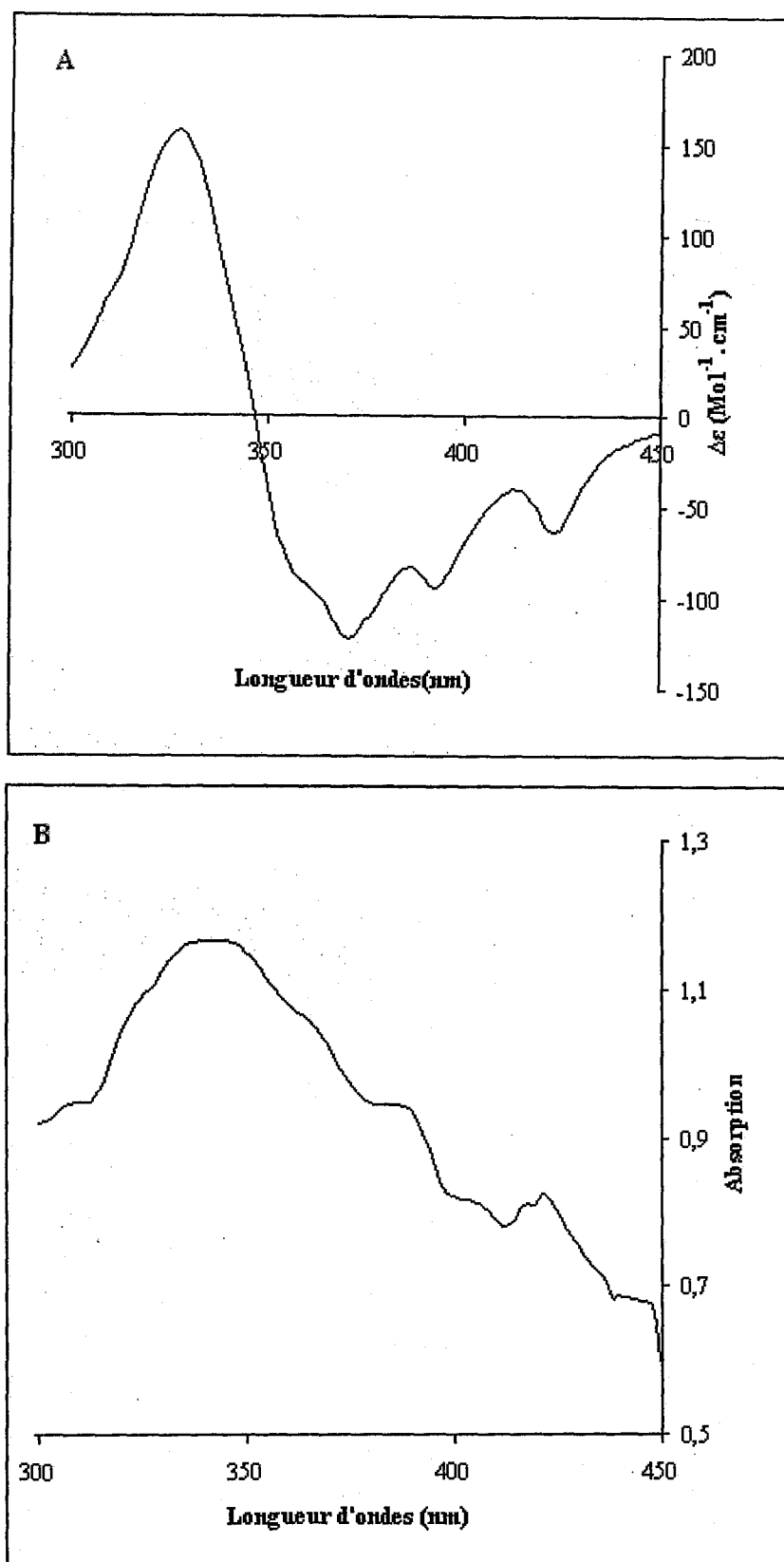


Figure N°19 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 5.

2.1.5. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,2 :

La figure N°20A représente le spectre de dichroïsme circulaire de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,2. On remarque qu'il existe un pic du coefficient d'extinction molaire de $\Delta\epsilon=118,853\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à une longueur d'onde de 328nm, qui serait éventuellement dû à la présence des formes agrégées insolubles. En effet, le doublet excitonique est centré à 345nm, dont la composante positive à 328nm est de $\Delta\epsilon=118,853\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et la composante négative à 357nm est de $\Delta\epsilon = -55,28\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. On observe aussi trois bandes négatives ; à 370nm ($\Delta\epsilon = -81,91\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), à 393nm ($\Delta\epsilon=-68,33\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et à 422nm ($\Delta\epsilon = -46,41\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,2 sont regroupés sur la figure N°20B. Les pics d'absorption sont de 0,80 et 0,82 aux longueurs d'ondes de 417nm et 422nm respectivement, qui sont plus faibles que celui observé à une longueur d'onde autour de 341nm, qui est estimé à 1,12. Ceci nous laisse supposer que les monomères solubles sont peu présents dans ces conditions expérimentales.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) suggère que la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,2 est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles.

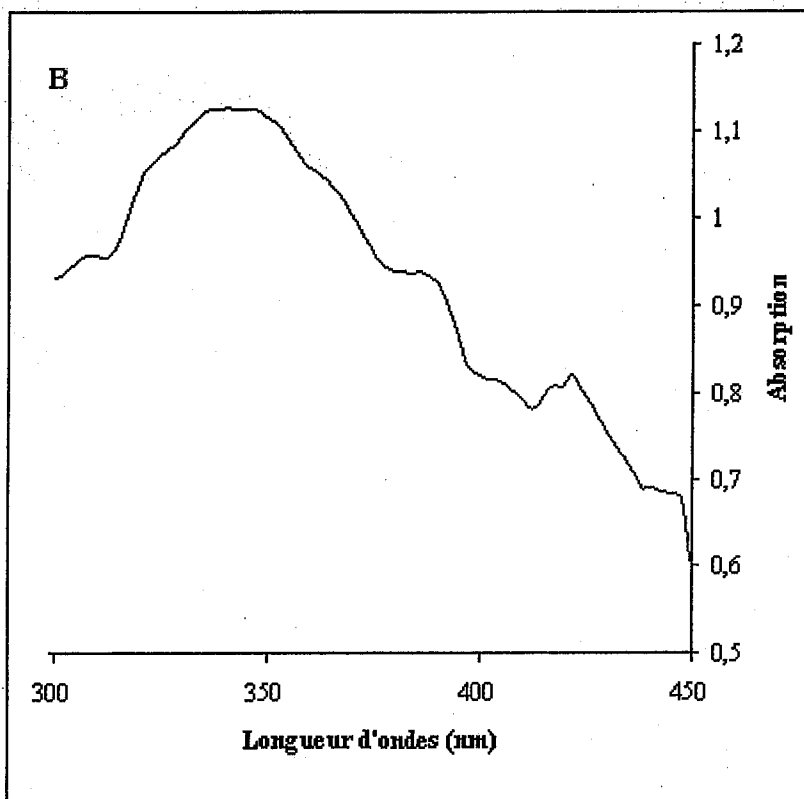
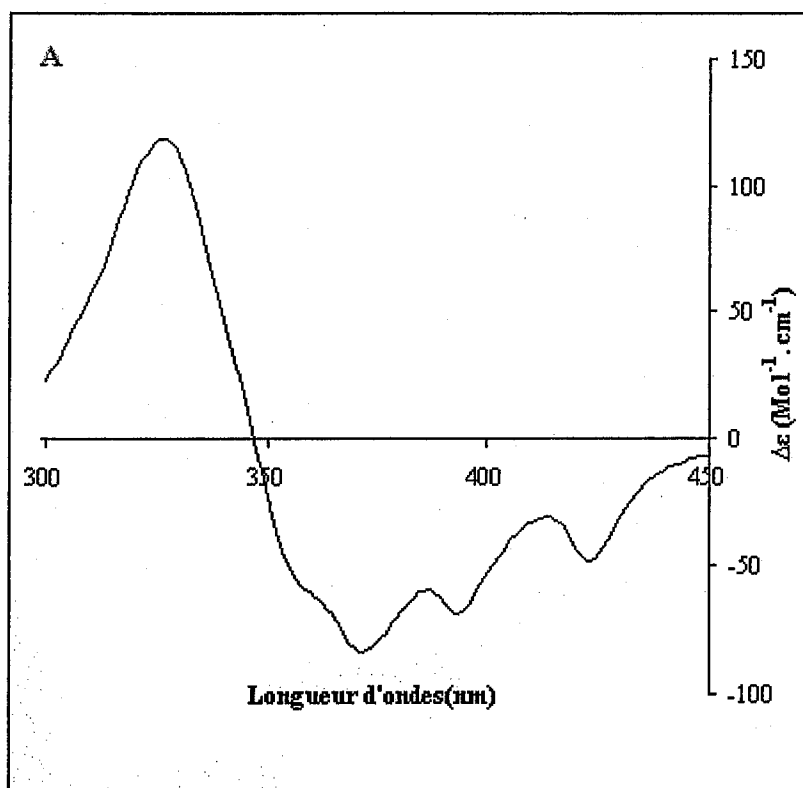


Figure N°20 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 5,2.

2.1.6. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique pH 5,4 :

La figure N°21A représente le spectre de dichroïsme circulaire de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH 5,4. On note à une longueur d'onde de 327nm un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 106,404\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, le doublet excitonique est centré à 347nm, dont la composante positive à 327nm est de $\Delta\epsilon = 106,404\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ et la composante négative à 357nm est de $\Delta\epsilon = -53,75\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, ce qui serait dû à la présence des formes agrégées insolubles. On observe également trois bandes négatives ; à 371nm ($\Delta\epsilon = -78,029\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), à 393nm ($\Delta\epsilon = -61,57\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et à 422nm ($\Delta\epsilon = -41,87\text{Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH 5,4 sont regroupés sur la figure N°21B. Les pics d'absorption sont de 0,77 et 0,78 aux longueurs d'ondes de 417nm et 422nm respectivement, et de 1,06 à une longueur d'onde de 340nm, ce qui suggère une faible proportion de monomères solubles.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) laisse supposer que la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique à pH 5,4 est sous forme d'un mélange de formes monomériques solubles et agrégées insolubles.

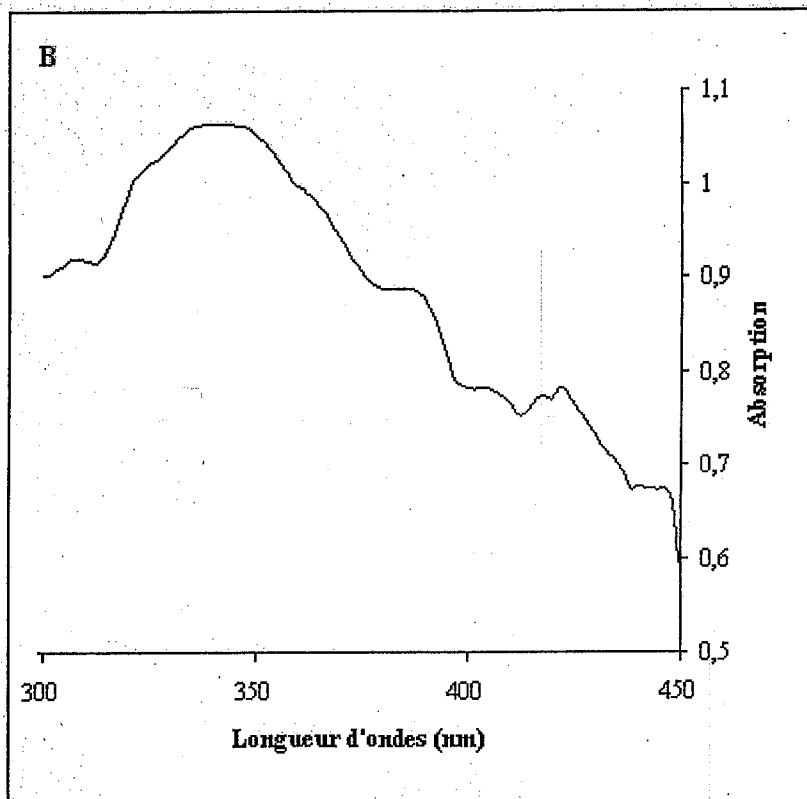
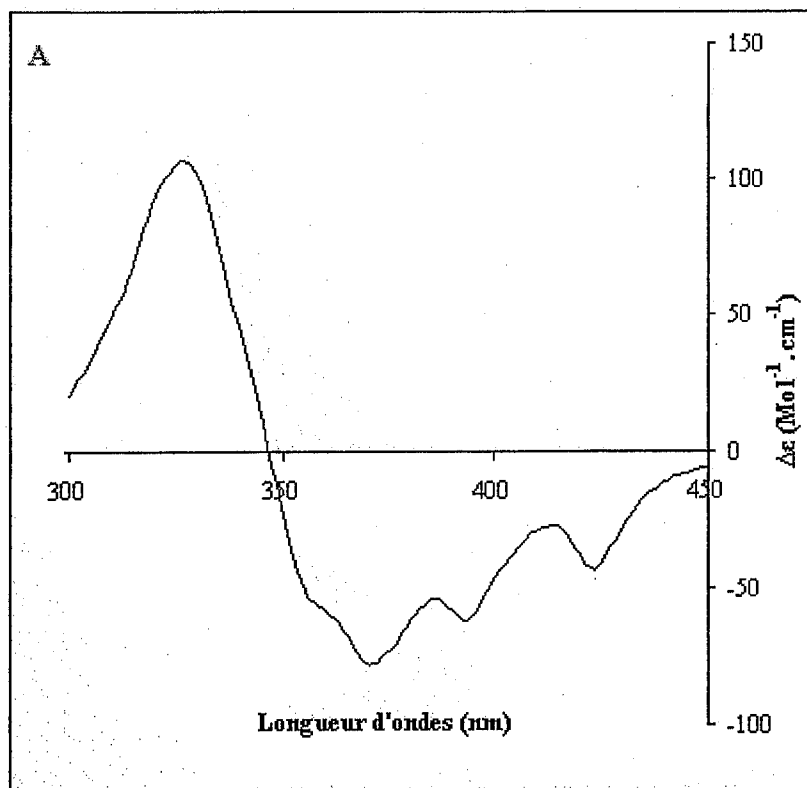


Figure N°21 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorbance (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4}M) à pH 5,4.

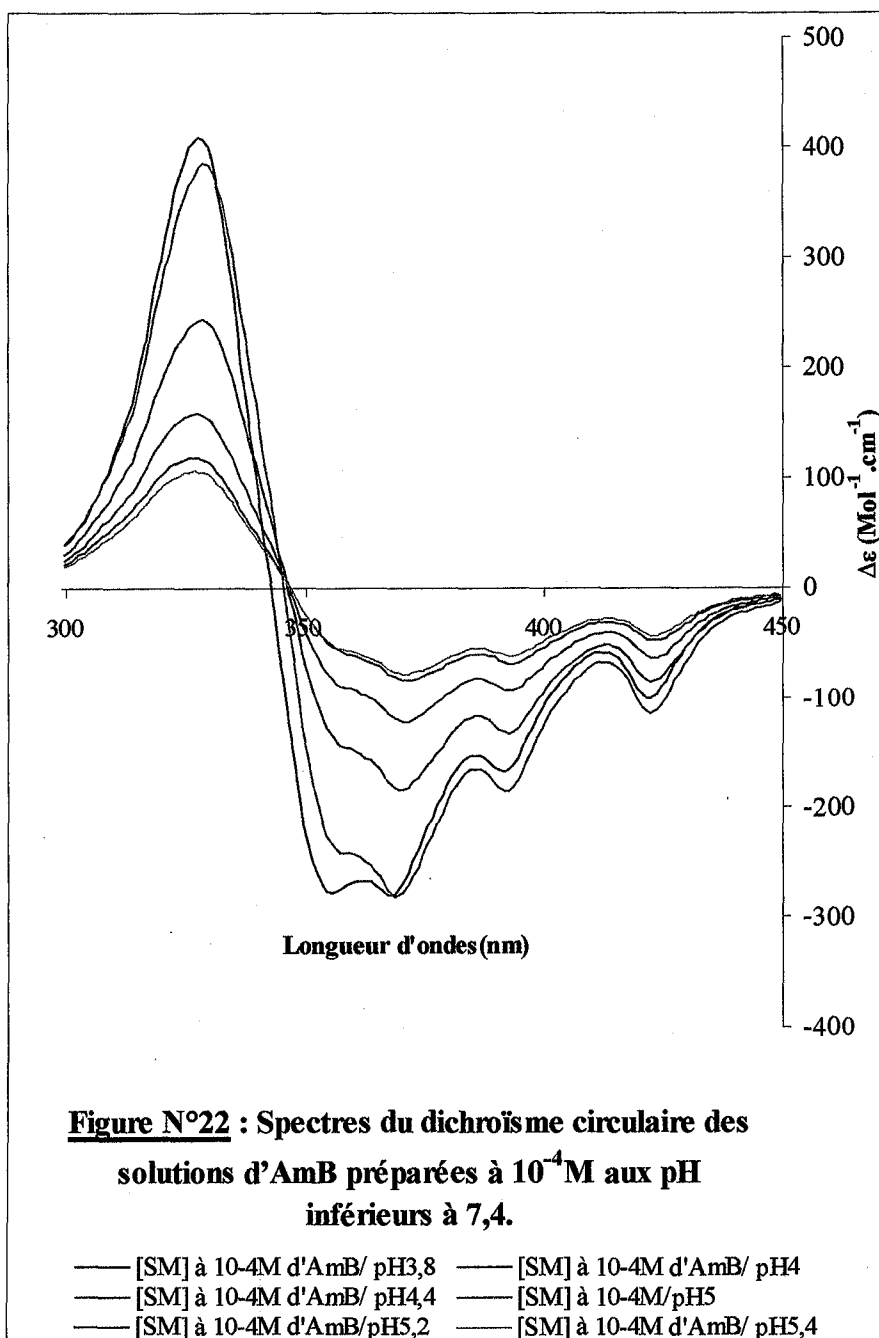
Les spectres du Dichroïsme Circulaire nous permettent d'apprécier la présence des formes agrégées (longueurs d'ondes autour de 339nm) et super agrégées (longueurs d'ondes autour de 322nm) de l'AmB. Les spectres d'absorption quant à eux, nous permettent de mieux apprécier les formes monomériques solubles (aux longueurs d'ondes autour de 409nm).

La figure N°22 regroupe les spectres obtenus du dichroïsme circulaire (DC) des solutions mères d'AmB solubilisées à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique aux pH inférieurs à 7,4.

Nous remarquons que les pics du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ sont obtenus aux longueurs d'ondes autour de 330nm, ce qui suppose que les solutions mères d'AmB solubilisées à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique aux pH inférieurs à 7,4 renferment des formes agrégées.

D'autre part, nous constatons que lorsque le pH de la solution mère augmente de pH3,8 à pH5,4, le coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ diminue, ce dernier passe de $409,372 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à $106,404 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. De plus, le taux de formes solubles d'AmB est d'autant plus faible lorsque l'intensité du signal du dichroïsme circulaire ($\Delta\epsilon$) diminue. Il semblerait alors que plus le pH de la solution mère d'AmB (solubilisée à 10^{-4} M) diminue (jusqu'à pH3,8) plus le taux d'agrégats augmente, ce qui suggère qu'à pH 5,4 il y a peu de formes agrégées.

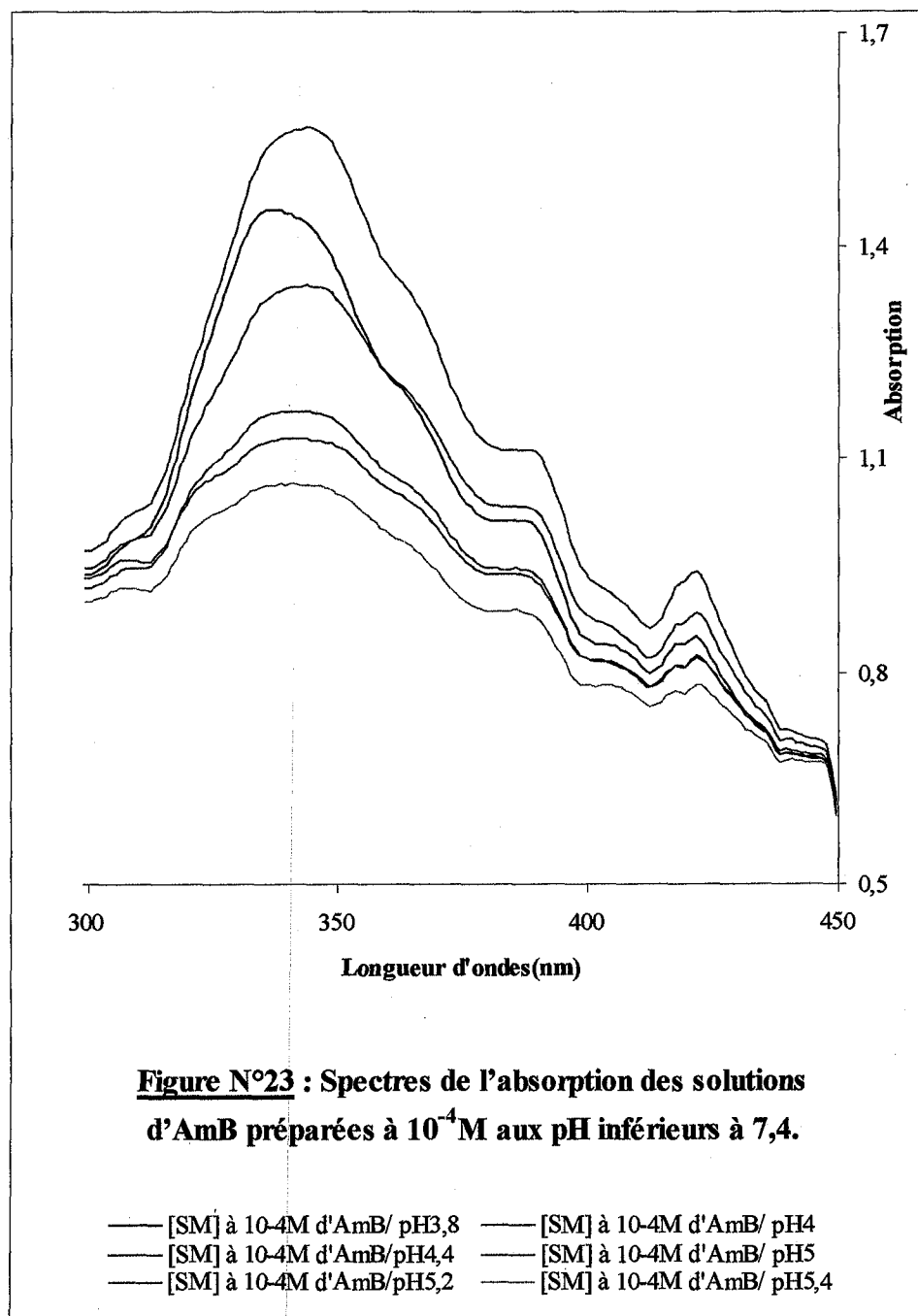
Par ailleurs, aucun pic de $\Delta\epsilon$ n'est observé aux longueurs d'ondes de 322nm, ce qui laisserait penser qu'il n'y a pas de formation de super agrégats aux pH des solutions mères allant de 3,8 à 5,4 ce qui devrait être confirmé par d'autres méthodes ou d'autres techniques de mesures telles que la diffusion de lumière ou la viscosité.



La figure N°23 représente les spectres d'absorbance des solutions mères d'AmB préparées à 10^{-4} M aux pH inférieurs à 7,4.

Nous remarquons qu'aux pH allant de 3,8 à 5,2, le signal de l'absorbance aux longueurs d'ondes autour de 417nm et 422nm est d'une part presque de même amplitude pour toutes ces conditions de pH, d'autre part il est assez faible (absorbance inférieur à 1). Ces spectres seraient en faveur d'une faible proportion de formes monomériques de la molécule d'AmB dans ces conditions de pH. De plus, le maximum d'absorbance est observé à des longueurs d'ondes autour de 340nm, ce qui confirmerait la présence des agrégats.

Par ailleurs, le spectre d'absorbance de la solution d'AmB préparée à pH5,4 semble avoir un aspect plus étalé pour des longueurs d'ondes allant de 420 à 300nm, ce qui semblerait être en faveur de formes intermédiaires d'AmB entre agrégats et monomères solubles dans ces conditions de pH.



2.2. Etat physique de l'AmB dans des conditions alcalines (pH $\geq 7,4$)

2.2.1. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du PBS pH 7,4 :

La figure N°24A représente le spectre de dichroïsme circulaire enregistré pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du PBS pH 7,4. On remarque qu'il existe un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 196,059 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à une longueur d'onde de 327nm. Le doublet excitonique est centré à 347nm, dont la composante positive à 327nm, et la composante négative à 357nm est de $\Delta\epsilon = -107,668 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, ce qui suggère la présence des formes agrégées insolubles. De plus, on observe trois bandes négatives ; à 369nm ($\Delta\epsilon = -136,55 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), à 392nm ($\Delta\epsilon = -96,83 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à 422nm ($\Delta\epsilon = -61,04 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du PBS pH 7,4 sont regroupés sur la figure N°24B. On observe des pics d'absorption de 0,68 et 0,70 pour des longueurs d'ondes de 417nm et 422nm respectivement. Un autre pic d'absorbance est observé à une longueur d'onde autour de 343nm estimé à 0,95.

L'ensemble des spectres enregistrés (par dichroïsme circulaire et par l'absorption moléculaire) nous laisse penser que la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du PBS pH 7,4 est un mélange de formes solubles et insolubles.

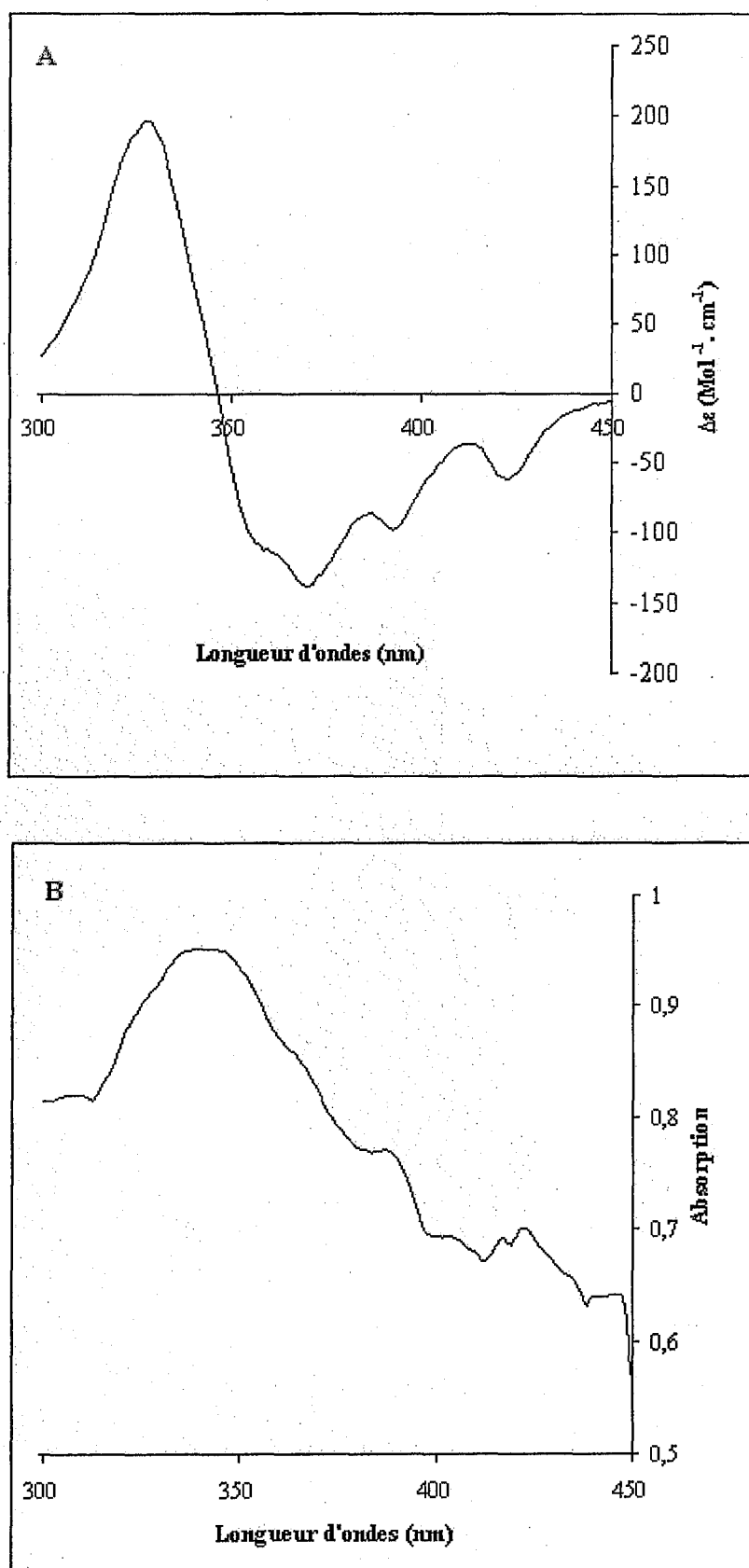


Figure N°24 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 7,4.

2.2.2. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH9,5 :

Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH9,5 sont regroupés sur la figure N°25A. On note à une longueur d'onde de 329nm un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 1138,14 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Le doublet excitonique est centré à 338nm, dont la composante positive à 329nm et la composante négative à 349nm est de $\Delta\epsilon = -662,69 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ce qui laisse penser qu'il y a des formes agrégées insolubles. On note un épaulement à 364nm et deux bandes négatives sont enregistrées, l'une à 391nm ($\Delta\epsilon = -185,157 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) l'autre à 421nm ($\Delta\epsilon = -98,34 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH9,5 sont regroupés sur la figure N°25B. Les pics d'absorption sont de 1,04 et 1,2 pour des longueurs d'ondes de 385nm et 408nm respectivement, ce qui serait dû à la présence de monomères solubles. D'un autre côté, un pic d'absorption, estimé à 1,94, est observé à une longueur d'onde autour de 335nm, ce qui pourrait être lié à la présence de formes agrégées insolubles. Il semblerait que dans ces conditions de pH 9,5 l'AmB est un mélange de formes solubles et de formes insolubles.

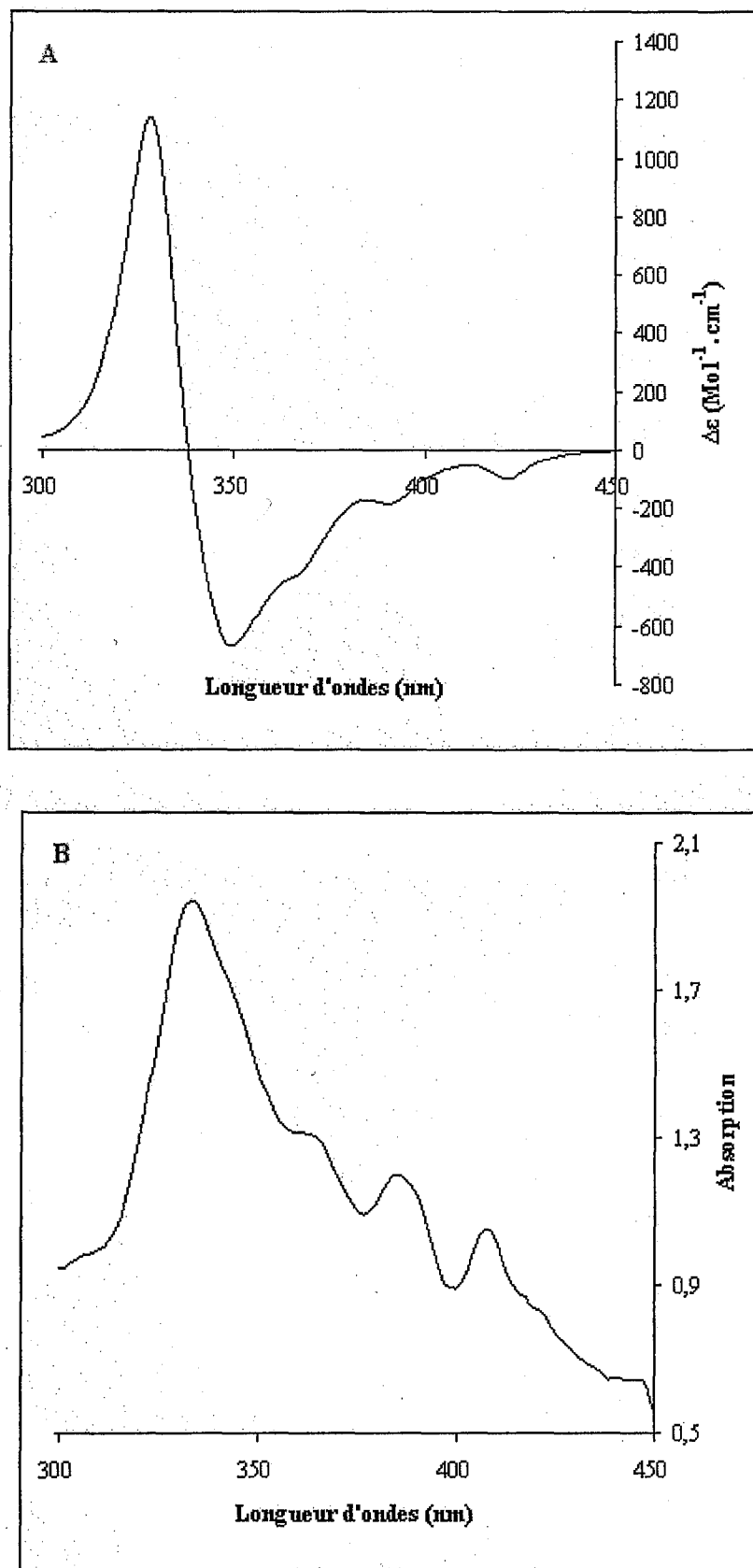


Figure N°25 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 9,5.

2.2.3. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10 :

La figure N°26A représente le spectre de dichroïsme circulaire enregistré pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10. On remarque un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\varepsilon = 1295,14 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à une longueur d'onde de 332nm avec un doublet excitonique centré à 344nm, dont la composante positive à 332nm et la composante négative à 354nm est de $\Delta\varepsilon = -752,87 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ceci suggère qu'il y a des formes agrégées insolubles.

On observe aussi un épaulement à 365nm et deux bandes négatives l'une à 391nm ($\Delta\varepsilon = -318,11 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) l'autre à 422nm ($\Delta\varepsilon = -171,56 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10 sont regroupés sur la figure N°26B. Les pics d'absorption sont de 1,59 et 1,30 pour des longueurs d'ondes de 386nm et 409nm, ce qui laisse penser qu'il y a des monomères solubles. Un autre pic d'absorption estimé à 2,50 est observé à une longueur d'onde autour de 337nm, ce qui suggère qu'il y a des formes agrégées insolubles. Il semblerait alors que l'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH 10 est un mélange de formes solubles et insolubles.

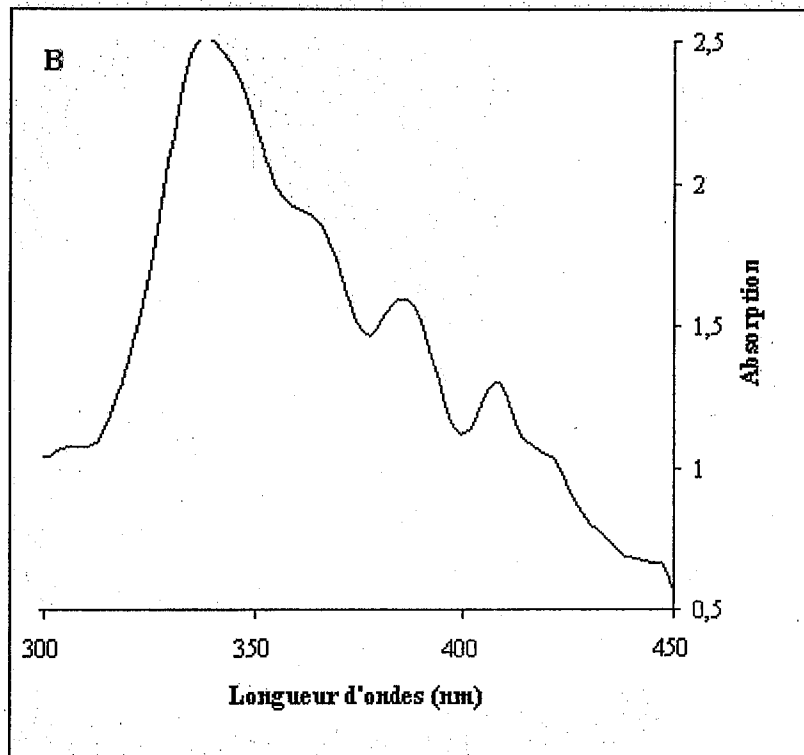
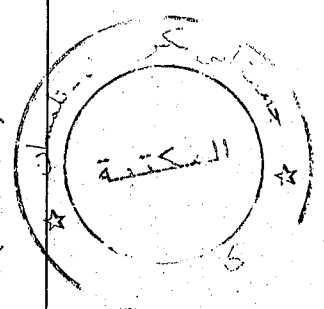
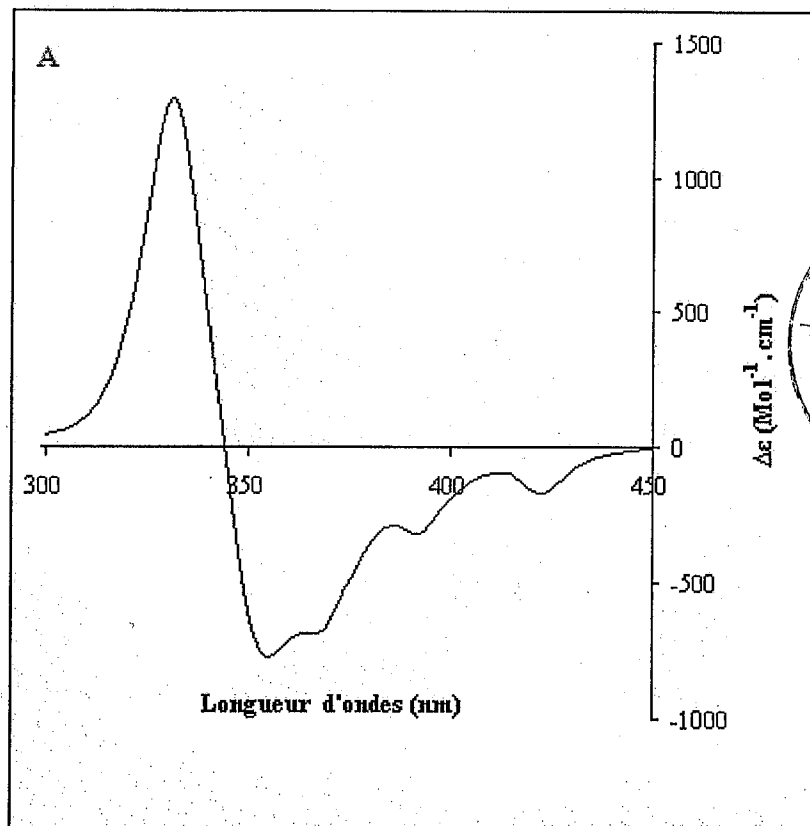


Figure N°26 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 10.

2.2.4. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,5 :

Les spectres de dichroïsme circulaire enregistrés pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,5 sont regroupés sur la figure N°27A. On note à une longueur d'onde de 336nm un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 390,118 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ avec un doublet excitonique centré à 350nm dont la composante positive à 336nm et la composante négative à 358nm est de $\Delta\epsilon = -662,69 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ce spectre est beaucoup plus faible que celui observé pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH 10. Ce résultat nous laisse supposer qu'à pH 10,5 il y a dissociation des agrégats que nous avons observé à pH10, ce qui donnerait des formes oligomériques solubles.

De plus, trois bandes négatives sont enregistrées à 369nm ($\Delta\epsilon = -209,34 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), à 393nm ($\Delta\epsilon = -143,72 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à 423nm ($\Delta\epsilon = -82,23 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,5 sont regroupés sur la figure N°27B. Les pics d'absorption sont de 1,54 et 1,30 pour des longueurs d'ondes de 385nm et 408nm respectivement, qui seraient dû à la présence de monomères solubles. Un autre pic d'absorption estimé à 1,80 est observé à des longueurs d'ondes allant de 345nm à 365nm. Cet aspect du spectre d'absorption est un argument supplémentaire en faveur d'une dissociation des agrégats (observés à pH 10) à pH 10,5.

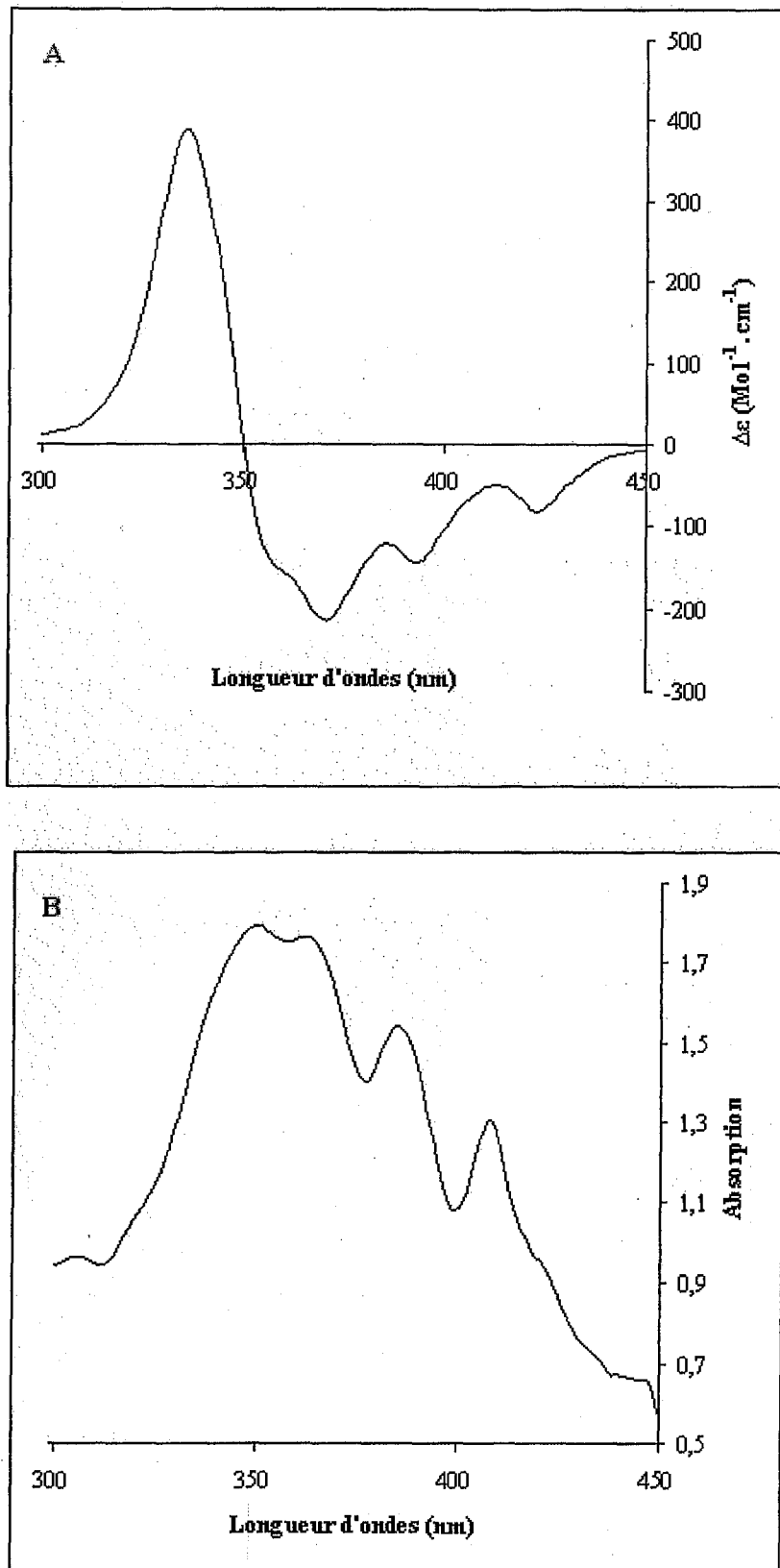


Figure N°27 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH10,5

2.2.5. Etat de la molécule d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,8 :

La figure N°28A représente le spectre de dichroïsme circulaire enregistré pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,8. On remarque un pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon = 297,708 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à une longueur d'onde de 337nm. Le doublet excitonique est centré à 369nm, dont la composante positive à 337nm et la composante négative à 377nm est de $\Delta\epsilon = -27,368 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ce spectre est beaucoup plus faible que celui observé à pH 10 ce qui serait dû à une dissociation des agrégats observés à pH10. Cette dissociation semble être plus importante que celle observée à pH 10,5 puisque le pic de $\Delta\epsilon$ à ce dernier pH est plus important que celui observé à pH 10,8.

On observe également deux bandes négatives à 396nm ($\Delta\epsilon = -40,79 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et à 425nm ($\Delta\epsilon = -26,90 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Les spectres d'absorption pour une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate pH10,8 sont regroupés sur la figure N°28B. On observe des pics d'absorption de 1,62 et 1,38 pour des longueurs d'ondes de 385nm et 408nm respectivement, qui suggèrent la présence de monomères solubles. Un autre pic d'absorption, estimé à 1,75, est observé à des longueurs d'ondes allant de 350nm à 365nm. Cet aspect du spectre d'absorbance est un argument supplémentaire en faveur de la dissociation des agrégats observés à pH 10.

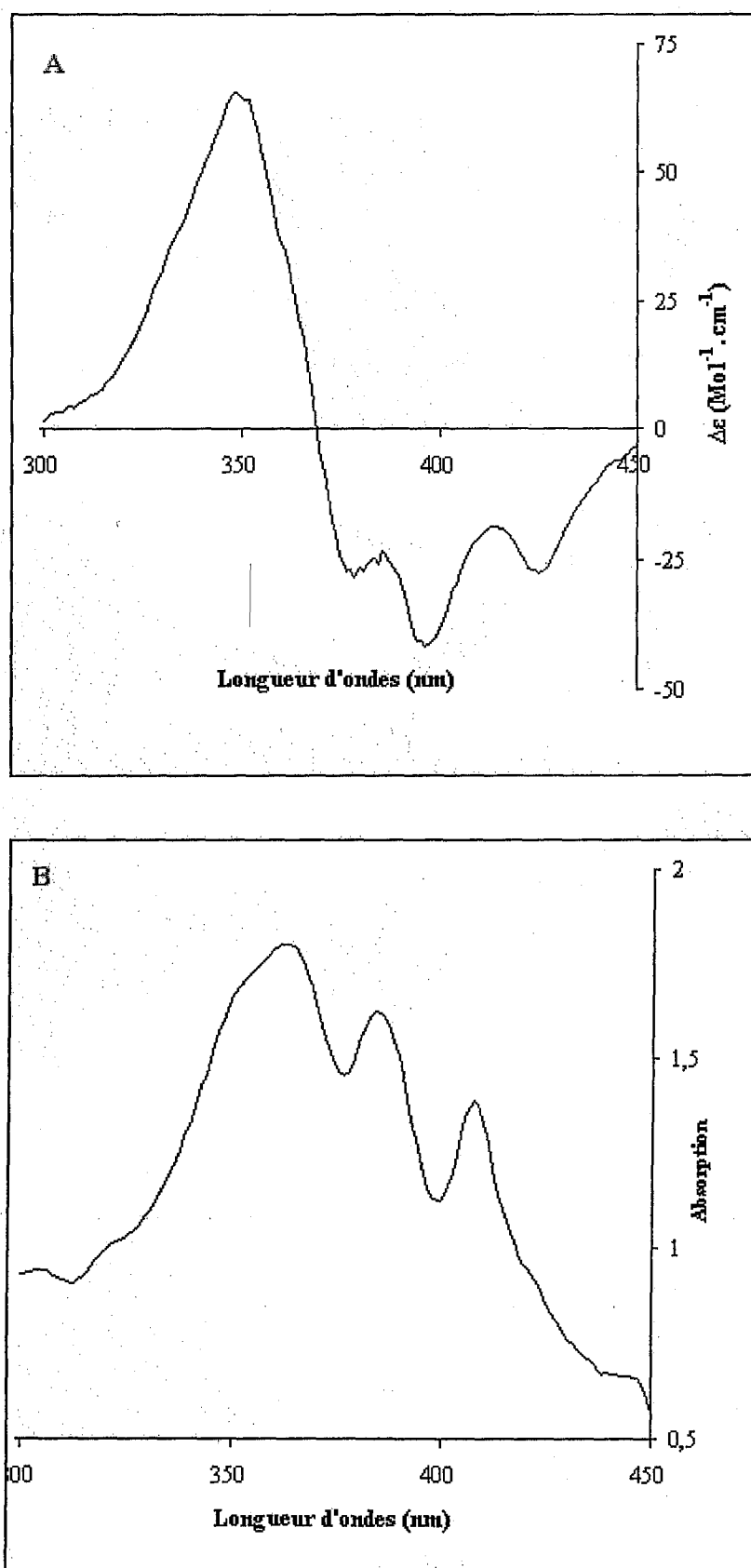


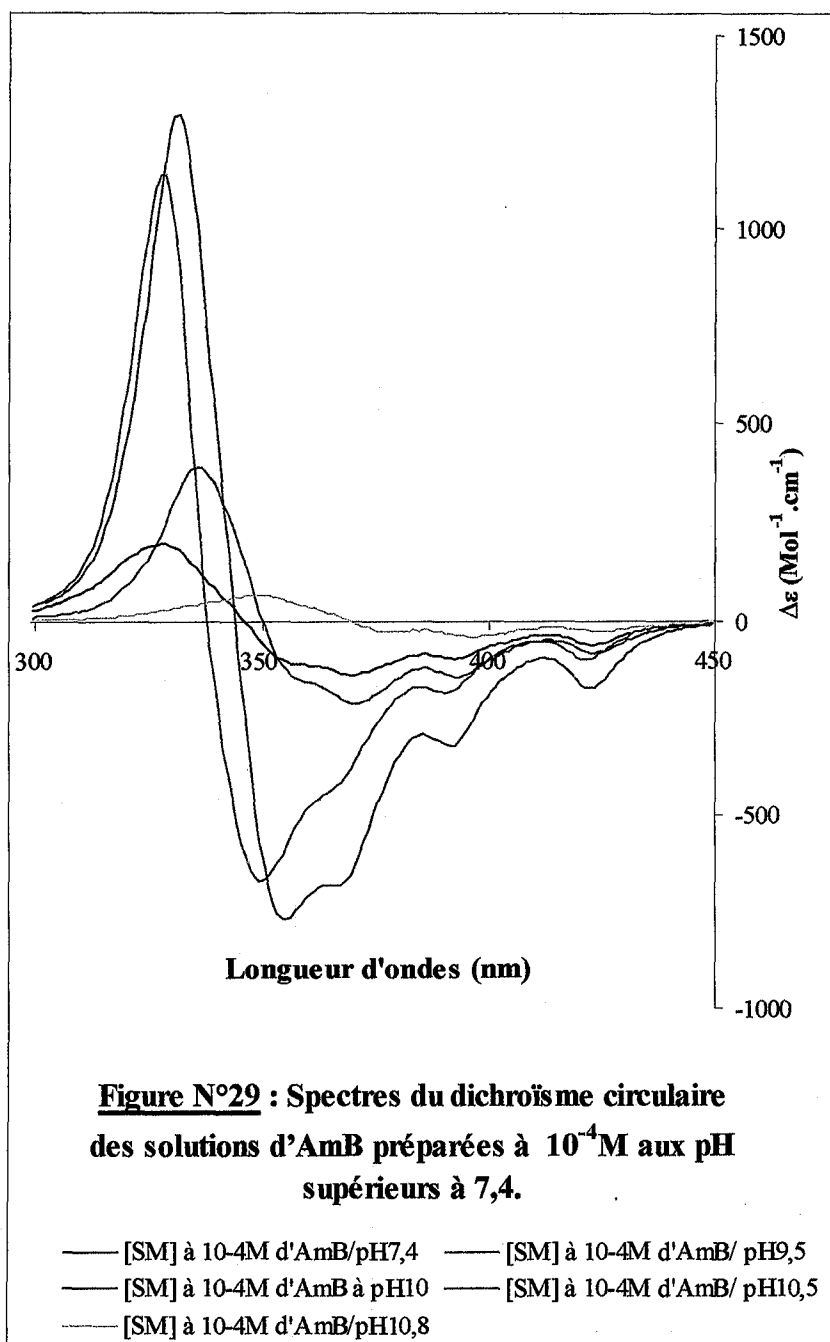
Figure N°28 : Spectres du Dichroïsme Circulaire (A) et d'absorption (B) des solutions mères d'AmB (10^{-4} M) à pH 10,8.

La figure N°29 regroupe les spectres obtenus du dichroïsme circulaire (DC) des solutions mères d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate aux pH supérieurs à 7,4.

Aucun pic de coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ n'est observé aux longueurs d'ondes de 322nm ce qui nous laisse supposer qu'il n'y a pas de formation de super agrégats dans les solutions d'AmB préparées entre pH7,4 et 10,8.

Les pics du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ sont obtenus pour des longueurs d'ondes entre 330nm et 337nm. Nous remarquons que lorsque le pH de la solution mère augmente – de 7,4 à 10– l'amplitude de $\Delta\epsilon$ s'élève de $196,059\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $1295,14\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, il semblerait alors que l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles dans ces conditions de pH. De plus, l'intensité du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ est très importante à pH 9,5 ($1138,14\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et pH 10 ($1295,14\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ce qui suggère que la proportion des formes agrégées est importante dans ces conditions.

D'un autre côté, ce coefficient d'extinction molaire chute brutalement au-delà de pH 10. En effet, il passe de $1295,14\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à pH 10, à $390,118\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à pH 10,5 et $297,708$ à pH 10,8. Il semblerait que les agrégats observés à pH10 se sont dissociés à pH 10,5 et 10,8.



La figure N°30 représente les spectres d'absorbance des solutions mères d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate aux pH supérieurs à pH7,4.

Nous remarquons qu'aux pH 9,5 et à pH 10, les spectres d'absorbances sont de même aspect mais d'amplitude différente. En effet, des pics d'absorbance sont observés à des longueurs d'onde de 385nm et 408nm ce qui suggère la présence de formes monomériques solubles. Mais un autre pic maximal (supérieur aux précédents) est observé à une longueur d'onde autour de 337nm aussi bien à pH 9,5 qu'à pH 10 qui serait probablement dû à la présence d'agrégats insolubles.

Par ailleurs, à pH 10,5 et 10,8 nous remarquons d'une part que l'aspect du spectre s'affaïsse et que des pics d'absorbance sont observés pour des longueurs d'ondes de 408nm, d'autre part que le spectre s'étale entre 350nm et 365nm, ce qui est un argument en faveur de la dissociation des agrégats obtenus au-delà de pH 10 (spectre du DC figure N°27 et 28). Il semblerait qu'à pH 10,5 et 10,8 la solution d'AmB est un mélange entre formes monomériques et oligomériques solubles.

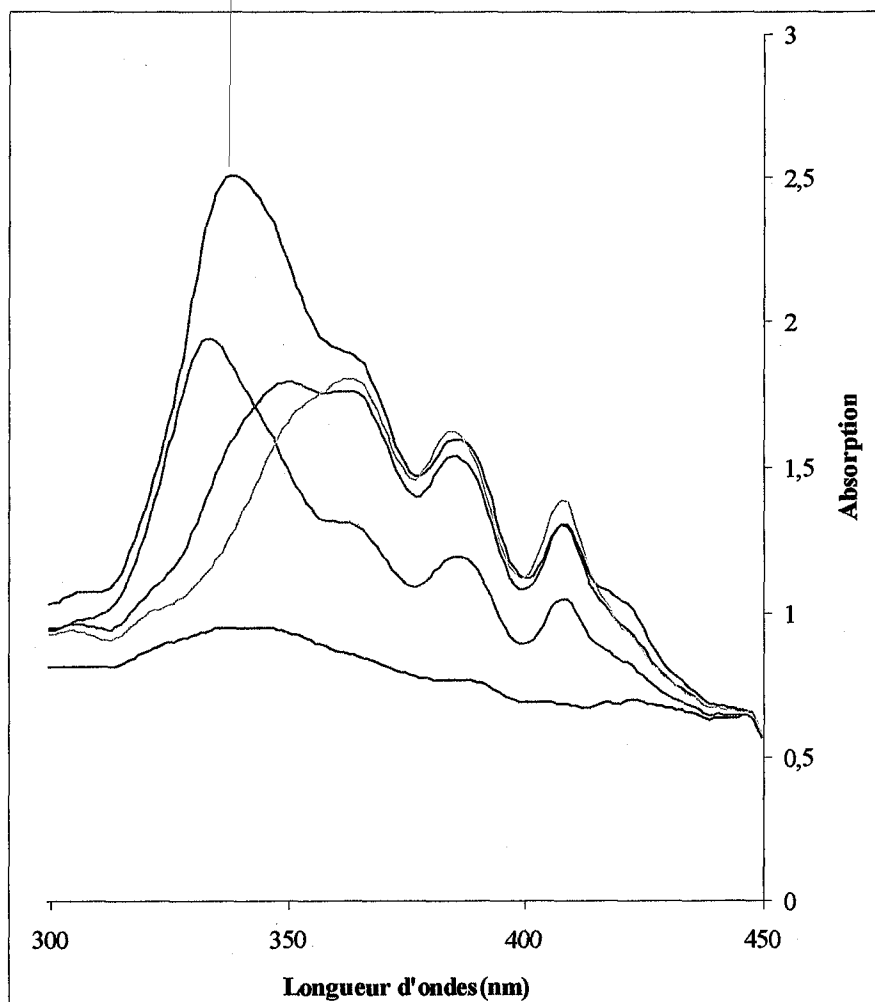


Figure N°30 : Spectres de l'absorption des solutions d'AmB préparées à 10^{-4} M aux pH supérieurs à 7,4.

- [SM] à 10^{-4} M d'AmB/ pH7,4 — [SM] à 10^{-4} M d'AmB/ pH9,5
- [SM] à 10^{-4} M d'AmB/ pH10 — [SM] à 10^{-4} M d'AmB/ pH10,5
- [SM] à 10^{-4} M d'AmB/pH10,8

2.2. Etude des pics de dichroïsme circulaire en fonction du pH de la solution mère d'AmB :

D'après les résultats obtenus jusqu'à ce niveau de l'étude, nous constatons que chaque solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M aux différents pH présente des spectres différents du dichroïsme circulaire et de l'absorbance. Cette différence est observée essentiellement sur les spectres du dichroïsme circulaire. Il semblerait que l'aspect du spectre est fonction du pH de la solution. C'est pourquoi, afin d'apprécier l'effet pH, nous avons regroupé les différents pics du dichroïsme circulaire obtenus (aux longueurs d'ondes autour de 328nm pour les $\text{pH} \leq 7,4$ et de 329 et 337nm pour les $\text{pH} > 7,4$) en fonction du pH de la solution mère d'AmB solubilisée à 10^{-4} M sur la figure N°31.

Nous remarquons que pour une longueur d'onde $\lambda=328\text{nm}$, lorsque le pH de la solution mère augmente – de pH 3,8 à pH 5,4 – l'intensité du doublet excitonique $\Delta\epsilon$ diminue de $409,372 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à $106,404 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Or plus l'intensité du $\Delta\epsilon$ diminue, plus la proportion des formes en présence diminue [(Legrand P. et coll., 1992), (Gaboriau F. et coll., 1997b)], ce qui suggère qu'à pH 5,4 il y a moins d'agrégats insolubles qu'à pH 3,8. Alors qu'à partir de pH 7,4, lorsque le pH de la solution d'AmB augmente jusqu'à pH 10, le $\Delta\epsilon$ augmente (pour des longueurs d'ondes autour de 330nm) de $196,83 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à $1295,14 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le plus important signal enregistré est à pH 10, ce qui serait dû à une proportion plus importante en agrégats. Au-delà de pH 10 (pH 10,5 et 10,8) ce $\Delta\epsilon$ chute brutalement ce qui suggère une diminution des formes agrégées dans la solution.

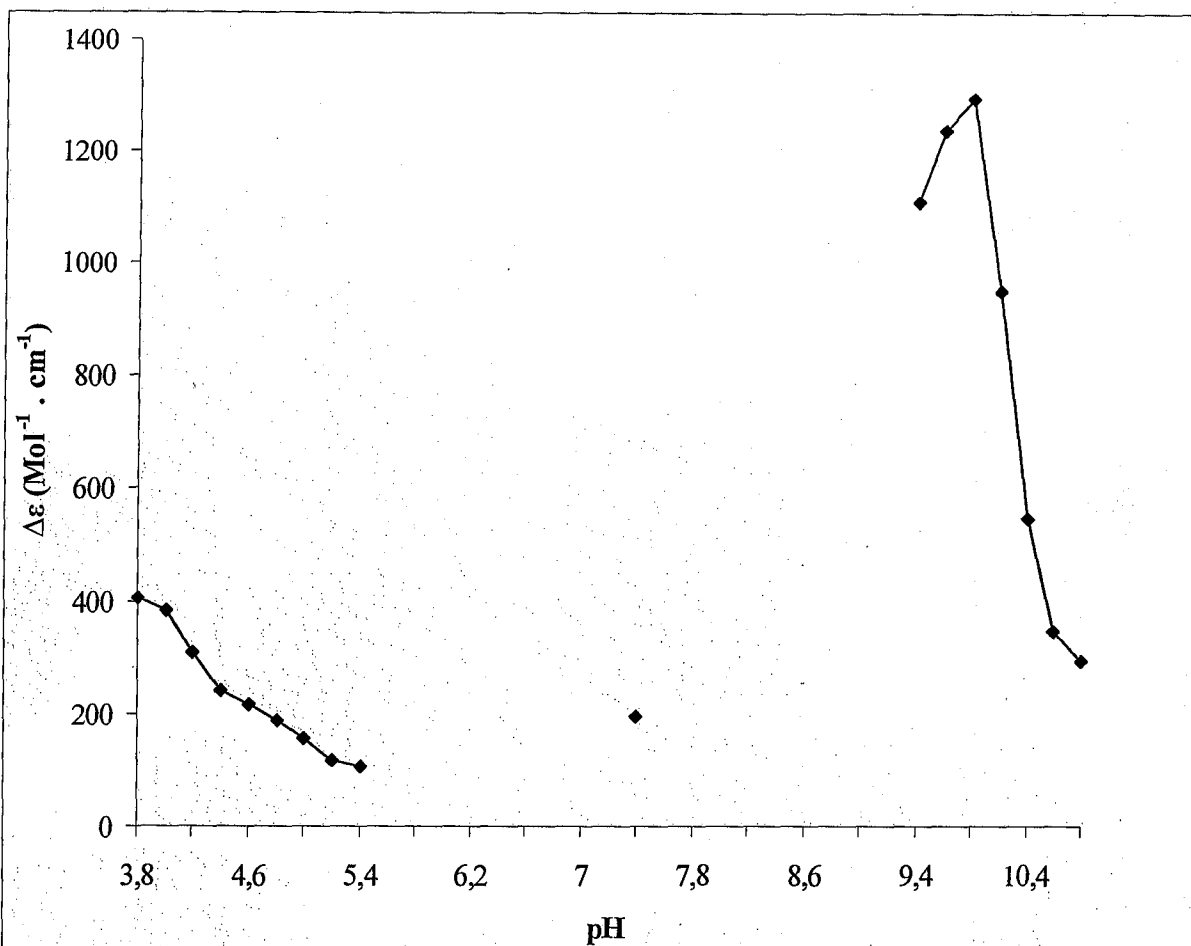


Figure N°31: Effet du pH de la solution mère d'AmB sur les spectres du Dichroïsme Circulaire (pic maximum obtenu à une longueur d'onde autour de 328nm pour les $\text{pH} \leq 7,4$ et entre 329 et 337nm pour les $\text{pH} > 7,4$).

2.4. Détermination des proportions des différentes formes de l'amphotéricine B

D'après les spectres enregistrés du dichroïsme circulaire et de l'absorbance des différentes solutions d'AmB solubilisées à 10^{-4} M dans les différents tampons aux différents pH, il semblerait que l'AmB est soit essentiellement sous formes monomériques et oligomériques solubles, ou bien sous formes d'agrégats insolubles, c'est pourquoi nous avons voulu déterminer les différentes proportions de ces trois formes de l'AmB.

Après avoir incubé les solutions mères d'AmB (solubilisées à 10^{-4} M dans les différents tampons aux différents pH) 5 minutes à 37°C , nous les avons divisé en deux parties, l'une incubée à nouveau 10 minutes à 37°C et diluée 100 fois dans du méthanol (l'échantillon a) qui nous donne la concentration totale en AmB. L'autre est centrifugée à 12 000g pendant 10 minutes, et on a récupéré le surnageant (échantillon b) sur lequel on détermine les formes monomériques d'une part, d'autre part après l'avoir dilué 100 fois dans le méthanol on détermine les formes solubles oligomériques et monomériques.

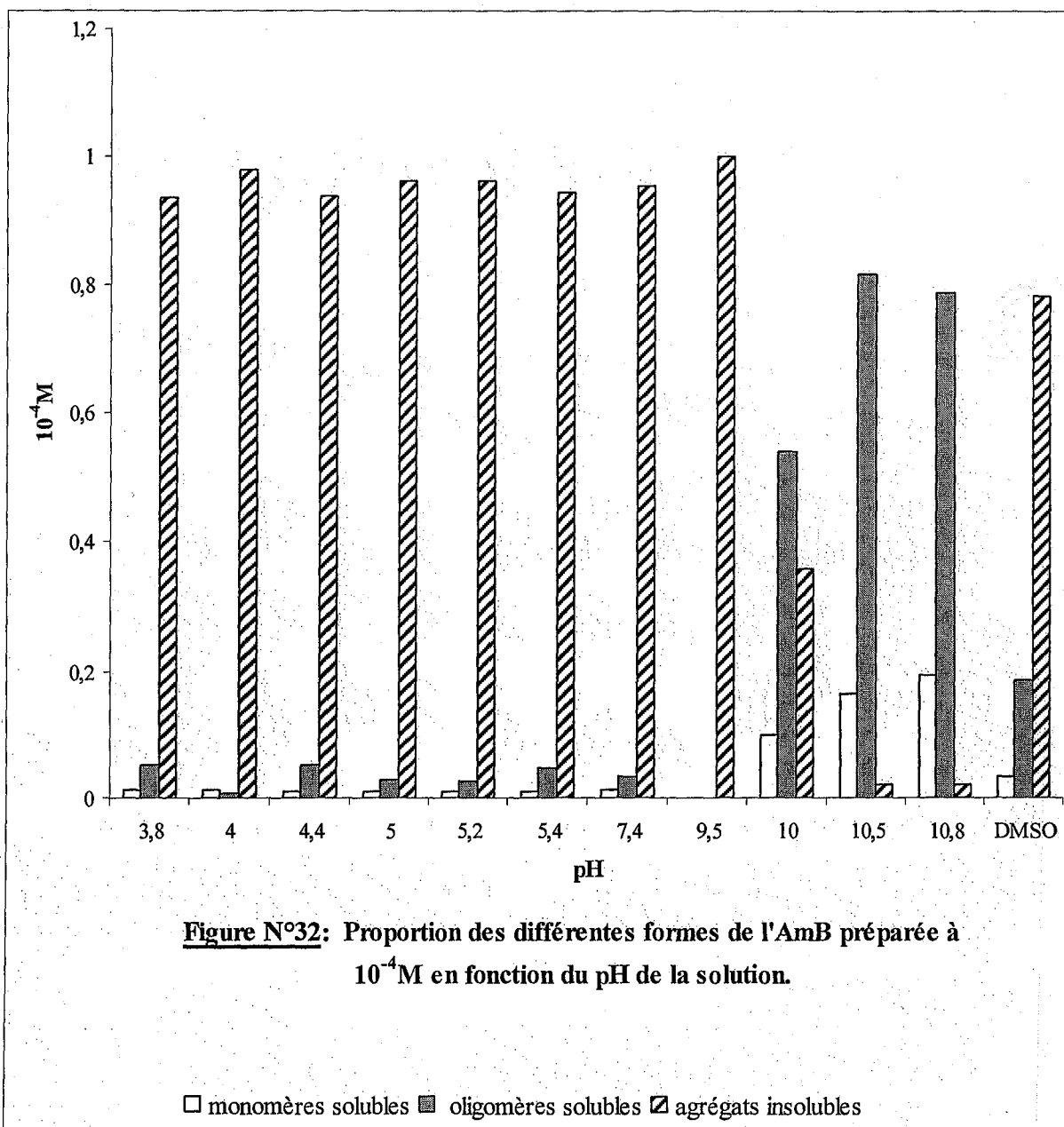
Quel que soit le pH de la solution mère d'AmB et quel que soit la nature du tampon utilisé, la densité optique de l'échantillon « a » (qui nous donne la concentration totale en AmB) est identique ce qui confirme que dans toutes ces solutions la concentration totale en AmB est la même 10^{-4} M.

La figure N°32 représente la proportion des différentes formes de l'AmB préparée à 10^{-4} M, en fonction du pH de la solution mère.

- L'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du DMSO est répartie en $0,78 \times 10^{-4}$ M d'agrégats insolubles, $0,18 \times 10^{-4}$ M d'oligomères solubles et $0,035 \times 10^{-4}$ M de monomères solubles.
- A pH 3,8 la concentration des formes agrégées est de $0,93 \times 10^{-4}$ M, celle des formes monomériques est de $0,012 \times 10^{-4}$ M et celle des formes solubles oligomériques est de $0,052 \times 10^{-4}$ M. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 94%).
- A pH 4 la concentration des formes agrégées est de $0,98 \times 10^{-4}$ M, celle des formes monomériques est de $0,013 \times 10^{-4}$ M et celle des formes solubles oligomériques est de $0,007 \times 10^{-4}$ M. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 98%).
- A pH 4,4 la concentration des formes agrégées est de $0,93 \times 10^{-4}$ M, celle des formes monomériques est de $0,010 \times 10^{-4}$ M, et celle des formes solubles oligomériques est

de $0,052 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 94%).

- A pH 5 la concentration des formes agrégées est de $0,96 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,011 \times 10^{-4} \text{M}$, et celle des formes solubles oligomériques est de $0,028 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 96%).
- A pH 5,2 la concentration des formes agrégées est de $0,96 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,011 \times 10^{-4} \text{M}$, et celle des formes solubles oligomériques est de $0,027 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 96%).
- A pH 5,4 la concentration des formes agrégées est de $0,94 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,011 \times 10^{-4} \text{M}$, et celle des formes solubles oligomériques est de $0,046 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 94%).
- A pH 7,4, la concentration des formes agrégées est de $0,95 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,013 \times 10^{-4} \text{M}$, et celle des formes solubles oligomériques est de $0,033 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (à 94%).
- A pH 9,5 la concentration des formes agrégées est de 10^{-4}M . Dans ces conditions expérimentales, l'AmB est totalement sous formes d'agrégats insolubles (100%).
- A pH 10, la concentration des formes agrégées est de $0,36 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,10 \times 10^{-4} \text{M}$ et celle des formes solubles oligomériques est de $0,54 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales, l'AmB semble être sous forme d'agrégats solubles et insolubles.
- A pH 10,5 la concentration des formes agrégées est de $0,02 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,16 \times 10^{-4} \text{M}$ et celle des formes solubles oligomériques est de $0,82 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales, l'AmB est totalement sous formes solubles oligomériques et monomérique.
- A pH 10,8 la concentration des formes agrégées est de $0,02 \times 10^{-4} \text{M}$, celle des formes monomériques est de $0,19 \times 10^{-4} \text{M}$ et celle des formes solubles oligomériques est de $0,78 \times 10^{-4} \text{M}$. Dans ces conditions expérimentales, l'AmB est totalement sous formes solubles oligomériques et monomériques.



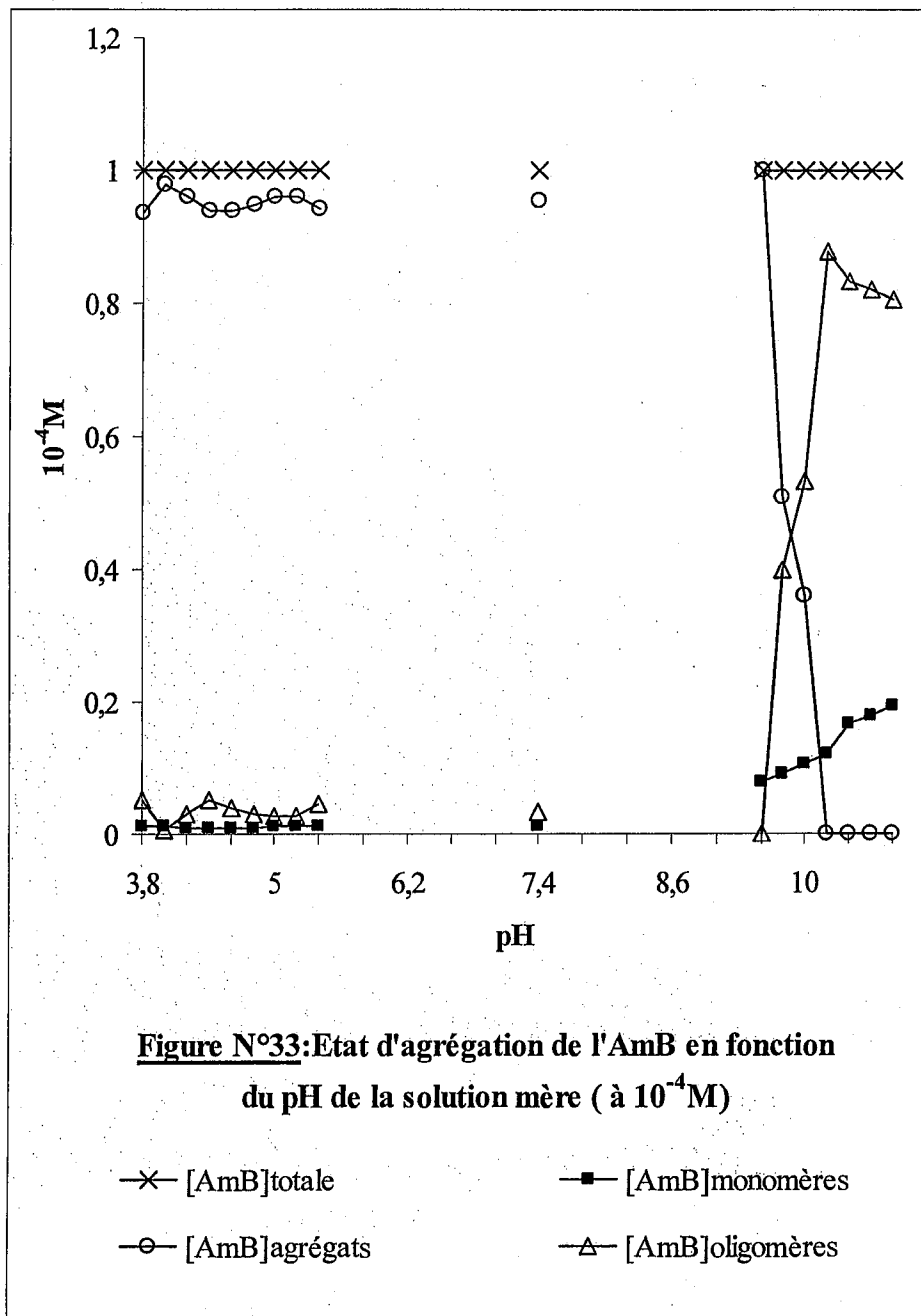
D'après les résultats obtenus, il apparaît que pour les solutions mères d'AmB préparées à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique aux pH allant de 3,8 à 5,4, l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats insolubles (entre 95 et 98 %). Ces résultats sont en accord avec les spectres du dichroïsme circulaire qui montrent des pics du coefficient d'extinction molaire à des longueurs d'ondes autour de 330nm (correspondants aux agrégats). Il en est de même pour les solutions mères préparées à pH 7,4 (10^{-4} M dans du tampon PBS).

Pour les solutions mères d'AmB préparées à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate à pH 9,5 l'AmB est totalement sous forme d'agrégats insolubles, ce qui explique l'importance de l'intensité du coefficient d'extinction molaire du dichroïsme circulaire observé dans ces conditions de travail (figure N°25). À pH 10, l'AmB est essentiellement sous forme d'agrégats solubles et insolubles, ce qui explique le déplacement du pic du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ vers une autre plage de longueurs d'ondes. En effet, il passe d'une longueur d'onde $\lambda=329$ nm à pH9,5 vers $\lambda=332$ nm à pH 10 (figure N°29). Quant aux solutions préparées aux pH 10,5 et 10,8 l'AmB est essentiellement sous forme d'oligomères solubles, ce qui est un argument supplémentaire en faveur de la dissociation des agrégats au-delà de pH 10 comme nous le suggère les spectres du dichroïsme circulaire (figure N°29).

De plus nous remarquons que l'AmB solubilisée dans du DMSO est sous forme d'agrégats solubles et insolubles, ce qui est en accord avec les résultats de Legrand P. et coll. (1992).

D'un autre côté, il ressort d'après la figure N°33 que pour des pH de la solution mère de pH3,8 à 9,5, la proportion des agrégats insolubles est maximale (autour de 95% de l'AmB totale) alors que la proportion des monomères et des oligomères solubles est négligeable. En revanche, à partir de pH 10 il n'y a plus d'agrégats insolubles qui sont formés, l'AmB est essentiellement sous forme d'oligomères solubles (agrégats solubles). De plus, la proportion des monomères solubles dans ces conditions expérimentales augmente, elle passe de 10% pour pH10 à 20% pour un pH10,8.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Gagos M. et coll. (2008) qui montrent qu'aux pH allant de 3 à 10 l'AmB est sous forme d'agrégats insolubles, alors qu'aux pH supérieurs à 10 l'AmB est sous forme de monomères solubles.



DISCUSSION

Les résultats que nous avons obtenus montrent que la variation du pH de la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4} M, module l'état d'agrégation de la molécule. En effet, pour des pH fortement acides (de 3,8 à 5,4) ou fortement alcalins (de 9,5 à 10,8), l'AmB est soit essentiellement sous forme d'agrégats insolubles ou sous forme de monomères solubles, ou bien alors un mélange entre les deux formes ; monomères solubles et agrégats solubles. Les pics d'absorbance ou d'extinction molaire ne sont observés qu'aux longueurs d'ondes autour de 328nm. Par contre, nous n'avons pas noté la présence de supers agrégats. De plus, il apparaît que dans des conditions de pH basiques (pH9,5) l'intensité du coefficient d'extinction molaire est beaucoup plus important qu'aux pH fortement acides (pH3,8 à 5,4). En effet, $\Delta\epsilon$ est de $1138,14 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à pH9,5 alors qu'il n'est que de $409,372 \text{ Mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à pH3,8.

Quant aux solutions mères d'AmB préparées à 10^{-4} M (la concentration finale est de 2×10^{-6} M) à pH 3,8, elles perdent leur efficacité vis-à-vis du *C. albicans* (la 444 IP Institut Pasteur de Paris). Cette perte d'activité pourrait être due à une dégradation partielle de la molécule.

Dans les limites d'observation utilisées, aux pH allant de 4 à 10,8 et pour des concentrations finales de l'antifongique de 2×10^{-6} M, la croissance des levures dans le milieu de Sabouraud (pH 5,8) est inhibée durant les 10 heures de suivie, l'activité antifongique est préservée dans ces conditions expérimentales. D'un autre côté, l'activité de l'AmB préparée à partir d'une solution mère à 10^{-4} M dans les différents tampons aux différents pH, utilisée à une concentration finale de 10^{-5} M vis-à-vis des érythrocytes suspendus dans du tampon PBS à pH 7,4 dépend du pH de la solution mère. Les solutions antifongiques préparées dans du tampon acétate/acide acétique aux pH 3,8, 4, 4,4 et 5, dans du PBS à pH 7,4 et dans du tampon carbonate/bicarbonate à pH 10, induisent une fuite totale du K^+ intra érythrocytaire et une totale hémolyse. Alors que les solutions antifongiques préparées à pH5,4 dans du tampon acétate/acide acétique et à pH 10,8 dans du tampon de carbonate/bicarbonate, sont peu toxiques vis-à-vis des globules rouges ; la toxicité est réduite de 75%(20 à 25% de fuite de K^+).

L'ensemble des résultats obtenus à pH 5,4 et 10,8 montrent une importante réduction de la toxicité vis-à-vis des cellules animales hôtes et une préservation de l'efficacité antifongique vis-à-vis de la levure *C. albicans*.

La question qui se pose est de savoir si ces résultats très encourageants sur le plan pharmacologique peuvent être expliqués sur la base des données spectroscopiques.

Rappelons tout d'abord que l'AmB est une molécule amphotère ; elle possède un groupement carboxylique COOH qui confère à la molécule son pouvoir acide. Et un groupement amine NH³⁺ de la glucosamine, qui confère à la molécule son pouvoir basique. Par conséquent, la charge globale de l'AmB varie en fonction du pH du milieu.

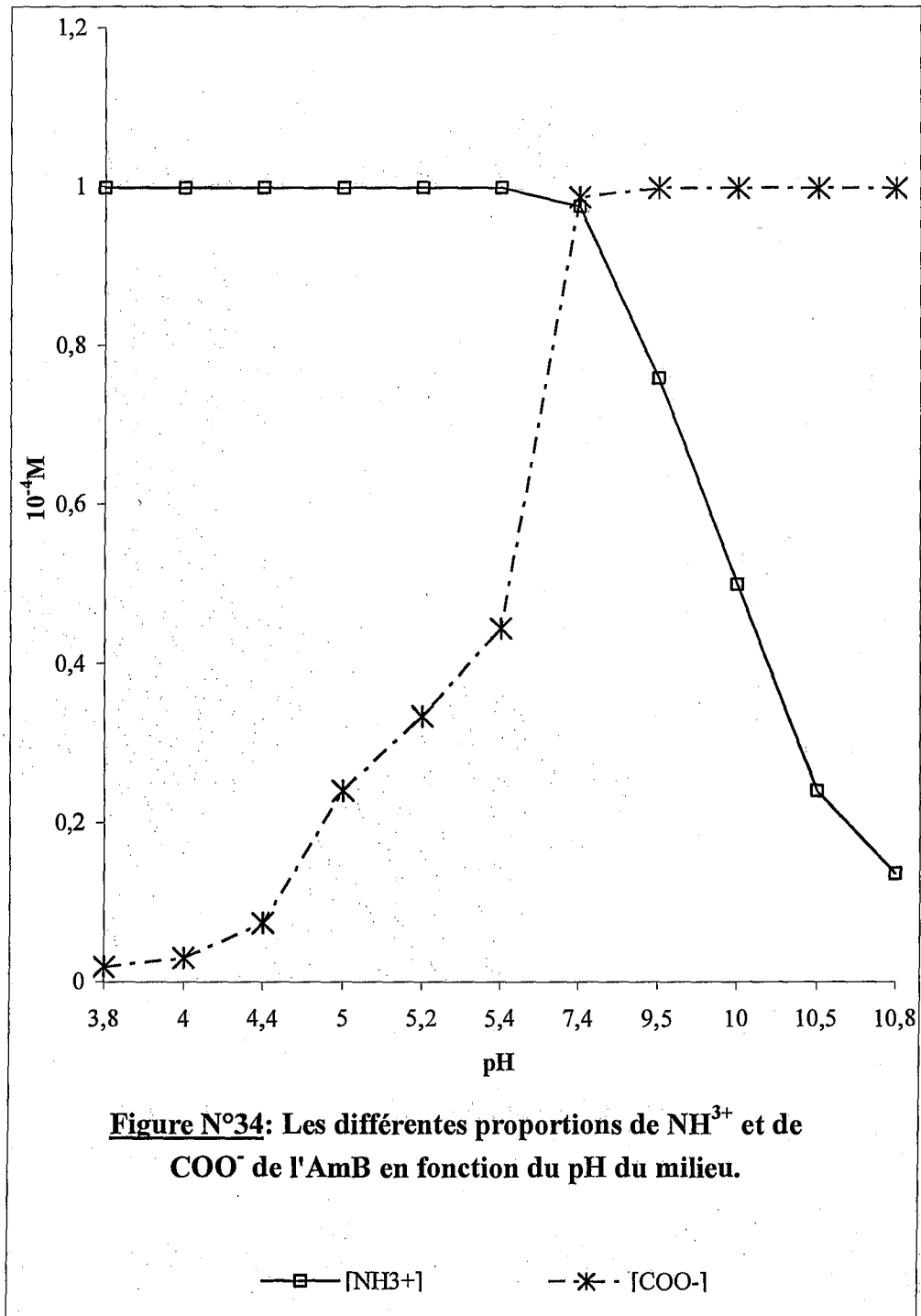
Le pK du groupement carboxylique de l'AmB est de 5,5 et celui du groupement amine est de 10 (Hung C.T. et coll., 1988). Le pHi de cet antifongique est alors autour de 7,5. A ce pH là, l'AmB est sous forme de zwitterion.

Selon l'équation de Henderson-Hasselbalch :

$$\text{pH} = \text{pK} + \text{Log}([\text{A}^-]/[\text{AH}])$$

Nous avons alors calculé les différentes concentrations des fractions COO⁻ et NH³⁺ de l'AmB en fonction du pH du milieu dans lequel elle est dissoute (figure N°34) :

$$\text{pH} = 5,5 + \text{Log}([\text{COO}^-] / [\text{COOH}]) \quad \text{et} \quad \text{pH} = 10 + \text{Log}([\text{NH}_2] / [\text{NH}_3^+]).$$



Par ailleurs, en solution aqueuse l'AmB est sous plusieurs formes (Gaboriau F. et coll., 1997a):

- les monomères d'AmB solubles, actifs envers le *C. albicans* et non actifs envers les érythrocytes, présentant un faible spectre de dichroïsme circulaire.
- les oligomères solubles ou agrégats solubles d'AmB, actifs vis-à-vis des levures et des érythrocytes, présentant un important pic de dichroïsme circulaire centré autour de 340nm.
- Les agrégats d'AmB, peu actifs envers *C. albicans* et les érythrocytes, présentant un important pic de dichroïsme circulaire centré autour de 340nm.
- Les super agrégats d'AmB qui apparaissent aux hautes températures (préchauffage 20 minutes à 70°C), peu actifs envers les érythrocytes, présentant un important pic de dichroïsme circulaire centré autour de 320nm.

De par sa structure, l'AmB est un poly-électrolyte. Il est généralement admis (Bolard J., 1991) que les agrégats d'AmB sont dans une configuration hélicoïdale. A pH acide, les charges positives sont localisées à la surface de la tringle formée par cet arrangement. L'existence des charges le long d'une macromolécule, et plus particulièrement d'un poly-électrolyte, induit des interactions électrostatiques à longue ou moyenne portée ; c'est ce qu'on appelle écrantage par les « contre ions libres » (Spiteri M.N. et coll., 1997).

La condensation des contre ions - l'AmB étant sous forme d'agrégats à pH acide - pourrait se produire par les groupements CH_3COO^- du tampon acétate/acide acétique selon le modèle de Manning (Manning G.S., 1978). Il se pourrait alors que cet écrantage ou « screening » soit à l'origine de la réduction de toxicité observée à pH 5,4.

Trois longueurs principales sont nécessaires au traitement de cette théorie de Manning :

- La première est la distance curviligne « a » entre les charges le long de la chaîne. Dans l'ensemble des travaux théoriques exposés, la répartition des charges est supposée homogène.
- La longueur d'écran de Debye « r_d », qui est l'échelle sur laquelle les interactions électrostatiques sont écrantées (Debye P. et Hückel E., 1923) ;

$$r_d^2 = (\epsilon k_B T) / (8\pi q_e^2 I) = 1 / 8\pi l_b I$$

Où I est la force ionique de la solution $I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i$;

ϵ est la constante diélectrique ;

k_B la constante de Boltzmann ;

q_e la charge de l'électron ;

z la charge de l'ion ;

T température en °Kelvin ;

z_i la valence de l'espèce ionique i ;

c_i la concentration molaire.

La longueur de Bjerrum $l_b = e^2 / \epsilon k_B T$, qui correspond à la taille au-dessus de laquelle l'interaction électrostatique entre 2 charges élémentaires devient supérieure à l'énergie thermique $k_B T$;

- La troisième longueur caractéristique est la longueur de déclin λ ou « Decay length » en contre ions qui se profile uniquement dans le régime non linéaire d'écrantage. Cette longueur représente le degré de réduction de la conductivité due à l'association des contre ions au poly électrolyte. Cette longueur est fortement liée à la densité de charge surfacique σ :

$$\lambda_z = \epsilon k_B T / 4\pi\sigma e z = 1 / (4\pi\sigma / q_e l_b z)$$

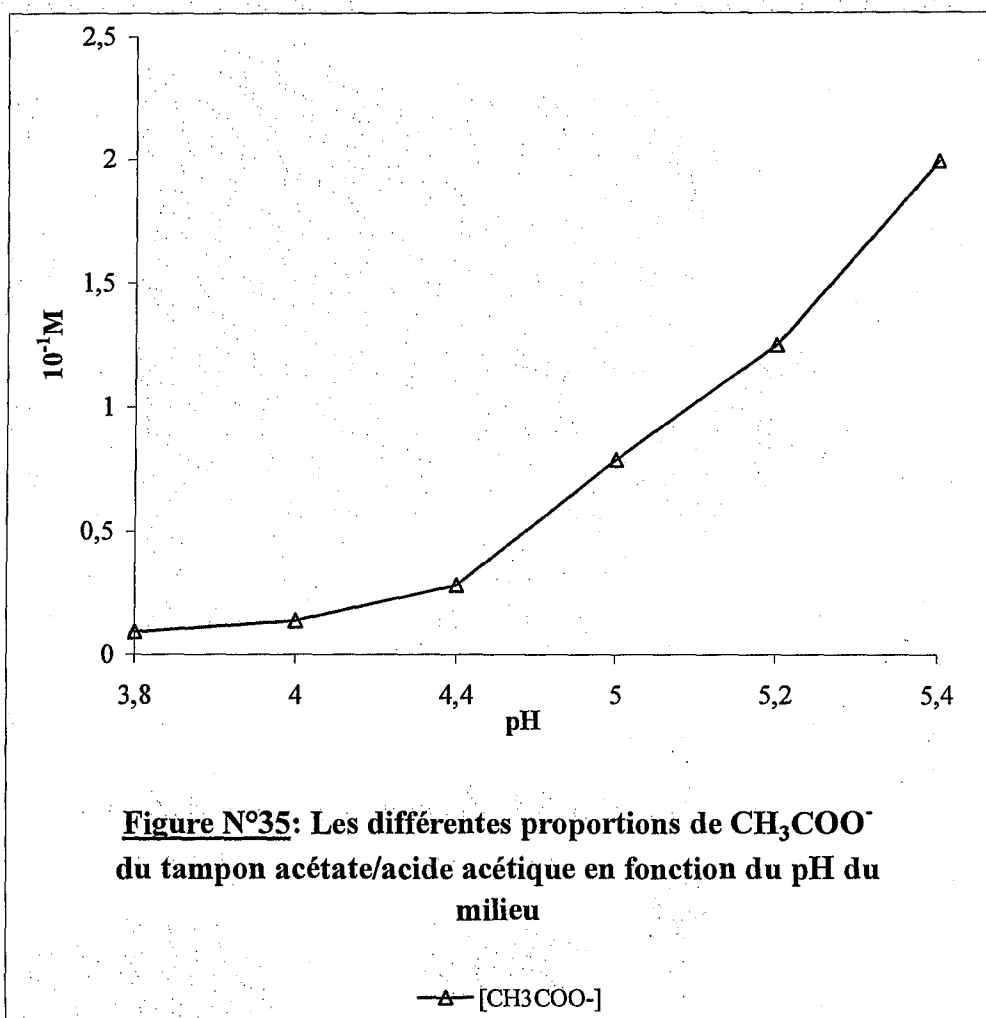
Selon la loi de Gauss en unité cgs, une densité de charge surfacique génère près d'elle un champs électrostatique $E = 4\pi\sigma/\epsilon$. Par conséquent, la signification physique de λ_z est la distance moyenne de cette surface de la valence de l'ion z en présence de l'énergie $k_B T$.

Les valeurs relatives des longueurs « a », « r_d » et « λ_z » définissent les différents régimes de l'écrantage des macro ions associés aux différents comportements compétitifs. Ces régimes nous permettent de distinguer entre la forme linéaire et la forme non linéaire de l'équation de Poisson-Boltzmann, et sur le plan effectif de distinguer entre une géométrie plane ou cylindrique (tableau N°2)(Rouzina I. et Bloomfield V.A., 1996).

Tableau N°2 : Régime pour la résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann. (Rouzina I. et Bloomfield V.A., 1996)

Cas	Condition	Description
1	$r_d < \lambda_z < a$	Linéaire, plane
2	$\lambda_z < r_d < a$	Non linéaire, plane
3	$\lambda_z < a < r_d$	Non linéaire, cylindrique
4	$r_d < a < \lambda_z$	Linéaire, cylindrique (pseudo plane)
5	$a < r_d < \lambda_z$	Linéaire, cylindrique
6	$a < \lambda_z < r_d$	Non linéaire, cylindrique

La concentration en ions CH_3COO^- du tampon acétate/acide acétique (dont le pK est de 4,8) est elle aussi fonction du pH (figure N°35), ce qui pourrait justifier l'hypothèse proposée en démontrant qu'il existe un maximum d'écrantage à pH 5,4. De plus, lorsque le pH augmente de 4 à 7, la concentration en ions acétate augmente alors que les charges positives de la tringle formée par le poly électrolyte diminuent.



L'hypothèse de départ est qu'il existe un maximum d'écrantage à pH5,4 d'où réduction de la toxicité.

Selon les travaux de Ganis P. et coll. (1971), dans une molécule d'AmB, la longueur des liaisons simples (C – C) est de $1,50 \pm 0,05 \text{ \AA}$ et celle des doubles liaisons (C = C) est de $1,33 \pm 0,05 \text{ \AA}$. Par conséquent, la longueur de la partie hydrophobe de l'AmB est de 22 \AA . D'autre part, tenant compte de la structure hélicoïdale des formes agrégées de l'AmB (Bolard J. et coll. 1991) et des paramètres géométriques donnés par Millié P. et coll. (1999), nous avons estimé que le rayon de courbure « a » (correspondant à la distance entre les charges le long de la chaîne du poly électrolyte) est de 13 \AA .

Par la suite, nous avons déterminé la longueur de Debye « r_d » et la longueur de Decay « λ » en fonction du pH suivant les équations citées précédemment (tableau N°3):

Tableau N°3: La longueur de Debye « r_d » et la longueur de Decay « λ » en fonction du pH.

pH	r_d (Å)	λ (Å)
3,8	33	5,7
4,2	23	5,7
4,5	19	5,7
4,6	16	5,7
4,8	15	6,3
5	13,4	7,1
5,2	12,6	8,1
5,4	11,7	9,5

Dans un second temps, nous avons déterminé dans quel régime proposé par Rouzina I et Bloomfield V.A. (1996) se situent nos solutions d'AmB en fonction du pH :

- De pH 3,8 à pH 5 : $\lambda < a < r_d$, ce qui correspond au système cylindrique non linéaire. Dans ce cas de figure, la fraction d'acétate liée par unité de surface chargée (Ξ) est :

$$\Xi = 1 - 1/\xi \quad (\xi \text{ étant le coefficient de Manning-Oosawa}).$$

$\Xi = 0,2$ entre pH 3,8 et 4,6, et il augmente brutalement au dessus de 0,98 à pH5 (tableau N°4).

- pH > 5 : $\lambda < r_d < a$, ce qui correspond au système non linéaire plane. Dans ce deuxième cas de figure, la tringle formée maintient toutes les charges neutralisées. La fraction d'acétate liée par unité de surface chargée $\Xi = 1$ (tableau N°4). Cependant, vu que la charge des agrégats diminue avec la déprotonation du groupement carboxylique de l'AmB, l'écrantage diminue. Un maximum d'écrantage est observé à pH 5.

Tableau N°4 : Estimation de la surface d'écrantage de l'AmB par les contres ions CH_3COO^-

pH	r_d (A°)	$\sigma 10^4$ coulomb/m ²	λ (A°)	$1/\xi$	Ξ	CH_3COO^-	Charge AmB	$\Xi \times \text{Charge AmB}$
3,8	33	0,94	5,7	0,8	0,2	0,09	1	0,2
4,2	23	0,94	5,7	0,8	0,2	0,2	1	0,2
4,5	19	0,94	5,7	0,8	0,2	0,34	0,95	0,19
4,6	16	0,94	5,7	0,8	0,2	0,38	0,89	0,18
4,8	15	0,85	6,3	0,68	0,32	0,5	0,86	0,27
5	13,4	0,75	7,1	0,98	0,98	0,6	0,8	0,78
5,2	12,6	0,66	8,1		1	0,7	0,68	0,68
5,4	11,7	0,56	9,5		1	0,8	0,55	0,55

Au pH 5,4, où l'on note le maximum de protection des globules rouges, on devrait observer un maximum d'écrantage. Or ce n'est pas le cas d'après le modèle proposé. Cette contradiction pourrait être expliquée d'une part par l'incertitude du modèle géométrique de l'AmB, d'autre part, par le fait qu'à pH 5,4 nous sommes à la limite du pouvoir tampon de l'acétate/acide acétique (100mM).

L'interprétation que nous donnons à cette réduction de toxicité qui serait due à l'écrantage des formes agrégées de l'AmB pourrait être étendue aux dérivés chargés de l'AmB tel que le 3-diméthylaminopropylamide « AMA » [(Blanc I. et coll., 2000), (Chéron M. et coll., 1988)] ou le N-méthyl-N-D-fructosyl amphotéricin B méthyl ester « MFAME » (Szindler-Reichert J. et coll. 2001).

Quant à l'origine de l'importante réduction de la toxicité observée à pH 10,8, elle est loin d'être liée à un effet écran par des contre-ions. En effet, à ce pH l'AmB est chargée négativement et par conséquent ne peut pas interagir avec les anions des carbonates. Cependant, dans ces conditions de pH 10,8 l'AmB est entièrement sous forme de monomères ou d'oligomères solubles (figure N°32). En effet, la longueur d'onde du spectre dichroïque se déplace et le coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ chute brutalement (figure N°29), ce qui explique la dissociation des formes agrégées. Or ce sont les formes monomériques qui sont les moins toxiques envers les cellules animales.

En conclusion, nous suggérons l'hypothèse selon laquelle la réduction de la toxicité de l'AmB envers les globules rouges observée à pH 5,4 est due à un écrantage de cet antifongique par les groupements acétates du tampon sans réorganisation des formes agrégées de l'AmB. D'autre part, à pH 10,8, la réorganisation des formes de l'AmB et la déprotonation de l'amine de la mycosamine sont responsables de cette réduction de toxicité.

B- ETUDE *IN VIVO*

L'amphotéricine B à la posologie de 0,5 à 1,5 mg/kg/jour reste le traitement de référence de la plupart des mycoses systémiques, notamment chez les immunodéprimés. Son efficacité est variable suivant la nature de l'agent fongique incriminé et du terrain sous-jacent : greffes de moelle, transplantations d'organes, hémopathies et cancer, infections par le VIH, corticothérapie, diabète...

Une réponse à l'amphotéricine B est ainsi observée dans 60 à 80 % des candidémies et seulement 50 % des candidoses chroniques disséminées [(Rex J.H. et coll., 1994), (Edwards J.E. et coll., 1997)], 20 à 83 % des aspergilloses pulmonaires invasives [(Denning DW, 1994), (Andrès E. et coll., 1995)], 70 % des cryptococcoses (en association avec la flucytosine) [(Joly V. et coll, 1996), (Van der Horst C. M. et coll., 1997)].

Des réactions d'intolérance immédiates sont observées chez 70 à 90 % des patients [Galis H.A. et Drew R.H., 1990]. Elles comportent de la fièvre et des frissons (30 à 50 % des traitements), plus rarement des céphalées, des nausées (20 %), des vomissements et des diarrhées. Un bronchospasme, une hypotension, voire des troubles du rythme cardiaque sont exceptionnellement rapportés. Une partie de ces effets secondaires serait liée à la libération de prostaglandines et de cytokines [Cleary J.D. et coll., 1992]. Parmi les autres manifestations directement rattachées à l'administration d'amphotéricine B, il convient également de noter des veinites, des thrombophlébites et des réactions allergiques. Plusieurs substances (telles que le paracétamol) sont susceptibles de prévenir ou d'atténuer ces effets secondaires [(Goodwin S.D. et coll., 1995), (Rosa G. et coll., 1997)]. La durée optimale de perfusion reste un sujet de controverse. Une meilleure tolérance lors de perfusion rapide (une heure) a été suggérée (Gales M.A. et Gales B.J., 1995), mais la majorité des auteurs s'accorde pour recommander une perfusion intraveineuse en quatre heures, en particulier lors de l'instauration du traitement ou s'il existe une insuffisance rénale, une hypokaliémie ou des troubles cardiaques (Cruz J.M. et coll., 1992).

La principale toxicité de l'amphotéricine B est rénale. Celle-ci est davantage liée à la dose cumulative d'amphotéricine B qu'à la concentration sérique. Ainsi, une dose cumulative de 3 à 4 g peut être à l'origine d'une insuffisance rénale irréversible. En revanche, avec de plus faibles doses, l'insuffisance rénale devient réversible à l'arrêt du traitement (Blanchet B. et coll., 2004).

Des troubles métaboliques à type : d'hypokaliémie, d'hypomagnésémie et d'acidose métabolique (Clements J.S. et Peacock J.E., 1990), ainsi qu'une toxicité médullaire (anémie, leucopénie et/ou thrombopénie) (Galis H.A. et Drew R.H., 1990) sont également signalés.

La pharmacocinétique de l'amphotéricine B est complexe et partiellement étudiée chez l'homme (Kan V.L. et coll., 1991). L'amphotéricine B se lie fortement aux protéines plasmatiques (91 à 95 %) après administration par voie intraveineuse. Sa demi-vie plasmatique est de 24 à 48 heures, mais sa demi-vie d'élimination est proche de 15 jours (Atkinson A.J. Jr. et Bennett JE., 1978). Des concentrations élevées d'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 %) (Christiansen K.J. et coll., 1985).

Malgré son efficacité, l'amphotéricine B pose un sérieux problème de toxicité en pratique clinique, c'est pourquoi il est indispensable de trouver une solution permettant une augmentation de l'index thérapeutique.

Le principal progrès des formes liposomales repose sur l'absence de dégradation de l'amphotéricine B dans la circulation sanguine, permettant ainsi sa diffusion de manière intacte dans les tissus. De plus, la capture sélective des liposomes par le système réticulo-endothélial permet l'obtention de fortes concentrations d'antifongiques dans le poumon, la rate, le foie et les ganglions lymphatiques, tissus atteints par les agents pathogènes (Blanchet B. et coll., 2004). De plus, plusieurs milliers de patients traités par ces formulations lipidiques de l'amphotéricine B, présentent une toxicité rénale inférieure à celle de ceux traités par la Fungizone® classique (Kleinberg M., 2006)

Mais l'inconvénient majeur de ces formulations lipidiques est l'important coût de revient de ces préparations. Afin de palier à ce problème certaines solutions ont été proposées, dont le préchauffage de la Fungizone® à 70°C pendant 20 minutes [(Gaboriau F. et coll., 1997b), (Petit C. et coll., 1998)] qui permet une réduction de la toxicité tout en maintenant l'efficacité.

Plus récemment, Espada R. et coll. (2008) et Mariné M. et coll. (2008) proposent un poly-agrégat d'amphotéricine B obtenu par la solubilisation de l'antifongique dans une solution contenant du désoxycholate de sodium mais qui contrairement à la Fungizone® n'est pas réajustée à pH 7,4, permet de réduire la toxicité rénale tout en maintenant l'efficacité antifongique vis-à-vis de *Candida glabrata*.

Les résultats que nous avons obtenus dans la partie *in vitro* de notre étude, montrent que les solutions d'AmB solubilisées à 10^{-4} M à pH5,4 (dans du tampon acétate/acide acétique 100mM) et pH10,8 (dans du tampon carbonate/bicarbonate 10mM) permettent une réduction de la toxicité vis-à-vis du globule rouge tout en maintenant l'efficacité antifongique chez *C. albicans*. Il nous a semblé alors, indispensable de passer aux tests *in vivo* afin de voir si nous retrouvons des résultats similaires.

C'est pourquoi, nous avons étudié l'effet de ces deux formulations d'AmB préparées à pH 5,4 et 10,8 chez les rats Wistar.

Notre travail se répartit comme suit :

- 1- des tests de toxicité chez des rats Wistar sains.
- 2- Des tests d'efficacité chez des rats Wistar infectés par *Candida albicans*.

1. EVALUATION DE LA TOXICITE RENALE CHEZ LES RATS WISTAR :

La néphrotoxicité est la principale atteinte chez les patients traités à l'amphotéricine B, alors que cette dernière reste une des principales solutions efficaces pour le traitement des mycoses invasives. Avec les formulations lipidiques, la toxicité rénale est largement réduite (Kleinberg M., 2006).

Rappelons que l'urée provient de la destruction des protéines et qu'elle est entièrement filtrée par les glomérules. La créatinine sanguine quant à elle, constituant des protéines musculaires, est éliminée uniquement par les reins et n'est pas affectée comme l'urée par des facteurs extra rénaux.

Le dosage de l'urée (urémie) et de la créatinine (créatininémie) dans le sang permet alors d'apprécier facilement, et pour un coût réduit, la fonction rénale.

On a vu précédemment que lorsqu'on utilise des solutions d'AmB solubilisées à 10^{-4} M à pH 5,4 et 10,8 la toxicité *in vitro* vis-à-vis des globules rouges est largement réduite, c'est pourquoi, afin d'évaluer l'action de ces solutions sur la fonction rénale, nous avons fait des dosages sériques de l'urée et de la créatinine chez les rats Wistar.

Dans un premier temps, nous avons mesuré le pH sanguin des rats 3 heures après avoir injecté les différentes solutions ; tampon acétate/acide acétique (100mM) pH 5,4 et tampon carbonate/bicarbonate (10mM) pH 10,8.

Comparativement au pH physiologique du rat qui est de 7,4, en injectant jusqu'à 3mL (volume maximale qu'on puisse introduire chez un rat) de ces solutions tampons aux rats Wistar nous n'observons aucune modification du pH sanguin des animaux. Ce dernier est maintenu constant à $\text{pH } 7,6 \pm 0,02$. L'addition de ces solutions tampons ne modifie pas le pH sanguin des rats.

Evaluation de la toxicité rénale aiguë suite à une injection unique :

Pour évaluer la toxicité rénale aiguë des solutions antifongiques, nous avons tout d'abord apprécié l'effet d'une injection unique de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4 et dans du tampon carbonate/bicarbonate (10mM) pH10,8. Les rats ont été suivis pendant 15 jours sur le plan du comportement en général et des paramètres rénaux. Les prélèvements, en vue d'analyse, ont été effectués à 6 heures, 24 heures, 48 heures, une semaine et 15 jours (le suivi se fait sur les mêmes rats du début jusqu'à la fin de l'expérience).

Les lots de 6 rats Wistar mâles, sont répartis comme suit :

- un lot témoin qui n'a subi aucun traitement.
- Un lot contrôle qui a reçu la solution tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH5,4.
- Un lot test qui a reçu la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg.
- Un lot contrôle qui a reçu la solution tampon carbonate/bicarbonate (10mM) à pH 10,8
- Un lot test qui a reçu la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate (10mM) à pH 10,8 à raison de 1mg/kg.

Evaluation de la toxicité rénale aiguë de la solution d'AmB préparée à pH 10,8 chez les rats Wistar sains :

Les rats traités aussi bien par la solution tampon que par la solution antifongique n'ont présenté aucun trouble du comportement (ni agressivité, ni asthénie) suite à l'injection à raison de 1mg d'AmB /Kg.

Les paramètres sanguins étudiés sont l'urée et la créatinine. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°36.

- Nous remarquons que la concentration en urée chez les rats mâles Wistar qui n'ont subi aucun traitement (lot témoin), est constante durant 15 jours. Il en est de même pour la concentration en créatinine qui reste constante durant les 15 jours de suivi.
- Chez les rats mâles Wistar qui ont reçu une injection unique d'une solution tampon carbonate/bicarbonate (10mM) à pH 10,8 (le volume injecté est équivalent au volume d'une injection d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate (10mM) à pH 10,8 à raison de 1mg/Kg), le taux d'urée est constant durant une semaine, il augmente ensuite de manière significative 15 jours après l'injection ($p=0,017$). La concentration en créatinine est elle aussi constante durant une semaine et augmente de manière significative au bout de 15 jours par rapport à la concentration du lot témoin ($p=0,0047$).
- Le taux d'urée chez les rats mâles Wistar qui ont reçu une injection unique d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate/bicarbonate (10mM) à pH 10,8 (lot test) augmente significativement six heures après l'injection par rapport au lot témoin ($p=0$). Cette augmentation est suivie d'une diminution significative 24 heures après ($p=0,09$). La concentration en urée rejoint la concentration témoin 48 heures après l'injection. La concentration en créatinine quant à elle augmente significativement 48 heures après l'injection ($p=0,036$), ce taux reste élevé durant les 15 jours de suivi.

Les résultats obtenus montrent que l'injection de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon carbonate bicarbonate (10mM) à pH 10,8, induit une perturbation des paramètres rénaux (urée et créatinine) et que ces perturbations persistent au-delà d'une semaine de suivi.

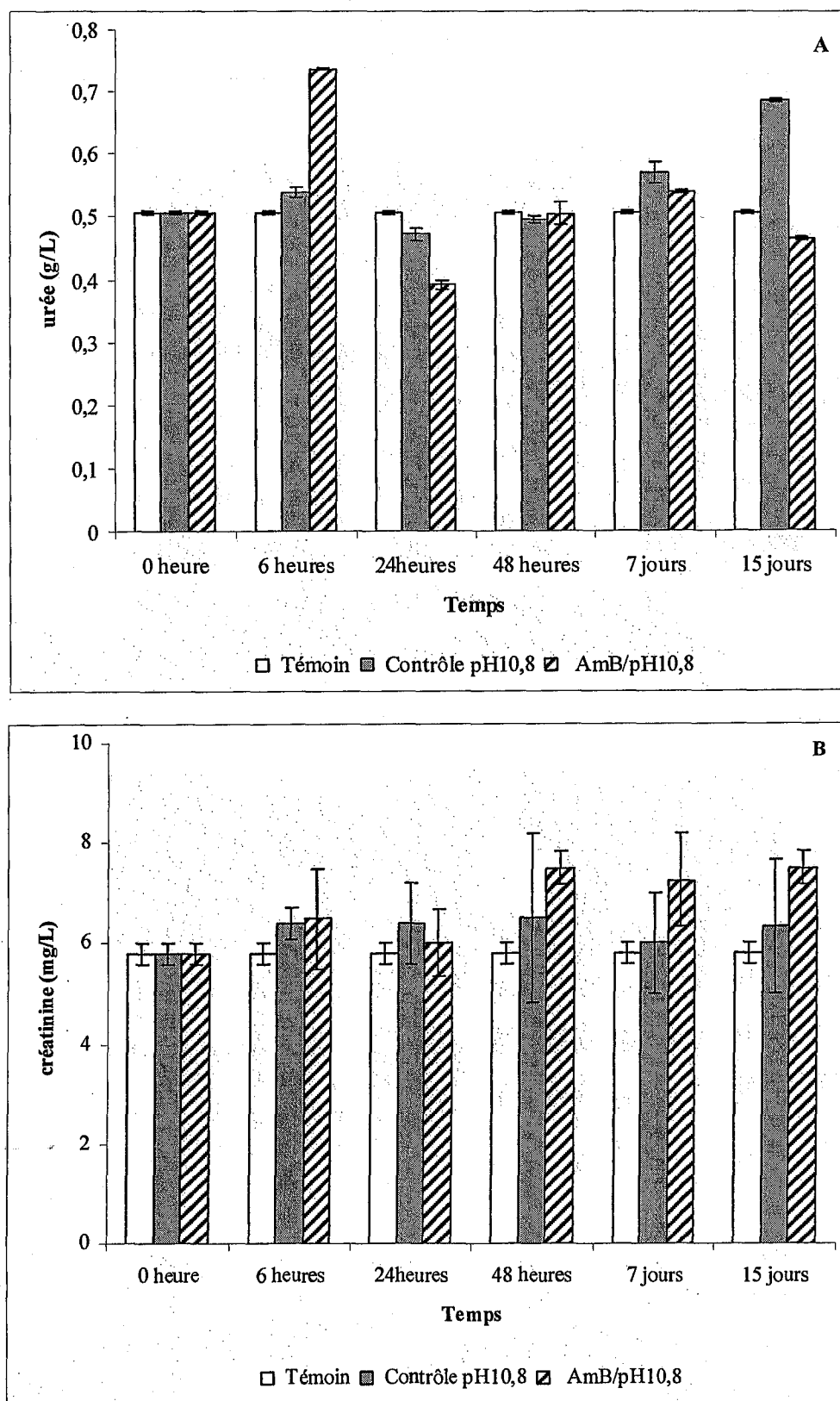


Figure N°36 : Effet d'une injection unique d'une solution d'AmB solubilisée à $10^{-4}M$ dans du tampon carbonate/bicarbonate (10mM) à pH 10,8, à raison de 1mg/kg, sur les paramètres sanguins (urée et créatinine) chez les rats Wistar.

1.1.2. Evaluation de la toxicité rénale de la solution d'AmB préparée à pH5,4 chez les rats Wistar sains :

Les rats traités aussi bien par la solution tampon que par la solution antifongique n'ont présenté aucun trouble du comportement (ni agressivité, ni asthénie) suite à l'injection à raison de 1mg d'AmB /Kg.

Les paramètres sanguins étudiés sont l'urée et la créatinine. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°37.

- Nous remarquons que les concentrations en urée et en créatinine, des rats mâles Wistar qui n'ont subi aucun traitement (lot témoin) sont constantes durant les 15 jours de suivi.
- Chez les rats mâles Wistar qui ont reçu une injection unique d'une solution tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH5,4 (le volume injecté est équivalent au volume d'une injection d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4 à raison de 1mg/kg), le taux d'urée est constant au cours des 15 jours de suivi. De plus, nous n'observons pas de différence significative avec le taux d'urée du lot témoin ($p > 0,30$). Il en est de même pour la concentration en créatinine, cette dernière est constante durant les 15 jours de suivi et ne diffère pas significativement de la concentration en créatinine du lot témoin ($0,4 < p < 0,8$).
- Six heures après l'injection unique d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, nous observons une augmentation peu significative du taux d'urée chez les rats mâles Wistar (du lot test) par rapport au lot témoin ($p = 0,045$), cette concentration rejoint celle du lot témoin 24 heures après l'injection. Quant à la concentration en créatinine, elle ne varie pas significativement durant les 15 jours de suivi. De plus, nous ne notons pas de différence significative avec la concentration en créatinine du lot témoin ($0,3 < p < 0,8$).

Les résultats obtenus montrent que l'injection unique d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg n'induit pas de perturbation des paramètres rénaux urée et créatinine, chez les rats Wistar.

A partir de cette première série expérimentale, il semble que la solution d'AmB préparée à pH 5,4 soit mieux tolérée par l'animal que celle préparée à pH 10,8 sur le plan rénal, suite à une seule injection à raison de 1mg d'AmB/kg.

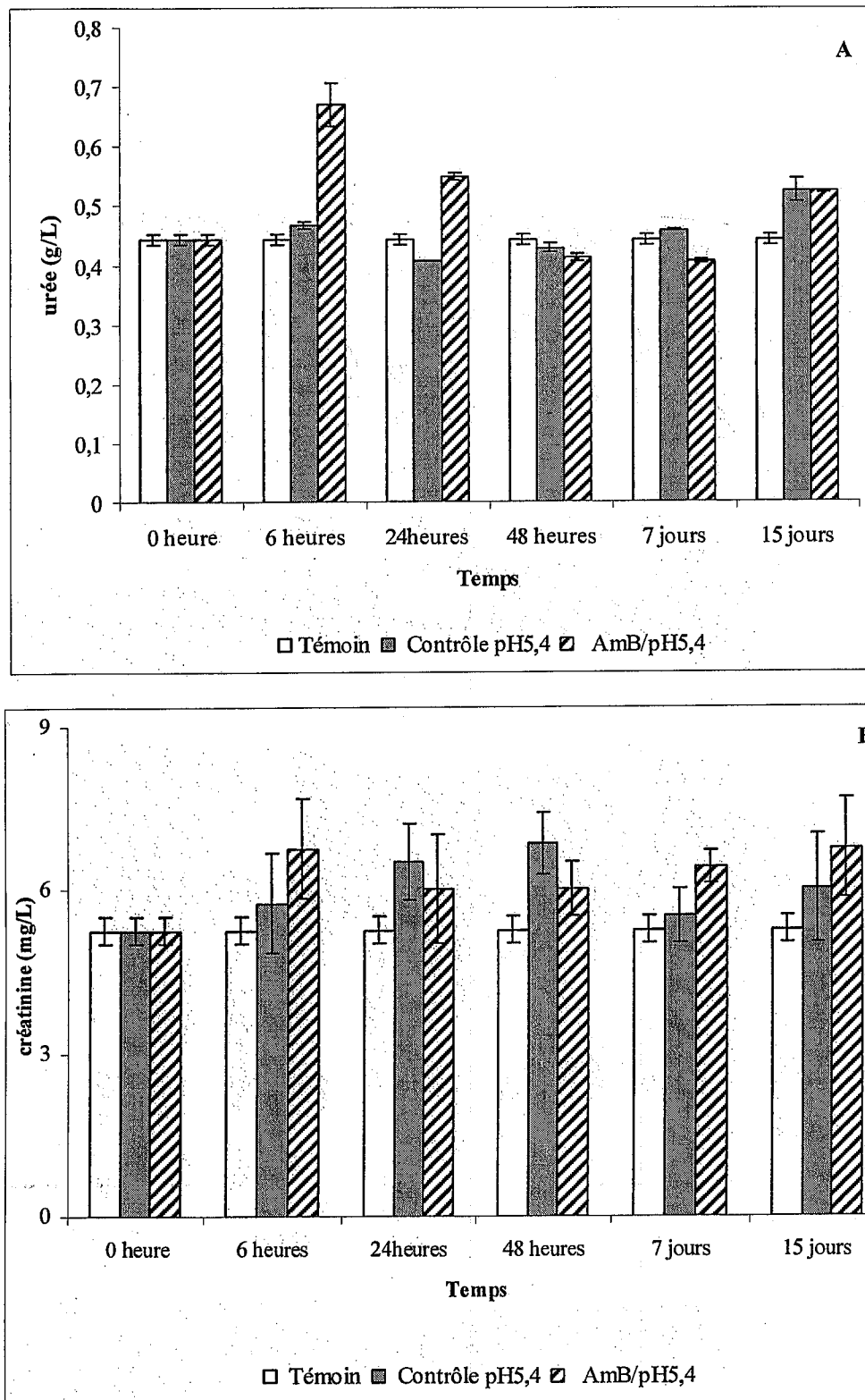


Figure N°37 : Effet d'une injection unique d'une solution d'AmB solubilisée à $10^{-4}M$ dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg, sur les paramètres sanguins (urée et créatinine) chez les rats Wistar.

Evaluation de la toxicité rénale aiguë suite à des injections répétées :

La première série des tests de toxicité a montré que la solution d'AmB, préparée à pH 5,4, n'induit pas de perturbations des paramètres rénaux, contrairement à la solution d'AmB préparée à pH 10,8. C'est pourquoi, dans un second temps, nous avons évalué la toxicité de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg, suite à des injections répétées toutes les 48 heures, jusqu'à la mort de l'animal. Les prélèvements, en vue d'analyse, ont été effectués toutes les 48 heures (le suivi se fait sur les mêmes rats du début jusqu'à la fin de l'expérience). Le premier prélèvement se fait 24 heures après la première injection.

Les lots de 6 rats Wistar mâles, sont répartis comme suit :

- un lot témoin qui n'a subi aucun traitement.
- Un lot contrôle qui est traité par des injections répétées de solution tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH5,4.
- Un lot test qui est traité par des injections répétées de solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg.

On note qu'à partir de la deuxième injection, une agressivité et une asthénie chez les rats des lots contrôle et test. De plus la queue de ces rats est fortement endommagée au niveau de l'injection.

Après la quatrième injection quatre rats sur six du lot test sont morts alors que les rats des deux autres lots (témoin et contrôle) sont vivants. Nous obtenons 100% de létalité du lot test après la sixième injection.

Les paramètres rénaux étudiés sont l'urée et la créatinine. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°38.

Sur la figure N°38A, nous remarquons que la concentration d'urée des rats du lot contrôle n'augmente pas de manière significative après la 3^{ème} injection ($p=0,32$). Pour le lot de rats test traités à l'AmB, nous observons une augmentation non significative du taux d'urée après la première injection, par rapport à la concentration d'urée avant traitement des rats ($p = 0,08$). Ensuite, cette concentration diminue après la deuxième injection et reste constante jusqu'à la troisième injection.

Sur la figure N°38B, nous remarquons que le taux de créatinine des rats du lot contrôle varie significativement d'une injection à l'autre. Cette différence est essentiellement observée entre la première et la deuxième injection ($p=0,04$). La concentration en créatinine est plus importante après la première injection. Il en est de même pour le lot de rats test traités à l'AmB, où nous observons une variation significative de la concentration en créatinine suite aux différentes injections ($p=0,047$). Cette différence est toujours observée entre la première et la deuxième injection. D'autre part, après chaque injection, le taux de créatinine ne varie pas d'un lot à l'autre. Nous n'observons pas de variation significative entre les lots tests, contrôle et témoin ($0,3 < p < 0,5$).

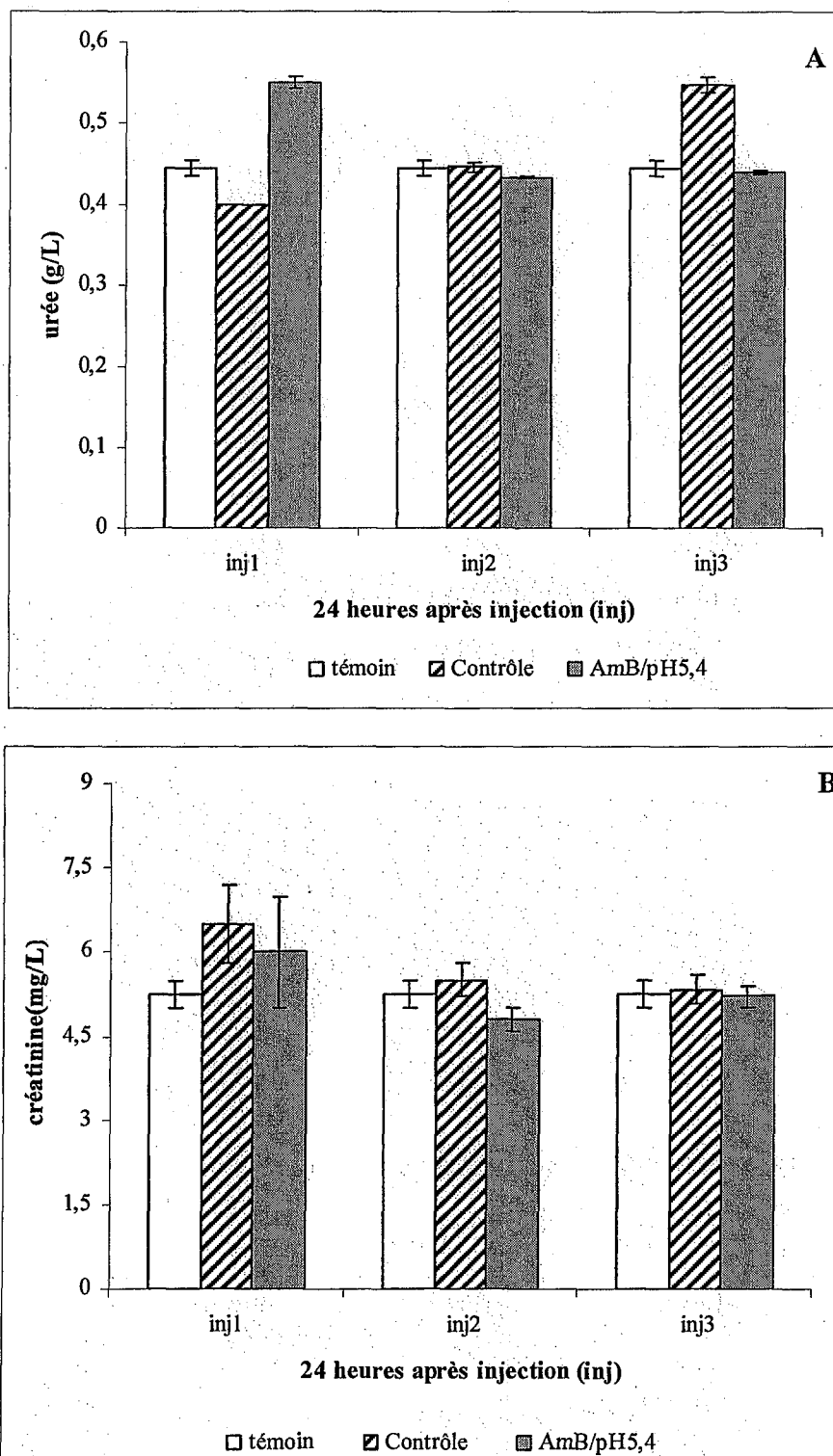


Figure N°38 : Effet d'injections répétées d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg, sur les paramètres sanguins (urée et créatinine) chez les rats Wistar sains.

D'après les résultats obtenus dans cette partie de l'étude, il ressort que 3 injections répétées de solutions d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg toutes les 48 heures n'induisent pas de perturbation significatives des paramètres rénaux (urée et créatinine). Dès la quatrième injection de la solution antifongique quatre rats sur six, du lot test, sont morts et à la sixième injection, nous observons 100% de létalité du lot test alors que les rats du lot contrôle (qui ont reçu des injections répétées de solution tampon pH 5,4) et du lot témoin (qui n'ont reçu aucune injection) sont vivants.

Ces résultats sont encourageants, sachant que la principale toxicité liée à l'injection d'une solution de Fungizone® (AmB désoxycholate de sodium) est sur le plan rénal.

Suite à ces résultats nous avons voulu effectuer des tests d'efficacité.

2. EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA SOLUTION D'AMPHOTERICINE B PREPAREE A pH 5,4 CHEZ LES RATS WISTAR INFECTES PAR *Candida albicans* :

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié l'efficacité de la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg toutes les 48 heures, chez des rats Wistar infectés par une souche de levure appartenant au genre *Candida albicans*.

2.1. Détermination du temps d'incubation des levures avant traitement chez les rats Wistar :

Dans un premier temps, nous avons déterminé le temps d'incubation des levures, après inoculation de la souche, avant le traitement de l'animal.

Nous avons pris un lot de rats mâles Wistar sains auxquels nous avons inoculé 0,2mL d'une suspension de 10^8 cellules/mL de *Candida albicans*, et nous avons suivi la concentration en levure dans le sang par hémoculture. Les résultats obtenus sont regroupés sur le tableau N°5.

Tableau N°5 : Concentration des levures dans le sang chez les rats Wistar.

Temps	Nombre de levures (ufc)
24 heures	0
48 heures	$1,65 \times 10^4$
72 heures	$1,65 \times 10^5$
96 heures	$1,65 \times 10^5$
168 heures	$1,65 \times 10^5$
240 heures	$1,65 \times 10^5$

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que les levures apparaissent dans le sang 48 heures après inoculation aux rats. Le nombre de levure est de $1,65 \times 10^4$ ufc/mL après 48 heures. Il passe à $1,65 \times 10^5$ ufc/mL après 72 heures d'incubation et reste constant durant 10 jours (240heures).

Sur le plan comportemental, nous notons une perte de l'appétit et une baisse d'énergie chez les rats, 72 heures après inoculation des levures, ce qui coïncide au temps de propagation des levures dans le sang. Les animaux restent en vie durant les 16 jours de suivi.

L'effet de cette inoculation des levures sur les paramètres rénaux est présenté sur la figure N°39.

Sur la figure N°39A, nous remarquons que chez les rats infectés, la concentration en urée ne diffère pas significativement de celle des rats témoins sains (sans infection) durant les 16 jours de suivi ($p > 0,5$).

Sur la figure N°39B, nous remarquons que le taux de créatinine augmente significativement au 3^{ème} jour chez les rats infectés par rapport à ceux du lot témoin ($p = 0,037$), ensuite il se stabilise pour augmenter à nouveau au 10^{ème} jour de l'inoculation ($p < 0,005$).

Ces résultats montrent que l'inoculation des levures induit une perturbation de la créatinine qui reflète une perturbation rénale 72 heures après l'inoculation, ce temps concorde avec l'apparition des levures dans le sang.

A partir de ces résultats, nous avons fixé le temps d'incubation à 72 heures, avant de commencer le traitement des rats infectés. Ceci est en accord avec les travaux de Espada R et coll., (2008), qui commencent le traitement des rats 72 heures après inoculation de la levure *Candida glabrata*.

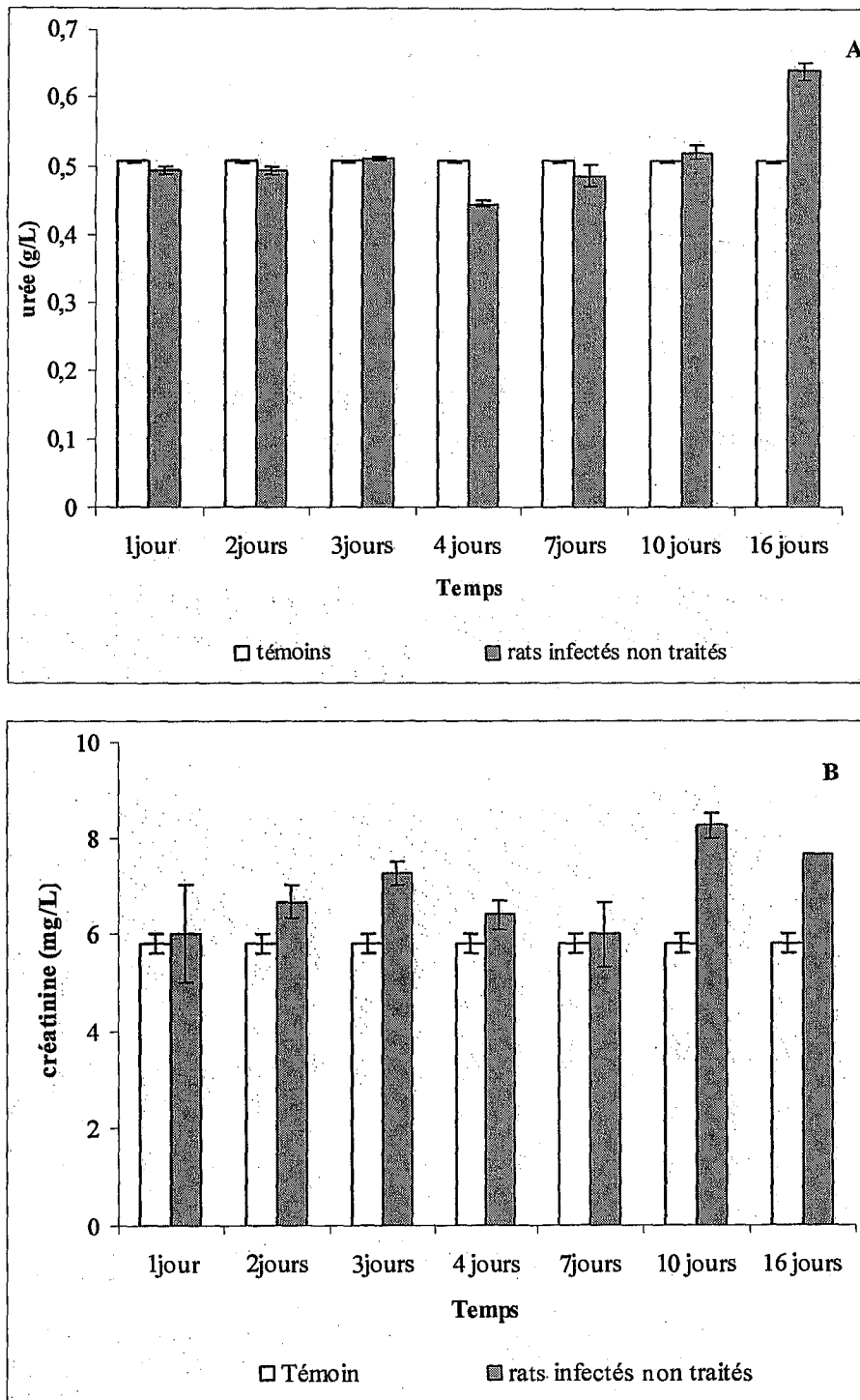


Figure N°39 : Paramètres sanguins (urée et créatinine) chez les rats infectés par la levure *Candida albicans*, n'ayant subi aucun traitement.

2.2. Les tests d'efficacité.

Pour les tests d'efficacité, les lots de 6 rats mâles Wistar sont répartis comme suit :

- un lot témoin infecté non traité.
- Un lot contrôle infecté traité par des injections répétées de solution tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH5,4.
- Un lot test infecté traité par des injections répétées de solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg.

On note dès la première injection, une agressivité des rats infectés des lots contrôle et test. De plus, après la deuxième injection, la queue de ces rats est fortement endommagée.

Suite à la sixième injection, tous les rats des lots test et contrôle sont morts.

Les paramètres rénaux étudiés sont l'urée et la créatinine. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°40.

Sur la figure N°40A, nous remarquons que la concentration de l'urée chez les rats infectés traités à la solution tampon (lot contrôle) augmente significativement par rapport au lot de rats infectés non traités ($p=0,011$), suite à la première injection. Ce taux d'urée est constant au cours des injections suivantes ($p=0,87$). Cette augmentation du taux d'urée (par rapport au lot témoin infecté non traité) est également observée chez les rats traités à la solution antifongique (lot test), suite à la première injection ($p=0,011$). La concentration en urée chez les rats infectés et traités à l'AmB reste stationnaire suite aux cinq injections.

Sur la figure N°40B, nous remarquons que la concentration en créatinine ne varie pas suite à la première injection, aussi bien pour les rats du lot contrôle traités par la solution tampon, que pour les rats du lot test traités avec la solution d'AmB ($p=0,75$). En revanche, suite aux deuxième, troisième, quatrième et cinquième injections, il y a une importante augmentation de la créatinine chez les rats des lots test (traités à l'AmB) et contrôle (traités par la solution tampon), par rapport au lot témoin ($p=0$).

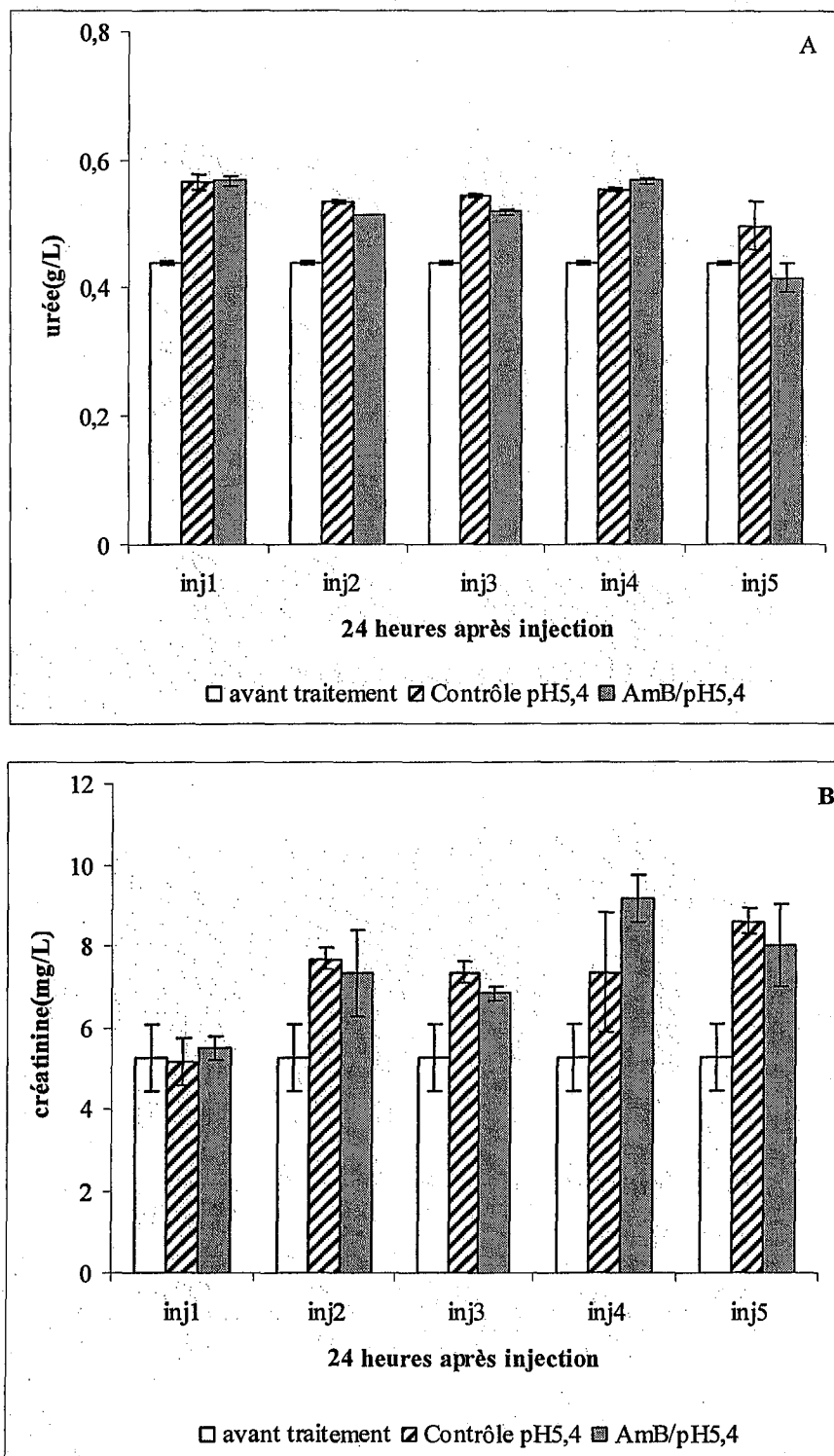


Figure N°40 : Effet d'injections répétées d'une solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg, sur les paramètres sanguins (urée et créatinine), chez les rats Wistar infectés par *C. albicans*.

Il ressort de ces résultats, que le traitement par la solution d'AmB solubilisée à $10^{-4}M$ dans du tampon acétate/acide acétique (100mM), à pH 5,4, à raison de 1mg/kg, toutes les 48 heures, n'induit pas de perturbations importantes du taux de l'urée chez les rats infectés, par contre, nous notons une importante perturbation du taux de la créatinine. Ceci est lié essentiellement d'une part, à la solution tampon acétate/acide acétique (100mM), d'autre part, à l'infection par *C. albicans*, puisqu'en absence de tout traitement, le taux de créatinine augmente significativement 72 heures après l'inoculation des levures et que cette augmentation est d'autant plus importante au 10^{ème} jour.

Quant à l'efficacité de cette solution d'AmB, les résultats de l'hémoculture, obtenus suite à chaque injection, sont reportés sur le tableau N°6.

Tableau N°6 : Concentration des levures dans le sang chez les rats Wistar, après traitement par la solution d'AmB préparée à pH5,4.

Rat infecté n°	Nombre de levures (ufc)					
	72 heures après inoculation	24 heures après injection 1	24 heures après injection 2	24 heures après injection 3	24 heures après injection 4	24 heures après injection 5
1	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	0	0	0	0
2	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	0	0	0	0
3	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	7×10^3	0	0
4	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	7×10^3	10^3	10^3
5	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	7×10^3	10^3	10^3
6	$1,7 \times 10^5$	$3,5 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	7×10^3	10^3	10^3

D'après le tableau N°6, nous remarquons qu'après la première injection de la solution d'AmB, solubilisée à pH 5,4, le nombre de levures passe de $1,7 \times 10^5$ ufc/mL (avant traitement des rats) à $3,5 \times 10^4$ ufc/mL, chez tous les rats du lot. Suite à la deuxième injection, deux rats sur six n'ont plus de levure dans le sang (0 ufc/mL suite à l'hémoculture) contrairement aux quatre autres rats de ce même lot test, qui ont un taux de levure, dans le sang, de $1,6 \times 10^4$ ufc/mL. Ce dernier passe à 7×10^3 ufc/mL après la troisième injection. Suite à la quatrième injection, trois rats sur six n'ont plus de levures dans le sang (0 ufc/mL suite à l'hémoculture) alors que chez les 3 autres nous dénombrons les levures à 10^3 ufc/mL. Il en est de même après la cinquième injection.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que le nombre de levures diminue suite aux injections d'AmB solubilisée à pH 5,4. Cependant, nous n'obtenons pas une efficacité totale par ce traitement, puisque l'hémoculture de 50% des rats traités est positive et que le traitement ne peut être poursuivi car nous observons une totale létalité après la sixième injection de cette solution antifongique.

DISCUSSION

La série de tests réalisés dans cette deuxième partie de l'étude, nous a permis d'évaluer la toxicité des solutions d'AmB solubilisée à 10^{-4} M, à pH 5,4 et pH10,8.

Nous remarquons que, suite à une injection unique d'une solution d'AmB, préparée à pH 5,4, les concentrations en urée et en créatinine ne varient pas significativement par rapport au lot de rats témoins, alors que suite à une injection unique d'une solution d'AmB, solubilisée à pH 10,8, les concentrations en urée et en créatinine varient significativement par rapport au lot témoin. Il semblerait que la solution d'AmB préparée à pH 5,4, ait moins d'effet sur la fonction rénale que la solution d'AmB préparée à pH10,8.

De plus, trois injections répétées de solutions d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg toutes les 48 heures n'induisent pas de perturbations significatives des paramètres rénaux. Il semble que dans ces conditions expérimentales, la fonction rénale ne soit pas atteinte, or la principale toxicité de l'AmB est la toxicité rénale. Ces résultats semblent être en accord avec les tests *in vitro* qui montrent une réduction de la toxicité envers les globules rouges, en présence d'une solution d'AmB solubilisée à pH 5,4.

Par ailleurs, suite à l'inoculation de 0,2mL d'une suspension de levures *C. albicans* 444 IP (à partir d'une suspension mère de 10^8 cellules/mL) à des rats Wistar par voie péritonéale, l'infection se manifeste 72 heures après par une hémoculture positive. En effet, cet examen révèle une concentration levurienne maximale de $1,7 \times 10^5$ ufc/mL, cette concentration persiste en absence de tout traitement, durant les 16 jours de suivi.

Quant aux paramètres rénaux, nous remarquons que le taux d'urée ne varie pas significativement par rapport au lot de rats témoins sains, alors que la concentration de la créatinine augmente significativement 72 heures après inoculation des levures aux rats. Cette augmentation coïncide avec la concentration maximale de levures présentes dans le sang.

Le traitement des rats par la solution d'AmB solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg, toutes les 48 heures, ne permet pas d'obtenir une totale efficacité chez tous les rats infectés par la levure *Candida albicans*. Nous remarquons au niveau de l'hémoculture une absence de levures chez 50% seulement des

rats infectés et traités par cette solution d'AmB, préparée à pH 5,4, après 9 jours (injection répétée toutes les 48 heures). Cette efficacité partielle de la solution antifongique pourrait être liée à la souche de levure utilisée, puisqu'il s'agit d'une souche qui peut développer des mycéliums dans les tissus infectés. D'autre part, cela pourrait être lié à la dormance des levures (Boucherit Z et coll., 2007).

CONCLUSION GENERALE

Le but qui avait été défini pour le présent travail était la détermination *in vitro* de l'effet de l'état physique de la molécule d'amphotéricine B, un antifongique polyénique, sur son activité aussi bien vis-à-vis des globules rouges humains (modèle universel de cellules animales) que vis-à-vis de *Candida albicans*, levure responsable de l'une des principales mycoses systémiques.

En effet, si l'on est bien documenté au sujet de l'influence de l'environnement physico-chimique sur l'équilibre en solution aqueuse entre les différentes formes solubles et insolubles de l'amphotéricine B et que ce sont les formes super agrégées insolubles obtenues notamment par préchauffage 20 minutes à 70°C qui sont les moins toxiques vis-à-vis des cellules animales (Gaboriaud F. et coll, 1997b), on a en revanche, très peu d'informations sur l'effet du pH, d'une part, sur l'état physique de l'antifongique, d'autre part, sur son activité cellulaire.

Des pH de solutions mères d'amphotéricine B, des plus acides (pH 3,8) aux plus alcalins (pH 10,8), ont été étudiés d'une part *in vitro* sur le plan de l'activité antifongique, de la toxicité vis-à-vis des érythrocytes et sur l'état physique de l'antifongique, d'autre part *in vivo* par des tests de toxicité et d'efficacité chez les rats Wistar.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

- 1- La toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges dépend du pH de la solution mère. En effet lorsque l'on met en contact de ces cellules 10^{-5} M d'AmB, préparée à partir de solutions mères de 10^{-4} M, solubilisées dans des tampons de différents pH (pH 3,8, pH 4, pH 4,4, pH 5 et pH 10), nous observons une fuite quasi totale de K^+ intracellulaire et entre 70% et 80% d'hémolyse, résultats de même amplitude que ceux observés habituellement en présence d'une solution préparée dans du DMSO. Par contre, les solutions d'AmB préparées aux pH 5,4 et pH 10,8 n'induisent qu'une fuite partielle de K^+ intracellulaire (20%) et d'hémoglobine (20%) en 90 minutes d'incubation. La toxicité de l'AmB est ainsi réduite de 80%. Ces deux dernières conditions de pH semblent permettre une protection du globule rouge.

- 2- L'utilisation de solutions mères d'amphotéricine B solubilisées à 10^{-4} M à des pH de 5,4 ou de 10,8, permet d'augmenter *in vitro* la concentration finale d'amphotéricine B jusqu'à 2×10^{-5} M, sans augmenter très significativement la toxicité envers les érythrocytes (30% d'hémolyse), alors qu'avec une solution préparée dans du DMSO, une concentration finale d'amphotéricine B de 2×10^{-6} M induit une lyse totale des globules rouges.
- 3- Lorsque le pH de la solution mère d'amphotéricine B varie de 4 à 10,8 l'activité antifongique est maintenue vis-à-vis de *C. albicans* (444 IP Institut Pasteur Paris) durant les 10 heures de suivi, pour une concentration finale de 2×10^{-6} M, par contre, à pH 3,8 l'amphotéricine B perd 50% de son efficacité envers les cellules. De plus pour une concentration finale de 2×10^{-7} M, les solutions antifongiques préparées à pH 4, 4,4 et 5, perdent jusqu'à 30% de leur activité en comparaison à une solution témoin, préparée dans du DMSO, alors qu'à pH 5,4, 7,4, 10 et 10,8 la molécule reste pleinement active envers la levure durant les 10 heures de suivi de la culture en milieu sabouraud liquide.
- 4- Les solutions mères d'amphotéricine B solubilisées à 10^{-4} M à pH5,4 ou à pH10,8 permettent la réduction de la toxicité cellulaire de la molécule envers les érythrocytes tout en maintenant l'activité antifongique vis-à-vis des levures cultivées dans du sabouraud liquide.
- 5- Lorsque le pH de la solution mère d'amphotéricine B augmente de pH3,8 à pH5,4, le coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ diminue, ce dernier passe de $409,372 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $106,404 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (aux longueurs d'ondes autour de 328nm). Or il est habituellement considéré que lorsque l'intensité du signal du dichroïsme circulaire ($\Delta\epsilon$) diminue, le taux des agrégats d'AmB baisse [(Legrand P. et coll., 1992), (Gaboriau F. et coll., 1997b)].
- 6- Lorsque le pH de la solution mère augmente de 7,4 à 10 l'amplitude de $\Delta\epsilon$ s'élève de $196,059 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ à $1295,14 \text{ Mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, aux longueurs d'ondes autour de 330nm, l'amphotéricine B serait essentiellement sous forme d'agrégats insolubles dans ces conditions de pH, puisque selon Gaboriau F. et coll., (1997a), les agrégats d'amphotéricine B sont observés aux longueurs d'ondes autour de 330nm. De plus,

l'intensité du coefficient d'extinction molaire $\Delta\epsilon$ est très importante à pH 9,5 ($1138,14\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) et pH 10 ($1295,14\text{Mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) ce qui suggère que dans ces conditions la proportion des formes agrégées est importante. D'un autre côté le coefficient d'extinction molaire chute brutalement au-delà de pH 10, dans ces conditions de pH les agrégats d'amphotéricine B semblent s'être dissociés. Ce résultat est en accord avec les travaux de Dupont G. et coll. (1977).

- 7- Pour des pH de la solution mère allant de pH 3,8 à 9,5, la proportion des agrégats insolubles est maximale (autour de 95% de l'AmB totale) alors que celle des monomères et des oligomères solubles est négligeable. En revanche, à partir de pH 10 il n'y a plus d'agrégats insolubles qui sont formés, l'AmB est essentiellement sous forme d'oligomères solubles, la proportion des monomères dans ces conditions expérimentales augmente, elle passe de 10% pour pH 10 à 20% pour un pH 10,8.
- 8- La réduction de la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains observée à pH 5,4, pourrait être due à un écrantage des formes agrégées de la molécule par les contre ions CH_3COO^- du tampon acétate/acide acétique (100mM) selon le modèle de Manning G.S. (1978), alors que celle observée à pH 10,8 serait dû à la réorganisation de l'amphotéricine B en formes solubles, qui selon Gaboriau F. et coll. (1997b), ne sont pas actives sur ce même type de cellules.
- 9- Les tests *in vivo* ont révélé que l'injection d'une solution d'amphotéricine B à raison de 1mg/kg, solubilisée à 10^{-4}M à pH 5,4 n'induit pas de perturbation notable des paramètres rénaux chez les rats Wistar, alors qu'à pH 10,8 elle induit une variation significative des concentrations sériques d'urée et de créatinine. De plus, trois injections répétées de solutions d'amphotéricine B, préparées à pH 5,4, toutes les 48 heures (à raison de 1mg/kg), ne semblent pas perturber les paramètres rénaux chez les rats Wistar par rapport au lot témoin. Il est à noter que la toxicité rénale est l'atteinte limitante d'un traitement à l'amphotéricine B (Kleinberg M. et coll., 2006).

10- Le traitement des rats Wistar infectés par la levure *Candida albicans* (444 IP Institut Pasteur Paris), par la solution d'AmB, solubilisée à 10^{-4} M dans du tampon acétate/acide acétique (100mM) à pH 5,4, à raison de 1mg/kg toutes les 48 heures, ne permet pas d'obtenir une totale efficacité chez tous les rats ; l'hémoculture est négative (0 ufc/mL) chez 50% seulement de ces rats après 9 jours.

Il ressort de notre étude que la variation du pH des solutions mères d'amphotéricine B module *in vitro* l'activité de la molécule aussi bien vis-à-vis des érythrocytes que vis-à-vis des levures. D'autre part, l'état physique de l'amphotéricine B est lui aussi modulé par cette variation de pH, en effet, l'utilisation de solutions mères d'amphotéricine B, préparées dans des milieux tamponnés à pH 5,4 et 10,8, permettent de réduire la toxicité envers les cellules animales tout en maintenant l'efficacité antifongique. De plus, à pH 5,4 l'amphotéricine B ne semble pas perturber la fonction rénale chez l'animal.

En définitive, la préparation d'une nouvelle formulation d'amphotéricine B à partir d'une solution mère tamponnée à pH 5,4 semble être une solution possible parmi d'autres. Elle a l'avantage d'être facile d'accès, peu onéreuse et qui permet une augmentation de l'index thérapeutique. Il demeure entendu que cette formulation devrait être améliorée par d'éventuelles autres modifications (notamment des conditions physico-chimiques telles que la température, la force ionique, ajout de détergents...) qui se sont par ailleurs révélées avoir des effets positifs.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- vérifier si des résultats de réduction de toxicité hépatique sont retrouvés *in vivo* chez l'animal,
- vérifier si des résultats d'activité antifongique analogues sont retrouvés *in vivo* c'est à dire chez l'animal contaminé suite à des injections répétées toutes les 24 heures.
- étendre l'étude à d'autres levures pathogènes.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Abi Said D, Anaissie E, Uzun O, Pinzkowzki H, Vartivarian S. (1997). The epidemiology of hematogenous Candidiasis caused by different *Candida species*. Clin Infect Dis 24: 1122-1128.
- 2- Adler-Moore JP, Olson JA, Proffitt RT. (2004). Alternative dosing regimens of liposomal amphotericin B (AmBisome) effective in treating murine systemic candidiasis. J Antimicrob Chemother 54: 1096-1102.
- 3- Andrès E, Courouau F, Kurtz JE, Limacher JM, Quoix E. (1995). Traitement curatif de l'aspergillose pulmonaire invasive. Rev Pneumol Clin 51 : 228-231.
- 4- Andrès E, Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R (2001). Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B Revue de la littérature. Rev Méd Interne 22 : 141-150.
- 5- Antaniadou A., Dupont B. (2005). Lipid formulations of amphotericin B: where are we today? Journal de mycologie médicale 15: 230-238.
- 6- Aseandei A. and Luchian T. (2008). Ion selectivity, transport properties and dynamics of amphotericin B channels studied over a wide range of acidity changes. Colloids and Surfaces Biointerfaces 67 : 99-106.
- 7- Atkinson AJ Jr, Bennett JE. (1978). Amphotericin B pharmacokinetics in humans. Antimicrob Agents Chemother 13 : 271-276.
- 8- Baginski M., Resat H., McCammon J.A. (1997). Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. Mol. Pharmacol 52: 560-570
- 9- Blanc I., Bueno Da Costa M. H., Bolard J., Saint-Pierre Chazalet M. (2000) Oligonucleotide delivery by a cationic derivative of the polyene antibiotic amphotericin B: Interaction oligonucleotide/vector as studied by optical spectroscopy and electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta 1464: 299-308.
- 10- Blanchet B, Huet E, Astier A, Hulin A, (2004). Suivre thérapeutique des médicaments antifongiques. Pharmacocinétique des médicaments infectieux : Revue Française des Laboratoires 365 : 39-47.
- 11- Bolard, J. (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane permeability. Biochim. Biophys. Acta 864 : 258-303.
- 12- Bolard, J. (1991) Mechanism of action of an anti-*Candida* drug: amphotericin B and its derivatives. Ed. R. Prasad, 214-23.
- 13- Bolard J., Legrand P., Heitz F. and Cybulska B. (1991). One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. Biochemistry 30 : 5707-5715.

- 14- Bolard J, Vertut-Doï A. (1995). Internalisation of amphotericin B and other polyene antifungals in mammalian cells : a possible origin of their toxicity. Drug transport of antimicrobial and anticancer chemotherapy. Marcel Dekhar Inc :307-325.
- 15- Bolard J., Joly V., Yeni P. (1997). Amphotéricine B : ancien médicament, nouveaux concepts. Médecine thérapeutique 3 : 207-213.
- 16- Boucherit Z., Bolard J., Seksek O. (2007). Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. Medical mycology 45: 525-533.
- 17- Bourin M., Lievre M., Allain H. (1993). Cours de pharmacologie. Ed. Ellipses :327-331.
- 18- Bratjburg J., Elberg S., Bolard J., Kobayashi G.S., Levy R.A., Ostlund R.E. Jr., Schlessinger D., Medoff G. (1984). Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. J. Infec. Dis. 149 : 986-997.
- 19- Bratjburg J., Elberg S., Schwartz D.R., Vertut-Croquin A., Schlessinger D., Kobayashi G. and Medoff G. (1985). Involvement of oxydative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B. Antimicrob. Agents and Chemother 27 : 172-176.
- 20- Bratjburg J., Powderly W.G., Kobayashi G.S., Medoff G. (1990a). Amphotericin B : current understanding of mechanisms of action. Antimicrob. Agents and Chemother. 34 :183-188.
- 21- Bratjburg J., Powderly W.G., Kobayashi G.S, Medoff G. (1990b). Amphotericin B delivery systems. Antimicrob. Agents and Chemother. 34 :381-384.
- 22- Bratjburg J., Bolard J. (1996). Carrier effects on biological activity of amphotericin B. Clinical Microbiology Reviews 9: 512-531.
- 23- Canuto MM, Rodero FG. (2002). Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. Lancet Infect Dis: 2:550-63.
- 24- Carbon C., Regnier B., Saimot G., Valide J.L., Yeni P. (1994). Antifongiques : données générales. Ed. Médecine Science Flammarion : 449-461.
- 25- Chéron, M., Cybulska, B., Mazerski, J., Grzybosvska, J., Czerwinski, A. and Borowski, E. (1988). Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. Biochem. Pharmacol. 37: 827-836.
- 26- Christiansen KJ, Bernard EM, Gold JW, Armstrong D. (1985). Distribution and activity of amphotericin B in humans. J Infect Dis 152 : 1037-43
- 27- Cleary JD, Chapman S, Noblan R. (1992). Pharmacologic modulation of interleukin-1 expression by amphotericin B-stimulated human mononuclear cells. Antimicrob Agents Chemother. 36 : 977-81.

- 28-Clejan S., Bittman R. (1985). Rates of amphotericin B and filipin association with sterols : a study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *The journal of biological chemistry* 260 :2884-2889.
- 29-Clements J.S., Peacock JE. (1990). Amphotericin B revisited : reassessment of toxicity. *Am. J. Med.* 88 : 522-527.
- 30-Cruz JM, Peacock JE Jr, Loomer L, Holder LW, Evans GW, Powell BL. (1992). Rapid intravenous infusion of amphotericin B : a pilot study. *Am J Med* 93 : 123-30.
- 31-Cybulska, B., Bolard, J., Seksek, O., Czerwinski, A. Borowski, E. (1995) Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene macrolide antibiotics of the heptane's group influencing the ionic selectivity of the permeability pathways formed in the red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1240: 167-178.
- 32-Czub J., Baginski M. (2006). Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol-a molecular dynamics study, *J. Phys. Chem. B* 110: 16743-16753
- 33-Debye P., Hückel E.(1923). Zur Theorie der Elektrolyte.II. Grenzesetz für die elektrische Leitfähigkeit. *Physikalische Zeitschrift* 24 (15): 305-325.
- 34-De Kruijf B., Demel R.A. (1974). Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 339 57-70.
- 35-Demaimay R., Adjou K., Lasmezas C., Lazarini F., Cherifi K., Seman M., Deslys J. P., Dormont D. (1994). Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie. *J. Gen. Virol.* 75 :2499-2503.
- 36-Denning DW. (1994). Treatment of invasive aspergillosis. *J Infect* 28 Suppl 1 : 25-33.
- 37-Dotis J., Simitsopoulou M., Dalakiouridou M., Konstantinou T., Taparkou A., Kanakoudi-Tsakalidou F., Walsh T. J., Roilides, E. (2006) Effects of Lipid Formulations of Amphotericin B on Activity of Human Monocytes against *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 50, 868-873.
- 38-Drouhet E. (1978). Antifongiques : pharmacologie clinique base de la thérapeutique. *Expansion Scientifique Française*:1187-1206.
- 39-Dupont G., Rinnert, H., Lematre, J. (1977) Etude physico-chimique de l'amphotéricine B en milieu alcalin. *Compte Rendu de l'académie des sciences Paris* 284 : 853-856.
- 40-Dupont B. (2002). Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 : 31-36.

- 41-Edwards JE, Bodey GP, Bowden RA, Buchner T, de Pauw BE, Filler SG. (1997). International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. Clin Infect Dis 25 : 43-59.
- 42-Ernst, C., Dupont, G., Rinnert, H. et Lematre, J. (1978) Effet des variations de température sur le dichroïsme circulaire, le spectre d'absorption et la diffusion Rayleigh de l'amphotéricine B en solution aqueuse et hydroalcoolique. Compte Rendu de l'académie des sciences Paris 286: 175-178.
- 43- Espada R., Valdespina S., Dea M. A., Molero G. , M. P. Ballesteros, Bola F., Torrado J. J. (2008). In vivo distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation Journal of Antimicrobial Chemotherapy: 1-7.
- 44- Gaboriau F., Cheron M., Leroy L. and Bolard J. (1997a). Physico-chemical properties of heat-induced superaggregates of amphotericin B. Biophysical chemistry 66 : 1-12.
- 45- Gaboriau F., Cheron M., Petit C. and Bolard J. (1997b). Heat-induced superaggregation of amphotericin b reduces its *in vitro* toxicity : a new way to improve its therapeutic index. Antimicrob. Agents and Chemother. 41 :2345-2351.
- 46- Gales MA, Gales BJ. (1995). Rapid infusion of amphotericin B in dextrose. Ann Pharmacother 29 : 523-529.
- 47- Gallis HA, Drew RH, Pickard W. (1990). Amphotericin B : 30 years of clinical experience. Rev Infect Dis 12 : 308-29.
- 48- Ganis, P., Avitabile, G., Mechlin-ki, W. and Schaffner, C.P. (1971) Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-Iodoacetyl derivative. J. American. Chem. Soc. 93:118.
- 49- Gagos M., Herec M., Arczewska M., Czemel G., Dalla Serra M., Gruszecki W.I.. (2008). Anomalously high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: Implications for the biological action. Biophysical Chemistry 136: 44-49.
- 50- Germaud P., Morin O., et Moreau P. (2001). Antifongiques et aspergilloses. Revue Française des Laboratoires 332 :31-36.
- 51- Goodwin SD, Cleary JD, Walawander CA, Taylor JW, Grasela TH Jr. (1995). Pretreatment regimens for adverse events related to infusion of amphotericin B. Clin Infect Dis 20 : 755-761
- 52- Groll AH, Gea-Banacloche JC. (2003). Clinical pharmacology of antifungal compounds. Infect Dis Clin North Am 17: 159-191.

- 53-Gruda I., Gauthier E., Elberg S, Bratjburg J. and Medoff G. (1988). Effects of the detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells. *Biochem. Biophys. Res Commun* 154 : 954-956.
- 54-Gruszecki W.I., Gagos M., Herec M., Kernen P. (2003). Organization of antibiotic amphotericin B in model lipid membranes. A mini review, *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8 : 161-170.
- 55-Hac-Wydro K., Dynarowicz-Latka P, Grzybowska J, Borowski E. (2005). *N*-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)—a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity *Journal of Colloid and Interface Science* 287: 476-484.
- 56-Hac-Wydro K., Dynarowicz-Latka P. (2006). Interaction between nystatin and natural membrane lipids in langmuir monolayers - The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophysical Chemistry* 123:155-162.
- 57-Hammond S.M. (1977). Biological activity of polyene antibiotics. *Progress in medical chemistry*(14). Edd. G. P. Billis and G. R. West :106-164
- 58-Hargreaves PL, Nguyen TS, Ryan R (2006). Spectroscopic studies of amphotericin B solubilized in nanoscale bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1758 : 38-44
- 59-Hartsel, S., Bolard, J. (1996) Amphotericin B: new life for an old drug. *TiPS* 17: 445-449.
- 60-Herve M., Debouzy J.C. , Borowski E., Cybulska B., Gary-Bobo C.M. (1989). The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A ³¹P-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta* 980 : 261-272.
- 61-Hung, C.T., Lam, F.C., Perrier, D.G., Souter, A. (1988) A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorial design. *Inter. J. Pharma.* 44: 117-123.
- 62-Jarzebsky A., Falkowski L. and Borowski E. (1982). Synthesis and structure-activity relationships of amides of amphotericin B. *J. Antibiot.* 35: 220-229.
- 63-Joly V, Aubry P, Ndayiragide A, Carriere I, Kawa E, Mlika-Cabanne N. (1996). Randomized comparison of amphotericin B deoxycholate dissolved in dextrose or Intralipid for the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis* 23 : 556-562.
- 64-Kan VL, Bennett JE, Amantea MA, Smolskis MC, McManus E, Grasela DM. (1991). Comparative safety, tolerance and pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate in healthy male volunteers. *J Infect Dis* 164 : 418-421.
- 65-Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, Faroudy A, Ababou A, Lazreq A, Sbihi A (2006). Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale* 16 : 16-25.

- 66-Khutorsky V. (1996). Ion coordination in the amphotericin B channel, *Biophys. J.* 71: 2984-2995.
- 67-Kleinberg M. (2006). What is the current and future status of conventional amphotericin B? *International Journal of Antimicrobial Agents* 27 : 12–16
- 68-Kikkawa F., Kojima M. and Oguchi H. (1993). Potentiating effect of amphotericin B on five platinum anticancer drugs in human *cis*-diamminedichloroplatinum(II) sensitive and resistant ovarian carcinoma cells. *Anticancer Res.*13 :891-896.
- 69-Koldin M.K., Kobayashi G.S., Bratjburg J., Medoff G. (1985). Effects of elevation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipoproteins on amphotericin B-induced toxicity in rabbits. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 28 :144-148.
- 70-Lance M.R., Washington C., Davis S.S., (1996) Evidence for the formation of amphotericin B-phospholipid complexes in Langmuir monolayers. *Pharm. Res.* 13: 1008-1014.
- 71-Lasic D.D. (1992). Mixed micelles in drug delivery. *Nature* 355 : 279-280.
- 72-Legrand, P., Romero, E.A., Cohen, E., Bolard, J. (1992) Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 36: 2518-2522.
- 73-Legrand P, Vertut-Doi A, Bolard J. (1996). Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formulations by a macrophage-like cell line. *J. Antimicrob Chemother* 37 : 519-533.
- 74-Lopez-Berestein G., Hopfer R.L. , Mehta R., Mehta K., Hersh E.M. and Juliano R.L. (1984). Liposome-encapsulated amphotericin B for the treatment of disseminated candidiasis in neutropenic mice. *J. Infect. Dis.* 150 :278-283
- 75-Mangé A., Nishida N., Milhavet O., McMahon H. E. M, Casanova D., Lehmann S. (2000). Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *Journal of Virology* 74: 3135-3140.
- 76-Manning G.S. (1978) The molecular theory of polyelectrolyte solutions with applications to the electrostatic properties of polynucleotides. *Qu Rev Biophys* 11 : 179-246
- 77-Mariné M., Espada R., Torrado J., Pastor F. J. and Guarro . J (2008). Efficacy of a new formulation of amphotericin B in a murine model of disseminated infection by *Candida glabrata*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1-4.
- 78-Martin E., Stüben A., Görz A., Weller U. and Bhakdi S. (1994). Novel aspect of amphotericin B action: accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 38 : 13-22.

- 79-Masuda H., Tanaka T., Kido A., Kusaba I. (1991). Potentiation of cisplatin against sensitive and resistant human ovarian cancer cell line by amphotericin B. *Cancer J.* 4 :119-124.
- 80-Mazurski J., Bolard J., Borowski E. (1982). Self-association of some polyene macrolide antibiotic in aqueous media. *Biochim. Biophys. Acta* 719 : 11-17.
- 81-Mazurski J., Grzybowska J., Borowski E. (1990). Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *Eur. Biophys J.* 18: 159-164.
- 82-Mazurski J., Bolard J., Borowski E. (1995). Effect of the modifications of ionizable groups of amphotericin B on its ability to form complexes with sterols in hydroalcoholic media. *Biochim. Biophys. Acta.* 1236 : 170-176
- 83-Medoff G., Valeriote F. and Dieckman J. (1981). Potentiation of anticancer agents by amphotericin B. *JNCI* 6 :131-135.
- 84-Millié, P., Langlet, J., Bergès, J., Caillet, J., Démaret, J-P. (1999) Self-association of amphotericin B in water. Theoretical energy and spectroscopy studies. *J. Phys. Chem. B* 103: 10883-10891.
- 85-Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ. (1996). The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 100: 617-623.
- 86-Petit C., Cheron M., Joly V, Rodrigues J.M., Bolard J., Gaboriau F. (1998). In-vivo therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of deoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*(42) : 779-785.
- 87-Rao T.V.G., Trivedi A. and Prasad R. (1985). Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. *Can. J. Microbiol.* 31 :322-326.
- 88-Rex JH, Bennett JE, Sugar AM, Pappas PG, Van der Horst CM, Edwards JE. (1994). A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patient without neutropenia. *N Engl J Med* ; 331 : 1325-30.
- 89-Ridente Y., Aubard J., Bolard J. (1999). Absence in amphotericin B-spiked human plasma of free monomeric drug, as detected by SERS. *FEBS letters* 446: 283-286.
- 90-Rosa G, Dell'Utri D, Conti G, Pelaia P, Cogliati A, Orsi P. (1997). Efficacy of nefopam for the prevention and treatment of amphotericin B-induced shivering. *Arch Intern Med* 157 : 1589-1592.

- 91- Rouzina, I., Bloomfield, V.A. (1996) Competitive electrostatic binding of charged ligands to polyelectrolytes: planar and cylindrical geometries. *J. Phys. Chem.* 100: 4292-4304.
- 92- Sanglard D, Odds FC. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis* 2: 73–85.
- 93- Seoane R., Minones J., Conde O., Casas, Iribarnegaray E. (1998). Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols : a monolayer study. *Bichim. Biophys. Acta* 1375 :73-83.
- 94- Seoane R., Minones J., Conde O., Casas M., Iribarnegaray E. (1999). Interaction between amphotericin B and sterols in monolayers mixed films of ergosterol–amphotericin B, *langmuir* 15 3570–3578.
- 95- Smith, S.E., Rawlins, M.D. (1973) Variability in human drug response. Butterworth, London. 154-165.
- 96- Sokol-Anderson M.L., Bratjburg J., Medoff G. (1986). Amphotericin B-induced oxydative damage and killing of *Candida albicans*. *J. Infec. Dis.*154 :76-83.
- 97- Souza L.C. , Maranhao R.C., Schreier S., Campa A. (1993). IN vitro and in vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with triglyceride-rich emulsion. *The British Society of Antimicrobial Chemotherapy* 32: 123-132.
- 98- Spiteri, M.N., Boue, F., Lapp, A., Cotton, J.P. (1997). Polyelectrolyte persistence length in semidilute solution as a function of the ionic strength. *Physica. B.* 234, 303-305.
- 99- Szindler-Reichert J., Mazerski J., Cybulska B., Grzyboska J., Borowski E. (2001) MFAME, *N*-methyl-*N*-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity : relationship between self-association and effects on red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1528: 15-24.
- 100- Te Dorsthorst D.T.A., Mouton J.W., Van Den Beukel C.J.P., Van Der Lee H.A.L., Meis J.F.G.M., Verweij P.E. (2004). Effetc of pH on the in vitro activities of amphotericin B, itraconazole and flucytosine against *Aspergillus* isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 48: 3147-3150.
- 101- Te Dorsthorst D.T.A., Verweij P.E., Meis J.F.G.M., Mouton J.W. (2005). Relashionship between in vitro activities of amphotericin B and flucytosine and pH for clinical yeast and mold isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 49: 3341-3346.
- 102- Tran-Dinh S., Herve M., Lebourguais O., Jerome M. and Wietzerbin J. (1991). Effects of amphotericin B on the glucose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* cells : studies by ¹³C-, ¹H-NMR and biochemical methods. *European Journal of Biochemistry.* 197: 271-279.

- 103- Toledo Grijalba M., Chéron M., Borowski E. Bolard J. and Schreier S. (2006). Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series. *Biochimica and Biophysica Acta.* 1760: 973-979.
- 104- Van der Horst CM, Saag MS, Cloud SA, Hamill RJ, Graybill JR, Sobel JD. (1997). Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 337 :15-21.
- 105- Vertut-Doi A., Ohnishi S.I., Bolard J. (1994). The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 38 :2373-2379.
- 106- Wasan, K.M., Rosenblum, M.G., Cheun, L., Lopez-Berestein, G. (1994) Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 38: 223-227.
- 107- Wong-Beringer, A., Jacobs, R.A., Guglielmo, B.J. (1998) Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clinical Infectious Diseases* 27: 603-618.

Résumé

L'amphotéricine B, chef de file des antifongiques polyéniques, reste jusqu'à l'heure actuelle le traitement de choix dans les mycoses profondes et systémiques. Cependant il présente une forte toxicité vis-à-vis des cellules animales, qui est liée pour une large part à son insolubilité en milieu aqueux. Dans ce milieu, trois formes de l'AmB sont en présence : les monomères solubles, les oligomères solubles et les agrégats insolubles. Plusieurs études ont montré que l'activité de l'AmB est liée à son état physique d'une part, et que ce dernier est modulé par l'environnement physico-chimique d'autre part. Le pH de la solution est l'un de ces facteurs qui peut jouer un rôle important dans l'activité de cette drogue. C'est pourquoi nous avons entrepris d'évaluer l'impact de la modulation du pH de la solution antifongique sur la toxicité sélective de la molécule d' AmB. Dans cette perspective, nous avons dans un premier temps étudié l'effet de la variation du pH des solutions d' AmB, du plus acide (pH3,8) au plus alcalin (pH10,8), sur son activité aussi bien vis-à-vis des cellules animales hôtes que vis-à-vis des levures appartenant à l'espèce *Candida albicans*, et déterminé l'état physique de l'amphotéricine B dans chaque condition de pH. Ensuite nous avons effectué des tests *in vivo* chez les rats Wistar.

Il ressort de notre étude que la toxicité de l' AmB vis-à-vis des globules rouges humains est fortement réduite lorsque la solution mère d' AmB est préparée à pH 5,4 ou 10,8 tout en maintenant l'efficacité antifongique, et que l'état d'agrégation de l'antifongique dépend du pH de la solution mère. De plus les tests *in vivo* ont montré que la solution d'AmB préparée à pH5,4 n'altère pas la fonction rénale chez l'animal.

Mots clés : antifongiques polyéniques, amphotéricine B, pH, toxicité, activité, levure, agrégats, monomères, oligomères.

Abstract

Amphotericin B, a leading polyenic antifungal, remains till now the treatment of choice in the deep and systemic mycoses. However, it has a high toxicity towards animal cells, which is linked in a large part to its insolubility in aqueous mediums. In this medium, three forms of AmB are involved: the soluble monomers, the soluble oligomers, and the ken to assess the impact of the pH modulation of the antifungal solution on the selective toxicity of the AmB molecule. In this perspective, we have first studied the effect of the pH variation of the AmB stock solutions, from the most acid (pH3,8) to the most alkaline (pH10,8), on its activity towards the host animal cells as well as towards the yeasts belonging to the species *Candida albicans*. Then we have determined the physical state of AmB in each condition of pH.

It appears from our study that the toxicity of AmB towards the human erythrocytes is greatly reduced when the stock solution of AmB is prepared at pH 5,4 or 10,8 while maintaining the antifungal efficiency, and that the state of aggregation of the antifungal depends on the pH of this. Furthermore, *in vivo* study, show that stock solution of AmB prepared at pH 5,4 didn't affect the kidney of mice wistar.

Keywords: AmB, pH, toxicity, erythrocytes, *C. albicans*

ملخص

الـ amphotéricine B ، رائدة المضادات الفطرية polyéniques، تبقى حتى الآن العلاج الاختياري للميكوزات (mycoses) العميقة والنظامية. لكن لديها سمية عالية نحو الخلايا الحيوانية و هذا يعود بنسبة كبيرة لعدم قابلية الـ AmB لذوبان في وسط مائي. في هذا الوسط ، توجد ثلاثة أشكال الـ AmB هي : les monomers القابلة للذوبان ، les oligomères القابلة للذوبان و المجاميع الغير القابلة للذوبان (agrégats). لقد بينت دراسات عديدة أن نشاط الـ AmB مرتبط بحالتها الفيزيائية من جهة ، وأن هذا الأخير معدل بالمحيط الفيزيائي والكيميائي من جهة أخرى. pH للمحلول هو واحد من العوامل التي قد تلعب دورا هاما في نشاط هذا المخدر. هذا هو السبب في أننا تعهدنا لتقييم أثر تعديل درجة حموضة محلول المضاد للفطريات على السمية الاختيارية لجزء AmB. في هذا المنظور، لقد قمنا في بداية الأمر بدراسة أثر التغيرات في pH لمحاليل AmB، من الأكثر حموضة (pH3.8) إلى الأكثر قاعدية (pH10.8)، على نشاطها تجاه الخلايا الحيوانية و تجاه الخمائر من نوع *Candida albicans*. ثم حددنا الحالة الفيزيائية لـ AmB في كل شروط pH.

ويبدو من خلال دراستنا أن سمية الـ AmB، تجاه كريات الدم الحمراء ، تنخفض إلى حد كبير عندما محلول الـ AmB الأم أعد في pH 5.4 أو 10.8 مع الحفاظ على الفعالية المضادة للفطريات ، وأن حالة تجميع المضاد للفطريات تحت تأثير درجة حموضة المحلول الأم. و من جهة أخرى تنخفض سمية الـ AmB عند فاران wistar عندما نستعمل محلول الـ AmB الأم أعد في pH5.4