

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

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEN
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MAGISTER

en Biologie Cellulaire et Moléculaire
Option : Microbiologie

par
M^{elle} BELKHERROUBI Lamia

Thème

AMPHOTERICINE B : ENVIRONNEMENT
PHYSICO-CHIMIQUE ET ACTIVITE CHEZ
Candida albicans

Soutenu le :

Devant le jury suivant :

Président :	M ^r CHABANE-SARI D.	Professeur
Promoteur :	D ^r BENYOUCEF S. M.	Docent
Co-promoteur :	M ^{me} BOUCHERIT Z.	Chargée de Cours
Examineurs :	M ^{me} MERZOUK H. M ^r BOUCHERIT K. M ^r MOUSSA-BOUDJEMA B.	Maître de Conférence Chargé de Cours Chargé de Cours

Année universitaire : 2000 - 2001

Dédicaces

A mon père et à ma mère pour tout leur amour, leur soutien et leurs encouragements,

A mon frère Kamel et à ma sœur Rim,

A ma grand mère pour l'affection qu'elle me porte,

A la mémoire de mon grand père Mokhtar Haddam,

*A la mémoire de mes grands parents paternels et de mon oncle
Abdel-Madjid Belkherroubi,*

A toute ma famille,

Ainsi qu'à tous mes amis.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au laboratoire de biochimie du département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, sous la direction de Monsieur BENYOUCEF S. M. Docent, qui m'a accueilli au sein de son équipe.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour la rigueur avec laquelle il a dirigé mon travail et la richesse inestimable de son enseignement.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame BOUCHERIT Z. Maître assistante Chargée de Cours au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr 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.

Ma gratitude va également à Monsieur CHABANE-SARI D., Professeur de biologie au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ce travail.

Monsieur BOUCHERIT K., Maître assistant Chargé de Cours au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, trouvera ici le témoignage de ma reconnaissance pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté tout au long de mon travail.

Je le remercie également pour avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

Mes vifs remerciements vont à Madame MERZOUK H., Maître de Conférence au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, ainsi qu'à Monsieur MOUSSA-BOUDJEMAA B., Maître assistant Chargé de Cours au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour leur disponibilité à juger ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à Monsieur FEKKAR B. Inspecteur Vétérinaire Chargé de Cours à la Faculté de Médecine, pour son aide, ses encouragements et sa constante disponibilité.

Je remercie Monsieur MOUSSAOUI A. Maître assistant Chargé de Cours au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour toute l'aide qu'il m'a apporté.

Je tiens également à remercier Monsieur BOUDILMI B. Directeur du laboratoire vétérinaire régionale de Tlemcen et le Professeur BENMANSOUR M. Chef du service de néphrologie au centre hospitalo-universitaire de Tlemcen, pour l'accueil bienveillant qu'ils m'ont toujours réservé.

J'adresse l'expression de mon amitié au personnel du laboratoire de biochimie au département de Biologie, Faculté des Sciences, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, ainsi qu'au personnel des laboratoires de biochimie et d'hémodialyse du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen, pour l'aide permanente qu'ils m'ont prodigué au cours de la réalisation de ce travail.

Summary:

Amphotericin B remains the drug of choice for the treatment of systemic fungal disease despite its toxicity for mammalian cells.

The major drawback to the use of amphotericin B is its insolubility in water. Amphotericin B in aqueous solution is a mixture of different species: monomers, water-soluble oligomers and aggregates.

The equilibrium between monomers and aggregates seems to play a key role in drug activity. The self-associated soluble forms of amphotericin B and the monomers were reported to be more toxic to mammalian cells than non-soluble aggregates.

On the other hand, the aggregation state of amphotericin B depends on its physicochemical environment.

In this field of research, in the present work, we study the influence of the variation of the physicochemical environment of the drug towards its activity against *Candida albicans*.

From the obtained results, it appears that the formation of aggregates or supperaggregates by the choice of solvent, or by the increase of the concentration of stock solutions, or by heating the solution at 70°C during 20 minutes, or by the utilisation of high pH, does not reduce the antifungal activity against *C. albicans*.

Key words: Amphotericin B, toxicity, solubility, physicochemical environment, amphotericin B-concentration, amphotericin B-solvent, amphotericin B-temperature, amphotericin B-pH, *Candida albicans*.

ABREVIATIONS

AmB : Amphotéricine B.

BSA : sérum albumine bovine.

DMF : Diméthyl formamide.

DMSO : Diméthyl sulfoxyde.

[S] : Concentration de la solution mère.

[Protéines] : Concentration en protéines.

SDS : Sulfate dodesyl-sodium.

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE :INTRODUCTION	1
1. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMPHOTERICINE B.....	3
2. MECANISMES D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B.....	4
3. NOUVELLES FORMULATIONS D'AMPHOTERICINE B.....	7
3.1. Les dérivés d'amphotéricine B.....	7
3.2. Micelles mixtes détergents-amphotéricine B.....	8
3.3. Formulations liposomales.....	8
3.4. Complexation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines du sérum sanguin.....	9
DEUXIEME PARTIE :MATERIEL ET METHODES	16
1. MATERIEL.....	16
2. METHODES.....	16
2.1. Préparation des solutions antifongiques.....	16
2.2. Culture et mesure de la croissance.....	16
2.2.1. Le milieu de culture.....	16
2.2.2. La culture en erlenmeyer.....	16
2.2.3. Mesure de la croissance.....	17
a. La numération cellulaire.....	17
b. La récupération des cellules par la méthode de centrifugation.....	17
c. Le dosage des protéines par la méthode de LOWRY(1951).....	17
TROISIEME PARTIE :RESULTATS ET DISCUSSION	20
A. EFFET DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION MERE	22
1. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMSO.....	25
2. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMF.....	30
3. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans de l'éthanol.....	34
4. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans du méthanol.....	38
B. EFFET DE LA NATURE DU SOLVANT	42
1. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-3} M.....	43
2. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 5.10^{-3} M.....	46
3. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-3} M.....	49
4. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 5.10^{-4} M.....	53
5. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M.....	56

C. EFFET DE LA TEMPERATURE	62
1. Effet de la température sur la solution mère d'amphotéricine B à 10^{-4} M préparée dans le DMSO.....	64
2. Effet de la température sur la solution mère d'amphotéricine B à 10^{-4} M préparée dans l'éthanol.....	70
3. Effet de la nature du solvant.....	83
4. Effet de la température sur la solution mère de Fungizone [®] préparée à 10^{-4} M dans le DMSO.....	95
D. EFFET pH	105
1. Effet du tampon carbonate/bicarbonate à pH 10.....	107
2. Effet du tampon carbonate/bicarbonate à pH 10.8.....	110
3. Effet de la variation de pH de la solution mère sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B.....	136
QUATRIEME PARTIE :CONCLUSION GENERALE	151
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	155

INTRODUCTION

Le rôle des mycoses a augmenté considérablement au cours de ces dernières décennies. De nouveaux aspects pathologiques ont été observés à la suite de l'apparition des mycoses iatrogènes et des infections hospitalières, rançon des explorations endoscopiques et des thérapeutiques modernes (antibiotiques antibactériens, corticoïdes, immunosuppresseurs, antimitotiques, radiations...).

À côté des champignons classiques, de nouveaux champignons opportunistes sont de plus en plus isolés et reconnus responsables de nouvelles pathologies. Parmi les principales causes des modifications épidémiologiques et pathologiques, il y a la prolongation de survie d'un grand nombre de patients à risque (leucémiques, cancéreux, transplantés d'organes, héroïnomanes, malades atteints de SIDA...) et la diminution de la mortalité par infection microbienne. D'autre part, les échanges intercontinentaux intensifs que nous vivons, ont rendu nécessaire la connaissance des mycoses d'importation d'origine tropicale cutanées (dermatomycoses) ou profondes systémiques (histoplasmoses, blastomycoses...).

Mais jusqu'à l'heure actuelle, on ne dispose pas encore de drogue tout à la fois efficace et démunie de toxicité dans le traitement des mycoses profondes.

La découverte en 1950 par HAZEN et BROWN de la Nystatine, polyène à activité antifongique synthétisée par les *Streptomyces*, a ouvert l'ère de l'antibiothérapie antifongique (DROUHET, 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, 1986).

Jusqu'aux années 70, le traitement des mycoses profondes reposait sur l'utilisation de l'amphotéricine B découverte en 1955 (HARTSEL et BOLARD, 1996). Mais cette molécule présente un nombre important d'effets secondaires dont fièvre, vomissements, diarrhées [(BOURIN et al., 1993), (CLEMENT et al., 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 (BOLARD et al., 1997).

Le début des années 80 a été marqué par l'apparition des azolés. Tout d'abord le miconazole dont l'utilisation a été limitée par la survenue fréquente d'effets secondaires, puis le kétoconazole et enfin les triazolés dont les deux molécules étudiées en clinique sont le fluconazole et l'itraconazole (BRYSKIER, 1999).

Contrairement à l'amphotéricine B, les azolés sont mieux tolérés (CANIAUX et al., 1984); ce qui a suscité de grands espoirs malheureusement déçus par l'apparition de cas de résistances de plus en plus fréquents (SCHOLER et POLACK, 1984). De plus, à la différence

de l'amphotéricine B qui a un caractère fongicide au moins dans certaines mycoses, les azolés sont plutôt des inhibiteurs de la croissance des cellules fongiques(CARBON et al., 1994).

C'est pourquoi, il y a actuellement un regain d'intérêt pour une aussi vieille molécule que l'amphotéricine B qui en 45 ans d'existence a l'avantage de présenter encore très peu de cas de résistances au sein d'une espèce habituellement sensible.

Le champ des applications thérapeutiques de l'amphotéricine B s'est largement étendu. Depuis 1960, plusieurs études sur l'activité de l'amphotéricine B chez les *Leishmania* ont été publiées(HARTSEL et BOLARD, 1996). L'activité de l'amphotéricine B s'étend jusqu'aux virus et plus particulièrement au VIH[(PLESKOFF et al., 1995), (PONTANI et al., 1989)]. D'autre part, l'amphotéricine B agirait comme un antiprion[(DEMAIMAY et al., 1994), (Mc KENZIE et al., 1994)].

Certaines études, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, montrent que l'amphotéricine B augmente la cytotoxicité de différents agents antitumoraux[(KIKKAWA et al., 1993), (MASUDA et al., 1991), (MEDOFF et al., 1981)].

Il semble aussi que l'amphotéricine B à des doses subléthales 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 et al., 1994).

Mais la toxicité de l'amphotéricine B a conduit depuis plusieurs années, à rechercher des solutions visant à une augmentation de son index thérapeutique ; c'est à dire de réduire sa toxicité vis à vis des cellules animales tout en maintenant son activité antifongique.

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 où 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).

Parmi les stratégies proposées et sur la base des premiers travaux de LEGRAND et al.(1992) qui ont trait à la modulation de l'environnement physico-chimique de la molécule d'amphotéricine B favorisant l'apparition de formes moins toxiques vis à vis du globule rouge, nous avons étudié dans notre travail l'effet de la modulation de l'environnement physico-chimique de l'amphotéricine B sur sa toxicité.

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 de la famille des macrolides (molécule cyclique fermée par une liaison ester interne) polyénique, synthétisée par un actinomycète le *Streptomyces nodosus* (HAMMOND, 1977).

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, 1977).

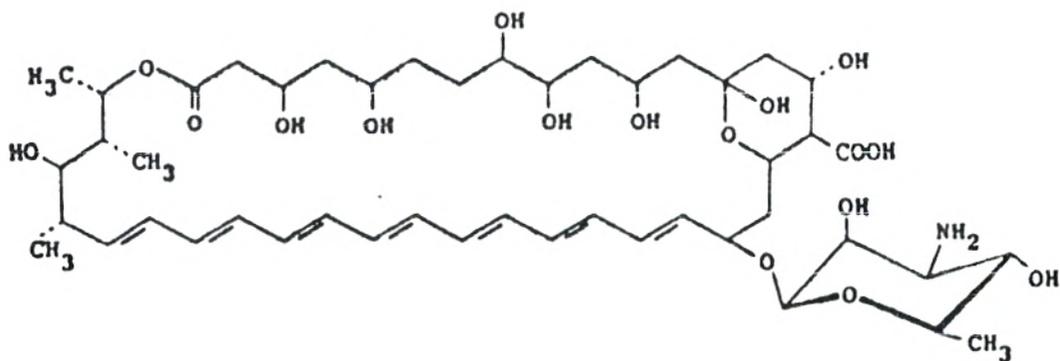


Figure N°1 : Structure de l'amphotéricine B (HAMMOND, 1977).

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, 1977).

En solution aqueuse, l'amphotéricine B est sous forme monomérique pour des concentrations inférieures à 10^{-7} M. A des concentrations plus élevées, elle s'associe sous forme d'oligomères et d'agrégats d'oligomères. Son poids moléculaire est de 960(CARPON et al., 1994).

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 et al., 1995).

2. MECANISMES D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B

Il est généralement admis que l'amphotéricine B agit par l'interaction avec les stérols membranaires(l'érgostérol chez la levure et le cholestérol chez les cellules animales), entraînant la formation de canaux transmembranaires à travers lesquels il y aura fuite des composants cellulaires essentiels[(BOLARD et MILHAUD, 1996), (BRATJBURG et BOLARD, 1996)].

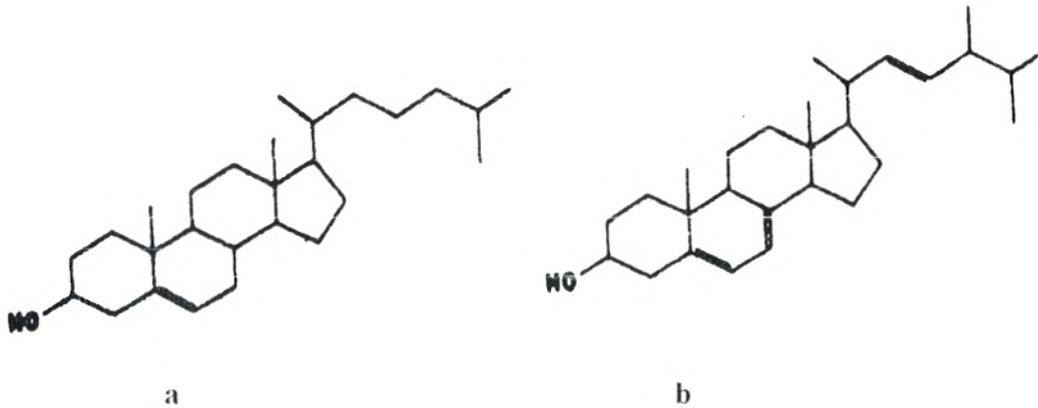
En effet, l'étude de trois souches de *Candida* résistantes à l'amphotéricine B montre que ces souches possèdent les mêmes stérols que les souches sensibles mais en concentration plus faible(SAFE et al., 1977).

D'un autre côté, l'inhibition de la synthèse du cholestérol par l'addition du kétoconazole, permet une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B envers des cellules rénales en culture(JOLY et al., 1992).

L'interaction amphotéricine B-stérol dépend de la composition membranaire en phospholipides(CLEJAN et BITTMAN, 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 et al., 1985).

L'induction par l'amphotéricine B d'une perméabilité transmembranaire au K^+ est reliée à la formation de canaux. Par ailleurs, il est apparu que l'amphotéricine B n'inhibe pas la perméabilité aux ions potassium au travers des membranes contenant du cholestérol qu'à partir d'un certain seuil de concentration(BOLARD et al., 1997). D'autre part, la formation de canaux ne nécessite pas obligatoirement la présence de stérols. L'amphotéricine B peut interagir avec les phospholipides(HARTSEL et BOLARD, 1996).

Cependant, la sélectivité de l'amphotéricine B envers les cellules fongiques est due à la grande affinité de l'amphotéricine B avec l'ergostérol membranaire[(ARCHER et GALE, 1975), (KITO et al., 1987), (SEOANE et al., 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 et al., 1990a), (BRATJBURG et al., 1990b), (HERVE et al., 1989)].



**Figure N°2 : Structure du cholestérol(a) et de l'ergostérol(b)
(BRATJBURG et al., 1990a).**

Outre la faculté de former des pores au travers de la membrane plasmique, l'amphotéricine B peroxyde les lipides[(BRATJBURG et al., 1985), (SOKOL-ANDERSON et al., 1986)], et inhibe l'action d'enzymes membranaires telles que l'ATPase à proton de *Candida* ou la Na^+/K^+ ATPase des érythrocytes(BOLARD et VERTUT-DOÏ, 1995).

Dans le sérum, l'amphotéricine B est essentiellement sous une forme liée aux lipoprotéines(BRATJBURG et al., 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 et al., 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 et al., 1985), (WASAN et al., 1994)].

La figure N°3 résume schématiquement les différents mécanismes d'action de l'amphotéricine B sur les cellules.

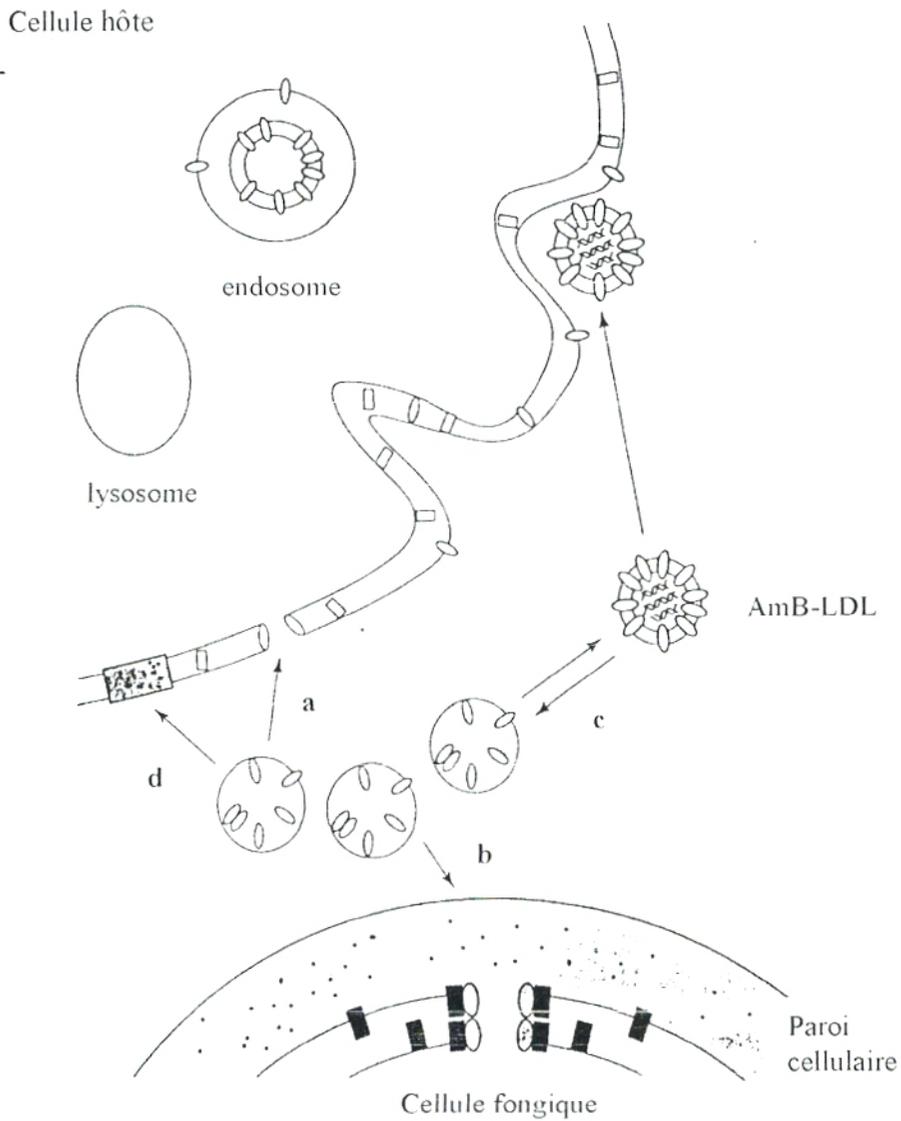


Figure N°3 : Mécanismes d'action anticellulaire de l'amphotéricine B.

- 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 et BOLARD, 1996).

○, Amphotéricine B ; □, cholestérol ; ■, ergostérol

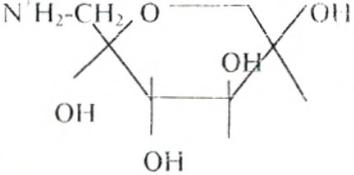
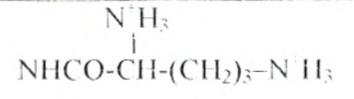
3. NOUVELLES FORMULATIONS D'AMPHOTERICINE B

3.1. Les dérivés d'amphotéricine B

Des modifications chimiques sont faites sur la molécule d'amphotéricine B 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 preparation du N-acyl, N-guanidine, N-méthyl, N-glycosyl et N-aminocyl (tableau N°1), (BOLARD, 1991).

Tableau N°1 : Structure chimique de l'amphotéricine B et de quelques-uns de ses dérivés (BOLARD, 1991).

	X	Y
Amphotéricine B (AmB)	COO ⁻	N ⁺ H ₃
Amphotéricine B méthylester (AmE)	COOCH ₃	N ⁺ H ₃
N-acétyl amphotéricine B (Ac AmB)	COO ⁻	NHC(=O)CH ₃
N-(1-désoxy-D-fructose-1-yl) amphotéricine B (N-Fru AmB)	COO ⁻	
Amphotéricine B 3-(N', N', diméthyl-amino) propylamide (AmA)	CONH(CH ₂) ₃ NH ⁺ (CH ₃) ₂	N ⁺ H ₃
N-D ornithyl amphotéricine B méthylester (OAmE)	COOCH ₃	

3.2. Micelles mixtes détergents-amphotéricine B

L'amphotéricine B injectable traditionnelle commercialisée sous le nom de Fungizone[®] depuis 1958, correspond à ce type de formulation puisque c'est un mélange d'amphotéricine B et de désoxycholate de sodium. Cette formulation est moins toxique que l'amphotéricine B pure.

Certains détergents ont été testés, tels que le sodium lauryl sulfate et le monolaurate sucrose (GRUDA et al., 1988).

D'autres détergents semblent plus intéressants *in vitro* ou sur des modèles animaux : le sulfate de cholestérol et les mélanges de lécithines et de désoxycholate (LASIC, 1992).

3.3. Formulations liposomales

L'introduction des liposomes comme transporteurs d'amphotéricine B permet une augmentation de l'index thérapeutique par rapport à l'amphotéricine B. L'amphotéricine B est ajoutée soit pendant la préparation des liposomes, soit après. La plupart des préparations montrent *in vitro*, une diminution de toxicité de l'amphotéricine B sur les cellules des mammifères, tout en conservant leur activité antifongique. *In vivo*, le nombre de préparations étudiées est plus limité, mais on observe de même que *in vitro* une réduction de toxicité permettant d'augmenter la quantité d'amphotéricine B administrée (BRATJBURG et al., 1990a).

L'équipe de LOPEZ-BERESTEIN (1984) prépare la première formulation lipidique d'amphotéricine B, ce qui a permis le développement de ces formulations en industrie pharmaceutique. En décembre 1995, le complexe lipidique amphotéricine B (ABLCL) est la première formulation lipidique produite. Un an plus tard, c'est l'ABCD (dispersion colloïdale d'amphotéricine B) qui est commercialisée. Enfin, en 1997 l'AmBisome est commercialisé (WONG-BERINGER et al., 1998).

L'augmentation de l'index thérapeutique de l'AmBisome *in vivo*, permet l'administration de doses plus importantes d'amphotéricine B par voie intraveineuse pour traiter les mycoses systémiques telles que les Candidoses, les Aspergilloses, les Blastomycoses et les Cryptococcoses, ainsi que des infections intracellulaires telles que les Leishmanioses (SPERRY et al., 1998).

Il apparaît donc que là où la réduction de toxicité permet d'augmenter nettement la dose unitaire chez l'animal et d'améliorer la survie après une dose unique, le traitement des patients par l'amphotéricine B lipidique peut être prolongé bien au-delà de la durée habituellement

admise pour la Fungizone[®], sans apparition d'une toxicité rénale ou aggravation d'une insuffisance rénale préexistante. Schématiquement, quelle que soit la formulation lipidique de l'amphotéricine B, sa toxicité est inférieure et son efficacité identique à celle de la Fungizone[®] dans le traitement des mycoses systémiques (Candidoses, Aspergilloses, Cryptococcoses), ceci pour des doses quotidiennes 3 à 6 fois plus élevées que celle de la Fungizone[®] (BOLARD et al., 1997).

Le tableau N°2 représente les caractéristiques des diverses formulations lipidiques.

Tableau N°2 : Caractéristiques des formulations lipidiques de l'amphotéricine B (BOLARD et al., 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 (7/3)	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.

3.4. Complexation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines du sérum sanguin

Les études *in vitro* sur les cellules rénales en culture (WASAN et al., 1994) et sur le globule rouge (BOUCHERIT, 1995) mettent en évidence l'effet protecteur des lipoprotéines de haute densité (HDL). Ces HDL assurent la protection du globule rouge jusqu'à des concentrations très élevées en amphotéricine B (10 μ g/ml ; 10 fois la concentration minimale inhibitrice).

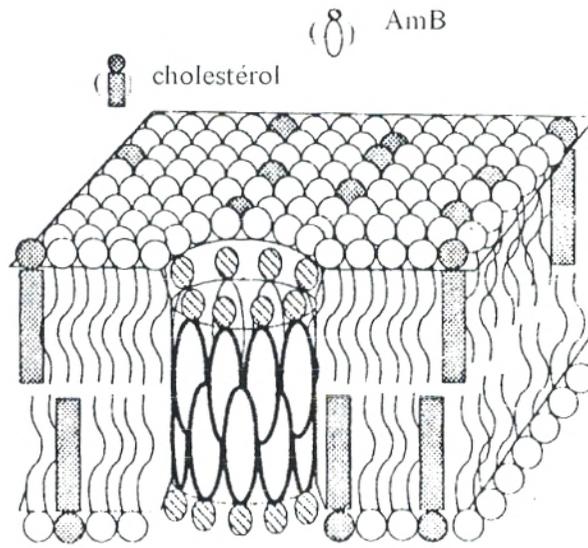
Toutefois, quel que soit le type de formulation utilisée et quel que soit le mécanisme d'action mis en œuvre, la toxicité de l'amphotéricine B est liée à l'interaction entre un certain type de forme de la molécule présente dans le milieu, avec les cellules cibles.

En effet, en solution aqueuse, l'amphotéricine B est un mélange de différentes espèces : monomères solubles, oligomères solubles et agrégats insolubles (MAZERSKI et al., 1982).

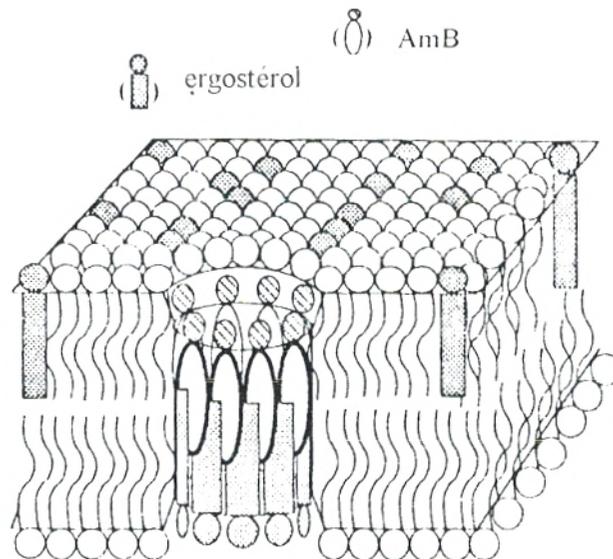
Cette information a orienté les investigations vers la détermination de la forme d'amphotéricine B qui est responsable de la toxicité cellulaire.

BOLARD et al. (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°4).

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. Le rôle essentiel du cholestérol serait alors de favoriser l'insertion de ces dimères dans la membrane en modifiant la structure physique des phospholipides (BOLARD et al., 1997).



a



b

Figure N°4 : Modèles hypothétiques illustrant les différentes possibilités de formation de canaux transmembranaires :

(a): membranes à cholestérol,

(b): membranes à ergostérol(BRATJBURG et BOLARD, 1996).

Par ailleurs, WIETZERBIN et al.(1990) démontrent que le dérivé d'amphotéricine B le moins toxique pour les cellules animales est celui qui présente le taux le plus important d'agrégats.

De ces études, il ressort clairement que c'est sous la forme d'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 la formation de ces agrégats.

D'un autre côté la sélectivité des monomères envers les cellules fongiques peut également expliquer l'augmentation de la sélectivité de l'amphotéricine B lorsqu'elle est incorporée dans les liposomes(figure N°5). Ces derniers vont jouer le rôle de réservoirs de monomères(LEGRAND et al., 1997).

Plus récemment(RIDENTE et al., 1999), il a été démontré que se sont les monomères et les oligomères qui interagissent avec les LDL.

Par conséquent, le seuil de concentration au-delà duquel l'oligomère apparaît semble déterminer l'activité de l'amphotéricine B.

Les formes lipidiques d'amphotéricine B servent alors à véhiculer les formes les moins toxiques vis à vis des cellules animales. Cependant, la préparation des différentes formulations lipidiques revient trop cher d'autant plus que les mycoses systémiques sévissent dans les pays pauvres. C'est pourquoi, nous avons été amenés à rechercher des formulations moins onéreuses.

Par ailleurs, HUNG et al.(1988) montrent que l'état d'agrégation de la molécule d'amphotéricine B est modulé par son environnement physico-chimique dont la lumière, le taux d'oxygène, la température, la force ionique et le pH.

Sur la base de nos connaissances sur la sélectivité de l'amphotéricine B liée aux formes en présence dans le milieu aqueux et sur l'influence des paramètres physico-chimiques sur l'état d'agrégation de la molécule, la tendance a été de modifier l'environnement physico-chimique de l'amphotéricine B en vue de favoriser l'apparition des formes agrégées (LEGRAND et al., 1992).

Les travaux entrepris par LEGRAND et al.(1992) montrent que lorsque la concentration de la solution mère augmente, le taux d'agrégats augmente, ce qui induit une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B envers le globule rouge. D'autre part, le taux d'agrégats dépend aussi de la nature du solvant. Il apparaît que pour une même concentration, lorsque l'amphotéricine B est dissoute dans le diméthyl sulfoxyde(DMSO) le taux d'agrégats est supérieur à celui observé lorsqu'elle est dissoute dans le diméthyl formamide(DMF).

D'autre part, le préchauffage des solutions d'amphotéricine B permet d'augmenter la taille des agrégats(ERNST et al., 1978). La formation de ces superagrégats 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 superagrégats(GABORIAU et al., 1997a). La formation de ces superagrégats diminue fortement la toxicité aussi bien *in vitro* envers le globule rouge(GABORIAU et al., 1997b) que *in vivo*(PETIT et al., 1998).

JOHNSON et al.(1978) démontrent qu'en milieu alcalin l'activité antifongique de l'amphotéricine B envers le *C. albicans* diminue.

L'étude spectroscopique de l'amphotéricine B en milieu alcalin montre que 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 pH 10. Mais il convient de signaler que l'évolution observée est globalement réversible dans le domaine du pH étudié(DUPONT et al., 1977).

D'un autre côté, BOUCHERIT(1995) montre qu'à pH acide l'effet protecteur des lipoprotéines envers le globule rouge augmente significativement.

L'ensemble de ces études aboutit à la conclusion que lorsque l'on favorise la formation des agrégats et des superagrégats par la modification de l'environnement physico-chimique de la molécule d'amphotéricine B, la toxicité aussi bien *in vitro* que *in vivo* envers les cellules animales est réduite.

Mais le problème qui reste posé est celui de savoir si en favorisant l'apparition de ces formes agrégées non toxiques pour les cellules animales, on ne réduisait pas l'activité antifongique de la molécule.

C'est pourquoi, nous avons entrepris de vérifier si dans les conditions favorisant la formation des agrégats et des superagrégats, l'amphotéricine B maintenait son activité antifongique.

Nous avons alors testé l'effet d'un certain nombre de conditions favorables à la formation de ces formes agrégées, sur la croissance de *C. albicans*, levure pathogène chez l'homme.

Dans le cadre de cette recherche, nous avons étudié les paramètres physico-chimiques suivants :

- 1- La nature du solvant dans lequel l'amphotéricine B est dissoute. Notre choix a porté sur quatre solvants organiques qui diffèrent par leur polarité : le diméthyl sulfoxyde(DMSO), le diméthyl formamide(DMF), l'éthanol et le méthanol.
- 2- La concentration de la solution mère d'amphotéricine B. Dans ce cas, les concentrations choisies varient de 10^{-2} M à 10^{-4} M d'amphotéricine B préparées dans les différents solvants(DMSO, DMF, éthanol et méthanol).
- 3- La température à laquelle la solution mère est préparée. Nous avons comparé les solutions préparées à température ambiante et celles préchauffées 20 minutes à 70°C.
- 4- Le pH. Nous avons testé différentes solutions d'amphotéricine B ayant des pH alcalins 10 et 10.8.

METHODS
ET
MATERIEL

1. MATERIEL

Pour notre étude, nous avons utilisé le *Candida albicans* ATCC 9036 (American Type Culture Collection) provenant du Laboratoire de microbiologie industrielle, faculté des Sciences, Université ROI ALAZIZ-Djeddah-Arabie Saoudite. Cette souche est maintenue par repiquage successif sur gélose sabouraud et conservée à 4°C.

2. METHODES

2.1. Préparation des solutions antifongiques

Les antifongiques polyéniques utilisés dans ce travail sont :

- L'amphotéricine B (AmB), provenant des laboratoires SIGMA.
- La Fungizone[®] qui est la forme commercialisée de l'amphotéricine B par les laboratoires SQUIBB. Elle est composée de 50% d'AmB, 38.75% de désoxycholate de sodium, 10% de phosphate disodique et de 0.887% de phosphate monosodique.

L'AmB est dissoute dans différents solvants et à différentes concentrations.

La solution d'AmB est ajoutée au milieu de culture au même moment que l'inoculum à la concentration finale de 2µg/ml.

2.2. Culture et mesure de la croissance

2.2.1. Le milieu de culture :

La culture est menée sur le milieu sabouraud liquide de composition suivante : 3g/l d'extrait de levure, 5g/l de peptone et 10g/l de glucose. Le pH du milieu est de 5.9±0.2. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes(KOENIG, 1995).

2.2.2. La culture en erlenmeyer :

Deux à trois précultures de *C. albicans* sont effectuées dans 12ml de sabouraud liquide et incubées à 37°C pendant 18 heures.

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers contenant du sabouraud liquide auquel nous avons ajouté 12ml de préculture, en absence ou en présence de solutions antifongiques(volume final de la culture est de 200ml). L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation continue.

2.2.3. Mesure de la croissance :

Toutes les deux heures un prélèvement de la culture est effectué (le premier se fait au moment de l'addition de l'inoculum et qui correspond au temps zéro), afin de suivre la croissance de la levure.

La mesure de la croissance se fait par la numération cellulaire sur la cellule de Thoma et par le dosage des protéines après récupération des cellules par la méthode de centrifugation.

a. La numération cellulaire :

La numération cellulaire se fait après dilution, sur la cellule de Thoma en présence d'un colorant vitale ; le bleu de bromothymol à 5% (POL, 1996).

b. La récupération des cellules par la méthode de centrifugation :

10ml de prélèvement sont centrifugés à 4000 tours/minute pendant 15 minutes dans une centrifugeuse JOUAN. Le surnageant est éliminé.

Les cellules sont lavées avec une solution de lavage glacée contenant du $MgCl_2$ (2mM) et du NaCl (150mM). On centrifuge une deuxième fois à 4000 tours/minute pendant 10 minutes. Les cellules sont ainsi lavées deux fois.

Le culot est ensuite resuspendu dans 300 μ l de NaOH (3N) et plongé dans un bain-marie bouillant pendant 3 minutes afin de lyser les cellules. Ensuite 50 μ l de SDS (sulfate dodesyl-sodium) à 10% sont ajoutés pour solubiliser les cellules et le tout est repris dans 2.2ml d'eau distillée. Agiter de manière à bien solubiliser les cellules (figure N°6).

La suspension de levure ainsi préparée servira pour le dosage des protéines.

c. Le dosage des protéines par la méthode de LOWRY (1951) :

Principe :

En solution alcaline, les protéines forment avec les liaisons cuivriques un complexe de couleur bleu. Ensuite le folin est réduit par les liaisons peptidiques formant un complexe d'une intensité supérieure.

Mode opératoire :

Les réactifs utilisés sont :

- Réactif 1(R1) de composition suivante : dissoudre dans de l'eau distillée 25g/l de Na_2CO_3 , et 5g/l de NaOH.
- Réactif 2(R2) de composition suivante : dissoudre dans de l'eau distillée 0.5g/l de $\text{CuSO}_4(5\text{H}_2\text{O})$ et 2.5g/l de tartrate double Na^+/K^+ .
- Réactif 3(R3) est le folin(1N) (qui est un réactif phénol).

Dans un tube à essai mélanger : 2ml de R1 + 0.6ml de R2 + 0.32ml d'échantillon.

Après agitation, l'incubation se fait à température ambiante pendant 10 minutes. Ensuite on ajoute 0.32ml de R3. Après agitation incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

La lecture de la densité optique se fait à une longueur d'onde $\lambda=750\text{nm}$ sur le spectrophotomètre SHIMADZU.

Une courbe d'étalonnage doit être établie à chaque dosage avec des solutions de BSA (sérum albumine bovine) allant de 0 à 150 $\mu\text{g/ml}$.

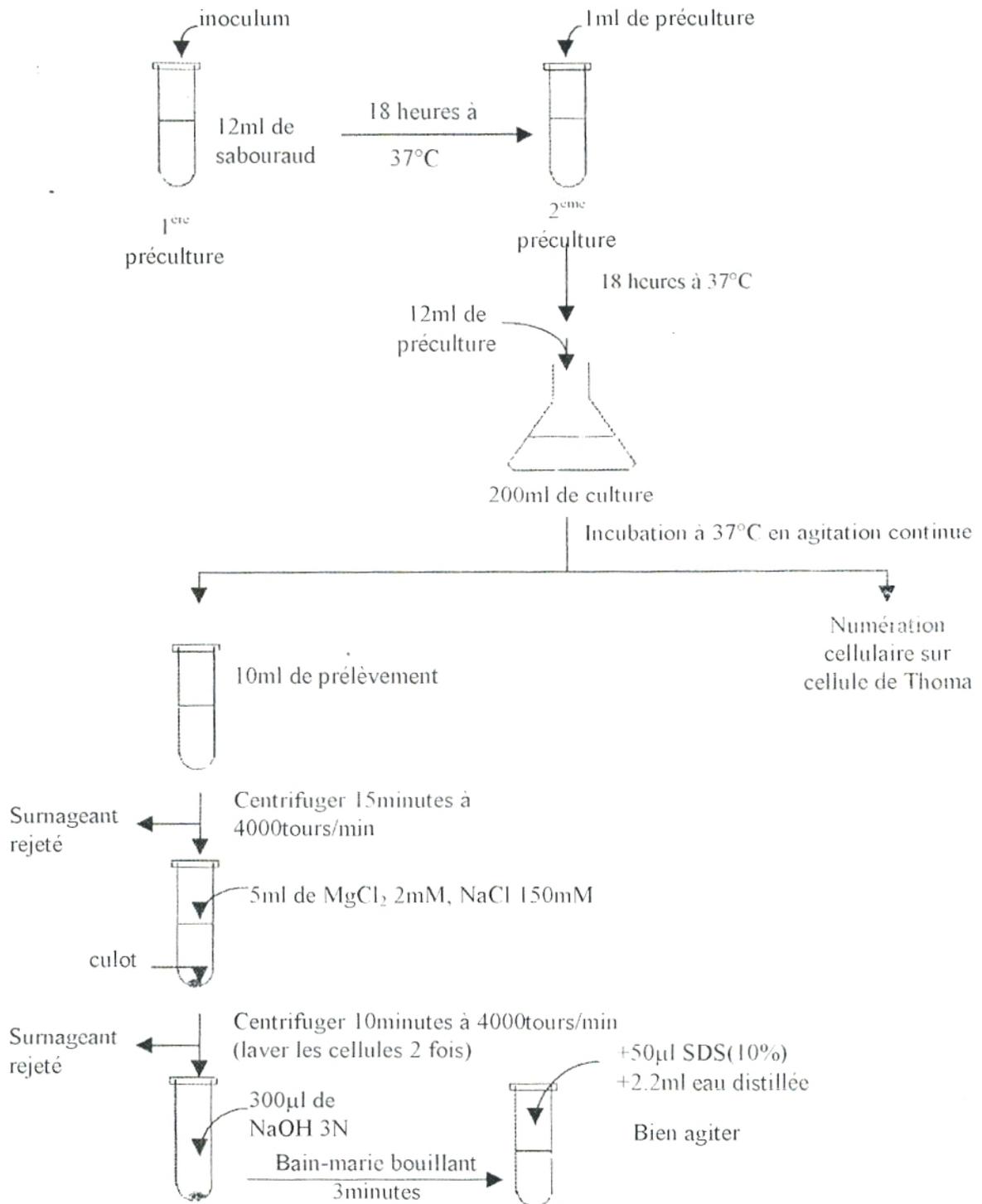


Figure N°6 : Culture et mesure de la croissance de *C. albicans*.

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

En milieu aqueux, l'amphotéricine B est faiblement soluble et elle est présente sous différentes formes : monomères et oligomères solubles, et agrégats insolubles. Il a été démontré que les agrégats se lient faiblement ou pratiquement pas au cholestérol membranaire (WIETZERBIN et al., 1990).

L'étude faite par LEGRAND et al.(1992), démontre clairement que ce sont les formes oligomériques solubles d'amphotéricine B qui sont toxiques envers le globule rouge, alors que les agrégats insolubles le sont moins.

Etant donné que se sont les agrégats d'amphotéricine B qui sont les moins toxiques vis à vis des cellules animales, il serait donc intéressant de favoriser l'apparition de ces formes avant d'injecter la molécule.

Plusieurs facteurs physico-chimiques peuvent modifier l'équilibre entre les différentes formes présentes dans le milieu aqueux. LEGRAND et al. (1992) montrent que lorsque la concentration de la solution mère d'amphotéricine B ; préparée soit dans le DMSO soit dans le DMF, augmente, cela favorise l'apparition des agrégats insolubles. Cet état d'agrégation dépend aussi du solvant utilisé.

Le taux d'agrégats est modulé non seulement par la concentration de la solution mère et par la nature du solvant, mais aussi par la température. Lorsque cette dernière atteint 70°C, il y a formation de superagrégats. Ces superagrégats sont en fait une conversion des agrégats qui vont se combiner aux monomères(GABORIAU et al., 1997a).

Des études menées *in vitro*(GABORIAU et al., 1997b) et *in vivo*(PETIT et al., 1998) avec la Fungizone[®], montrent que le préchauffage de la molécule d'amphotéricine B permet une diminution de la toxicité envers les cellules animales, ce qui permet l'administration de doses plus importantes d'amphotéricine B.

D'autres paramètres tels que le pH du milieu et la force ionique peuvent modifier l'état d'agrégation de la molécule d'amphotéricine B(HUNG et al., 1988).

Dans le cadre de ce vaste travail, nous avons envisagé d'étudier l'activité de l'amphotéricine B dans des conditions favorables à la formation d'agrégats[(DUPONT et al., 1977), (GABORIAU et al., 1997a), (LEGRAND et al., 1992)]. Le travail a été entrepris chez *Candida albicans*.

Les cultures de *C. albicans* sont menées à 37°C en agitation continue. La concentration finale d'amphotéricine B dans le milieu de culture est de 2µg/ml. Nous avons choisi cette concentration d'une part parce que la concentration minimale inhibitrice *in vitro* vis à vis du *C. albicans* est comprise entre 0.2µg/ml et 4µg/ml(HAMMOND, 1977), d'autre part pour être proche des conditions expérimentales de LEGRAND et al.(1992) où ils ont fait les mesures spectroscopiques des différentes formes d'amphotéricine B à une concentration finale de 2µg/ml(provenant des différentes solutions mères).

A. EFFET DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION MERE

L'étude de LEGRAND et al.(1992) montre que d'une part l'augmentation de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B favorise l'apparition des agrégats, d'autre part, c'est sous cette forme agrégée que l'amphotéricine B est la moins toxique vis à vis du globule rouge humain.

Dans le but de voir si en favorisant l'apparition de ces formes, l'amphotéricine B garde son efficacité vis à vis du *C. albicans*, nous avons testé une série de solutions mères à différentes concentrations, préparées dans quatre solvants différents ; le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le diméthyl formamide(DMF), l'éthanol et le méthanol. La structure de chacun de ces solvants est représentée sur le tableau N°3.

Tableau N°3 : Structure chimique des solvants utilisés.

DMSO (acétone)	DMF (amide)	Ethanol (alcool)	Méthanol (alcool)
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{S}=\text{O} \\ \diagup \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{N} - \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C} - \text{C}-\text{OH} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$

L'amphotéricine B présente des seuils de solubilité différents en fonction du solvant utilisé. Le seuil de solubilité dans le DMSO est de 30 à 40mg/ml, dans le DMF il est de 4mg/ml(BUDAVARI et al., 1996), alors que dans l'éthanol et dans le méthanol il est de 1mg/ml ;solubilité que nous avons obtenu facilement.

Les solutions mères d'amphotéricine B sont préparées aux concentrations suivantes :

- 10^{-2}M , $5 \cdot 10^{-3}\text{M}$, 10^{-3}M , $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ et 10^{-4}M dans le DMSO et dans le DMF.
- 10^{-3}M , $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ et 10^{-4}M dans l'éthanol et dans le méthanol.

Les solutions ainsi préparées sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C, pendant 18 heures avant leur utilisation pour assurer une meilleure solubilité et une bonne stabilité.

Dans les expériences menées dans le présent travail, au temps t_0 , on ajoute à la culture de *C. albicans*, à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$, l'amphotéricine B provenant des différentes solutions mères. La croissance de la levure est suivie jusqu'à la phase stationnaire. Une culture à laquelle aucune addition n'est effectuée sert de témoin.

Pour tester l'innocuité des solvants, une série de culture contrôle est menée en ajoutant des volumes de solvants correspondant aux volumes des solutions mères ajoutées.

Pour les concentrations de solutions mères allant de 10^{-2}M à 5.10^{-4}M , nous observons que quel que soit le solvant utilisé, le volume ajouté n'induit pas de modification de la croissance de la levure. Les courbes représentant l'évolution du nombre de cellules en fonction du temps après addition de ces solvants, sont parfaitement superposables à la courbe témoin sans aucune addition. Il n'y a pas d'inhibition de la croissance (courbes non représentées). Par contre à 10^{-4}M , on observe que le DMSO n'induit aucune modification de la croissance alors que le DMF produit une inhibition du nombre de cellules de 10%. L'éthanol et le méthanol induisent quant à eux 25% d'inhibition du nombre de cellules. La figure N°7 représente l'effet des solvants à 10^{-4}M d'AmB en solution mère sur la croissance de *C. albicans*, croissance qui est suivie par la numération cellulaire.

1. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMSO

Les figures N°8 et N°9 représentent l'effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°8 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°9.

- La courbe(a) de la figure N°8 représente la culture témoin sans aucune addition. Nous observons après l'incorporation de l'inoculum au temps zéro, que la levure passe par une phase de latence de 2 heures qui se caractérise par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de cellules au bout de 8 heures d'incubation. Ce taux reste constant durant une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation.
- Les courbes(b), (c), (d), et (e) de la figure N°8 représentent respectivement la croissance de la levure en présence d'AmB provenant de solutions mères à $10^{-2}M$, $5.10^{-3}M$, $10^{-3}M$ et $5.10^{-4}M$, la concentration finale d'antifongique étant de $2\mu g/ml$. Nous observons après l'addition de l'inoculum et de la solution d'antifongique que la phase de latence se prolonge jusqu'à 10 heures d'incubation. La croissance est totalement inhibée(100% d'inhibition).
- La courbe(f) de la figure N°8 représente la croissance de la levure en présence d'AmB provenant de la solution mère à $10^{-4}M$ (la concentration finale d'AmB étant de $2\mu g/ml$). Nous remarquons que la levure est en phase stationnaire jusqu'à 6 heures d'incubation. Ensuite, le nombre de cellules augmente peu pour atteindre les 10% au bout de 8 heures. La levure est ensuite en phase stationnaire où le nombre de cellules est constant. Le taux d'inhibition est de 90%

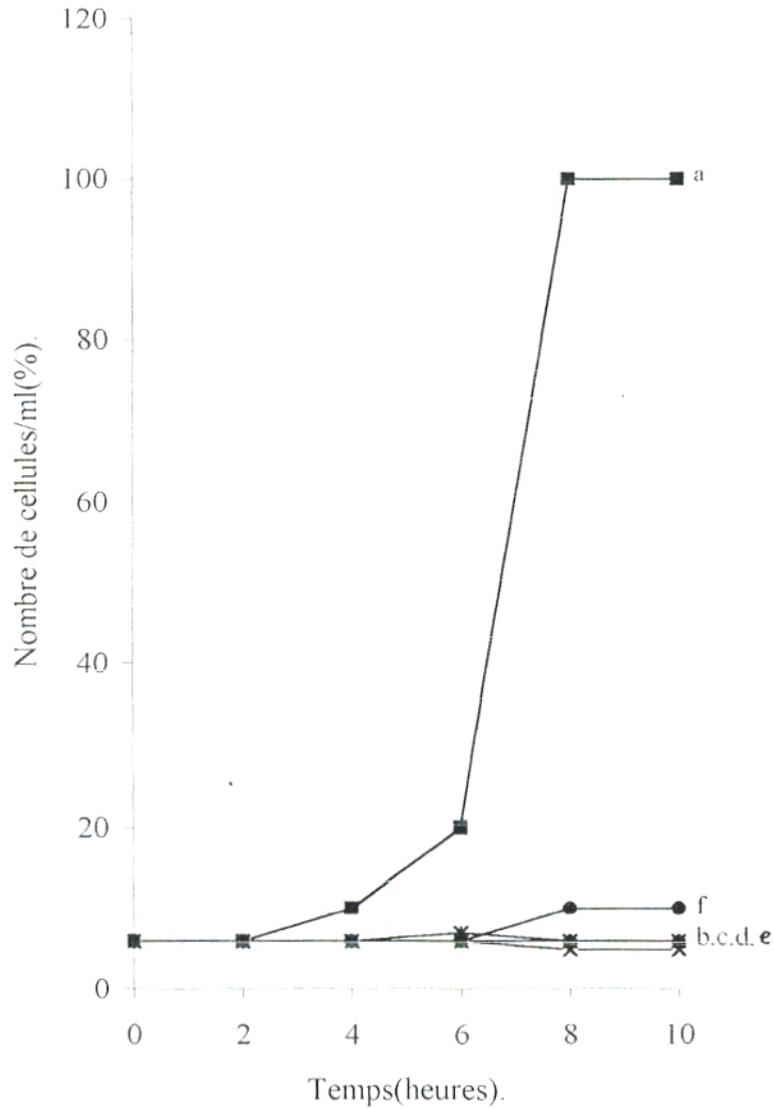


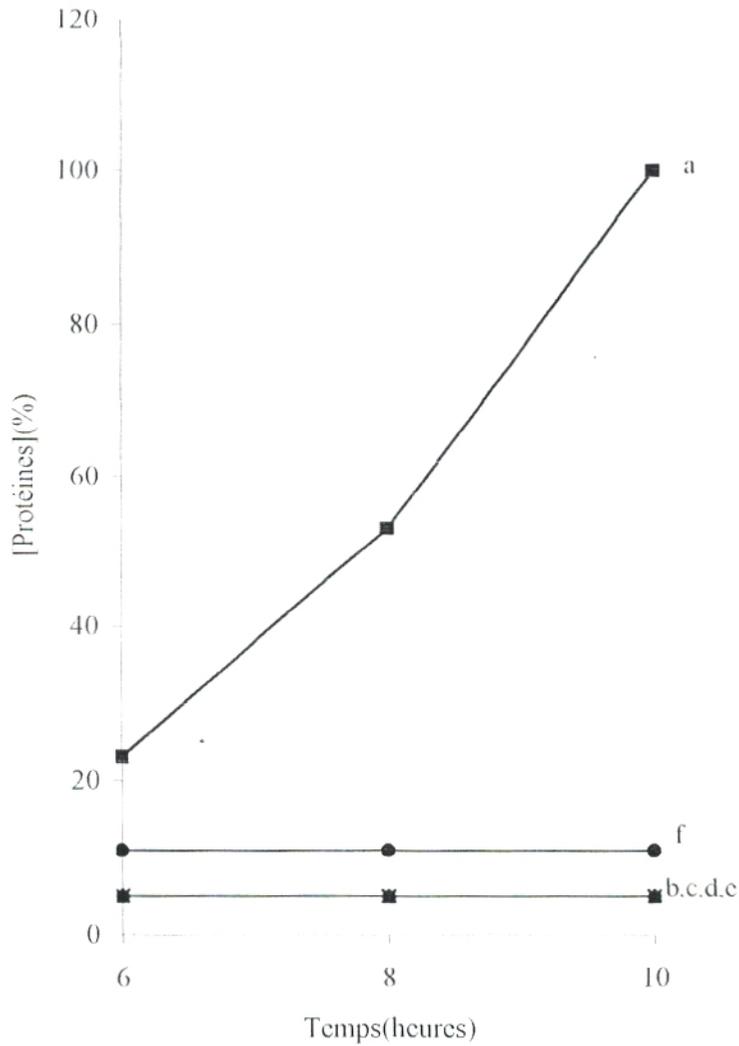
Figure N°8: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml.

- Courbe (a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-2} M d'AmB/DMSO
- ▲ Courbe (c) : [SM] à $5 \cdot 10^{-3}$ M d'AmB/DMSO
- × Courbe(d): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/DMSO
- * Courbe(e): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB/DMSO
- Courbe(f): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO

La masse protéique est suivie à partir de la phase exponentielle de la levure correspondant à la culture témoin c'est à dire à partir de 6 heures d'incubation. Elle est représentée sur la figure N°9.

- La courbe(a) représente la culture témoin sans aucune addition. Nous remarquons que la masse protéique augmente de façon exponentielle allant de 20% en 6 heures d'incubation pour atteindre le taux maximum(100%) au bout de 10 heures d'incubation.
- Les courbes(b), (c), (d), et (e) représentent l'effet des concentrations d'AmB en solutions mères à $10^{-2}M$, $5.10^{-3}M$, $10^{-3}M$ et $5.10^{-4}M$. Le taux de protéines est constant, atteignant seulement 5%. L'inhibition est totale.
- La courbe(f) représente l'effet de la solution mère à $10^{-4}M$ d'AmB. Le taux de protéines est de 10%. L'inhibition de la masse protéique est de 90%.

Il ressort que l'évolution de la masse protéique dépend du nombre de cellules en culture.



FigureN°9: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml.

- Courbe(a): Témoin
- Courbe(b): [SM] à 10^{-2} M d'AmB/DMSO
- ▲— Courbe(c): [SM] à $5 \cdot 10^{-3}$ M d'AmB/DMSO
- ×— Courbe(d): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/DMSO
- *— Courbe(e): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB/DMSO
- Courbe (f): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO

D'après les résultats que nous avons obtenus, quelle que soit la concentration de la solution mère variant de 10^{-2} M à 5.10^{-4} M, l'AmB utilisée à $2\mu\text{g/ml}$ reste totalement active sur le *C. albicans*. Mais à 10^{-4} M, l'AmB perd seulement 10% de son activité. Ainsi, la dilution de la solution mère d'un facteur de 100 ; de 10^{-2} M à 10^{-4} M, n'induit qu'une faible perte d'efficacité de l'AmB.

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus avec le *Saccharomyces cerevisiae* (BENYACOUB et HACHEMI, 1998). Dans cette étude, c'est la Fungizone[®] qui a été testée à des concentrations de solutions mères variant de 10^{-2} M à 10^{-5} M d'AmB dans le DMSO et à une concentration finale de $5\mu\text{g/ml}$. Il en ressort que plus la concentration de la solution mère augmente, plus la toxicité vis à vis du *S. cerevisiae* augmente.

En ce qui concerne la toxicité vis à vis des cellules animales, les travaux de LEGRAND et al.(1992) montrent que lorsque la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO augmente, le taux d'agrégats augmente et la toxicité vis à vis du globule rouge diminue. En revanche, c'est à la concentration de la solution mère de 10^{-4} M (à $2\mu\text{g/ml}$ en concentration finale) qu'il y a apparition d'un taux maximum de monomères et d'oligomères solubles et un maximum de toxicité de l'AmB vis à vis du globule rouge.

D'un autre côté, en ce qui concerne l'activité antifongique de l'AmB, de nos résultats il ressort clairement que lorsque nous favorisons l'apparition des agrégats par augmentation de la concentration de la solution mère, l'activité antifongique de l'AmB vis à vis du *C. albicans* est maintenue.

2. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans le DMF

Les figures N°10 et N°11 représentent l'effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMF sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire(figure N°10) et par l'évolution de la masse protéique(figure N°11).

- Les courbes(a) des figures N°10 et N°11 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b), (c) et (d) des figures N°10 et N°11 représentent l'effet des solutions mères d'AmB aux concentrations de 10^{-2} M, $5 \cdot 10^{-3}$ M et 10^{-3} M respectivement(la concentration finale d'AmB étant de $2 \mu\text{g/ml}$). Nous remarquons un prolongement de la phase de latence jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition de la croissance est totale(100%). La masse protéique reste également constante(courbe 11b, 11c et 11d) ; elle est aux environs de 10%. L'inhibition est totale.
- Les courbes(e) des figures N°10 et N°11 représentent l'effet de la solution mère à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB. Dans ce cas le nombre de cellules reste constant pendant 6 heures, ensuite il y a une légère augmentation du nombre de cellules qui atteint 10% au bout de 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition est de 90%. La masse protéique(courbe 11e) est autour de 10%. Ce taux ne diffère pas du taux obtenu avec les concentrations allant de 10^{-2} M à 10^{-3} M.
- Les courbes(f) des figures N°10 et N°11 représentent l'effet de la solution mère à 10^{-4} M d'AmB. Nous remarquons que le nombre de cellules(courbe 10f) reste constant pendant 4 heures prolongeant ainsi la phase de latence de 2 heures par rapport au témoin(courbe 10a). Ensuite, la levure se multiplie lentement jusqu'à atteindre un maximum de 10% de cellules. L'inhibition est de 90%. Mais cette inhibition de la croissance est due en partie au DMF seul, où l'on remarque sur la courbe(i) de la figure N°10(qui le représente) que le nombre de cellules évolue de la même manière que le témoin(courbe a) mais n'atteint qu'un taux maximum autour de 90%. L'inhibition due au solvant seul est de 10%. Par conséquent, l'inhibition induite par l'AmB seule n'est que de 80%. La masse protéique représentée par la courbe(f) de la figure N°11, évolue de façon à atteindre un maximum de 20% au bout de 8 heures d'incubation. La masse protéique est parallèle au nombre de cellules.

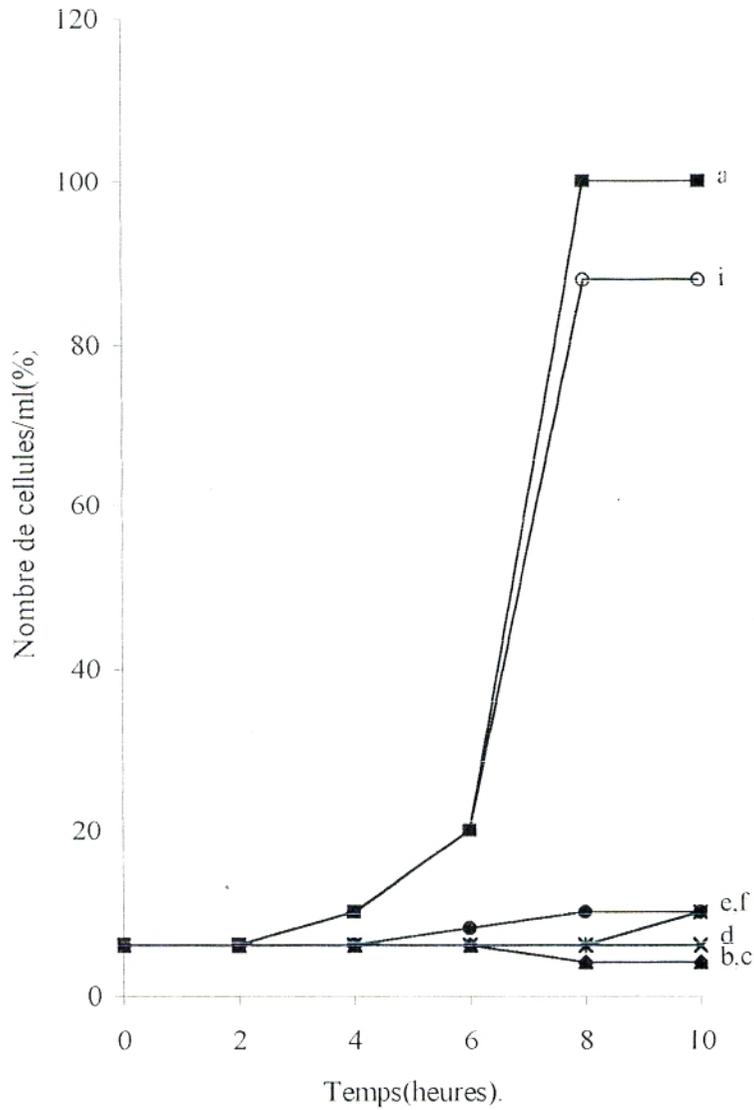
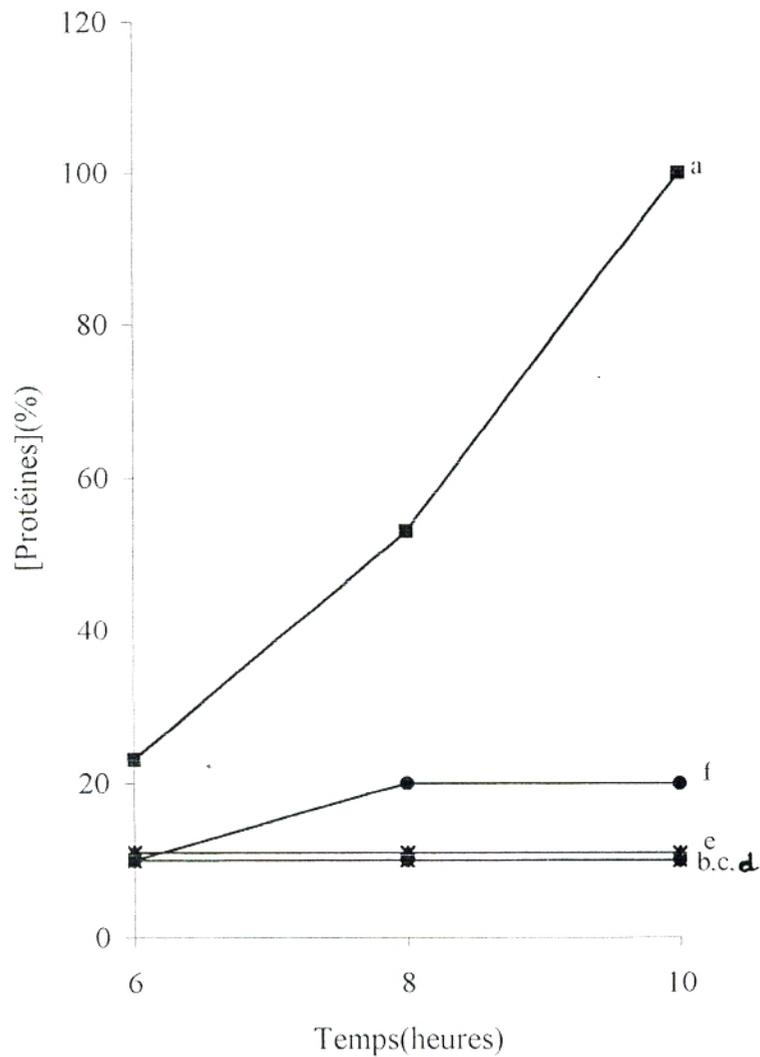


Figure N°10: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMF, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml.

- Courbe(a): Témoign
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-2} M d'amB/DMF
- ▲— Courbe(c): [SM] à $5 \cdot 10^{-3}$ M d'AmB/DMF
- ×— Courbe(d): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/DMF
- *— Courbe(e): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB/DMF
- Courbe(f): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMF
- Courbe(i): Contrôle DMF(volume de DMF ajouté correspondant au volume de la [SM] à 10^{-4} M)



FigureN°11: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMF, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-2} M d'AmB/DMF
- ▲— Courbe(c): [SM] à $5 \cdot 10^{-3}$ M d'AmB/DMF
- ×— Courbe(d): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/DMF
- *— Courbe(e): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB/DMF
- Courbe(f): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMF

Les résultats que nous avons obtenus, montrent que la diminution de la concentration de la solution mère de 10^{-2} M à 10^{-4} M n'induit qu'une faible diminution de l'efficacité de l'AmB vis à vis du *C. albicans* ; de 20% seulement. En effet, lorsque la concentration de la solution mère varie de 10^{-2} M à 10^{-3} M, il y a 100% d'inhibition, alors que lorsqu'elle passe à 5.10^{-4} M, il y a une perte d'activité de 10%. Cette perte est plus importante lorsque la concentration passe à 10^{-4} M d'AmB ; elle est de 20%.

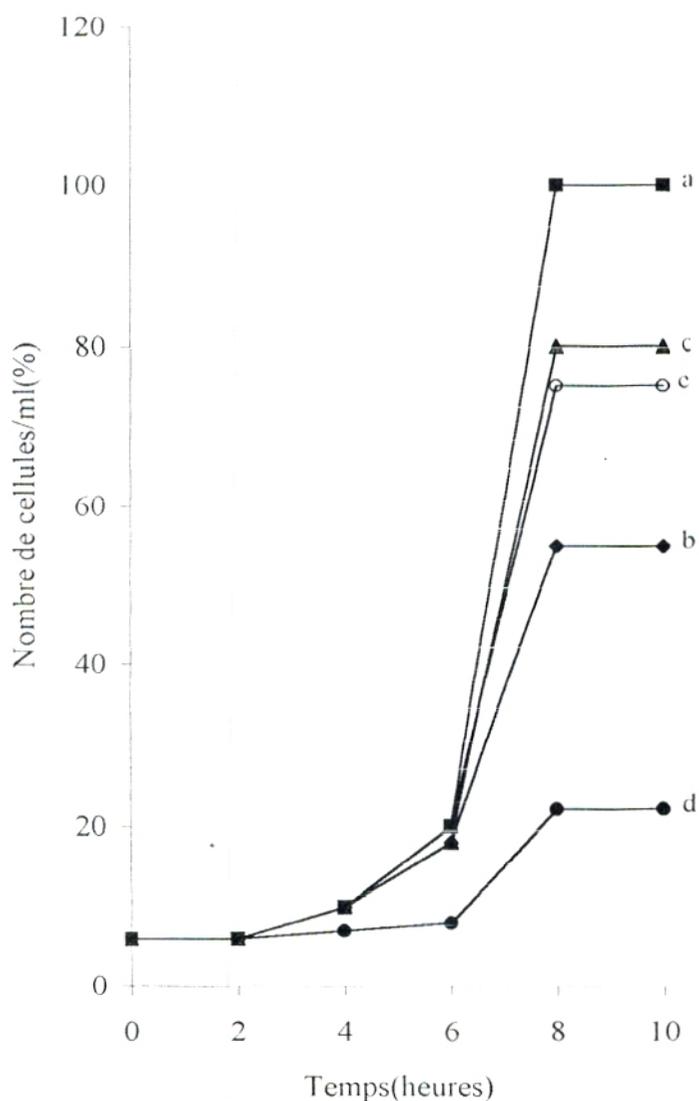
Nos résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par BENYACOUB et HACHEMI(1998) sur le *S. cerevisiae*, d'après lesquels l'augmentation de la concentration de la solution mère de Fungizone[®] préparée dans le DMF (la concentration finale étant de 5µg/ml) induit une augmentation de l'activité antifongique vis à vis de la levure.

D'après les travaux de LEGRAND et al.(1992), on sait que l'augmentation de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le DMF favorise l'augmentation du taux d'agrégats et la diminution de toxicité cellulaire. D'un autre côté, à 10^{-4} M (la plus faible concentration) l'AmB est uniquement sous forme de monomères et d'oligomères solubles, et la toxicité vis à vis du globule rouge est au maximum. Par ailleurs, les résultats que nous avons obtenus montrent qu'en favorisant la formation de ces agrégats, l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans* est maintenue et que c'est à 10^{-4} M d'AmB en solution mère, où la molécule est uniquement sous forme de monomères et d'oligomères solubles (aucune proportion d'agrégats) que l'AmB perd 20% de son activité antifongique.

3. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans de l'éthanol

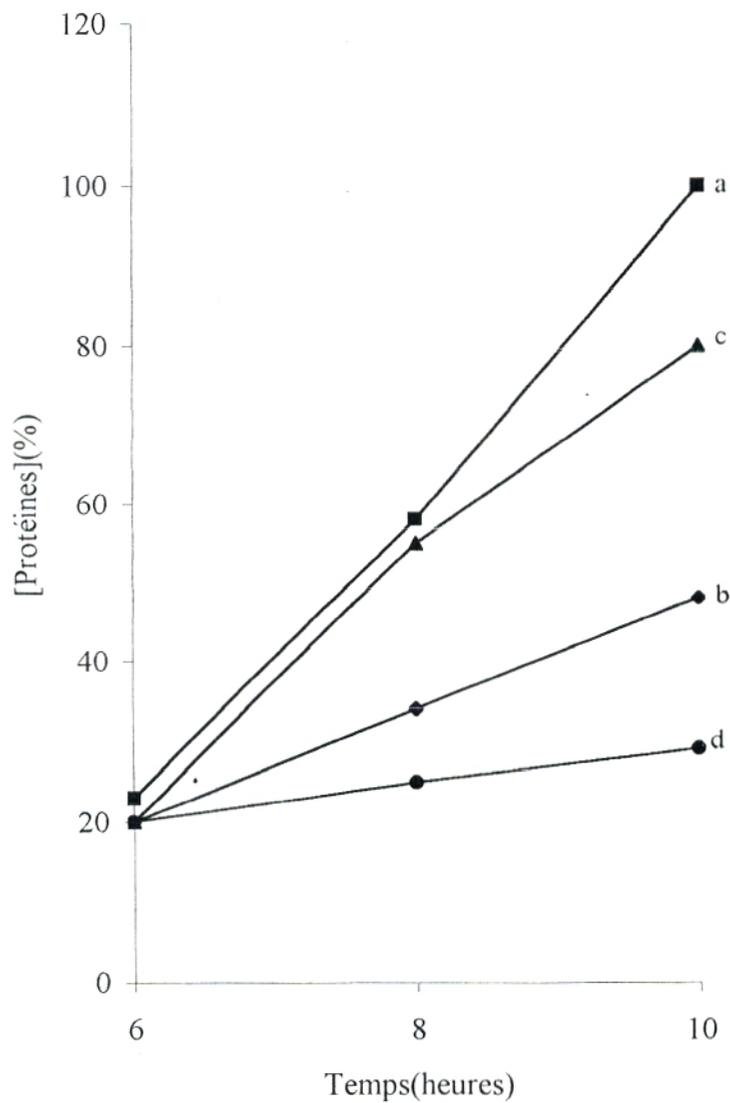
L'effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans l'éthanol, sur la croissance de *C. albicans* est représenté sur les figures N°12 et N°13, où elle est suivie par la numération cellulaire et par le dosage de la masse protéique respectivement.

- Les courbes(a) des figures N°12 et N°13 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°12 et N°13 représentent l'effet de la solution mère d'AmB à la concentration de 10^{-3} M (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$). Nous remarquons que le nombre de cellules augmente (courbe 12b) après une phase de latence de 2 heures identique à celle du témoin (courbe 12a), de façon exponentielle jusqu'à atteindre un maximum autour de 55% au bout de 8 heures d'incubation. Le taux d'inhibition est de 45%. L'évolution de la masse protéique représentée par la courbe 13b, est parallèle au nombre de cellules. Elle atteint un taux maximum de près de 50% en fin de croissance.
- L'effet de la solution mère à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB est représenté sur les courbes(c) des figures N°12 et N°13. Dans ce cas, après 2 heures de phase de latence, le nombre de cellules (représenté par la courbe 12c) augmente jusqu'à atteindre les 80% au bout de 8 heures d'incubation. Ensuite, il se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition est de 20%.
La masse protéique représentée par la courbe 13c évolue de la même manière que les cellules et elle atteint un maximum de 80% au bout de 10 heures de croissance.
- Les courbes(d) des figures N°12 et N°13 représentent l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M. Dans ce cas, après 2 heures d'incubation le nombre de cellules (représenté par la courbe 12d) augmente lentement et atteint les 20% au bout de 8 heures d'incubation. La masse protéique (courbe 13d) suit le nombre de cellules ; elle est de l'ordre de 30% en fin de croissance. Il faut préciser dans ce cas que l'inhibition de la croissance n'est pas due uniquement à un effet de l'AmB, mais à un effet combiné à celui de l'éthanol ; en effet l'éthanol seul est responsable de 25% d'inhibition du nombre de cellules comme nous pouvons le remarquer sur la courbe(e) de la figure N°12. Par conséquent, l'inhibition propre à l'AmB peut dans ce cas être estimée à environ 50%.



FigureN°12: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans l'éthanol, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2 μ g/ml.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/Ethanol
- ▲— Courbe(c): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB/Ethanol
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol
- Courbe(e): contrôle Ethanol(volume ajouté correspondant au volume ajouté de la [SM] à 10^{-4} M)



FigureN°13: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans l'éthanol, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2 μ g/ml.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/Ethanol
- ▲— Courbe(c): [SM] à 5.10^{-4} M d'AmB/Ethanol
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol

D'après les résultats que nous avons obtenu, nous constatons que lorsque la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans l'éthanol passe de $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ à 10^{-3}M (la concentration finale étant de $2 \mu\text{g/ml}$), l'activité antifongique augmente. Ainsi, l'augmentation de la concentration de la solution mère entraîne une augmentation de l'activité antifongique. Mais c'est à 10^{-4}M d'AmB où la solution mère est la plus diluée que nous observons une meilleure activité de l'AmB.

Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus avec la Fungizone[®] sur le *S. cerevisiae* par BENYACOUB et HACHEMI(1998). Ces auteurs remarquent que la diminution de la concentration de la solution mère de Fungizone[®] jusqu'à 10^{-5}M (la concentration finale étant de $5 \mu\text{g/ml}$) induit une diminution de l'activité antifongique.

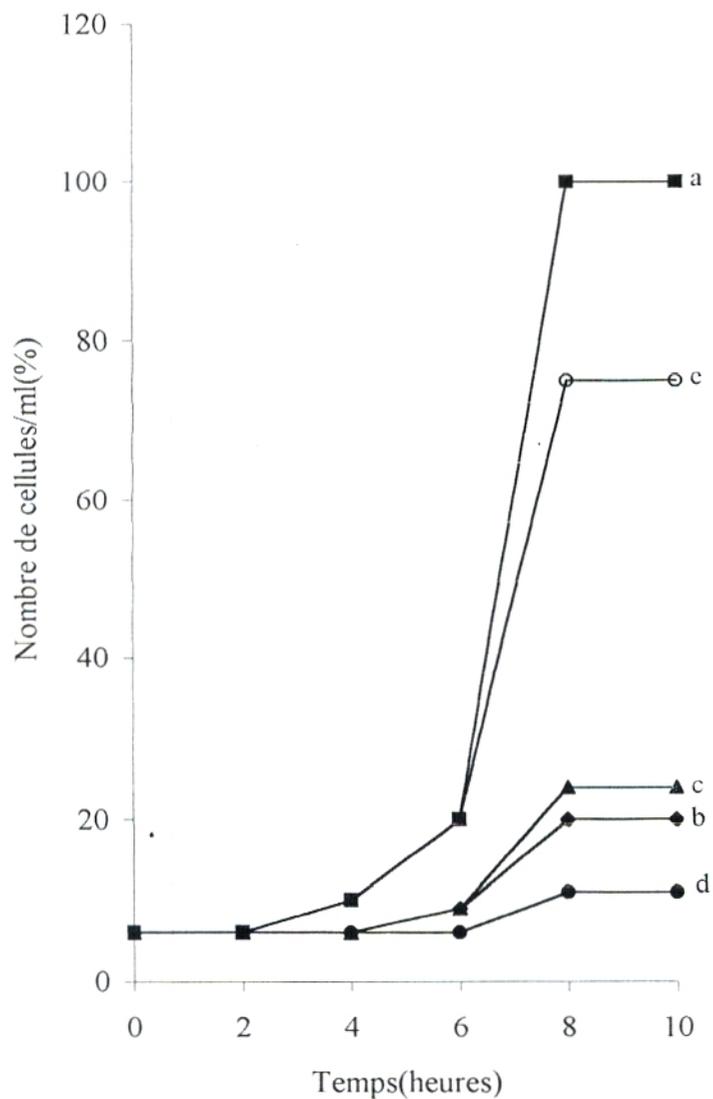
Par contre, les travaux menés *in vivo* par SOULIMANE (étude en cours au sein de notre laboratoire), montrent que lorsque la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans une solution hydroéthanolique à 30% est de 10^{-4}M , il y a une protection des souris alors qu'à 10^{-3}M il y a une augmentation de la toxicité vis à vis de ces souris qui se manifeste par diverses modifications des paramètres biologiques pouvant conduire jusqu'à la mort de l'animal.

Lorsque la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans l'éthanol augmente de $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ à 10^{-3}M , la toxicité vis à vis du *C. albicans* augmente. Par contre, lorsque nous passons à la concentration la plus diluée qui est de 10^{-4}M , nous observons un maximum d'activité antifongique. Cet effet est peut être lié à l'action combinée de l'AmB à une quantité élevée d'éthanol qui induit d'importantes perturbations.

4. Effet de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B préparée dans du méthanol

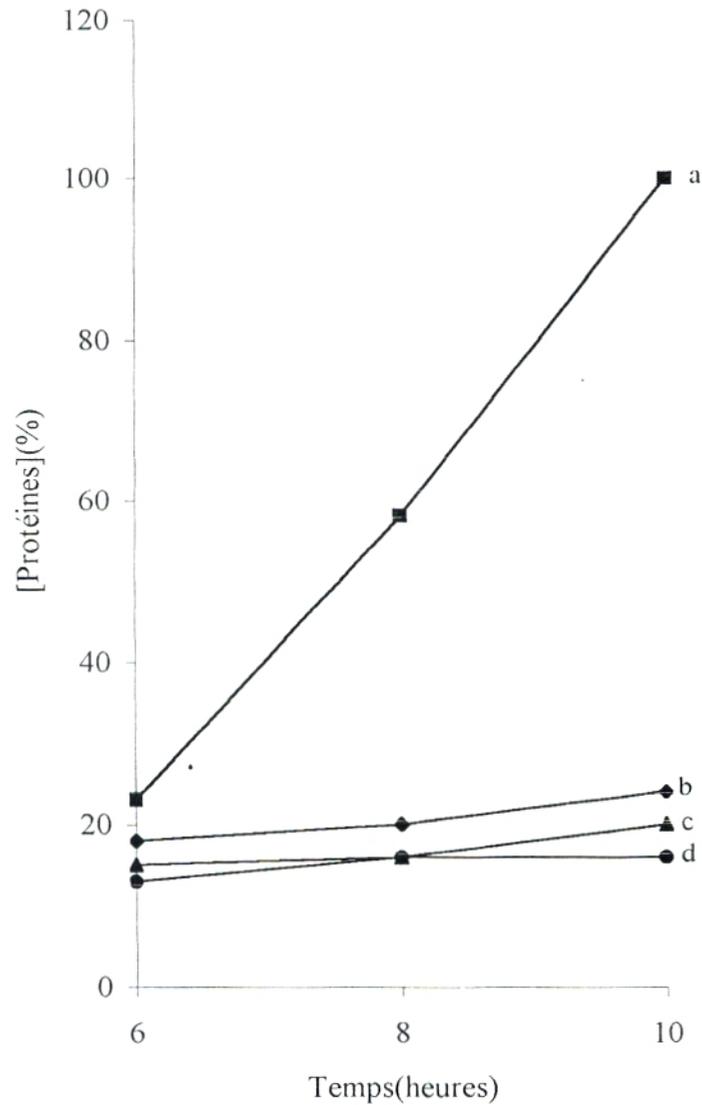
Les figures N°14 et N°15 représentent l'effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le méthanol sur la croissance de *C. albicans*, mesurée par la numération cellulaire (figure N°14) et par le dosage des protéines (figures N°15).

- Les courbes(a) des figures N°14 et N°15 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°14 représente l'effet de la solution mère d'AmB à $10^{-3}M$ (la concentration finale étant de $2\mu g/ml$). Nous observons que la phase de latence est identique à celle du témoin, ensuite le nombre de cellules augmente pour atteindre 20% au bout de 8 heures d'incubation. Le taux d'inhibition dans ce cas est de 80%.
- L'effet de la solution mère d'AmB à $5.10^{-4}M$ (la concentration finale étant de $2\mu g/ml$) est représenté par la courbe(c) de la figure N°14. Le nombre de cellules après une phase de latence de 2 heures, augmente jusqu'à atteindre un taux de l'ordre de 25%. L'inhibition est alors de 75%.
- Les courbes(b) et (c) de la figure N°15 représentent l'effet des concentrations de $10^{-3}M$ et de $5.10^{-4}M$ d'AmB en solution mères respectivement sur l'évolution de la masse protéique. Nous remarquons que le taux de protéines après 10 heures d'incubation est de l'ordre de 25% pour les deux concentrations ($10^{-3}M$ et $5.10^{-4}M$).
- Les courbes(d) des figures N°14 et N°15 représentent l'effet de la concentration de $10^{-4}M$ d'AmB en solution mère. Le nombre de cellules (courbe 14d) est constant pendant 6 heures prolongeant ainsi la phase de latence de 4 heures par rapport au témoin sans aucune addition ou au contrôle auquel a été ajouté le méthanol seul (courbe 14e). Ensuite, le nombre de cellules augmente pour atteindre 10% au bout de 8 heures d'incubation et se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures. Le taux de protéines (courbe 15d) est de l'ordre de 15% en fin de croissance. Il faut noter que l'inhibition induite par cette solution mère n'est pas uniquement due à l'AmB seule. L'inhibition de la croissance induite par le méthanol seul à cette concentration est représentée par la courbe(e) de la figure N°14. Il y a 25% d'inhibition au bout de 8 heures d'incubation. Par conséquent, le taux d'inhibition propre à l'AmB peut être dans ce cas estimé à 65%.



FigureN°14: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le méthanol, sur la croissance de *C. albicans* ; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-3} M d'AmB/Méthanol
- ▲— Courbe(c): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}$ M d'AmB/Méthanol
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Méthanol
- Courbe(e): contrôle Méthanol(volume ajouté correspondant au volume de [SM] à 10^{-4} M ajouté)



FigureN°15: Effet de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le méthanol, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-3}M d'AmB/Méthanol
- ▲ Courbe(c): [SM] à $5 \cdot 10^{-4}\text{M}$ d'AmB/Méthanol
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4}M d'AmB/Méthanol

Les résultats que nous avons obtenus montrent que plus la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans le méthanol augmente, plus la toxicité vis à vis du *C. albicans* augmente. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la Fungizone[®] testée sur le *S. cerevisiae* (BENYACOUB et HACHEMI, 1998). Dans cette étude, différentes concentrations de Fungizone[®] allant de 10^{-3} M à 10^{-4} M préparées dans le méthanol ont été testées, la concentration finale étant de 5µg/ml.

Il apparaît alors que, lorsque nous favorisons la formation des agrégats par l'augmentation de la concentration de la solution mère d'AmB préparée dans du méthanol, nous augmentons la toxicité vis à vis du *C. albicans*.

D'après les résultats obtenus dans cette première partie de l'étude, il ressort que plus la concentration de la solution mère augmente plus la toxicité vis à vis du *C. albicans* augmente et cela aussi bien avec le DMSO, le DMF, l'éthanol ou le méthanol utilisés comme solvants. Cette observation n'est pas très marquée avec le DMSO ou le DMF parce qu'à la concentration finale utilisée (2µg/ml), l'activité antifongique est quasi maximale. En revanche avec les alcools, cette différence d'activité est frappante. Mais la solution mère d'AmB à 10^{-4} M préparée dans de l'éthanol ne semble pas suivre ce raisonnement, puisque à cette concentration qui est la plus faible par rapport à 10^{-3} M ou à $5 \cdot 10^{-4}$ M, on observe la plus forte inhibition de la croissance de *C. albicans*. Cet effet est peut être dû à une toxicité induite par la quantité élevée d'éthanol ajoutée, et qui causerait d'importantes perturbations.

D'un autre côté, l'étude menée par LEGRAND et al. (1992) sur le globule rouge montre que plus la concentration de la solution mère augmente, plus la fuite du potassium (K^+) diminue et par conséquent se sont les formes les plus diluées qui sont les plus toxiques vis à vis du globule rouge. Ces mêmes observations sont faites avec la Fungizone[®] (SOKRANE et SOUIDI, 1998). Par conséquent, en favorisant la formation des agrégats par l'augmentation de la concentration de la solution mère (LEGRAND et al., 1992), non seulement il y a protection du globule rouge mais aussi une augmentation de l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*.

B. EFFET DE LA NATURE DU SOLVANT

Les travaux de LEGRAND et al.(1992) ont montré que d'une part les agrégats sont les moins toxiques vis à vis du globule rouge, d'autre part, leur apparition dépend de la concentration de la solution mère, enfin, pour une même concentration d'amphotéricine B en solution mère, le taux d'agrégats varie en fonction de la nature du solvant.

Sur la base de ces données, nous avons étudié l'effet de l'amphotéricine B dissoute dans quatre solvants différents sur la croissance de *C. albicans*.

Les concentrations des solutions mères d'amphotéricine B choisies sont les suivantes :

- 10^{-2} M ; les solvants utilisés sont le DMSO et le DMF.
- 5.10^{-3} M ; ce sont le DMSO et le DMF qui ont été utilisés comme solvants.
- 10^{-3} M ; le DMSO, le DMF, l'éthanol et le méthanol qui sont utilisés.
- 5.10^{-4} M ; les quatre solvants sont utilisés(DMSO, DMF, éthanol et méthanol).
- 10^{-4} M ; les quatre solvants sont utilisés(DMSO, DMF, éthanol et méthanol).

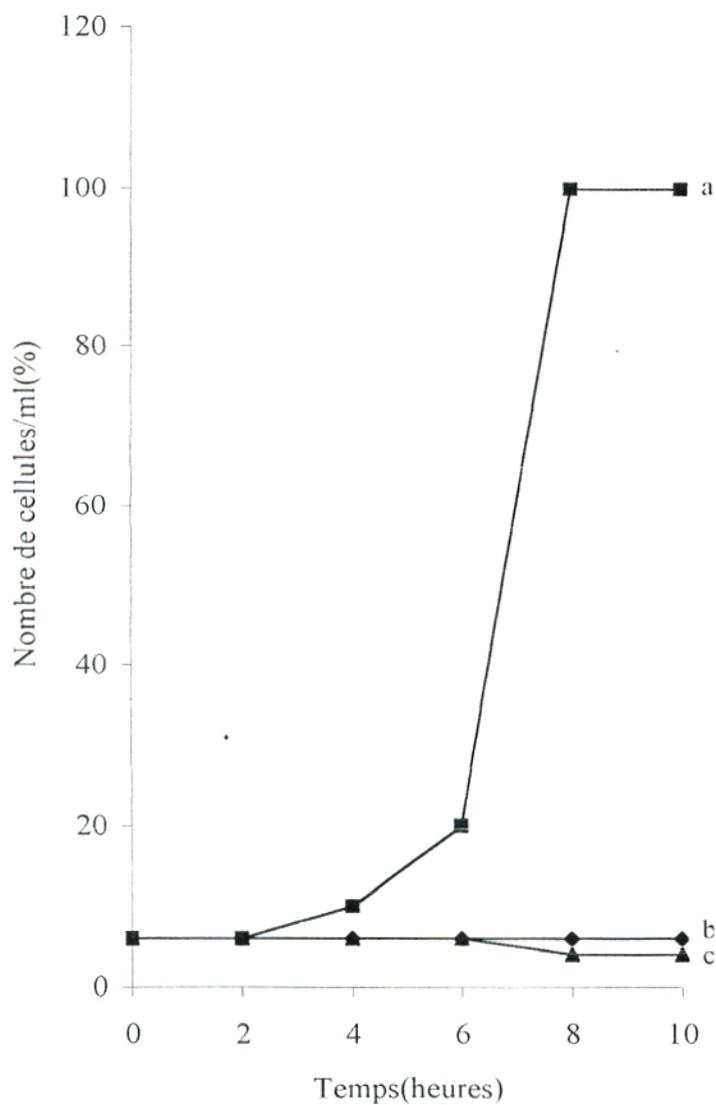
Les solutions mères ainsi préparées sont conservées à l'abri de la lumière à 4°C pendant 18 heures afin de permettre une meilleure stabilité et une bonne solubilisation de la molécule d'amphotéricine B.

Les solutions antifongiques sont ajoutées au même moment que l'inoculum à une concentration finale d'amphotéricine B de 2µg/ml. La croissance est suivie jusqu'à la phase stationnaire.

1. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-2} M

L'effet de la nature du solvant à 10^{-2} M d'AmB en solution mère (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$) sur la croissance de *C. albicans* est représenté sur les figures N°16 et N°17. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°16 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°17.

- Les courbes(a) des figures N°16 et N°17 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°16 représente l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO. Nous remarquons que le nombre de cellules reste constant durant les 10 heures d'incubation, prolongeant ainsi la phase de latence de 8 heures par rapport au témoin. L'inhibition est totale (100%). La masse protéique représentée par la courbe 17b, est elle aussi constante ; elle est de 5%.
- Les courbes(c) des figures N°16 et N°17 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le DMF. Il n'y a pas de modification du nombre de cellules de départ. L'inhibition est de 100%. La masse protéique est de 10%. Elle est deux fois supérieure à celle obtenue avec le DMSO. L'inhibition étant totale avec le DMSO et le DMF, cette différence du taux protéique peut être due à l'accumulation de déchets cellulaires lorsque la croissance est menée en présence de DMF.



FigureN°16: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à 10^{-2} M, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF

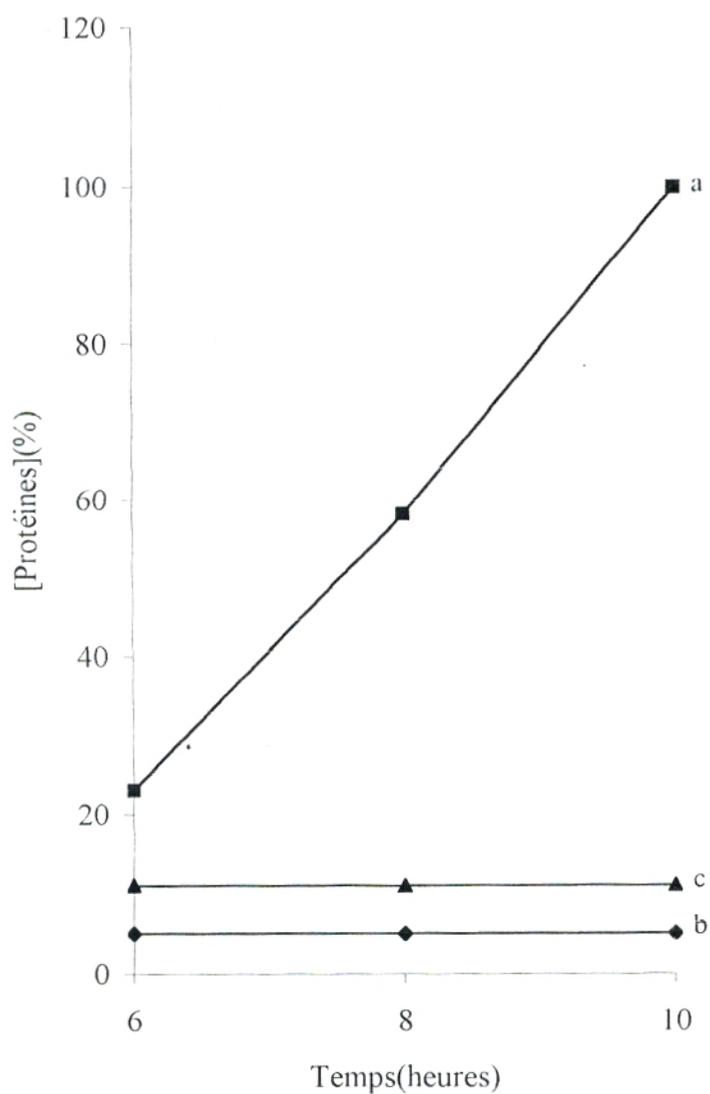


Figure N°17: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à 10^{-2} M, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoignage
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF

Il apparaît d'après ces résultats, qu'il n'y a pas de différences significatives de l'action de l'AmB lorsqu'elle est dissoute soit dans le DMSO soit dans le DMF. L'activité antifongique vis à vis du *C. albicans* est totale(100% d'inhibition).

Nos résultats sont en accord avec l'étude menée sur le *S. cerevisiae*(BENYACOUB et HACHEMI, 1998). En utilisant de la Fungizone[®] à 10^{-2} M d'AmB préparée dans du DMSO et dans du DMF(5µg/ml final), il apparaît que la croissance de la levure est inhibée à 100% aussi bien avec le DMSO qu'avec le DMF.

Lorsque la concentration de la solution mère est de 10^{-2} M, il n'y a pas de différences significatives dans l'activité antifongique de l'AmB sur la croissance de *C. albicans*, que la molécule soit dissoute dans le DMSO ou dans le DMF.

2. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 5.10^{-3} M

Les figures N°18 et N°19 représentent l'effet du DMSO et du DMF à 5.10^{-3} M d'AmB en solution mère(la concentration finale étant de 2µg/ml), sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°18 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°19.

- Les courbes(a) des figures N°18 et N°19 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°18 et N°19 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le DMSO. Nous remarquons que le nombre de cellules reste constant prolongeant la phase de latence jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition de la croissance est de 100%. La masse protéique est constante ; elle est de 5%.
- L'effet de la solution mère préparée dans le DMF est représenté par les courbes(c) des figures N°18 et N°19. Il n'y a pas de modification du nombre de cellules. L'inhibition est totale(100%). La masse protéique est autour de 10% en fin de croissance. Elle est supérieure à celle obtenue avec le DMSO, malgré le fait qu'il y ait une inhibition totale de la croissance aussi bien avec le DMSO qu'avec le DMF. Cette différence peut être due à une accumulation de déchets cellulaires dans le milieu.

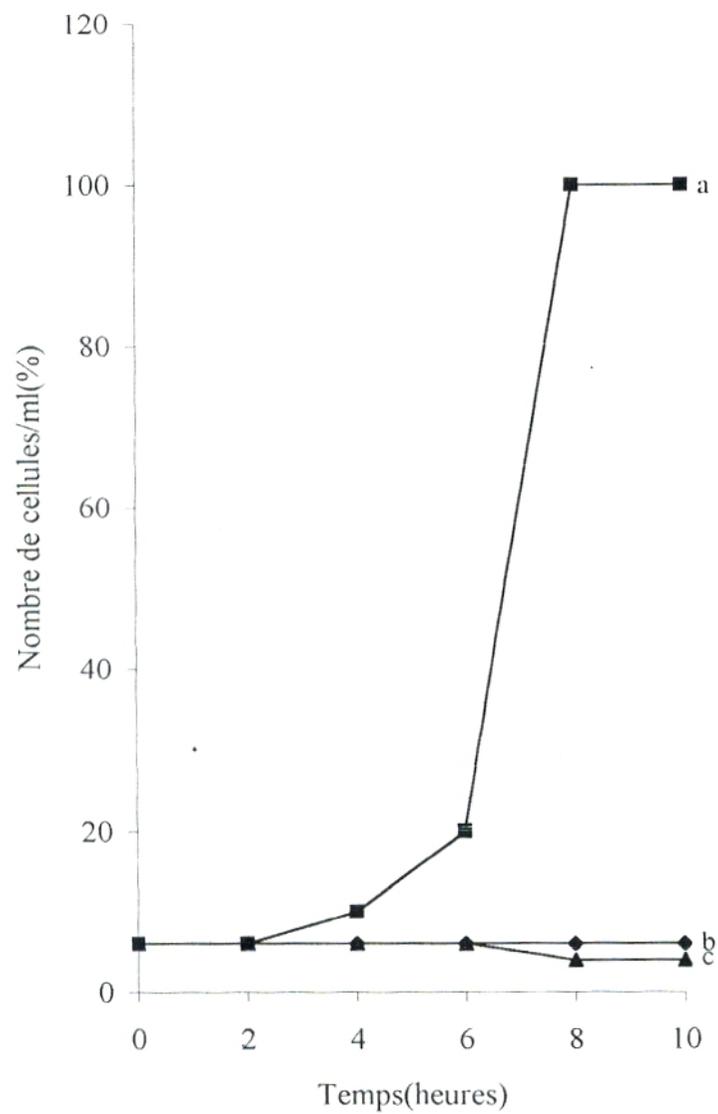


Figure N°18: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à $5.10^{-3}M$, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu g/ml$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): DMSO
- ▲ Courbe(c): DMF

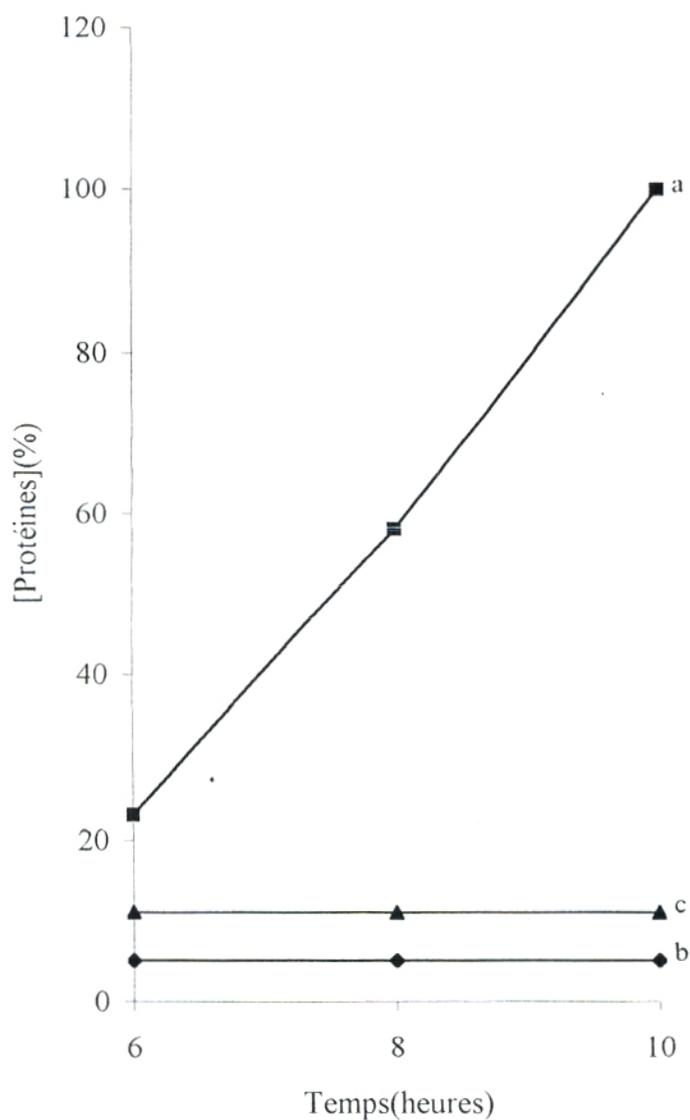


Figure N°19: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à $5 \cdot 10^{-3} M$, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant à $2 \mu g/ml$.

- Courbe(a): Témoign
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF

Il ressort de ces résultats que l'activité antifongique de l'AmB vis à vis du *C. albicans* est identique lorsque la solution mère est préparée soit dans le DMSO soit dans le DMF. L'AmB en solution mère de $5 \cdot 10^{-3} \text{M}$ préparée aussi bien dans le DMSO que dans le DMF, induit une inhibition totale de la croissance (100% d'inhibition).

3. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B **- préparée à 10^{-3}M**

L'effet des solvants à 10^{-3}M d'AmB en solution mère (la concentration finale étant de $2 \mu\text{g/ml}$), sur la croissance de *C. albicans* est représenté sur la figure N°20 où la croissance est suivie par la numération cellulaire et sur la figure N°21 où elle est suivie par la mesure de la masse protéique.

- Les courbes(a) des figures N°20 et N°21 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) et (c) de la figure N°20 représentent respectivement l'effet de la solution mère préparée dans le DMSO et celle préparée dans le DMF. Le nombre de cellules introduites au départ reste constant durant les 10 heures d'incubation. L'inhibition de la croissance est totale (100%). Le taux de protéines représenté par les courbes(b) et (c) de la figure N°21 est de 5% et 10% pour le DMSO et le DMF respectivement.
- La courbe(d) de la figure N°20 représente l'effet de l'éthanol. Après une phase de latence de 2 heures identique à celle du témoin (courbe a), nous remarquons que la levure se multiplie rapidement et que le nombre de cellules atteint les 55% au bout de 8 heures d'incubation. Ensuite, il se stabilise dans une phase stationnaire qui va jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition est de 45%. La masse protéique représentée par la courbe(d) de la figure N°21 est autour de 20% en 6 heures d'incubation et atteint les 50% en fin de croissance.
- Les courbes(e) des figures N°20 et N°21 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le méthanol. Nous remarquons que la phase de latence est prolongée de 2 heures par rapport au témoin (courbe a) ; elle est de 4 heures. Ensuite le nombre de cellules augmente pour atteindre un maximum de 20% après 8 heures d'incubation, et se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 80%. Le taux de protéines est autour de 25% en fin de croissance.

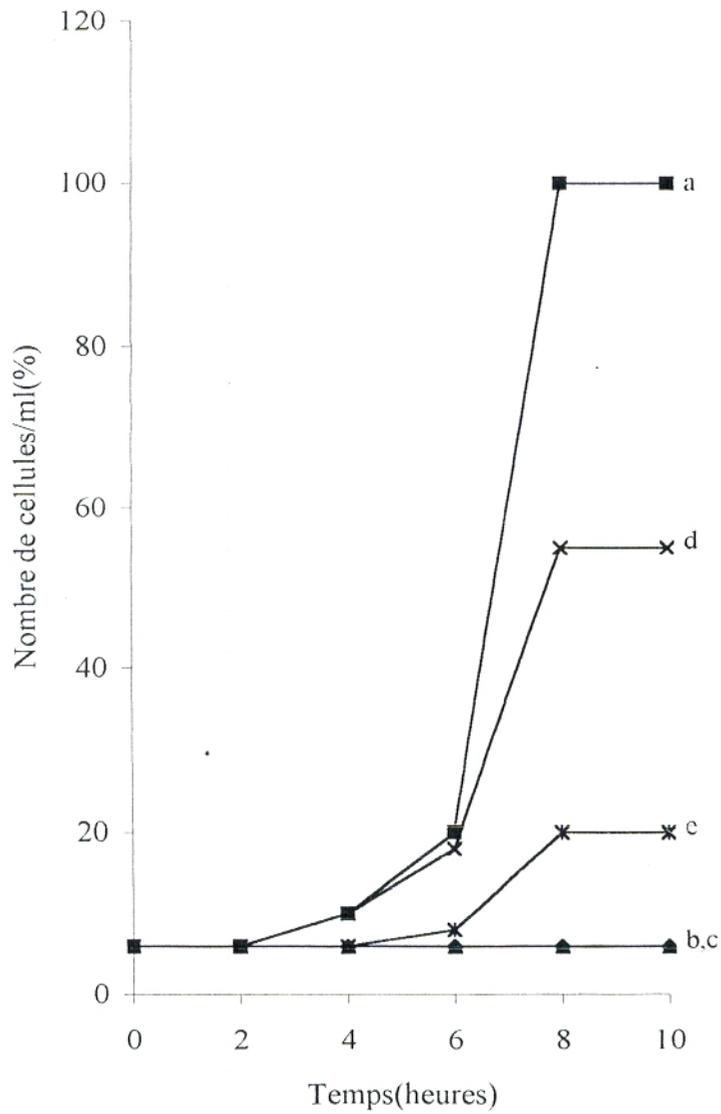


Figure N°20: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à 10^{-3} M, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoins
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF
- ×— Courbe(d): Ethanol
- *— Courbe(e): Méthanol

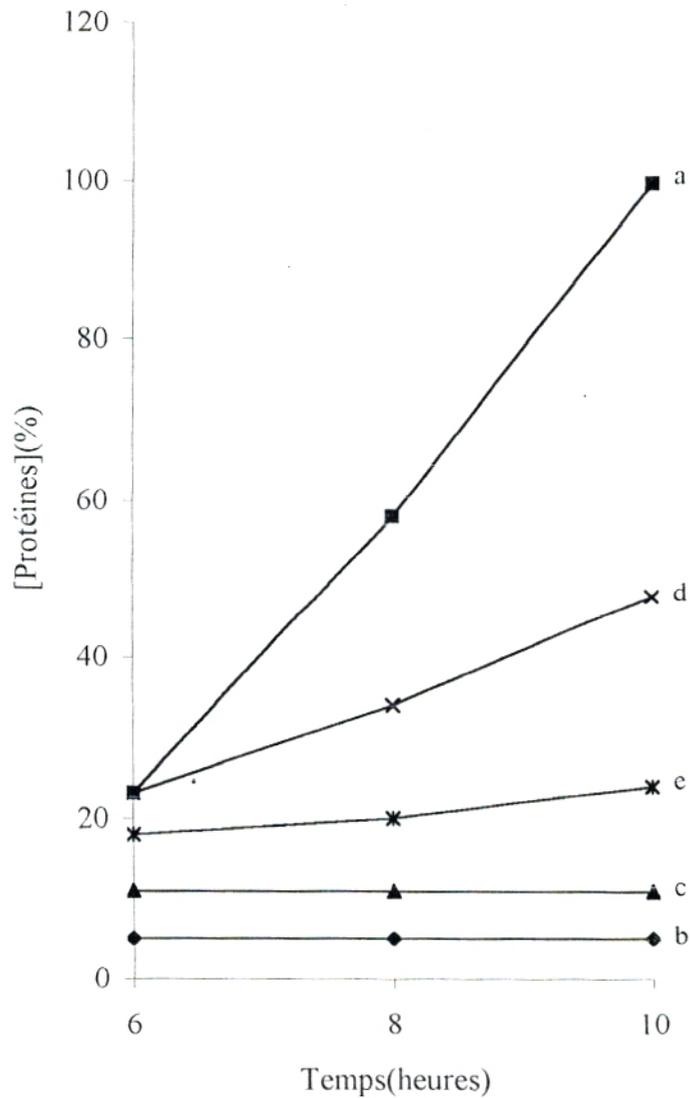


Figure N°21: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à 10^{-3} M, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF
- ×— Courbe(d): Ethanol
- *— Courbe(e): Méthanol

D'après les résultats obtenus, on constate que pour la concentration de 10^{-3} M d'AmB en solution mère (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$), la toxicité vis à vis du *C. albicans* varie en fonction du solvant utilisé. L'inhibition de la croissance est totale (100%) lorsque l'on utilise le DMSO ou le DMF, alors qu'elle est de 80% lorsque c'est le méthanol qui est utilisé et seulement de 45% dans le cas de l'éthanol.

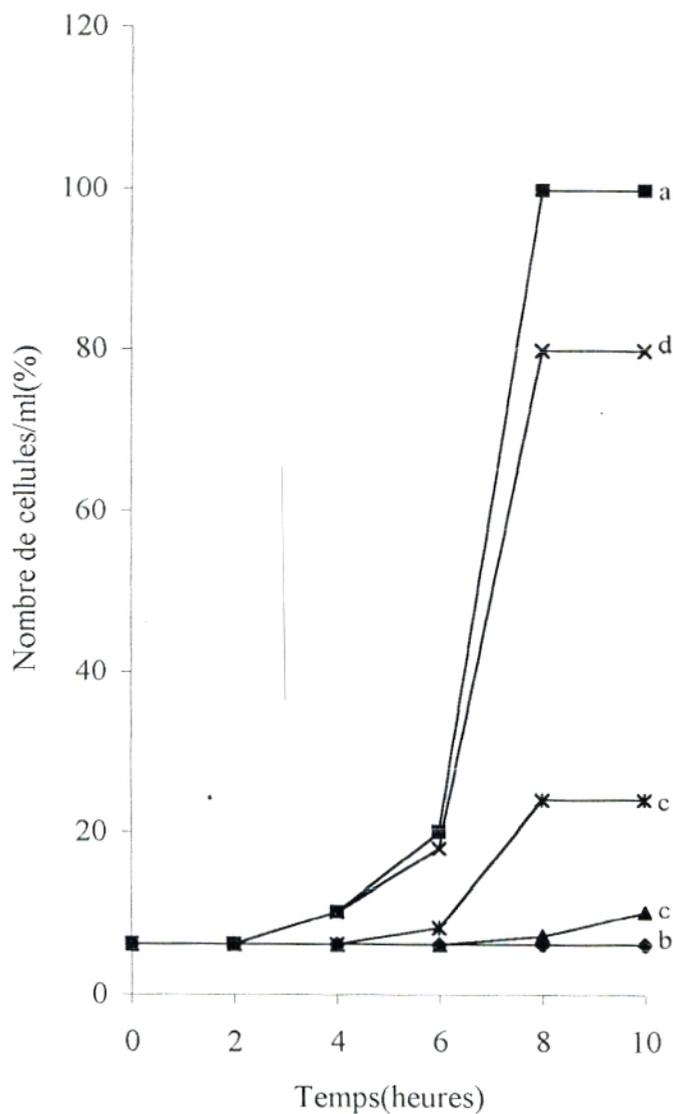
Nos résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus avec la Fungizone[®] sur le *S. cerevisiae* (BENYACOUB et HACHEMI, 1998). En utilisant la solution mère de Fungizone[®] à 10^{-3} M pour une concentration finale de $5\mu\text{g/ml}$, ce sont l'éthanol et le méthanol qui induisent une inhibition totale de la croissance, alors que le DMSO n'induit qu'une inhibition de 80%, et c'est avec le DMF que l'activité antifongique est la plus faible ; la croissance est inhibée seulement à 60%.

En partant de solutions mères à 10^{-3} M d'AmB, la toxicité de la drogue vis à vis du *C. albicans* varie en fonction du solvant utilisé. Alors qu'avec le DMSO et le DMF la croissance est inhibée à 100%, le méthanol induit une inhibition de 80%. C'est l'éthanol qui permet une moindre toxicité vis à vis du *C. albicans* ; le taux d'inhibition n'est que de 45%.

4. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à $5.10^{-4}M$

Les figures N°22 et N°23 représentent l'effet des solvants à $5.10^{-4}M$ d'AmB en solution mère (la concentration finale étant de $2\mu g/ml$) sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°22 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°23.

- Les courbes(a) des figures N°22 et N°23 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbe(b) des figures N°22 et N°23 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le DMSO. Nous remarquons que le nombre de cellules de départ reste constant jusqu'à 10 heures d'incubation. La croissance est inhibée à 100%. Le taux de protéines est constant ; il est de 5%.
- Les courbes(c) des figures N°22 et N°23 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le DMF. Nous remarquons que le nombre de cellules reste constant jusqu'à 6 heures d'incubation prolongeant ainsi la phase de latence de 4 heures par rapport au témoin. Ensuite il augmente faiblement et n'atteint que 10% en fin de croissance. Le taux d'inhibition est de 90%. La masse protéique est autour de 10%.
- Les courbes(d) des figures N°22 et N°23 représentent l'effet de la solution mère préparée dans l'éthanol. Après une phase de latence de 2 heures identique à celle du témoin, nous remarquons que le nombre de cellules augmente pour atteindre 80% au bout de 8 heures d'incubation. Ensuite il se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition n'est que de 20%. La masse protéique est autour de 20% en 6 heures d'incubation et atteint les 80% en fin de croissance.
- Les courbes(e) des figures N°22 et N°23 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le méthanol. Nous remarquons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 4 heures d'incubation (alors que celle du témoin n'est que de 2 heures). Ensuite le nombre de cellules augmente et est autour de 25% au bout de 8 heures d'incubation. Il se stabilise jusqu'à 10 heures. L'inhibition de la croissance est de 75%. La masse protéique évolue de façon parallèle au nombre de cellules. Elle est autour de 20% en 6 heures d'incubation et atteint les 25% en fin de croissance.



FigureN°22: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à $5.10^{-4}M$, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale étant de $2\mu g/ml$.

- Courbe(a): Témoïn
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF
- ×— Courbe(d): Ethanol
- *— Courbe(e): Méthanol

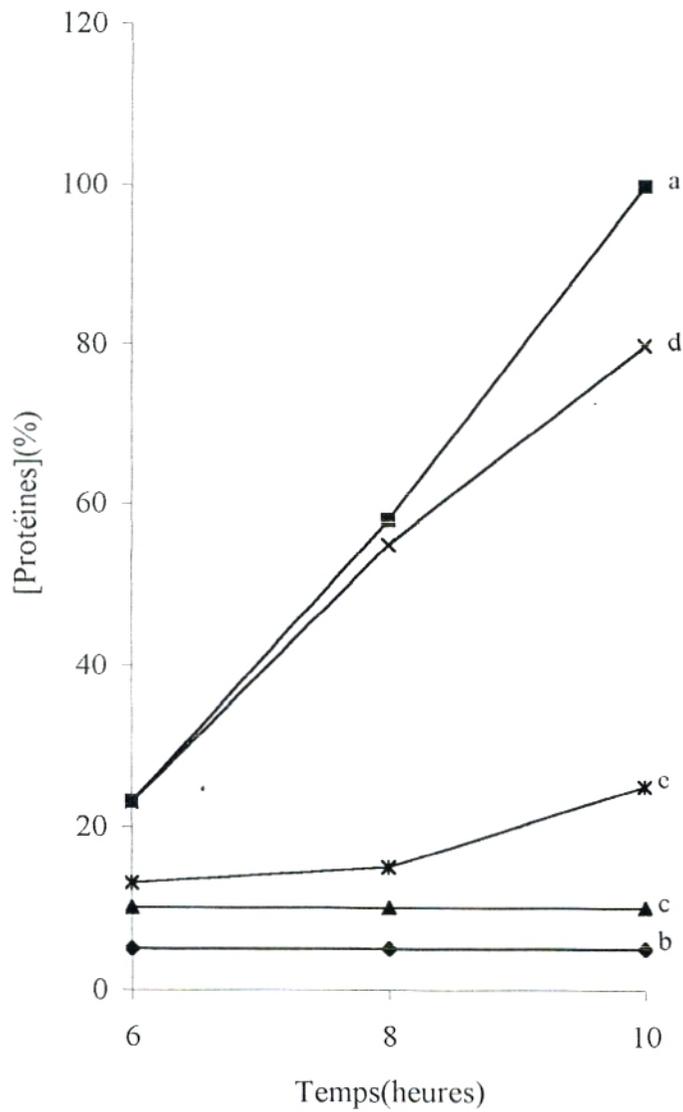


Figure N°23: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à $5.10^{-4}M$, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu g/ml$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF
- ×— Courbe(d): Ethanol
- *— Courbe(e): Méthanol

De ces résultats, il ressort que pour une concentration de 5.10^{-4} M d'AmB en solution mère (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$), l'action inhibitrice de l'AmB vis à vis du *C. albicans* varie en fonction du solvant utilisé. Elle est totale avec le DMSO, alors qu'elle diminue de 10% avec le DMF (90% d'inhibition). Par contre cette différence est beaucoup plus frappante avec les alcools. La croissance n'est inhibée qu'à 75% avec le méthanol alors que l'AmB perd pratiquement toute activité antifongique avec l'éthanol (20% d'inhibition seulement).

Pour des solutions mères de 5.10^{-4} M d'AmB, il apparaît que l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans* varie en fonction du solvant utilisé. Par conséquent, les solvants sont classés en fonction de la toxicité croissante de l'AmB dissoute dedans comme suit :

Ethanol < Méthanol < DMF < DMSO

5. Effet de la nature du solvant de la solution mère d'amphotéricine B préparée à 10^{-4} M

Rappelons tout d'abord qu'à cette concentration de la solution mère, le DMF, l'éthanol et le méthanol provoquent à eux seuls une inhibition de la croissance de la levure (voir figure N°7 du chapitre A).

L'effet de la nature du solvant à 10^{-4} M d'AmB en solution mère (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$) sur la croissance de *C. albicans* est représenté sur la figure N°24 où elle est suivie par la numération cellulaire, et sur la figure N°25 où elle est suivie par l'évolution de la masse protéique.

- Les courbes (a) des figures N°24 et N°25 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- L'effet de la solution mère préparée dans le DMSO est représenté sur les courbes (b) des figures N°24 et N°25. La phase de latence qui se traduit par une stabilité du nombre de cellules de départ est prolongée jusqu'à 6 heures d'incubation par rapport au témoin qui lui, présente une phase de latence de 2 heures (courbe 24a). Ensuite, le nombre de cellules augmente et atteint 10% au bout de 8 heures d'incubation. Les levures entrent alors dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition dans ce cas est de 90%. La masse protéique est constante ; elle est de 10%.

- Les courbes (c) des figures N°24 et N°25 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le DMF. Nous remarquons que le nombre de cellules reste constant pendant 4 heures prolongeant la phase de latence de 2 heures par rapport au témoin, ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 10%. La masse protéique est autour de 20% en fin de croissance. L'inhibition de la croissance dans ce cas là n'est pas due uniquement à l'AmB ; en effet le DMF seul à cette concentration induit 10% d'inhibition. Par conséquent le taux d'inhibition propre à l'AmB est autour de 80%.
- Les courbes(d) des figures N°24 et N°25 représentent l'effet de la solution mère préparée dans l'éthanol. Après une phase de latence de 2 heures, le nombre de cellules augmente ;il est autour de 20% après 6 heures d'incubation. Ensuite il se stabilise jusqu'à 10 heures d'incubation. L'évolution de la masse protéique est parallèle au nombre de cellules. Le taux protéique passe de 20% en 6 heures d'incubation à 30% en fin de croissance. L'inhibition dans ce cas est due en partie (25%) à l'éthanol seul. De ce fait l'inhibition de la croissance induite par l'AmB seule est estimée à 55%.
- Les courbes(e) des figures N°24 et N°25 représentent l'effet de la solution mère préparée dans le méthanol. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures. Ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 10% après 8 heures d'incubation. Les levures entrent alors dans une phase stationnaire jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique est de l'ordre de 15% en fin de croissance. L'inhibition induite par la solution antifongique est due en partie au méthanol seul (25%). L'action inhibitrice de l'AmB est estimée alors à 65%.

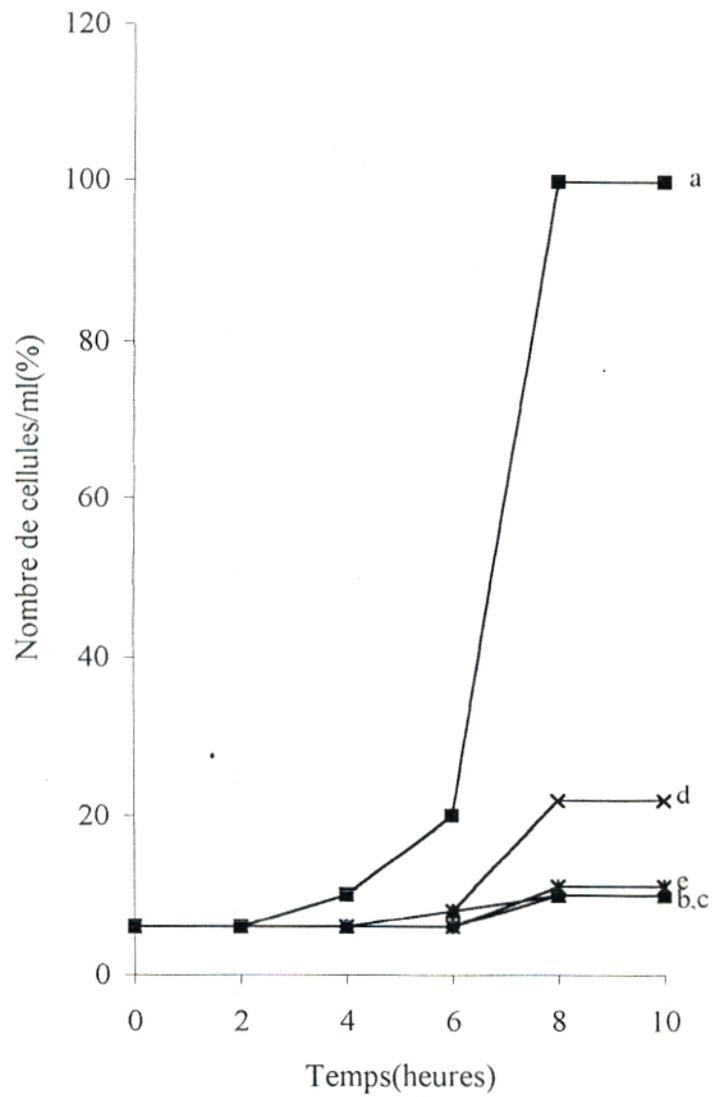


Figure N°24: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF
- ×— Courbe(d): Ethanol
- *— Courbe(e): Méthanol

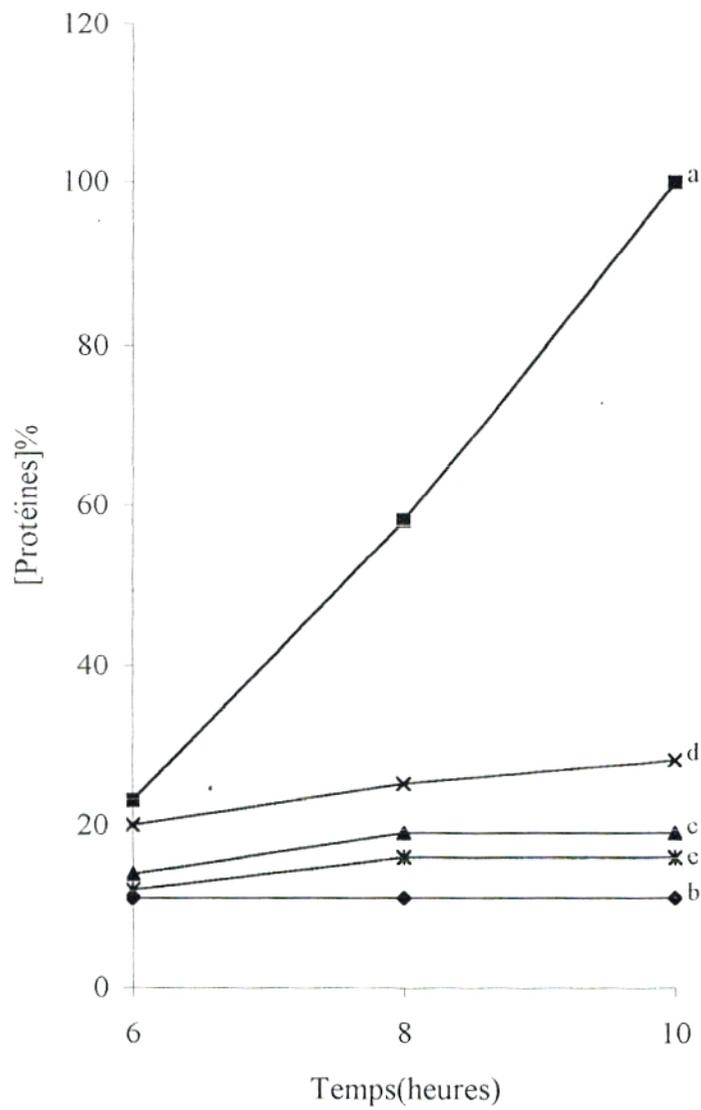


Figure N°25: Effet de la nature du solvant de la solution mère d'AmB à $10^{-4}M$, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu g/ml$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): DMSO
- ▲— Courbe(c): DMF
- ×— Courbe(d): Ethanol
- *— Courbe(e): Méthanol

Il apparaît lorsque l'on utilise une solution mère de 10^{-4} M, que l'action inhibitrice de l'AmB sur la croissance de la levure varie en fonction du solvant utilisé. La croissance est inhibée à 90% avec le DMSO, à 80% avec le DMF et à 65% avec le méthanol, alors qu'elle n'est que de 55% avec l'éthanol.

Nos résultats sont en désaccord avec l'étude menée sur le *S. cerevisiae* (BENYACOUB et HACHEMI, 1998), où il ressort qu'avec une concentration de 10^{-4} M de Fungizone[®] en solution mère, et utilisée à 5µg/ml final, l'activité antifongique varie en fonction du solvant utilisé. L'inhibition est de 80% avec l'éthanol et le méthanol alors qu'elle n'est que de 60% avec le DMSO et le DMF. Par conséquent, ce sont le DMSO et le DMF qui sont les moins toxiques vis à vis du *S. cerevisiae*, alors que nos résultats montrent que c'est avec ces solvants là que l'inhibition de la croissance de *C. albicans* est au maximum. Cette différence observée entre nos résultats et ceux de BENYACOUB et HACHEMI(1998) peut être attribuée d'une part à la différence existant entre les deux genres de levures (*Candida* et *Saccharomyces*), d'autre part au fait que nous avons utilisé de l'AmB pure alors qu'ils ont utilisé de la Fungizone[®] qui est une combinaison entre l'AmB et le désoxycholate de sodium.

A 10^{-4} M en solution mère, l'action inhibitrice de l'AmB vis à vis du *C. albicans* varie en fonction du solvant utilisé. Les solvants sont classés en fonction de leur toxicité croissante comme suit :

Ethanol < Méthanol < DMF < DMSO

Notre étude sur l'effet de la nature du solvant des solutions antifongiques préparées à des concentrations allant de 10^{-2} M à 10^{-4} M et utilisées à une concentration finale de 2µg/ml, sur la croissance de *C. albicans* montre que l'action inhibitrice de l'AmB dépend du solvant dans lequel elle est dissoute. Cette différence d'activité est d'autant plus accentuée lorsqu'il s'agit des concentrations de solutions mères les plus diluées.

Les solutions mères préparées à des concentrations de 10^{-2} M et de 5.10^{-3} M dans le DMSO et dans le DMF induisent une inhibition totale de la croissance de *C. albicans* (100%). Alors que les solutions mères d'AmB de 10^{-3} M préparées dans le DMSO ou dans le DMF induisent 100% d'inhibition, celle préparée dans le méthanol est moins efficace ; l'inhibition n'est que de 80% et c'est avec l'éthanol qu'elle est la moins toxique ; il y a 45% d'inhibition seulement.

Aux concentrations de $5 \cdot 10^{-4}$ M et de 10^{-4} M d'AmB en solution mère, il y a une accentuation de la variation de l'activité antifongique en fonction du solvant utilisé. Plus la polarité du solvant augmente plus la toxicité de l'AmB vis à vis du *C. albicans* diminue.

Quelle que soit la concentration de la solution mère utilisée, les solvants que nous avons choisis pour dissoudre l'AmB sont classés en fonction de la toxicité croissante de la drogue vis à vis du *C. albicans* comme suit :

$$\text{Ethanol} < \text{Méthanol} < \text{DMF} \leq \text{DMSO}$$

Il est à noter qu'à 10^{-4} M, l'AmB préparée dans le DMF est présente, en solution aqueuse de $2 \mu\text{g/ml}$ final, uniquement sous forme de monomères et d'oligomères solubles, alors que préparée dans le DMSO la proportion de monomères et d'oligomères solubles est beaucoup moins importante avec la présence d'une certaine proportion d'agrégats (LEGRAND et al., 1992).

Les agrégats d'AmB permettent alors une plus grande activité antifongique. En effet, à cette concentration de 10^{-4} M d'AmB en solution mère, lorsque le DMSO est utilisé comme solvant, il permet une inhibition de la croissance de 90% alors qu'avec le DMF le taux d'inhibition n'est que de 80%.

A la concentration de 10^{-2} M d'AmB en solution mère, nos résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la Fungizone[®] à la concentration de 10^{-2} M en solution mère, sur le *S. cerevisiae* (BENYACOUB et HACHEMI, 1998). En revanche, aux concentrations de 10^{-3} M et de 10^{-4} M, ils sont en total désaccord où il ressort que ce sont l'éthanol et le méthanol qui permettent un maximum d'inhibition alors que le DMSO et le DMF induisent une inhibition moindre. Cette différence peut s'expliquer d'une part par la différence existant entre le *C. albicans* et le *S. cerevisiae* en tant que levures appartenant à deux genres différents, d'autre part au fait que la Fungizone[®] est une combinaison entre AmB pure et désoxycholate de sodium.

D'un autre côté, il ressort de l'étude menée par LEGRAND et al. (1992) que pour une même concentration de solution mère d'AmB, le DMSO comparé au DMF permet une meilleure protection du globule rouge qui se traduit par une diminution de la fuite de potassium (K^+). Il en est de même lorsque c'est la Fungizone[®] qui est utilisée (SOKRANE et SOUIDI, 1998).

Les agrégats sont alors d'une part les formes d'AmB les moins toxiques vis à vis du globule rouge, d'autre part, ils permettent une meilleure activité antifongique vis à vis du *C. albicans*, pour une concentration finale de $2 \mu\text{g/ml}$.

C. EFFET DE LA TEMPERATURE

Le préchauffage de l'amphotéricine B en solution aqueuse augmente la taille des agrégats de cette molécule(ERNST et al., 1978).

Les études spectroscopiques menées par l'équipe de GABORIAU(1997a) montrent que le préchauffage à 70°C des solutions aqueuses d'amphotéricine B permet la conversion presque totale des agrégats en superagrégats. Cette conversion résulte de la condensation des agrégats avec les monomères. Ces superagrégats n'apparaissent pas aux concentrations supérieures à 10⁻⁴M. Dans ces conditions là, il y a une forte proportion d'agrégats et une quantité négligeable de monomères ; par conséquent, la concentration des superagrégats sera négligeable après le préchauffage. Ainsi c'est en chauffant les solutions d'amphotéricine B les plus diluées qu'il y aura apparition des superagrégats.

Plus tard, l'étude de l'activité biologique *in vitro* menée sur le globule rouge(GABORIAU et al., 1997b), aboutit à la conclusion que le préchauffage d'une solution aqueuse d'amphotéricine B à 70°C pendant 20 minutes entraîne une réduction de toxicité de l'antifongique vis à vis des globules rouges. Cette protection se traduit par :

- une diminution de la fuite de potassium(K⁺),
- une forte diminution du taux d'hémolyse. Avec la Fungizone[®] préchauffée, des concentrations 8 fois supérieures à celles des solutions non chauffées sont nécessaires pour induire 50% d'hémolyse.

La question immédiate qui se pose est de savoir si le préchauffage modifie ou non l'activité de l'amphotéricine B vis à vis du *C. albicans*.

Pour répondre à cette question, une série de solutions mères d'amphotéricine B a été préparée à température ambiante et à 70°C.

Nous avons fixé la concentration de la solution mère d'amphotéricine B à 10⁻⁴M, car au-dessus de cette concentration il est difficile d'obtenir des superagrégats.

Notre choix s'est porté sur deux solvants ; le DMSO qui semble être celui qui permet le maximum de toxicité vis à vis du *C. albicans*, et l'éthanol qui donne à la molécule un comportement particulier vu que c'est à cette concentration de 10^{-4} M que nous observons un maximum d'efficacité avec ce solvant.

Les solutions antifongiques sont préparées comme suit : l'amphotéricine B est dissoute dans le solvant choisi, ensuite la solution est partagée en deux parties. L'une des deux est plongée dans un bain-marie à 70°C pendant 20 minutes. Une fois chauffée, la solution est refroidie immédiatement sous un jet d'eau froide. L'autre partie est maintenue à température ambiante pendant 20 minutes.

Une fois les solutions préparées, elles sont utilisées le jour même ou après une période de temps fixé.

Les solutions antifongiques sont ajoutées à la culture au même moment que l'inoculum cellulaire, à une concentration finale de $2\mu\text{g}$ d'AmB/ml. La croissance est suivie jusqu'à la phase stationnaire.

D'autre part, une solution mère est préparée avec la Fungizone[®] à 10^{-4} M dans le DMSO. La solution ainsi préparée est partagée en deux parties ; l'une est maintenue à température ambiante pendant 20 minutes, l'autre est chauffée dans un bain-marie à 70°C pendant 20 minutes ensuite refroidie sous un jet d'eau froide.

Les solutions ainsi préparées sont utilisées le jour même ou après une période donnée de conservation. Elles sont ajoutées à la culture au temps zéro à une concentration finale d'AmB de $2\mu\text{g}/\text{ml}$. La croissance est suivie jusqu'à la phase stationnaire.

1. Effet de la température sur la solution mère d'amphotéricine B à 10^{-4} M préparée dans le DMSO

L'effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$) préparées le jour même aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans* est représenté sur les figures N°26 et N°27. La croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°26 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure-N°27.

- Les courbes(a) des figures N°26 et N°27 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°26 et N°27 représentent l'effet de la solution mère d'AmB préparée à température ambiante. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures. Ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 10% en 8 heures d'incubation. Les levures entrent alors en phase stationnaire jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition est de 90%. La masse protéique suit le nombre de cellules, elle est autour de 10%.
- Les courbes(c) des figures N°26 et N°27 représentent l'effet de la solution d'AmB préchauffée 20 minutes à 70°C . Nous remarquons que le nombre de cellules de départ reste constant durant 14 heures d'incubation. La phase de latence est prolongée de 12 heures par rapport au témoin. La masse protéique est constante elle aussi ; elle est de 5%. L'inhibition dans ce cas est totale (100%).

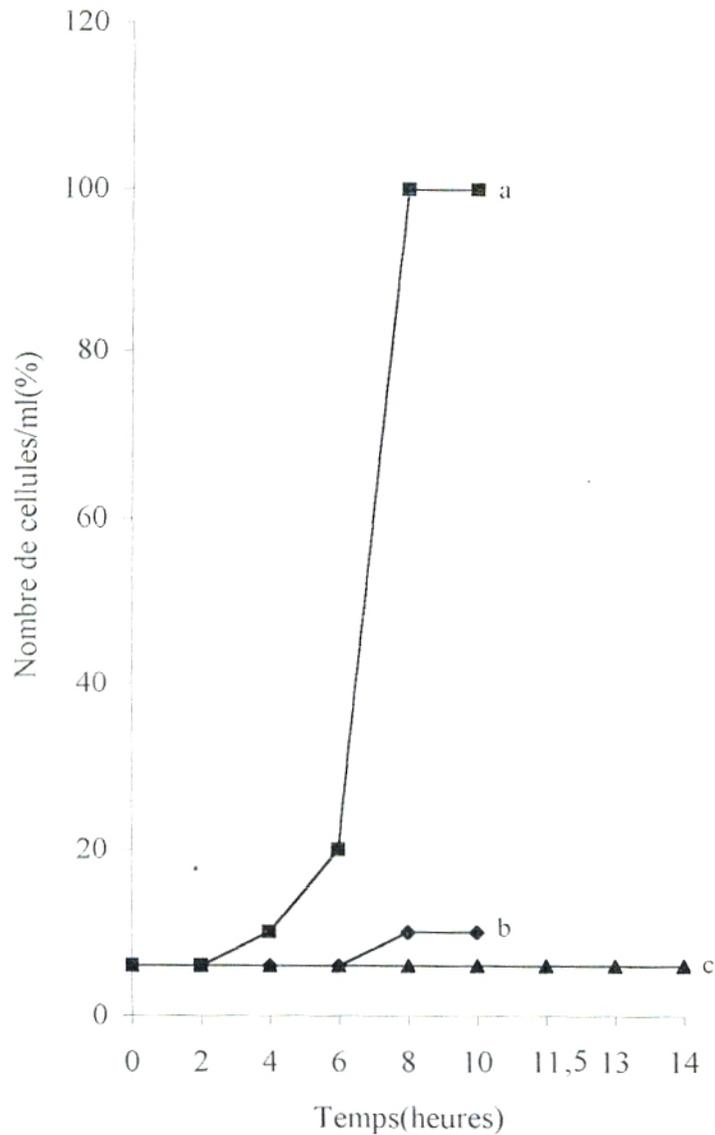
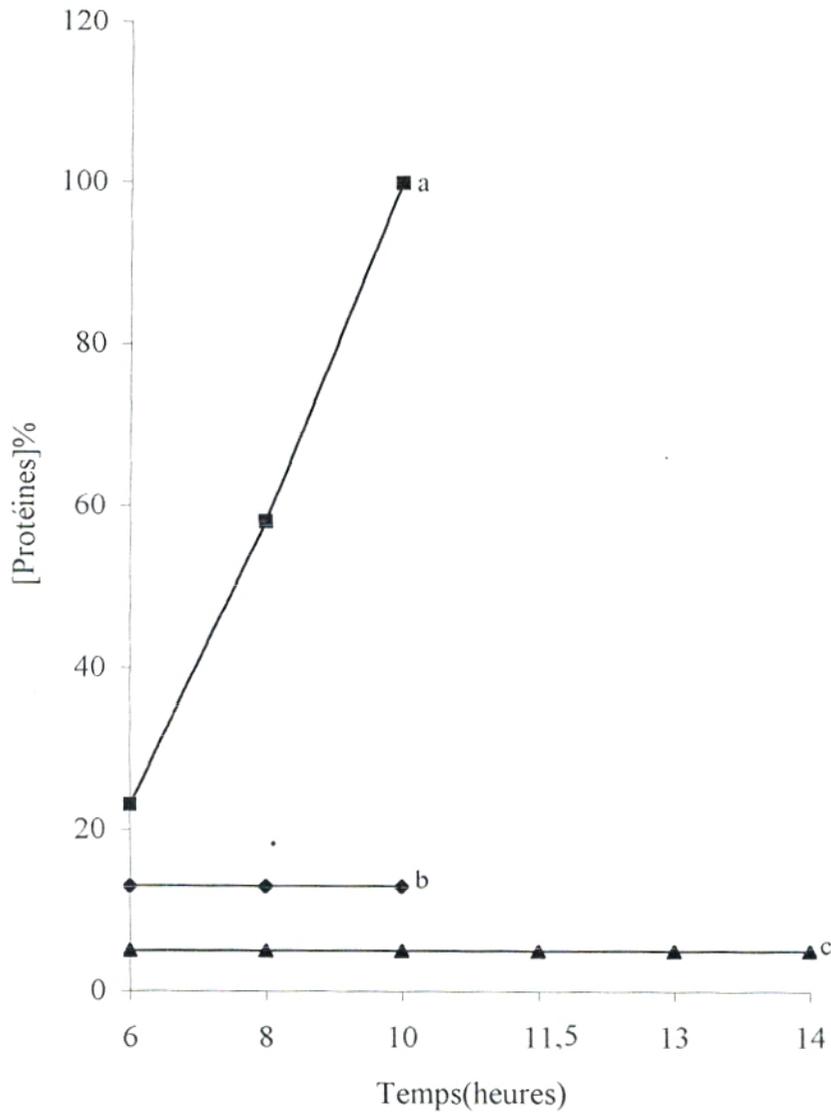


Figure N°26: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$ (les solutions d'AmB sont préparées le jour même de leur utilisation).

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préparée à température ambiante

—▲— Courbe (c) : [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C



FigureN°27: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées aux différentes températures, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$ (les solutions sont préparées le jour même de leur utilisation).

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préparée à température ambiante

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C

De ces résultats, il ressort qu'en chauffant à 70°C pendant 20 minutes la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO à 10⁻⁴M, le jour même, l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans* devient totale(100%).

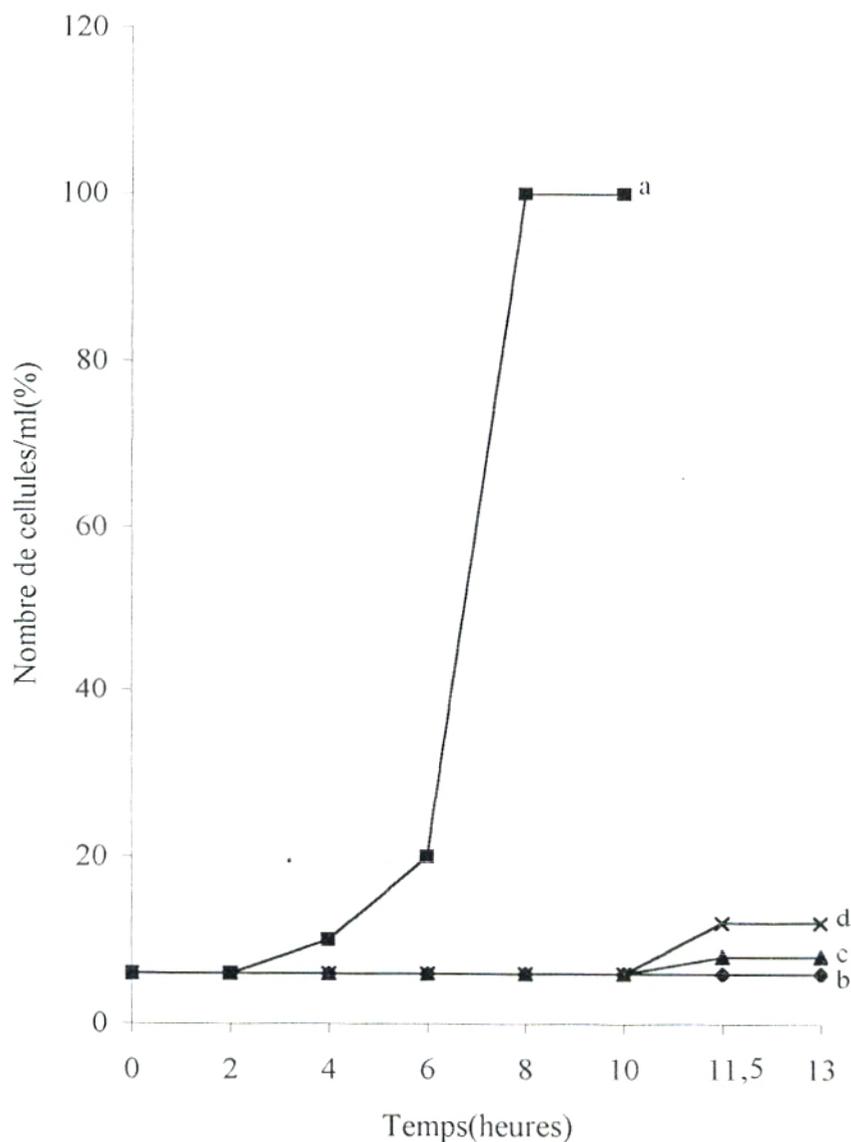
Le préchauffage des solutions mères d'AmB à 10⁻⁴M dans le DMSO à 70°C pendant 20 minutes permet la conversion presque totale des agrégats en superagrégats(GABORIAU et al., 1997a) et par conséquent ce sont ces superagrégats qui ont favorisé l'inhibition totale de la croissance de la levure.

Afin de contrôler la stabilité des solutions antifongiques au cours du temps, celles-ci ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière pendant 24 heures et pendant 1 semaine. Après chaque temps de conservation, leur activité antifongique est testée sur la croissance de *C. albicans*.

Pour ce qui est de la solution non chauffée, l'activité antifongique reste stable au bout d'une semaine de conservation. La croissance de *C. albicans* est similaire aussi bien en présence d'une solution préparée le jour même ou alors conservée 24 heures à 4°C ou encore 1 semaine à 4°C. La croissance est inhibée à 90%(courbes non représentées).

L'effet des solutions préchauffées à 70°C pendant 20 minutes et conservées à des temps différents, sur la croissance de *C. albicans* est représenté sur la figure N°28 où elle est suivie par la numération cellulaire, et sur la figure N°29 où elle est suivie par le dosage de la masse protéique.

- Les courbes(a) des figures N°28 et N°29 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°28 et N°29 représentent l'effet de la solution mère préparée le jour même. La phase de latence est prolongée jusqu'à 13 heures d'incubation. L'inhibition est totale(100%). La masse protéique est de 5%.
- Les courbes(c) des figures N°28 et N°29 représentent l'effet de la solution conservée à 4°C pendant 24 heures. La phase de latence se prolonge jusqu'à 10 heures d'incubation. Ensuite le nombre de cellules augmente et est autour de 10%. L'inhibition est de 90%. Le taux protéique est constant, il est autour de 10%.
- Les courbes(d) des figures N°28 et N°29 représentent l'effet de la solution conservée à 4°C pendant 1 semaine. Après une phase de latence de 10 heures, le nombre de cellules augmente ; il est autour de 15% après 11h30minutes d'incubation et se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 13 heures d'incubation. Le taux de protéines est de 15%. La croissance est inhibée à 85%.



FigureN°28: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C à des temps différents, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO, préchauffée 20' à 70°C , préparée le jour meme

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO, préchauffée 20' à 70°C , conservée 24h à 4°C et à l'abri de la lumière

—×— Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO, préchauffée 20' à 70°C , conservée 1semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

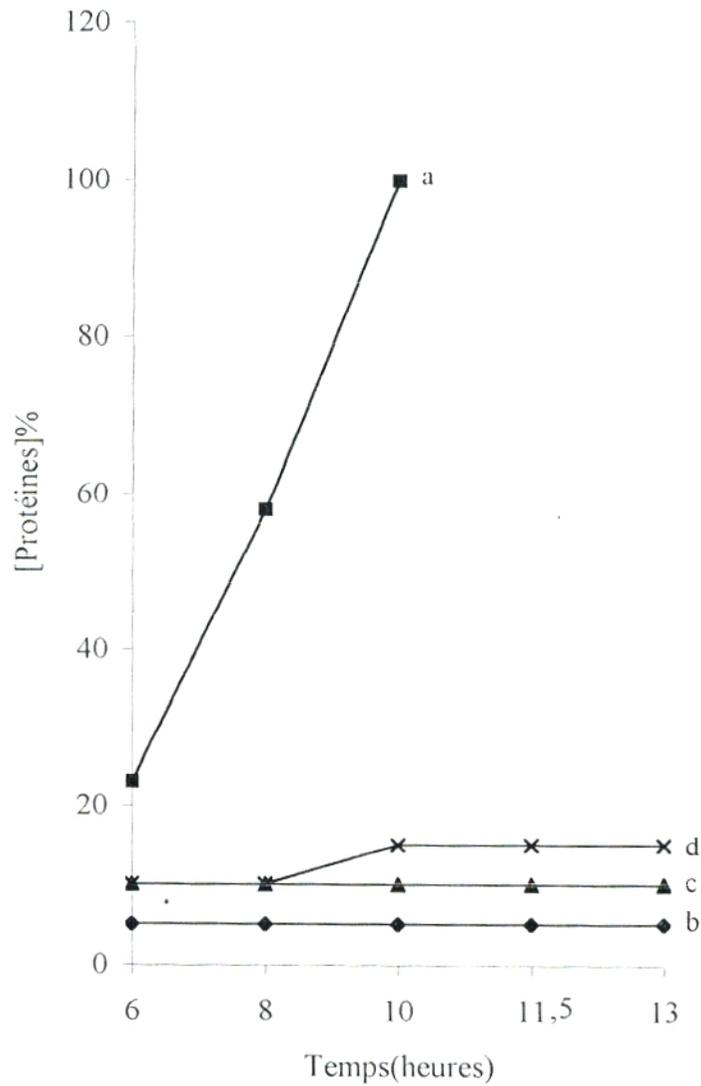


Figure N°29: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C à des temps différents, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C , préparée le jour même
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C , conservée 24heures à 4°C et l'abri de la lumière
- ×— Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C , conservée 1 semaine à 4°C et l'abri de la lumière

D'après ces résultats, il apparaît que les solutions d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO, préchauffées à 70°C pendant 20 minutes sont légèrement moins stables que les solutions non chauffées. Alors que ces dernières restent stables durant une semaine de conservation à 4°C et à l'abri de la lumière (90% d'inhibition), les solutions préchauffées perdent une partie de leur activité au cours du temps. En effet, elles perdent 15% de leur activité en une semaine de conservation. Mais cette perte est négligeable d'autant plus que le taux d'inhibition dans ce cas (85%) est très proche de celui obtenu avec la solution non chauffée (90%) et que ces solutions permettent un prolongement de la phase de latence de 4 heures par rapport aux solutions non chauffées.

Le préchauffage de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le DMSO permet l'augmentation de son activité antifongique.

2. Effet de la température sur la solution mère d'amphotéricine B à 10^{-4} M préparée dans l'éthanol

L'effet des solutions mères d'AmB préparées le jour même à 10^{-4} M dans de l'éthanol (la concentration finale étant de 2µg/ml) aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans* est rapporté sur les figures N°30 et N°31. La croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°30 et par le dosage des protéines sur la figure N°31.

- Les courbes(a) des figures N°30 et N°31 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(d) de la figure N°30 représente la culture contrôle dans laquelle on a ajouté un volume d'éthanol égal à celui des volumes des solutions mères ajoutées. Ceci nous permet de déterminer l'effet de l'éthanol seul sur la croissance de *C. albicans*. Nous remarquons jusqu'à 6 heures d'incubation que la croissance est identique à celle de la culture témoin. Ensuite le nombre de cellules atteint un maximum de 75% au bout de 8 heures d'incubation et se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition induite par cet alcool est de 25%.
- Les courbes(b) des figures N°30 et N°31 représentent l'effet de la solution éthanolique préparée à température ambiante. Nous remarquons après une phase de latence de 6 heures que le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre les 20% après 8 heures d'incubation. Il se stabilise ensuite dans une phase stationnaire allant

jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique passe de 5% en 6 heures d'incubation à 30% en fin de croissance. Le taux d'inhibition dû à l'AmB seule est estimé à 55%(par rapport à la culture contrôle).

- Les courbes(c) des figures N°30 et N°31 représentent l'effet de la solution éthanolique préchauffée 20 minutes à 70°C. Nous remarquons que la phase de latence est de 10 heures. Elle prolonge la phase de latence obtenue avec la solution éthanolique non chauffée de 4 heures. Ensuite le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre un maximum autour de 15% après 13 heures d'incubation. La croissance de la levure est alors stationnaire jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique passe de 5% en 6 heures d'incubation à 10% en fin de croissance. Le taux d'inhibition induit par l'AmB seule est estimé à 60%(par rapport à la culture contrôle).

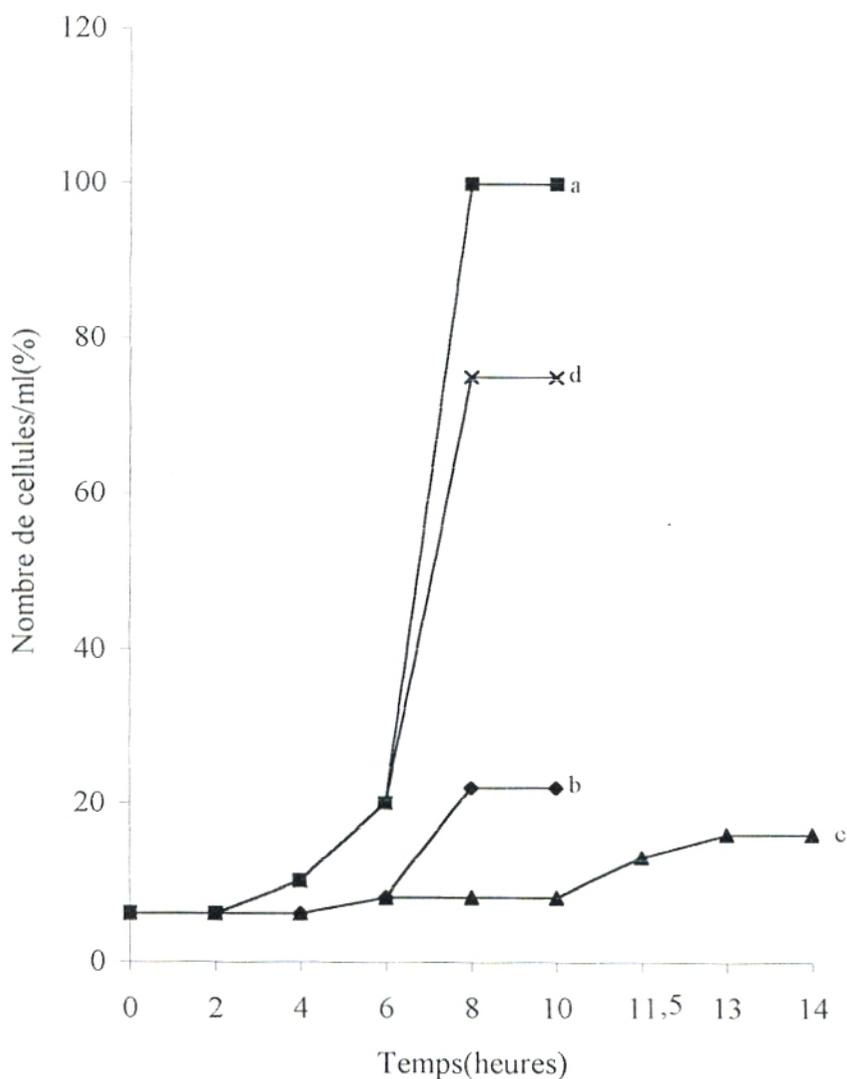


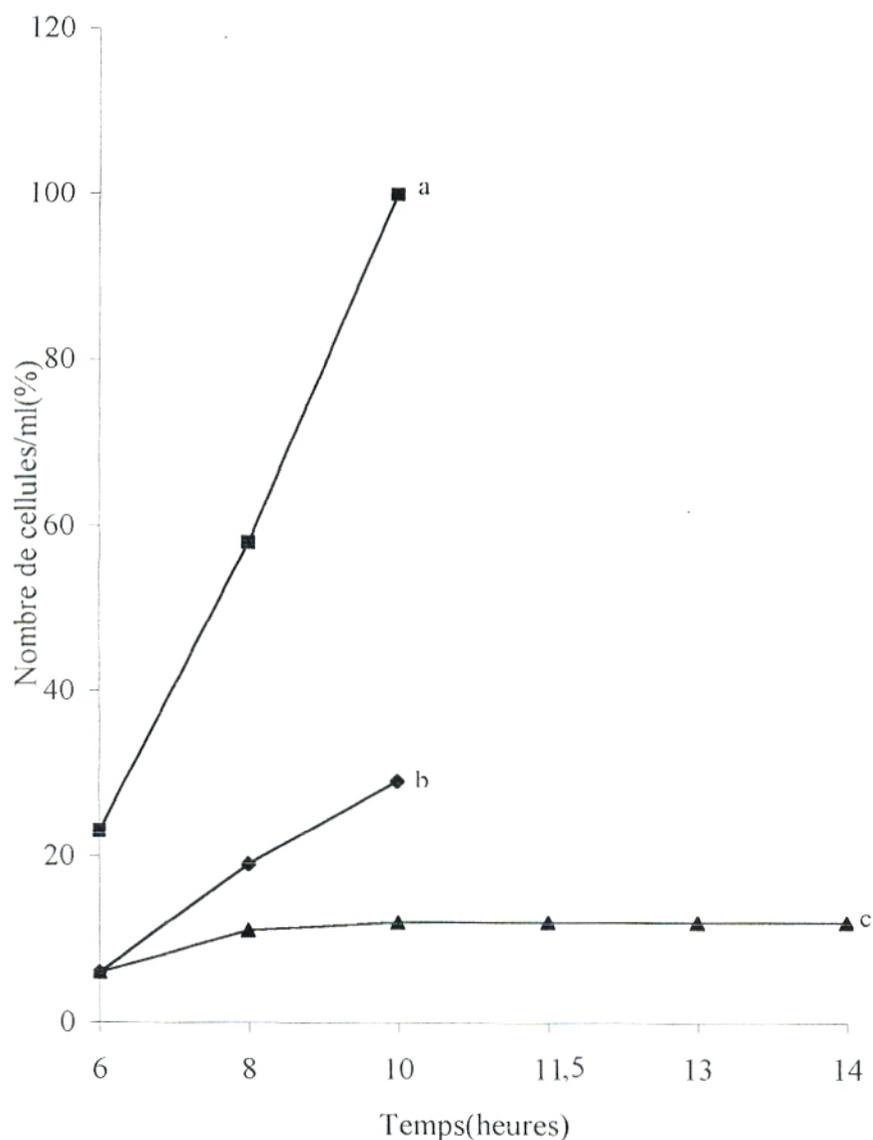
Figure N°30: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol, préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans* ; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$ (les solutions sont préparées le jour même de leur utilisation)

■ Courbe(a): Témoin

◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préparée à température ambiante

▲ Courbe(c) : [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C

× Courbe(d): Contrôle Ethanol (volume d'éthanol ajouté correspondant au volume de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M ajouté au milieu à une concentration finale d'AmB de $2\mu\text{g/ml}$)



FigureN°31: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol, préparées aux différentes températures, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$ (les solutions sont préparées le jour même de leur utilisation).

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préparée à température ambiante
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C

Sur la base des résultats obtenus, il apparaît que le préchauffage de la solution d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol permet d'augmenter l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*. En effet, l'inhibition effective de l'AmB est de 60% avec la solution éthanolique chauffée alors qu'elle n'est que de 55% avec la solution éthanolique non chauffée. Mais cette différence n'est pas significative, ce qui est le plus marquant dans cette augmentation d'activité c'est le prolongement de la phase de latence au cours de la croissance du *C. albicans* de 4 heures avec la solution éthanolique chauffée par rapport à la solution éthanolique non chauffée.

Une étude précédente(ERNST et al., 1978) montre qu'en solution hydroéthanolique (30% d'éthanol), lorsque la température augmente jusqu'à 75°C , la taille des agrégats de la molécule d'AmB augmente de façon importante. Ainsi, en favorisant cette augmentation de la taille des agrégats par le préchauffage de la solution d'AmB préparée dans l'éthanol, nous avons augmenté l'activité antifongique de l'AmB.

Afin de tester la stabilité des solutions antifongiques au cours du temps, elles ont été conservées à 4°C pendant 24 heures et pendant 1 semaine à l'abri de la lumière. Après chaque temps de conservation, leur activité est testée sur la croissance de *C. albicans*.

Les figures N°32 et N°33 représentent l'effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol, préparées à température ambiante, conservées à 4°C pendant des durées différentes, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°32 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°33.

- Les courbes(a) et (e) de la figure N°32 représentent la culture témoin sans aucune addition(100% de croissance) et la culture contrôle à laquelle nous n'avons ajouté que de l'éthanol seul(25% d'inhibition) respectivement.
- Les courbes(b) des figures N°32 et N°33 représentent l'effet de la solution éthanolique préparée le jour même. Nous remarquons après une phase de latence de 6 heures que le nombre de cellules augmentent pour atteindre un maximum de 20 % au bout de 8 heures d'incubation. Ensuite, il se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique passe de 10% en 6 heures d'incubation à 30% en fin de croissance. L'inhibition propre à l'AmB est estimée à 55%(par rapport au contrôle).

- Les courbes(c) des figures N°32 et N°33 représentent l'effet de la solution éthanolique conservée 24 heures à 4°C. Nous remarquons une phase de latence de 6 heures, suivie par une phase exponentielle allant jusqu'à 8 heures d'incubation où le nombre de cellules atteint un maximum autour de 20%. La masse protéique passe de 10% en 6 heures d'incubation à 30% en fin de croissance. L'inhibition propre à l'AmB est de 55%(par rapport au contrôle).
- Les courbes(d) des figures N°32 et N°33 représentent l'effet de la solution éthanolique conservée 1 semaine à 4°C. Après une phase de latence de 6 heures, le nombre de cellules augmente pour atteindre un maximum de 30% en 8 heures d'incubation. Ensuite, ce nombre se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique évolue de façon parallèle au nombre de cellules ; elle passe de 10% en 6 heures d'incubation à 40% en fin de croissance. Dans ce cas l'inhibition propre à l'AmB est estimée à 45%(par rapport au contrôle).

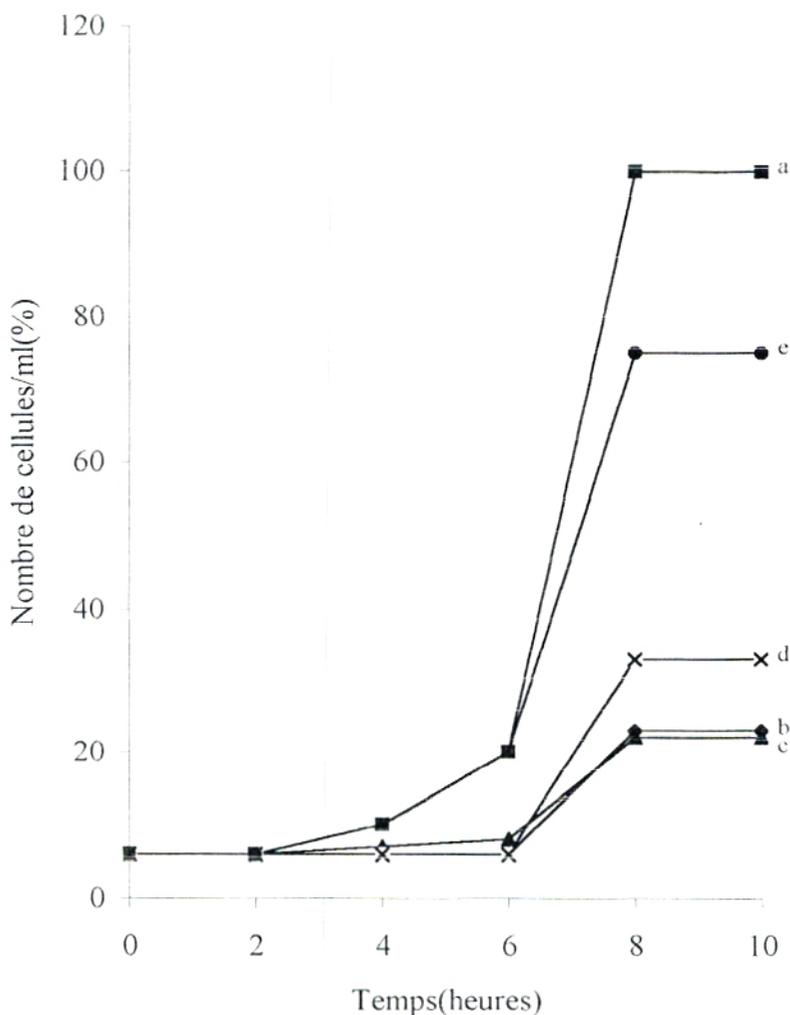
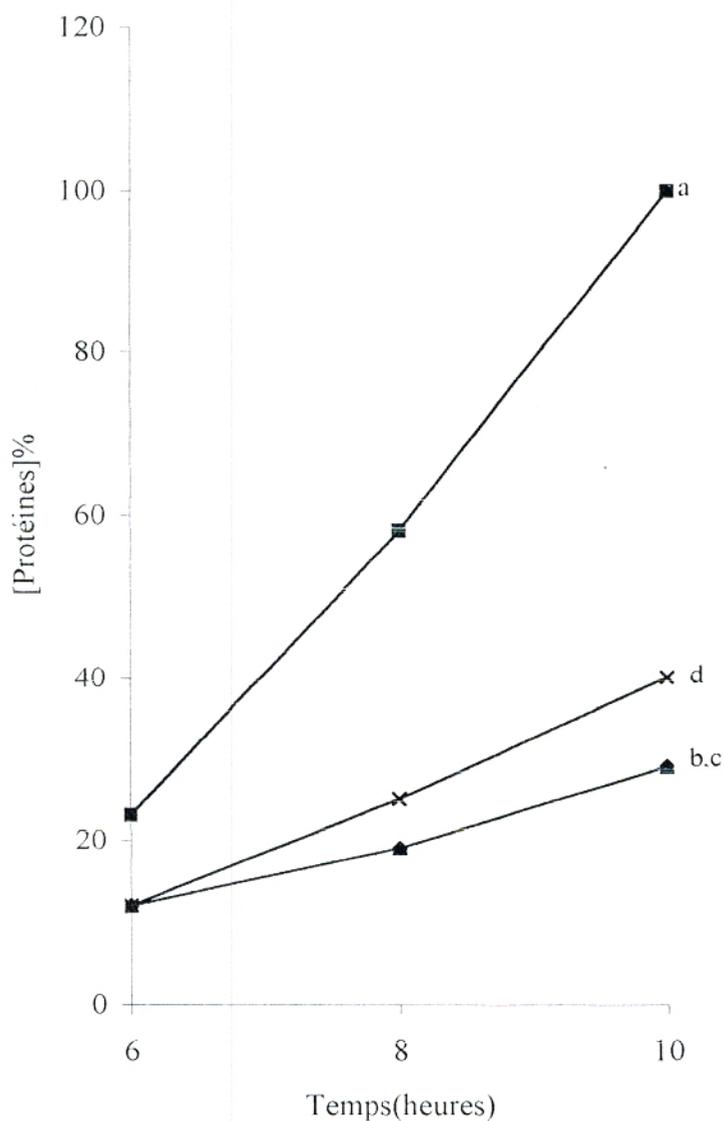


Figure N°32: Effet des solutions mères d'AmB à 10⁻⁴M dans l'éthanol, préparées à température ambiante, et conservées à 4°C à des temps différents, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10⁻⁴M d'AmB/Ethanol préparé le jour même
- ▲ Courbe(c): [SM] à 10⁻⁴M d'AmB/Ethanol conservée 24h à 4°C et à l'abri de la lumière
- ✕ Courbe(d): [SM] à 10⁻⁴M d'AmB/Ethanol conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière
- Courbe(e): Contrôle Ethanol (volume d'éthanol ajouté correspondant au volume des solutions mères d'AmB à 10⁻⁴M ajoutés au milieu à une concentration finale d'AmB de 2µg/ml)



FigureN°33: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol, préparées à température ambiante et conservées à 4°C à des temps différents, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préparée le jour même
- ▲ Courbe (c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol conservée 24h à 4°C et à l'abri de la lumière
- × Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol conservée 1semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

De ces résultats, il ressort que l'activité antifongique reste stable pendant au moins 24 heures. Nous observons un taux d'inhibition de 55% aussi bien avec la solution éthanolique préparée le jour même (à température ambiante) qu'avec celle conservée 24 heures à 4°C à l'abri de la lumière. Par contre, avec la solution éthanolique conservée 1 semaine, l'AmB perd 10% de son action inhibitrice sur le *C. albicans*.

Les figures N°34 et N°35 représentent l'effet des solutions d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol (la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml), préchauffées à 70°C pendant 20 minutes et conservées à 4°C pendant des durées différentes, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°34 et par le dosage des protéines sur la figure N°35.

- Les courbes(a) des figures N°34 et N°35 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(e) de la figure N°34 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume d'éthanol égal au volume des solutions antifongiques à 10^{-4} M ajouté ; le taux d'inhibition est de 25%.
- Les courbes(b) des figures N°34 et N°35 représentent l'effet de la solution éthanolique préchauffée, préparée le jour même. Nous remarquons que la phase de latence se prolonge de 8 heures par rapport au témoin et au contrôle. Ensuite le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre un maximum de 15% après 13 heures d'incubation. Ce taux de cellules se stabilise dans une phase stationnaire qui va jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique passe de 5% en 6 heures d'incubation à 10% en fin de croissance. L'inhibition propre à l'AmB est de 60%(par rapport au contrôle).
- Les courbes(c) des figures N°34 et N°35 représentent l'effet de la solution éthanolique préchauffée, conservée 24 heures à 4°C. Après une phase de latence de 8 heures (4 fois supérieures à celle du témoin et du contrôle), le nombre de cellules augmente et atteint 20% après 13 heures d'incubation. Ensuite ce taux se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique est autour de 20% en fin de croissance. Le taux d'inhibition propre à l'AmB est estimé à 55%(par rapport au contrôle).

- Les courbes(d) des figures N°34 et N°35 représentent l'effet de la solution éthanolique préchauffée, conservée 1 semaine à 4°C. Après une phase de latence de 8 heures, nous remarquons que le nombre de cellules augmente et atteint un maximum de 30% en 13 heures d'incubation. Il se stabilise dans une phase stationnaire qui va jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique se stabilise après 10 heures d'incubation autour de 25%. En présence de cette solution, le taux d'inhibition propre à l'AmB est estimé à 45%(par apport au contrôle).

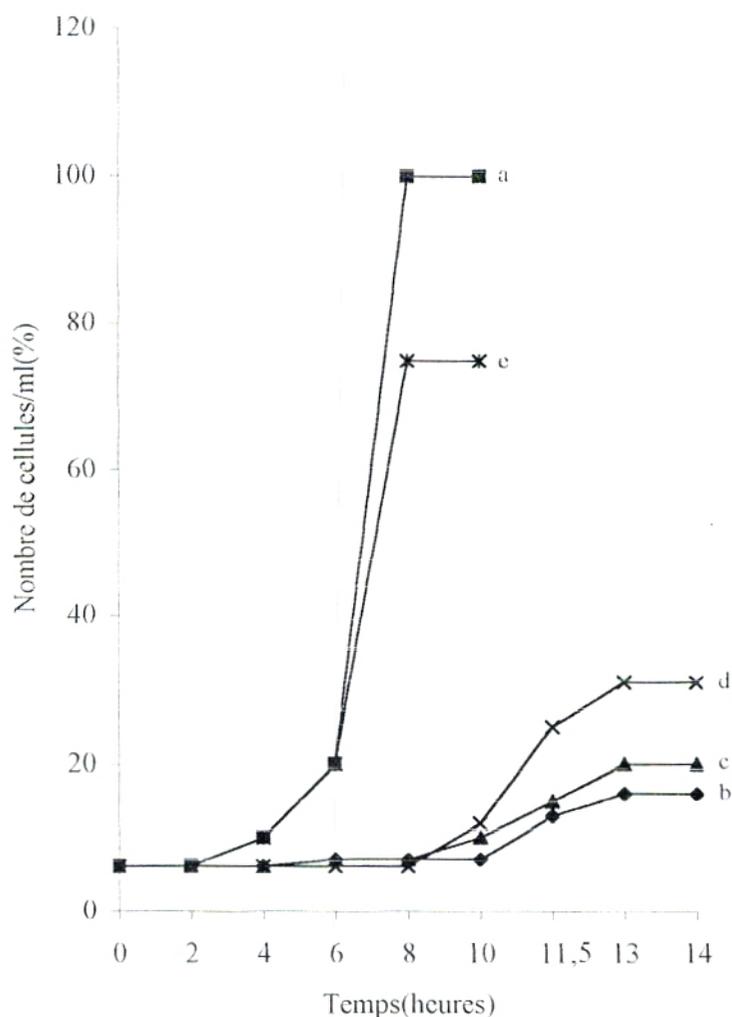


Figure N°34: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C à des temps différents, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol, préchauffée 20' à 70°C , préparée le jour même de son utilisation
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol, préchauffée 20' à 70°C , conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière
- ×— Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol, préchauffée 20' à 70°C , conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière
- *— Courbe(e): Contrôle Ethanol(volume d'éthanol ajouté correspondant au volume des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)

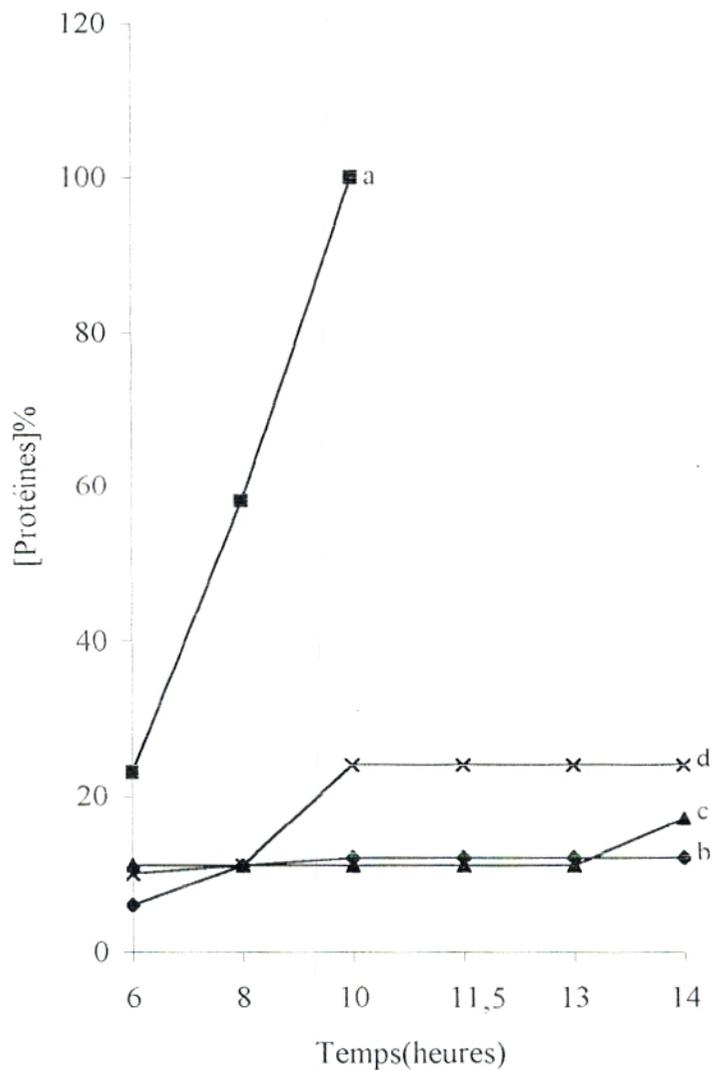


Figure N°35: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C à des temps différents, sur la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol, préchauffée 20' à 70°C , préparée le jour même de son utilisation

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière

—×— Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

Il ressort de ces résultats que les solutions d'AmB à 10^{-4} M dans l'éthanol et préchauffées 20 minutes à 70°C , deviennent moins stables au cours du temps. Nous remarquons qu'il y a une perte de 5% de l'activité antifongique après 24 heures de conservation. Cette perte est négligeable.

D'autre part, après une semaine de conservation, l'AmB perd 15% de son activité antifongique vis à vis du *C. albicans* par rapport à la solution préparée le jour même. Mais cette perte d'activité n'est pas due uniquement au préchauffage, car la solution éthanolique préparée à température ambiante perd 10% de son activité antifongique au bout d'une semaine de conservation à 4°C . Par conséquent le préchauffage n'induit qu'une perte négligeable de 5%.

Malgré la perte d'activité au cours du temps des solutions éthanoliques préchauffées 20 minutes à 70°C , leur pouvoir antifongique reste plus grand que les solutions non chauffées qui se traduit surtout par un prolongement d'au moins 8 heures de la phase de latence.

Le préchauffage des solutions d'AmB préparées à 10^{-4}M dans l'éthanol permet l'augmentation de l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*.

3. Effet de la nature du solvant

Dans cette partie de l'étude, nous comparons entre elles les solutions mères d'AmB à 10^{-4} M préparées dans le DMSO et celles préparées dans de l'éthanol après préchauffage à 70°C pendant 20 minutes.

Les figures N°36 et N°37 représentent l'effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$) préchauffées 20 minutes à 70°C , préparées le jour même de leur utilisation, sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°36 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°37.

- Les courbes(a) des figures N°36 et N°37 représentent la culture témoin sans aucune addition, et la courbe(e) de la figure N°36 représente la culture contrôle de l'éthanol où nous avons ajouté un volume d'éthanol égal à celui de la solution antifongique ajoutée(25% d'inhibition).
- Les courbes(b) des figures N°36 et N°37 représentent l'effet de la solution d'AmB préparée dans le DMSO. Nous remarquons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique est constante durant les 14 heures d'incubation ; elle est de 5%. L'inhibition est totale(100%).
- Les courbes(c) des figures N°36 et N°37 représentent l'effet de la solution antifongique préparée dans de l'éthanol. Nous remarquons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 10 heures d'incubation(par rapport au contrôle et au témoin qui ont une phase de latence de 2 heures). Ensuite le nombre de cellules augmente et atteint les 15% après 13 heures d'incubation et il se stabilise dans une phase stationnaire jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique est autour de 10% en fin de croissance. L'inhibition propre à l'AmB est estimée à 60%(par rapport au contrôle).

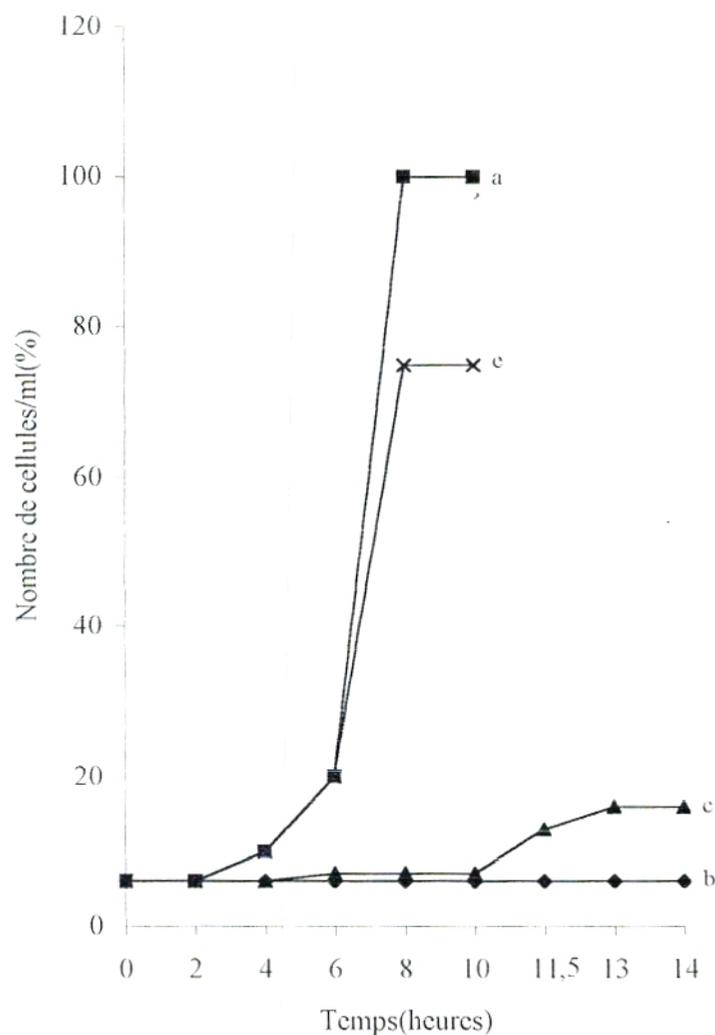
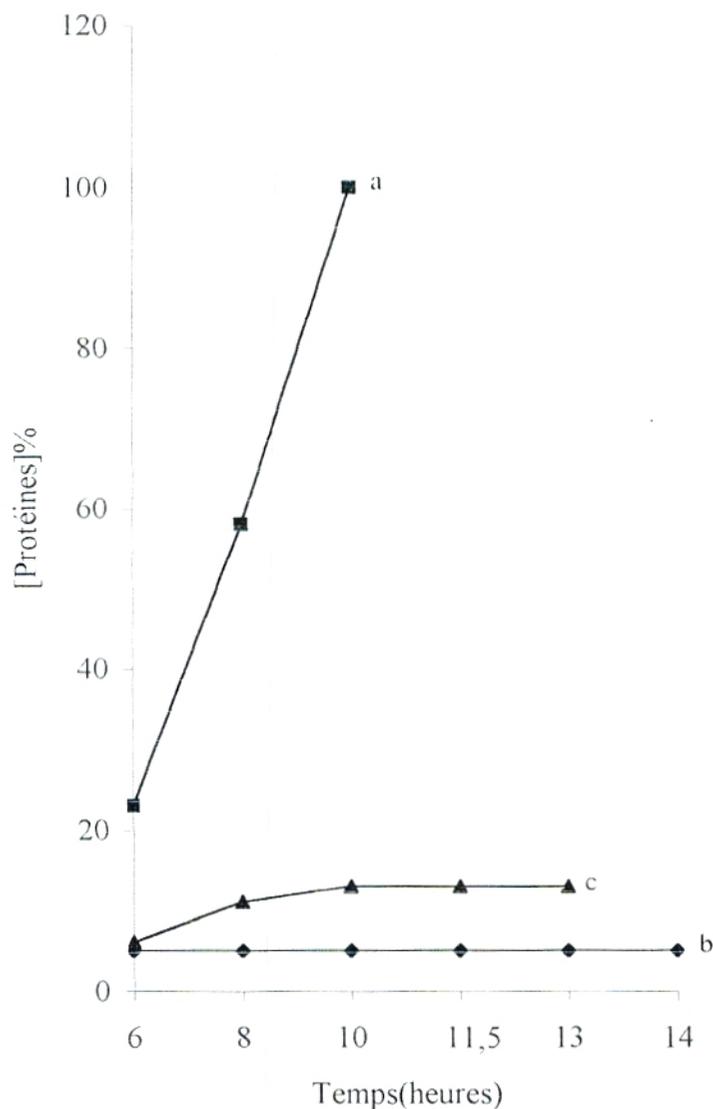


Figure N°36: Effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M préchauffées 20 minutes à 70°C , préparées le jour même de leur utilisation, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffées 20' à 70°C
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C
- ×— Courbe(e): Contrôle Ethanol (volume d'éthanol ajouté correspondant au volume des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, ajouté à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)



FigureN°37: Effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, préchauffées 20 minutes à 70°C , préparées le jour même de leur utilisation, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

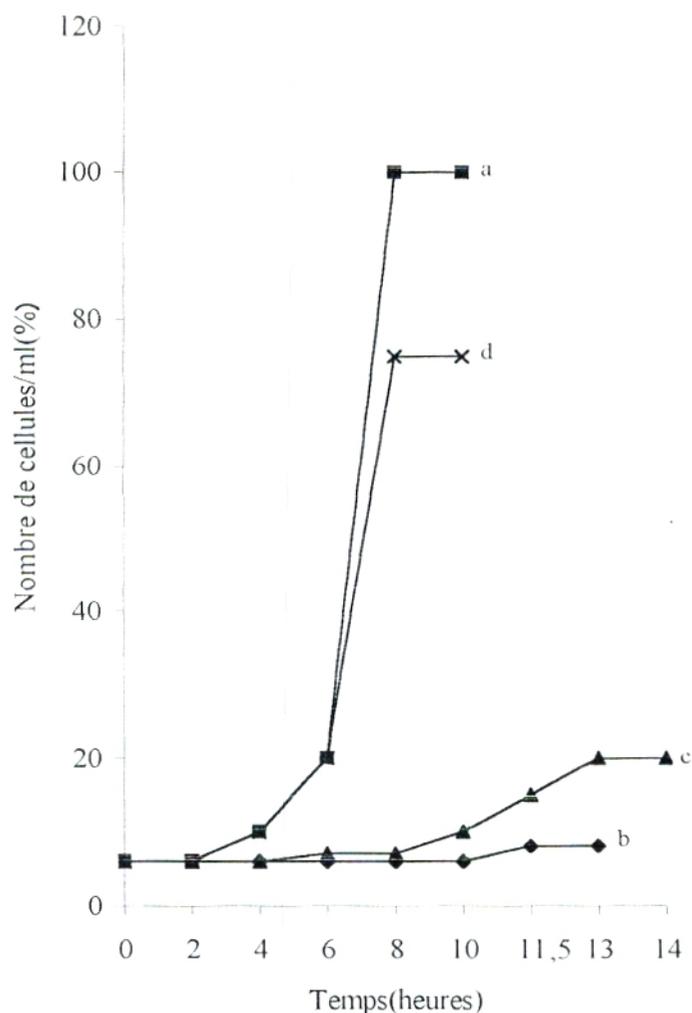
—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C

D'après les résultats obtenus, il apparaît que l'activité antifongique de la solution d'AmB préchauffée, vis à vis du *C. albicans*, est plus importante lorsque la molécule est dissoute dans le DMSO. La solution préparée à 10^{-4} M d'AmB dans le DMSO et préchauffée pendant 20 minutes à 70°C , permet une inhibition totale de la croissance de la levure, alors que celle préparée dans l'éthanol dans les mêmes conditions expérimentales ne permet qu'une inhibition de 60%.

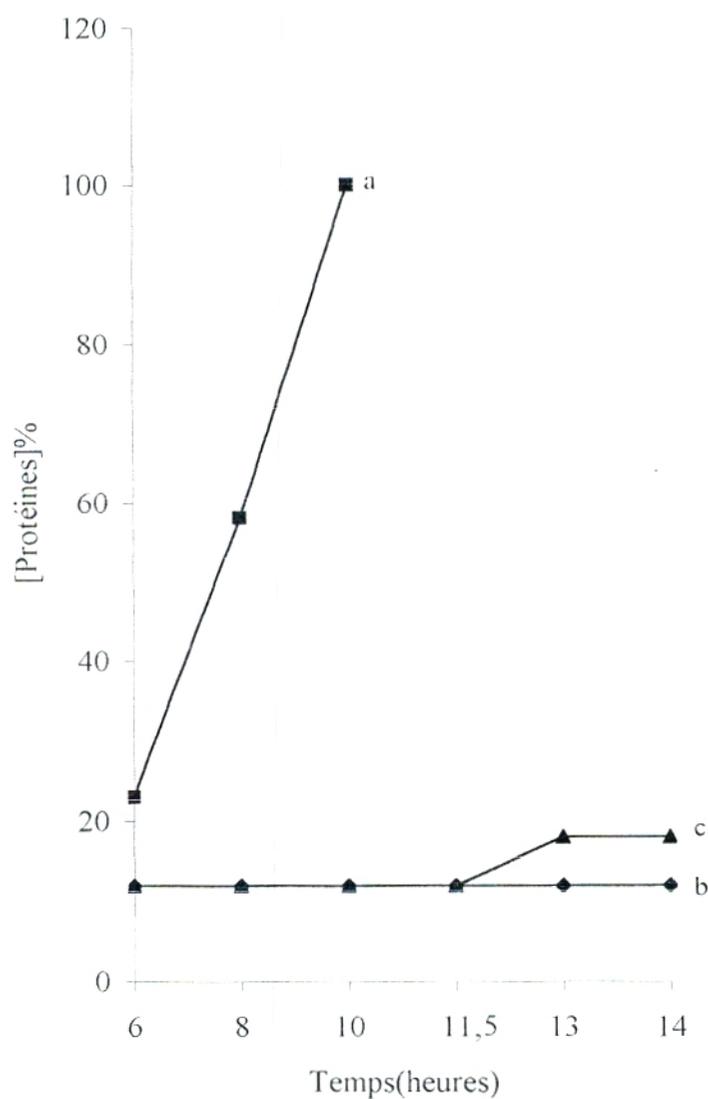
Les figures N°38 et N°39 représentent l'effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$) préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière, sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°38 et par le dosage des protéines sur la figure N°39.

- Les courbes(a) des figures N°38 et N°39 représentent la culture témoin sans aucune addition et la courbe(d) de la figure N°38 représente la culture contrôle de l'éthanol à laquelle nous avons ajouté un volume d'éthanol égale à celui des solutions antifongiques ajoutées (25% d'inhibition).
- Les courbes(b) des figures N°38 et N°39 représentent l'effet de la solution antifongique préparée dans le DMSO. Nous remarquons que la phase de latence est prolongée jusqu'à 10 heures d'incubation, ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 10%. Le taux d'inhibition est de 90%. La masse protéique est autour de 10%.
- Les courbes(c) des figures N°38 et N°39 représentent l'effet de la solution d'AmB préparée dans de l'éthanol. Nous remarquons que la phase de latence est de 8 heures, ensuite le nombre de cellules augmente pour atteindre 20% après 13 heures d'incubation. Il se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique est autour de 20% en fin de croissance. Le taux d'inhibition propre à l'AmB est estimé à 55%.



FigureN°38: Effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées 24 heures à 4°C , sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière
- ×— Courbe(d): Contrôle Ethanol(volume d'éthanol ajouté correspondant au volume des solutions mères à 10^{-4} M d'AmB, ajouté à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)



FigureN°39: Effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées 24 heures à 4°C , sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

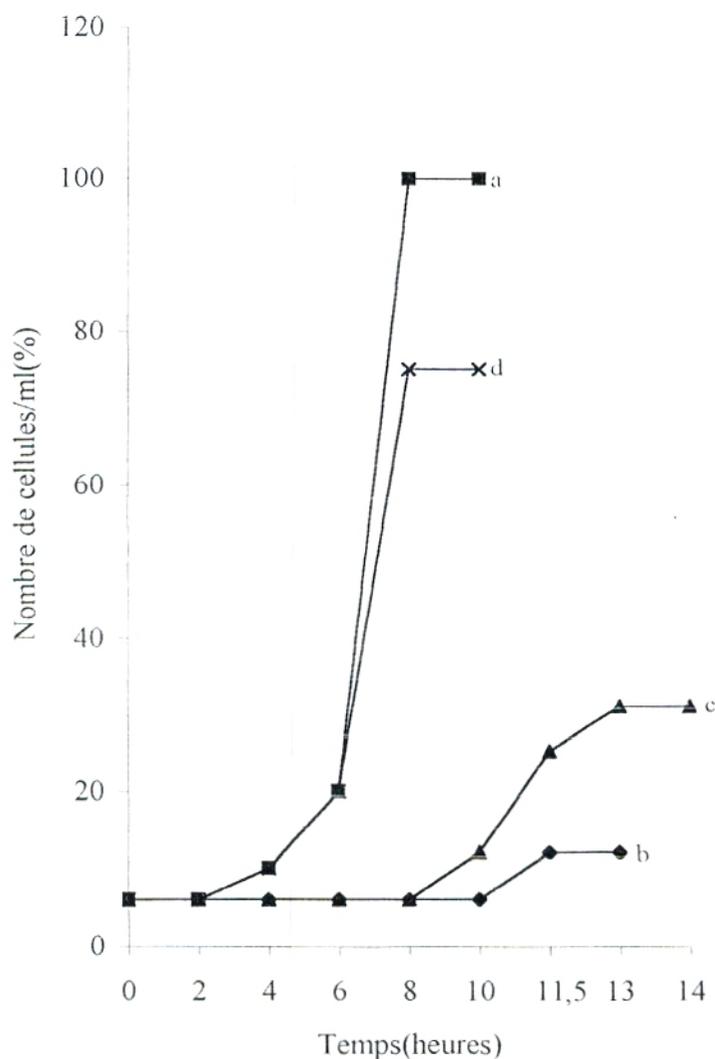
—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière

De ces résultats, il ressort que l'utilisation du DMSO comme solvant permet une meilleure activité de l'AmB préchauffée. En effet, alors qu'avec l'éthanol la solution d'AmB à 10^{-4} M préchauffée 20 minutes à 70°C et conservée 24 heures à 4°C induit une inhibition de la croissance de l'ordre de 55%, celle préparée dans le DMSO dans les mêmes conditions permet une inhibition totale de la croissance de *C. albicans*.

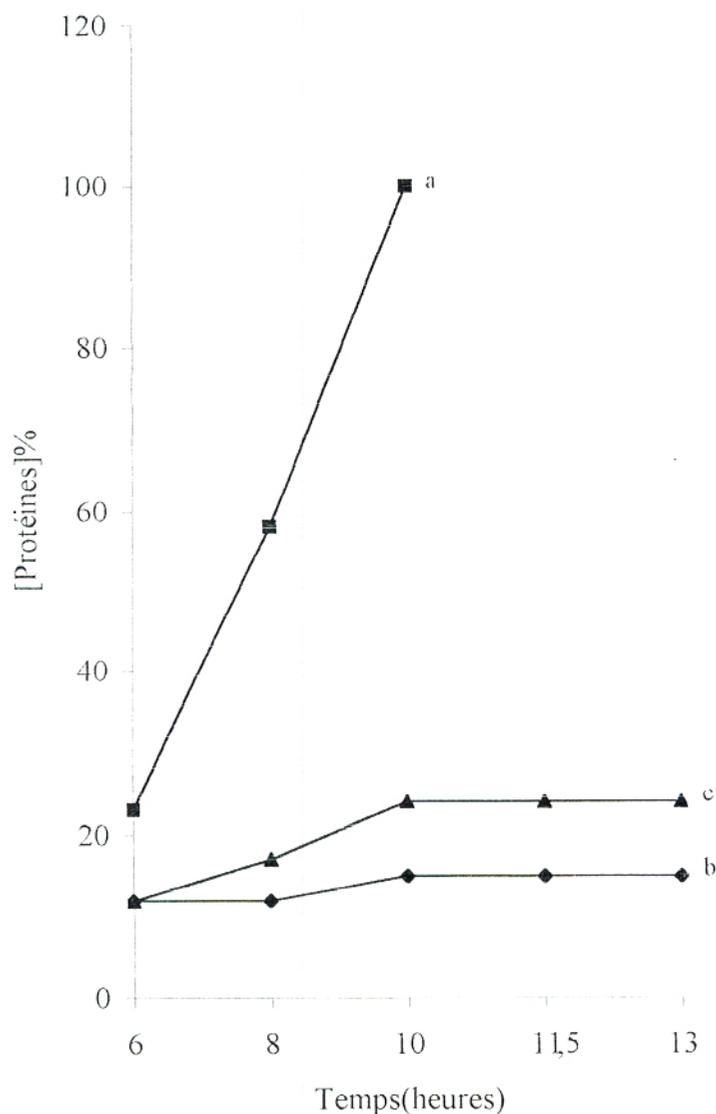
Les figures N°40 et N°41 représentent l'effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M (la concentration finale étant de $2\mu\text{g/ml}$), préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°40 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°41.

- Les courbes(a) des figures N°40 et N°41 représentent la culture témoin sans aucune addition, et la courbe(d) de la figure N°40 représente la culture contrôle de l'éthanol à laquelle nous avons ajouté une quantité d'éthanol égale à celle de la solution antifongique ajoutée.
- Les courbes(b) des figures N°40 et N°41 représentent l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans le DMSO. La phase de latence est prolongée de 8 heures par rapport au témoin. Ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 15% au bout de 11h30 minutes d'incubation où il se stabilise jusqu'à 13 heures d'incubation. La croissance est inhibée à 85%.
- Les courbes(c) des figures N°40 et N°41 représentent l'effet de la solution mère d'AmB préparée dans de l'éthanol. Nous remarquons après une phase de latence de 8 heures que le nombre de cellules augmente et atteint un maximum de 30% en 13 heures d'incubation. Ce taux se stabilise jusqu'à 14 heures d'incubation. La masse protéique est autour de 25% entre 10 heures et 13 heures d'incubation. Le taux d'inhibition propre à l'AmB est estimé à 45%.



FigureN°40: Effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées 1 semaine à 4°C , sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière
- ▲ Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière
- × Courbe(d): Contrôle Ethanol(volume d'éthanol ajouté correspondant au volume des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)



FigureN°41: Effet de la nature du solvant des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées 1 semaine à 4°C sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/Ethanol préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

De ces résultats, il ressort que l'utilisation du DMSO comme solvant permet de maintenir une activité antifongique deux fois supérieures à celle obtenue avec l'éthanol lorsque l'on conserve les solutions mères d'AmB préchauffées, pendant 1 semaine.

Il apparaît clairement que la nature du solvant joue un rôle important dans l'activité des solutions d'AmB préparées à 10^{-4} M et préchauffées 20 minutes à 70°C.

Par ailleurs, SOULIMANE étudie *in vivo*, la toxicité des solutions d'AmB à 10^{-4} M en solutions mères préchauffées 20 minutes à 55°C, 70°C et 80°C vis à vis des souris(travaux en cours au sein de notre laboratoire). Il ressort des résultats obtenus, que c'est le préchauffage à 70°C pendant 20 minutes des solutions d'AmB préparées aussi bien dans l'eau physiologique que dans une solution hydroéthanolyque(30%), qui permet une moindre toxicité vis à vis de l'animal. D'autre part, c'est avec l'eau physiologique que l'on observe une meilleure protection des souris.

Par conséquent, en comparaison avec les résultats que nous avons obtenus, le préchauffage à 70°C pendant 20 minutes des solutions antifongiques préparées à 10^{-4} M d'AmB permet non seulement une réduction de la toxicité de la drogue vis à vis de l'animal, mais aussi d'augmenter l'activité antifongique de la molécule d'AmB vis à vis du *C. albicans*. L'activité de l'AmB dépend du solvant dans lequel elle est dissoute.

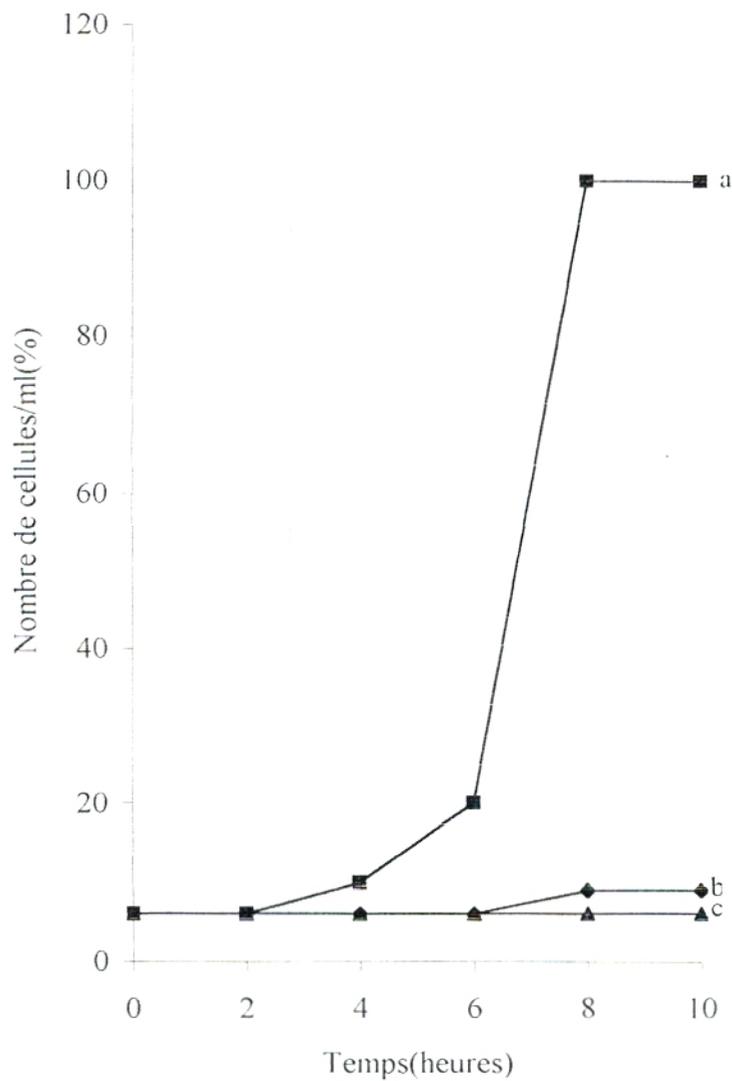
La nature du solvant joue un rôle important dans l'activité antifongique de l'AmB. Quelle que soit la durée de conservation des solutions préchauffées à 70°C pendant 20 minutes, l'AmB est nettement plus active lorsqu'elle est dissoute dans le DMSO.

4. Effet de la température sur la solution mère de Fungizone[®] préparée à 10⁻⁴M dans le DMSO

Nous avons voulu tester l'activité antifongique des solutions de Fungizone[®] préparées à 10⁻⁴M dans le DMSO. Notre choix s'est porté sur la Fungizone[®] car d'une part c'est sous cette forme que l'amphotéricine B est commercialisée et utilisée cliniquement, d'autre part pour pouvoir comparer nos résultats aux travaux de PETIT et al.(1998 et 1999).

Les figures N°42 et N°43 représentent l'effet des solutions mères de Fungizone[®] à 10⁻⁴M dans le DMSO (la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml), préparées aux différentes températures (utilisées le jour même de leur préparation), sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°42 et par le dosage des protéines sur la figure N°43.

- Les courbes(a) des figures N°42 et N°43 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°42 et N°43 représentent l'effet de la solution antifongique préparée à température ambiante. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures, ensuite le nombre de cellules augmentent et atteint 10% après 8 heures d'incubation. L'inhibition est de 90%. La masse protéique est constante ; elle est autour de 10%.
- Les courbes(c) des figures N°42 et N°43 représentent l'effet de la solution antifongique préchauffée 20 minutes à 70°C. La phase de latence est prolongée jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique est de 10%. L'inhibition dans ce cas est totale(100%).

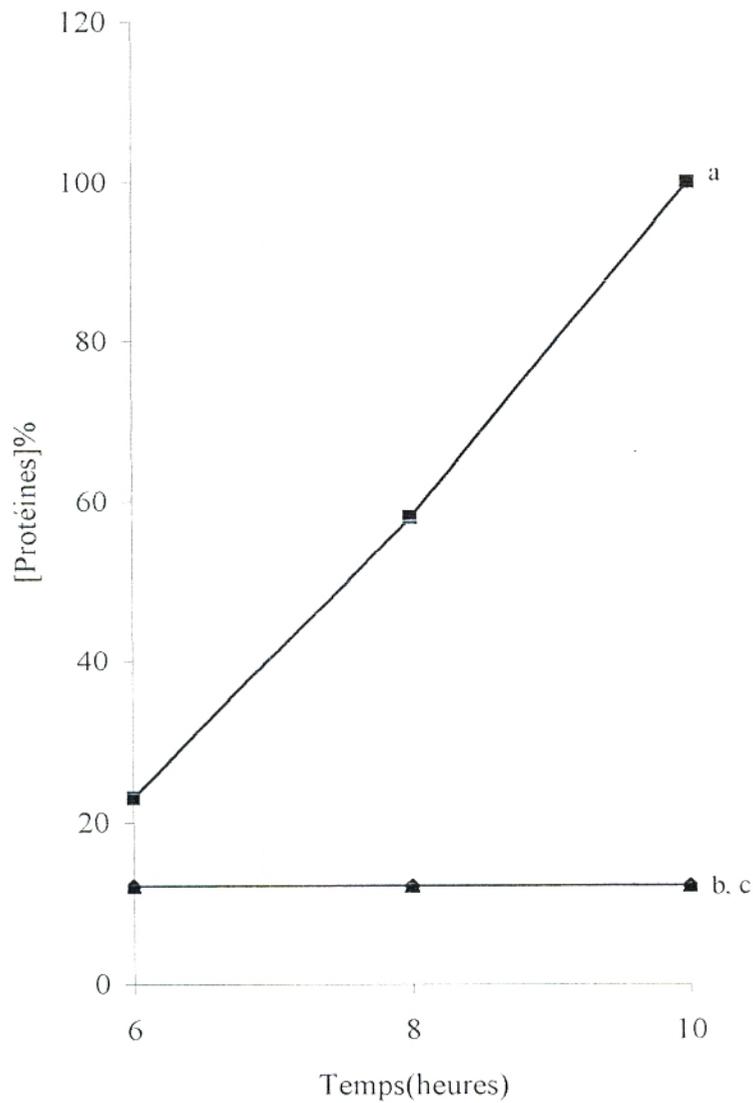


FigureN°42: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$ (utilisées le jour même de leur préparation).

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préparée à température ambiante

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C



FigureN°43: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées aux différentes températures, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$ (les solutions sont préparées le jour même de leur utilisation).

—■— Coureb(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préparée à température ambiante

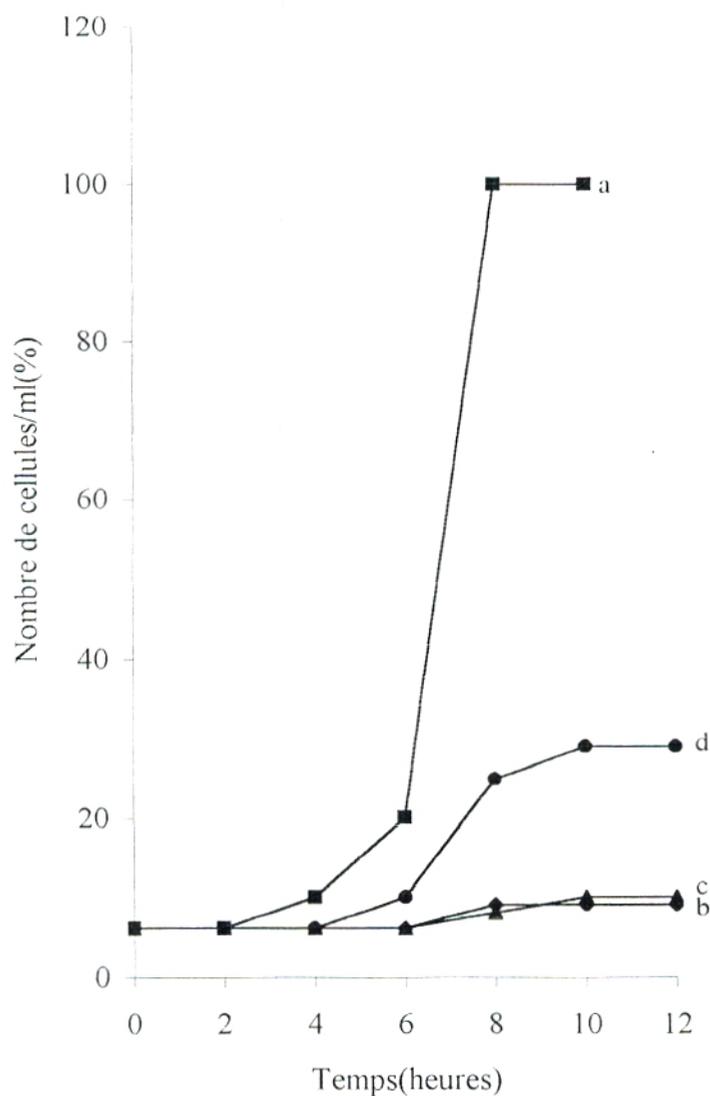
—▲— Coureb(c): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C

D'après ces résultats, le préchauffage de la solution de Fungizone[®] permet une meilleure inhibition de la croissance de la levure, qui se traduit par un prolongement de la phase de latence. Les solutions de Fungizone[®] à 10^{-4} M préparées dans le DMSO, aussi bien chauffées que non chauffées induisent une inhibition totale de la croissance. Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par l'équipe de PETIT et al.(1998) où il a été démontré aussi bien *in vitro* que *in vivo* que le préchauffage des solutions aqueuses de Fungizone[®] à 70°C pendant 20 minutes, maintient l'activité antifongique vis à vis du *Candida* et du *Cryptococcus*.

Pour tester la stabilité de la solution de Fungizone[®] au cours du temps, les solutions mères sont conservées à l'abri de la lumière à 4°C pendant 24 heures et 1 semaine. Après chaque temps de conservation, leur activité antifongique est testée.

Les figures N°44 et N°45 représentent l'effet des solutions mères de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées à température ambiante et conservées à 4°C pendant des durées différentes, sur la croissance de *C. albicans*, où elle est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°44 et par le dosage des protéines sur la figure N°45.

- Les courbes(a) des figures N°44 et N°45 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°44 et N°45 représentent l'effet de la solution antifongique préparée le jour même. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures, ensuite le nombre de cellules augmente jusqu'à 10% après 8 heures d'incubation, et se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique est de 10%. L'inhibition de la croissance est de 90%.
- Les courbes(c) des figures N°44 et N°45 représentent l'effet de la solution antifongique conservée 24 heures à 4°C. Après une phase de latence de 6 heures, le nombre de cellules augmente pour atteindre un maximum de 10% après 10 heures d'incubation et se stabilise durant 2 heures. La masse protéique est autour de 10%. L'inhibition est de 90%.
- Les courbes(d) des figures N°44 et N°45 représentent l'effet de la solution antifongique conservée 1 semaine à 4°C. La phase de latence est de 4 heures, elle est suivie par une phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 10 heures d'incubation où le nombre de cellules atteint un maximum de 30%. Il se stabilise ensuite durant 2 heures. Le taux d'inhibition est de 70%. La masse protéique passe de 10% en 6 heures d'incubation à 35% après 12 heures d'incubation.



FigureN°44: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées à température ambiante et conservées à 4°C à des temps différents, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO, préparée le jour même
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

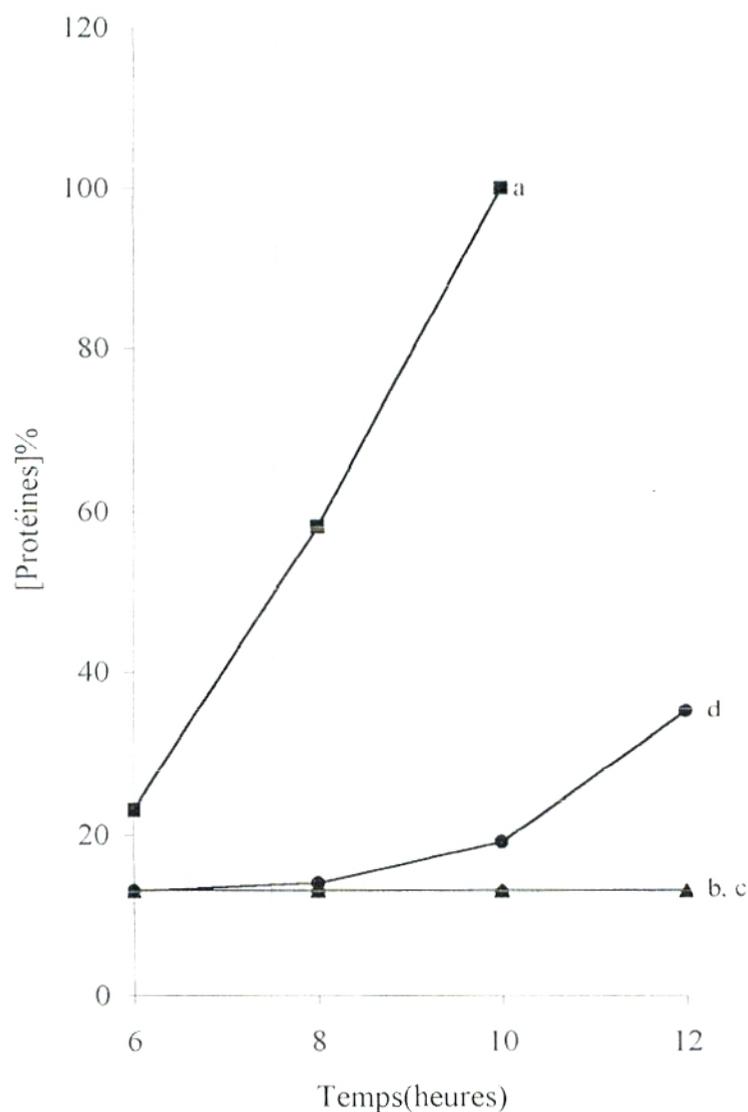


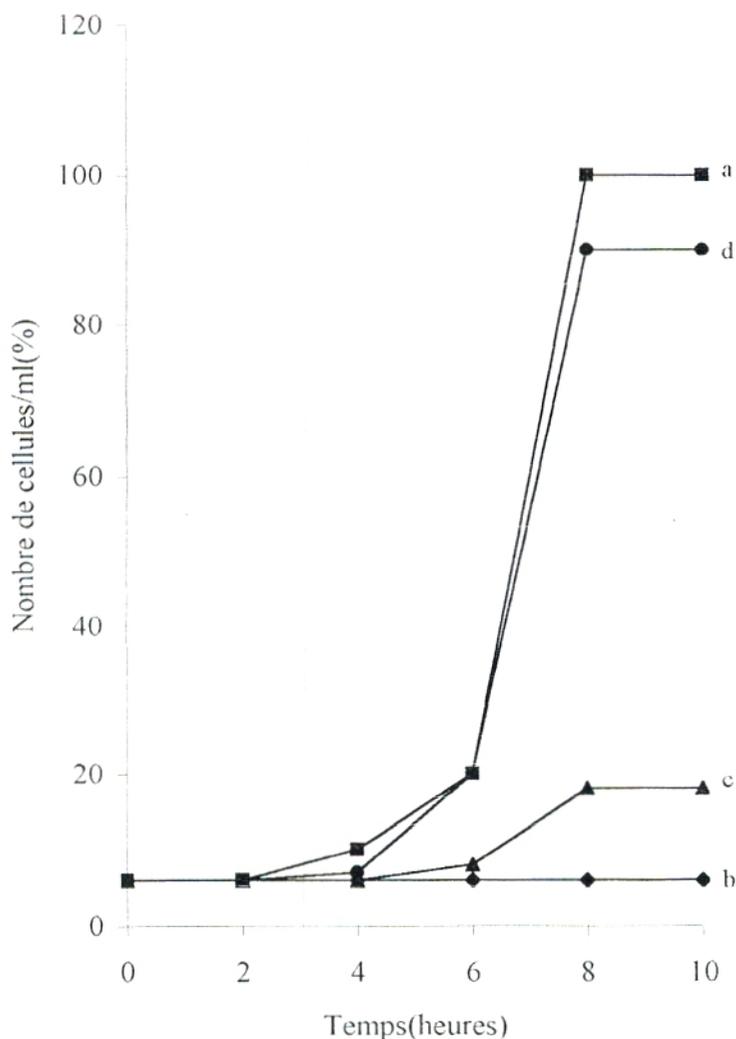
Figure N°45: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le DMSO, préparées à température ambiante et conservées à 4°C à des temps différents, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préparée le jour même
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

De ces résultats, il apparaît que l'activité de la solution de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans le DMSO préparée à température ambiante reste stable durant 24 heures de conservation, par contre elle perd 20% de son efficacité sur le *C. albicans* en 1 semaine de conservation. Par conséquent, en comparaison avec les solutions d'AmB pure préparées dans les mêmes conditions expérimentales, qui elles sont stables durant 1 semaine de conservation, les solutions de Fungizone[®] le sont moins.

L'effet sur la croissance de *C. albicans*, des solutions de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans le DMSO (la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml) préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C pendant des temps différents est représenté sur la figure N°46 où la croissance est suivie par la numération cellulaire et sur la figure N°47 où elle est suivie par le dosage des protéines.

- Les courbes(a) des figures N°46 et N°47 représentent la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes(b) des figures N°46 et N°47 représentent l'effet de la solution antifongique préchauffée et utilisée le jour même. Nous remarquons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition est totale(100%). La masse protéique est constante ; elle est autour de 10%.
- Les courbes(c) des figures N°46 et N°47 représentent l'effet de la solution antifongique préchauffée et conservée 24 heures à 4°C. Nous remarquons après une phase de latence de 6 heures, que le nombre de cellules augmente et atteint un maximum autour de 20% en 8 heures d'incubation. Ce taux se stabilise jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique passe de 20% en 6 heures d'incubation à 40% en fin de croissance. La solution antifongique préchauffée et conservée 24 heures à 4°C inhibe à 80% la croissance de la levure.
- Les courbes(d) des figures N°46 et N°47 représentent l'effet de la solution antifongique préchauffée et conservée 1 semaine à 4°C. Après une phase de latence de 4 heures, le nombre de cellules augmente rapidement et atteint les 90% en 8 heures d'incubation. Les levures entrent alors dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition est pratiquement nulle, elle n'est que de 10%. L'évolution de la masse protéique est parallèle au nombre de cellules ; elle est autour de 20% en 6 heures d'incubation et atteint les 100% en fin de croissance.



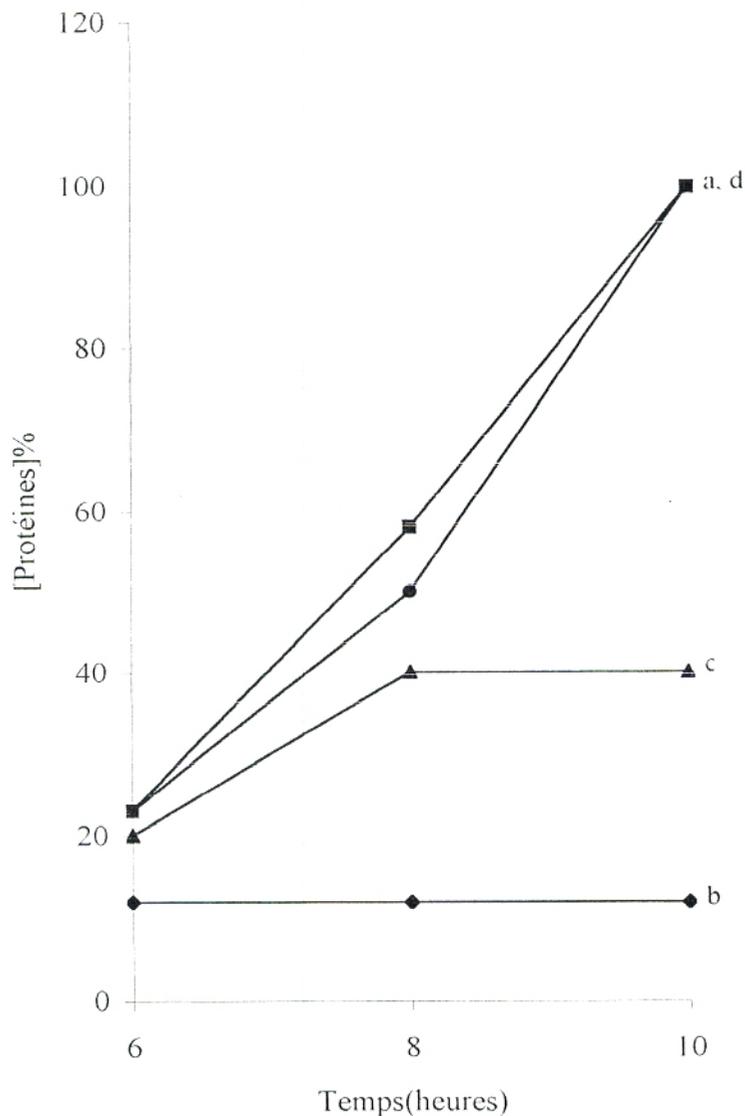
FigureN°46: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le DMSO, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C à des temps différents, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C , utilisée le jour même

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière

—●— Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière



FigurerN°47: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le DMSO, préchauffées 20 minutes à 70°C et conservées à 4°C à des temps différents, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C , utilisée le jour même

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 24 heures à 4°C et à l'abri de la lumière

—●— Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/DMSO préchauffée 20' à 70°C et conservée 1 semaine à 4°C et à l'abri de la lumière

Des résultats obtenus, il ressort que le préchauffage à 70°C pendant 20 minutes des solutions de Fungizone[®] à 10⁻⁴M dans le DMSO, rend la molécule moins stable au cours du temps. Alors que la solution préparée le jour même induit 100% d'inhibition, on observe une perte de 10% de l'activité antifongique après 24 heures de conservation. Cette perte est totale au bout d'une semaine de conservation. Par ailleurs, les solutions antifongiques non préchauffées ne perdent que 20% de leur activité antifongique vis à vis du *C. albicans* au bout d'une semaine de conservation. Par conséquent, les solutions de Fungizone[®] à 10⁻⁴M dans le DMSO, préchauffées 20 minutes à 70°C sont beaucoup moins stables que celles préparées à température ambiante.

En comparant entre elles les solutions d'AmB pure et de Fungizone[®] préparées dans les mêmes conditions, nous observons que :

- Aussi bien les solutions d'AmB pure que les solutions de Fungizone[®], chauffées ou non chauffées, préparées le jour même, ont la même activité vis à vis du *C. albicans*.
- Les solutions d'AmB pure sont plus stables que les solutions de Fungizone[®]. En effet, la solution d'AmB pure non chauffée est stable durant une semaine de conservation alors que la solution de Fungizone[®] l'est moins(elle perd 20% de son activité antifongique). Cette différence est nettement plus importante avec les solutions préchauffées où la Fungizone[®] est quasiment inactive sur le *C. albicans* au bout d'une semaine de conservation(10% d'inhibition), alors que l'AmB pure dans les mêmes conditions est pleinement active(90% d'inhibition).

L'utilisation de la Fungizone[®] ne diminue pas l'activité antifongique de l'AmB vis à vis du *C. albicans*. Cette activité n'est pas modifiée après le préchauffage des solutions antifongiques à 70°C pendant 20 minutes. Mais ce type de formulation est très instable vu que le préchauffage rend la Fungizone[®] totalement inactive vis à vis de la levure au bout d'une semaine de conservation à 4°C et à l'abri de la lumière.

Les résultats obtenus jusqu'à ce niveau de l'étude montrent clairement que l'utilisation des solutions d'AmB à 10^{-4} M, préchauffées 20 minutes à 70°C (utilisées à $2\mu\text{g/ml}$ final), permet l'augmentation du taux d'inhibition de la croissance de *C. albicans*, comparé aux solutions préparées à température ambiante. Cette augmentation se traduit essentiellement par le prolongement de la phase de latence.

Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par PETIT et al. (1998) où il ressort que l'activité antimicrobienne des solutions de Fungizone[®] est maintenue chez les souris infectées aussi bien par *Candida* que par *Cryptococcus*, lorsque les solutions sont préchauffées 20 minutes à 70°C . D'autre part, ces solutions préchauffées permettent d'augmenter l'activité antileishmaniale (PETIT et al., 1999).

Par ailleurs, il a été démontré que la taille des agrégats augmente après le préchauffage des solutions aqueuses d'AmB (ERNST et al., 1978). L'étude de GABORIAU et al. (1997a) sur les propriétés physico-chimiques de l'AmB, montre que le préchauffage des solutions à 70°C pendant 20 minutes, permet la conversion presque totale des agrégats en superagrégats et que cet état d'agrégation dépend du temps d'incubation et de la concentration de la solution mère. En effet, c'est aux faibles concentrations que nous obtenons un maximum de superagrégats.

Par conséquent, la formation des superagrégats par le préchauffage des solutions d'AmB a permis l'augmentation de l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*.

D'autre part, la formation de ces superagrégats permet de réduire la toxicité de l'AmB vis à vis du globule rouge (GABORIAU et al., 1997b). De plus, l'étude menée *in vivo* avec la Fungizone[®] chauffée 20 minutes à 70°C (PETIT et al., 1998), démontre clairement que cette formulation est beaucoup moins toxique vis à vis des souris traitées. Cette diminution de toxicité se traduit par une augmentation du taux d'animaux survivant après injection de la solution antifongique.

Comme il a été démontré dans le chapitre précédent, la nature du solvant dans lequel l'AmB est dissoute joue un rôle important dans l'activité antifongique des solutions vis à vis du *C. albicans*. En effet, le DMSO permet une activité antifongique de l'AmB plus importante que l'éthanol, aussi bien avec les solutions préparées à température ambiante que celles préchauffées 20 minutes à 70°C .

HUNG et al.(1988) montrent que la stabilité de l'AmB dépend d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques ; dont l'oxygène, la lumière, la température et le pH du milieu dans lequel se trouve la molécule. Des résultats que nous avons obtenus, il ressort que l'activité de la solution antifongique préparée à température ambiante est plus stable que celle des solutions préchauffées 20 minutes à 70°C. Nous observons une perte d'activité des solutions d'AmB pure préchauffées, de l'ordre de 15% au bout d'une semaine de conservation à 4°C à l'abri de la lumière alors qu'elle est beaucoup plus importante lorsqu'il s'agit des solutions de Fungizone[®] préparées dans les mêmes conditions ; où l'on observe une perte totale de l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*. D'où l'importance du mode de préparation des solutions antifongiques et de leur durée de conservation.

D. EFFET pH

Les travaux de JOHNSON et al. (1978), de KERRIDGE (1986) et de BOUCHERIT (1995) ont montré que l'activité de l'amphotéricine B est modulée par le pH du milieu. D'une part, vis à vis du *C. albicans*, on observe à pH acide une augmentation de l'activité antifongique de l'amphotéricine B. D'autre part, vis à vis du globule rouge, à pH compris entre 5.5 et 6.4, l'amphotéricine B est relativement moins toxique qu'à pH 7.4. Enfin, l'effet protecteur des lipoprotéines augmente significativement à pH 5.4 en comparaison à pH 7.4.

Par ailleurs, les travaux de DUPONT et al.(1977) montrent une modification de l'état d'agrégation de la molécule d'amphotéricine B sous l'effet du pH. En effet, lorsque le pH du milieu varie de 7.4 à 10, la taille des agrégats d'amphotéricine B augmente de manière importante donnant des superagrégats. Ces superagrégats sont caractérisés par une augmentation du rayon de giration de l'agrégat alors que la masse apparente reste constante.

D'un autre côté, la formation de superagrégats par élévation de la température entraîne une réduction de la toxicité vis à vis des cellules animales aussi bien *in vitro*(GABORIAU et al., 1997b) que *in vivo*(PETIT et al., 1998) sans perte notable de l'activité antifongique.

De plus, les superagrégats obtenus par préchauffage sont caractérisés par une augmentation de la masse apparente des agrégats et de leur rayon de giration(ERNST et al., 1978).

L'ensemble de ces observations nous a amené à étudier le comportement des superagrégats obtenus à pH alcalin vis à vis du *C. albicans*.

Notre choix s'est porté sur deux pH : le pH 10 qui entraîne une augmentation maximale du rayon de giration de l'agrégat(DUPONT et al., 1977), et le pH 10.8 avec lequel les agrégats se dissocient(DUPONT et al., 1977).

Nous avons utilisé le tampon carbonate/bicarbonate à pH 10 et à pH 10.8. Ces tampons sont stérilisés par des filtres millipores stériles à usage unique, d'une porosité de 0.22 μ m.

Les solutions d'amphotéricine B sont préparées à la concentration de 10⁻⁴M dans le tampon. La préparation des solutions se fait comme suit : à partir d'une solution d'amphotéricine B à 10⁻²M dans le DMSO, on réalise une dilution à 10⁻⁴M dans le tampon carbonate/bicarbonate au pH choisi. Ensuite, la solution est partagée en deux parties ; l'une est maintenue à température ambiante pendant 20 minutes, l'autre est plongée dans un bain-marie à 70°C pendant 20 minutes. Cette solution est ensuite refroidie sous un jet d'eau froide.

A partir de solutions de Fungizone[®] ou d'amphotéricine B pure à 10⁻²M dans le DMSO, une autre série de solutions mères est préparée à 10⁻⁴M dans le sabouraud(pH 5.9) et dans l'eau physiologique(pH 7). Les solutions ainsi préparées sont traitées de la même manière que celle décrite avec le tampon carbonate/bicarbonate.

Les solutions antifongiques sont utilisées le jour même de leur préparation. Elles sont ajoutées à la culture au même moment que l'inoculum à raison de 2 μ g d'AmB/ml final. La croissance est suivie jusqu'à la phase stationnaire.

1. Effet du tampon carbonate/bicarbonate à pH 10

En regard des résultats des travaux de DUPONT[†] et al.(1977) qui montrent lorsque le pH du milieu varie de pH 7.4 à pH 10, la taille des agrégats d'amphotéricine B d'une solution aqueuse à 10^{-4} M d'antifongique augmente de manière importante ; le rayon de giration de l'agrégat passe de 730A° à 1800A° alors que la masse apparente est constante, et que c'est à pH 10 que l'on observe la taille maximale de superagrégats, nous avons voulu tester l'activité antifongique de l'amphotéricine B lorsqu'elle est dissoute dans un solvant à pH 10.

- 1- Dans un premier temps, nous avons utilisé le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 à la concentration de 10mM afin de réduire l'effet force ionique. Après l'addition de ce tampon, le pH du milieu de culture passe de 5.9 à 6.1.

Les figures N°48 et N°49 représentent l'effet des solutions d'AmB à 10^{-4} M préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10(la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml), à différentes températures sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°48 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°49.

- Les courbes(a) des figures N°48 et N°49 représentent la culture témoin sans aucune addition qui se déroule à pH 5.9.
- La courbe(d) de la figure N°48 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon égale au volume ajouté des solutions mères. Le pH de la culture est de 6.1. Nous remarquons une phase de latence de 2 heures suivie par une phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 8 heures d'incubation où le nombre de cellules atteint les 100%. Ensuite, il se stabilise dans une phase stationnaire jusqu'à 10 heures d'incubation. Nous constatons alors que les courbes(a) et (b) de la figure N°48 sont parfaitement superposables et que le shift de pH qui va de 5.9 à 6.1 après l'addition du tampon carbonate/bicarbonate pH 10(10mM), n'entraîne aucune modification de la croissance de *C. albicans*.
- Les courbes(b) des figures N°48 et N°49 représentent l'effet de la solution antifongique préparée à température ambiante. Nous remarquons que la phase de latence est prolongée de 4 heures par rapport au témoin, ensuite le nombre de cellules augmente pour être autour de 10% après 8 heures d'incubation. Ce taux se

stabilise jusqu'à 10 heures d'incubation. La masse protéique est constante ; elle est autour de 10%. L'inhibition dans ce cas est de 90%.

- Les courbes(c) des figures N°48 et N°49 représentent l'effet de la solution antifongique préchauffée 20 minutes à 70°C. Nous remarquons que la phase de latence est de 4 heures. Le nombre de cellules augmente, il est autour de 10% au bout de 8 heures d'incubation. La levure entre alors dans une phase stationnaire qui dure 2 heures. La masse protéique est constante ; elle est de 10%. L'inhibition est de 90%.

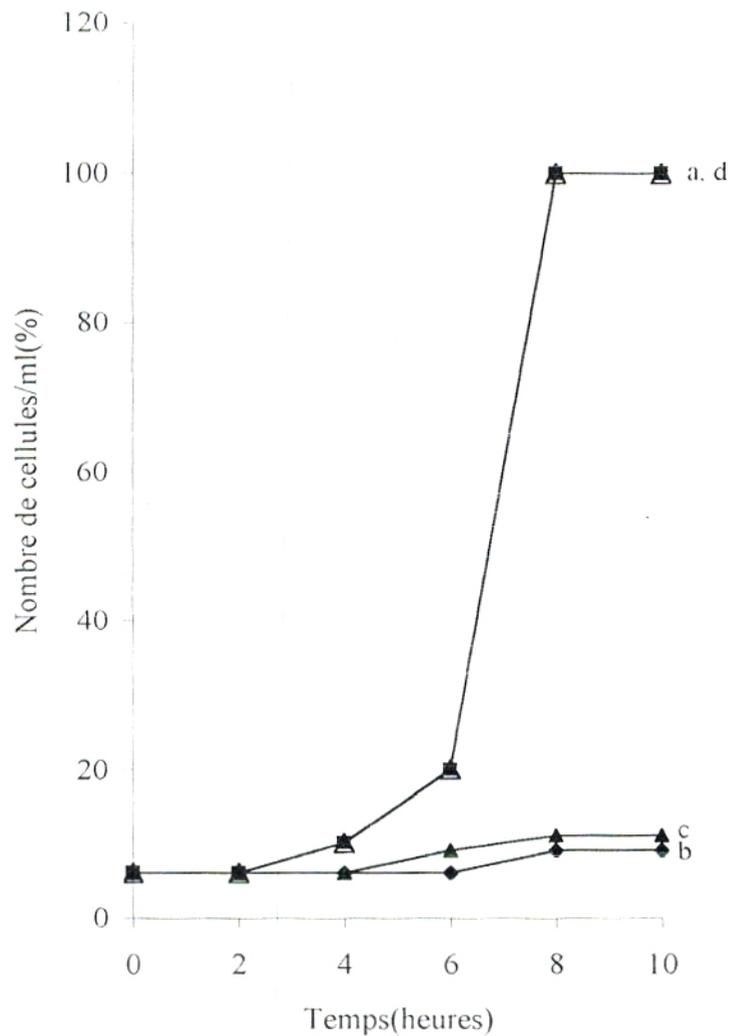
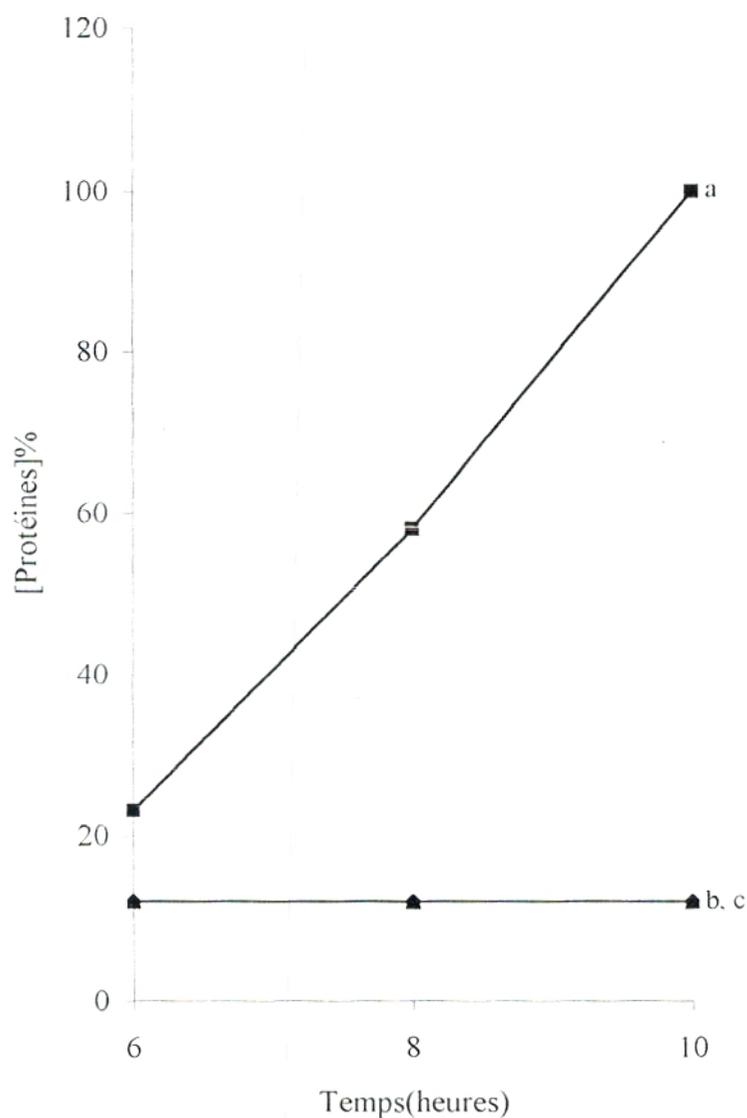


Figure N°48: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10(10mM), préparées à différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM), préparée à température ambiante
- ▲ Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM) préchauffée 20' à 70°C
- △ Courbe(d): Contrôle tampon pH10(10mM)(volume de tampon ajouté correspondant au volume des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à la concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)



FigureN°49: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10(10mM), préparées aux différentes températures, sur l'évolution de la masse protéique de *C. albicans* ; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

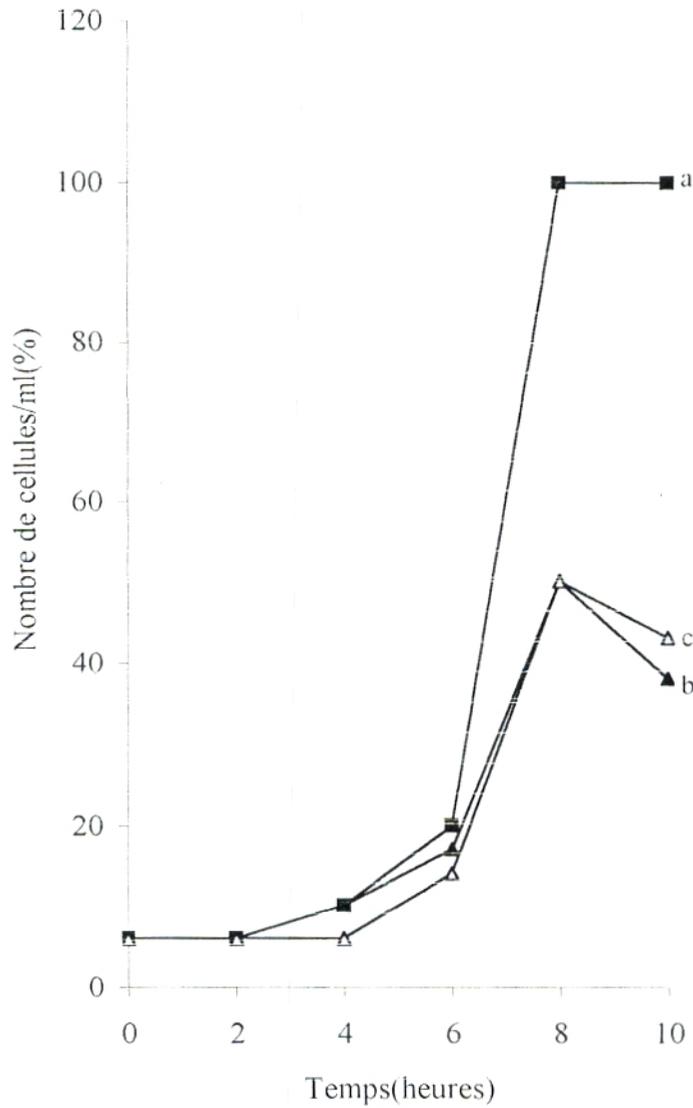
- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM) préparée à température ambiante
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM) préchauffée 20' à 70°C

D'après ces résultats, il apparaît que les solutions mères d'AmB à 10^{-4} M préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10, sont pleinement actives vis à vis du *C. albicans*(la croissance est inhibée à 90%). Cette activité n'est pas modifiée après le préchauffage des solutions à 70°C pendant 20 minutes(90% d'inhibition de la croissance). Par conséquent, la formation des superagrégats à pH 10(DUPONT et al., 1977) ne modifie pas l'activité antifongique de la molécule d'AmB vis à vis du *C. albicans*.

- 2- Dans un second temps, nous avons utilisé le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 à la concentration de 100mM. L'addition de ce tampon au milieu sabouraud entraîne un shift de pH important. Le pH du milieu passe de 5.9 à 6.6.

La figure N°50 représente l'effet de la solution d'AmB à 10^{-4} M préparée dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10, à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*(la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml). La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°50 représente la culture témoin sans aucune addition où la croissance se déroule à pH 5.9.
- La courbe(b) de la figure N°50 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10, correspondant au volume ajouté de la solution antifongique. La culture se déroule à pH 6.6. Nous remarquons que la phase de latence est de 2 heures. Les cellules entrent alors en phase de croissance exponentielle jusqu'à atteindre un maximum autour de 50% en 8 heures d'incubation. Ensuite ce taux chute brutalement après 10 heures d'incubation. La croissance est inhibée à 50%.
- La courbe(c) de la figure N°50 représente l'effet de la solution d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10. La culture se déroule à pH 6.6. Nous remarquons que la phase de latence est de 4 heures. Les cellules entrent alors en phase exponentielle où le nombre de cellules maximum est de 50 % après 8 heures d'incubation. Ensuite, ce taux chute brusquement au bout de 10 heures d'incubation. L'inhibition est de 50%. Ce taux est identique à celui obtenu avec la culture contrôle(courbe b).



FigureN°50: Effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10(100mM), préparée à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—▲— Courbe(b): Contrôle tampon pH10(100mM)(volume de tampon ajouté correspondant au volume des solutions mères à 10^{-4} M, ajouté à une concentration finale d'AmB de $2\mu\text{g/ml}$)

—△— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(100mM)

Ce résultat laisse suggérer que dans les conditions utilisées, l'AmB a perdu toute activité antifongique vis à vis du *C. albicans*.

La question qui se pose alors est de savoir si l'inhibition de l'activité antifongique observée est liée à un effet pH, c'est à dire au passage du pH du milieu de culture de 5.9 à 6.6 ou à un effet de la concentration élevée de 100mM du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.

Pour cela, nous avons voulu vérifier si en ramenant le pH du milieu de culture à son pH d'origine c'est à dire pH 5.9 par ajout d'acide chlorhydrique 1N (concentration finale inférieure à 3mM), l'AmB retrouvait ou non l'activité observée lorsque nous utilisons le tampon carbonate/bicarbonate à la concentration de 10mM, le pH étant toujours égal à 10.

La figure N°51 représente l'effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10, préparées à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*, en fonction du pH du milieu de culture (la concentration finale d'AmB étant de 2 μ g/ml). La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°51 représente la culture témoin sans aucune addition. La culture se déroule à pH 5.9.
- La courbe(b) de la figure N°51 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10 correspondant au volume ajouté des solutions antifongiques. La culture se déroule à pH 6.6.
- La courbe(c) de la figure N°51 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10, sur la croissance de *C. albicans*. La culture se déroule à pH 6.6.
- La courbe(d) de la figure N°51 représente l'expérience contrôle qui consiste à suivre la croissance de *C. albicans* en l'absence d'AmB et en présence de tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10, et de HCl(1N) pour ramener le pH du milieu de culture à 5.9. Nous remarquons après une phase de latence de 2 heures, une augmentation du nombre de cellules jusqu'à atteindre 100% en 8 heures d'incubation. Les cellules entrent alors en phase stationnaire durant 2 heures.
- La courbe(e) de la figure N°51 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10, et en présence de HCl(1N). Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures, ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 10% après 8 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 90% et elle est due uniquement à l'AmB.

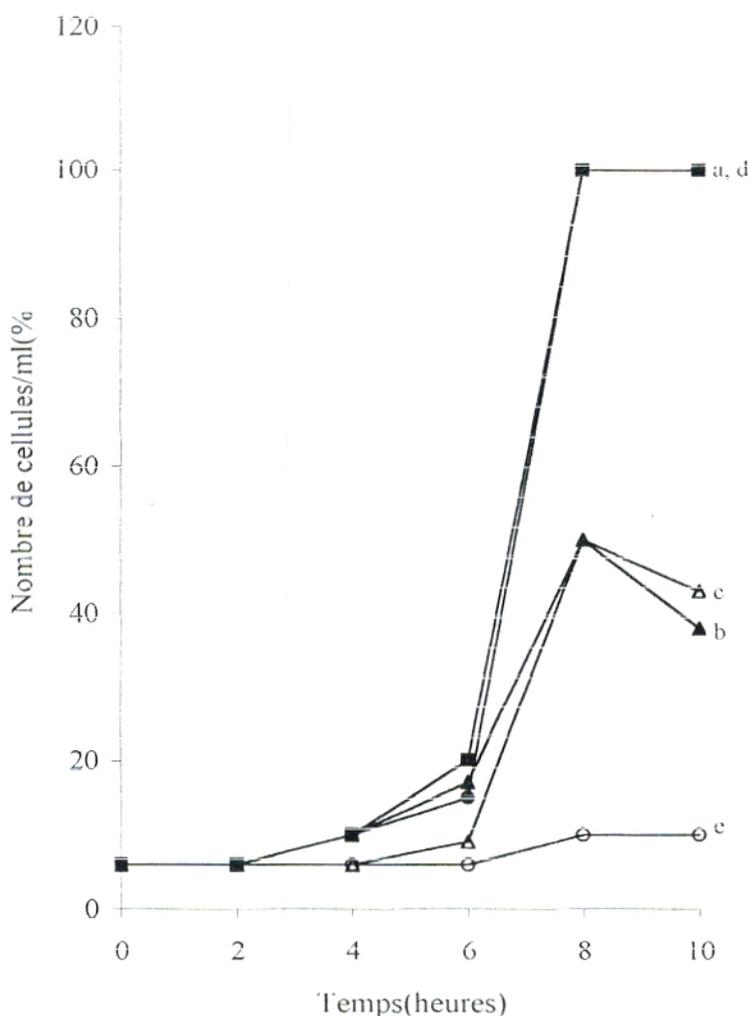


Figure N°51: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10(100mM), préparées à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*, en fonction du pH du milieu de culture (la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$).

- Courbe(a): Témoin
- ▲— Courbe(b): Contrôle tampon pH10(100mM)
- △— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(100mM)
- Courbe(d): Contrôle tampon pH10(100mM)+HCl(1N)
- Courbe(e): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(100mM)+HCl(1N)

Rq: Pour les tests contrôles, le volume de tampon ajouté correspond au volume des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$.

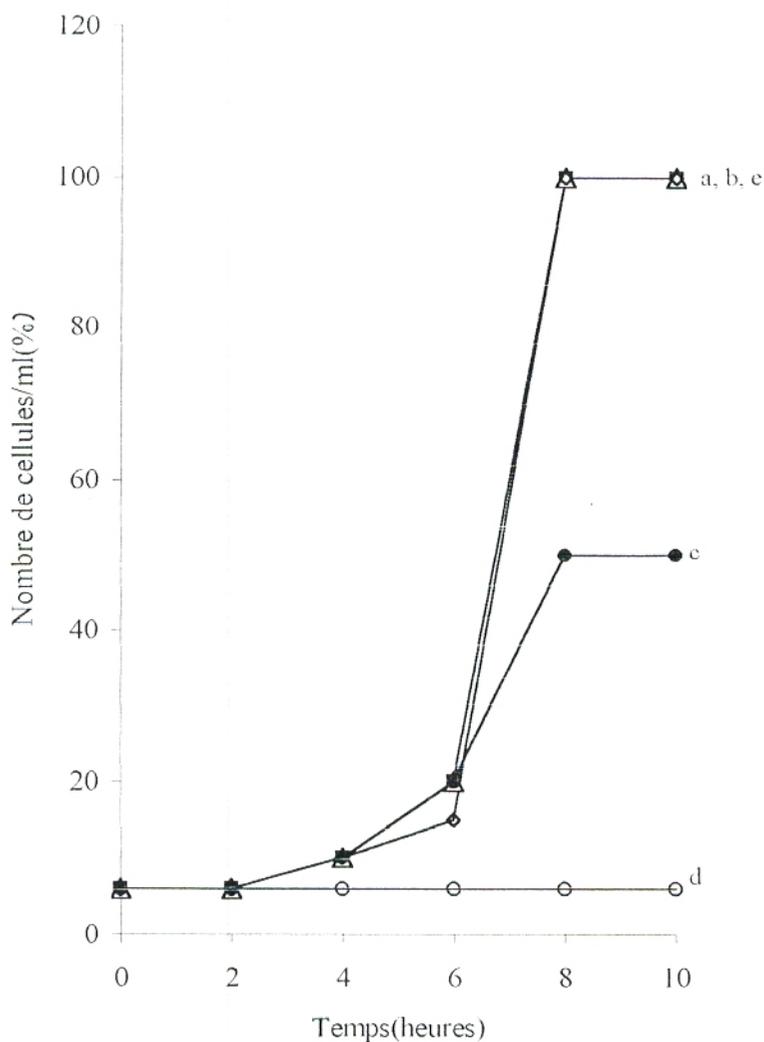
De ces résultats, il ressort que lorsque la culture se déroule à pH 6.6 qui est un pH défavorable à la croissance de *C. albicans*, l'AmB perd toute activité vis à vis de cette levure. Par contre, lorsque le pH du milieu de culture est de 5.9, pH favorable à la croissance de la levure, l'AmB est pleinement active, elle inhibe à 90% la croissance du *C. albicans*. Ce taux d'inhibition est identique à celui obtenu avec les solutions antifongiques préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10 à la concentration de 10mM(courbe b de la figure N°48).

Suite à ces observations, nous avons voulu savoir si la perte d'activité de l'AmB est dû uniquement à une augmentation du pH du milieu de culture ou à l'accumulation d'un effet pH et de l'effet de la force ionique du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.

C'est pourquoi dans un second temps, nous avons préparé des solutions d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10, à température ambiante. Ensuite, après l'addition de ces solutions mères au milieu de culture à la concentration finale de 2 μ g/ml, nous avons ajouté de la soude 1N(concentration finale inférieure à 3mM) au milieu de culture pour ramener le pH du milieu à 6.6 qui correspond au pH obtenu après l'addition de ce même tampon 100mM pH 10.

La figure N°52 représente l'effet de la solution d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10, préparée à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans* ; la culture étant menée à pH 6.6(la concentration finale d'AmB étant de 2 μ g/ml)

- La courbe(a) de la figure N°52 représente la culture témoin sans aucune addition. La culture se déroule à pH 5.9.
- La courbe(b) de la figure N°52 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10, égale au volume des solutions antifongiques. La culture est menée à pH 5.9.
- La courbe(c) de la figure N°52 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10 et NaOH(1N) pour ramener le pH du milieu à 6.6. Nous remarquons après une phase de latence de 2 heures, que le nombre de cellules augmente et atteint un maximum de 50% après 8 heures d'incubation. La levure entre ensuite dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 50%.
- La courbe(d) de la figure N°52 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10, en présence de NaOH(1N) la croissance est menée à pH 6.6. Nous remarquons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 100%, mais elle est due en partie(50%) à l'alcalinité du milieu.



FigureN°52: Effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10(10mM), préparée à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*; la culture étant menée à pH6.6(la concentration finale d'AmB est de $2\mu\text{g/ml}$).

- Courbe(a): Tmoin
- △— Courbe(b): Contrôle pH10(10mM)
- Courbe(c): contrôle pH10(10mM)+NaOH(1N)
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM)+NaOH(1N)
- ◇— Courbe(e): Contrôle tampon pH10(10mM)+NaOH(1N)+HCl(1N)

Rq: Pour les tests contrôles, le volume de solvant ajouté correspond au volume de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$.

Les expériences de culture menées à pH 6.6 en utilisant du sabouraud dans lequel on a introduit un tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10 et auquel on a ajouté de la soude 1N, montrent une inhibition de la croissance de la levure de 50%.

Pour voir si cette inhibition est due uniquement au shift de pH (qui passe de 5.9 à 6.6) ou alors à une dégradation irréversible du milieu de culture à pH 6.6, nous avons effectué une expérience contrôle à laquelle nous avons ajouté du tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10 et de la soude 1N (concentration finale inférieure à 3mM) pour ramener le pH du milieu à 6.6. Après ce shift de pH, nous avons ajouté du HCl 1N (concentration finale inférieure à 3mM) pour revenir à nouveau au pH initial du milieu qui est de 5.9. Cette culture contrôle est représentée par la courbe(e) de la figure N°52. Nous remarquons après une phase de latence de 2 heures, que la levure entre en phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 8 heures d'incubation où le nombre de cellules atteint 100% et se stabilise durant 2 heures.

D'après les cultures contrôles représentées par les courbes (c) et (e) de la figure N°52, nous constatons que d'une part, la croissance de *C. albicans* menée à pH 6.6 en présence du tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10, est inhibée à 50%, d'autre part, en présence du même tampon et après le retour du pH du milieu à 5.9 (par addition de HCl 1N), la levure reprend une croissance identique à celle du témoin (courbe (a) de la figure N°52).

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la croissance observée lorsque la culture est menée à pH 6.6 est due uniquement à l'alcalinité du milieu de culture et non pas à une dégradation partielle de ce dernier par le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.

De l'analyse des résultats obtenus à ce niveau de l'étude, il ressort que l'activité de la solution d'AmB préparée à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 et utilisée à la concentration finale de 2µg/ml, dépend du pH du milieu de culture. Lorsque la culture est menée à pH 5.9, qui est le pH initial du milieu sabouraud, les solutions antifongiques préparées à température ambiante ou préchauffées 20 minutes à 70°C sont pleinement actives vis à vis du *C. albicans*. Elles induisent 90% d'inhibition de la croissance, ce qui font penser que les superagrégats obtenus à pH 10 maintiennent l'activité antifongique de l'AmB.

D'un autre côté, lorsque la culture est menée à pH 6.6, l'activité antifongique dépend non seulement du pH du milieu de culture mais aussi de la force ionique du tampon carbonate/bicarbonate pH 10. En effet, les résultats obtenus en présence de ce tampon à la concentration de 100mM, laisse suggérer que l'AmB perde toute activité antifongique vis à vis du *C. albicans*. En revanche, l'utilisation du tampon à la concentration de 10mM, dans les mêmes conditions, maintient l'activité inhibitrice de l'AmB vis à vis de la levure.

De plus, des expériences de contrôle nous permettent de dire que l'inhibition de la croissance observée à pH 6.6 en absence d'AmB, n'est pas due à une dégradation du milieu de culture mais uniquement à l'alcalinité du milieu. En effet, le retour du pH du milieu de culture au pH initial(pH 5.9) permet le retour à la normale de la croissance(0% d'inhibition).

2. Effet du tampon carbonate/bicarbonate à pH 10.8

Les travaux de DUPONT et al.(1977) montrent lorsque le pH de la solution varie de 7.4 à 10, que la taille des agrégats d'amphotéricine B augmente sans modification de la masse apparente ce qui laisse supposer que les agrégats d'amphotéricine B passent d'une forme compacte à une forme plus expansée. Au-delà de pH 10, les agrégats d'amphotéricine B se dissocient entraînant une diminution de la masse apparente et du rayon de giration.

Nous avons voulu vérifier si le nouvel état d'agrégation obtenu pour des pH supérieurs à 10 ne s'accompagnait pas d'une modification de l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis à vis du *C. albicans*. Pour ce faire, nous avons réalisé une série d'expériences avec des solutions antifongiques préparées à pH 10.8.

- 1- Dans un premier temps, le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 est utilisé à la concentration de 10mM afin de réduire l'effet force ionique. Après l'addition de ce tampon, le pH du milieu de culture passe de 5.9 à 6.2.

Les figure N°53 et N°54 représentent l'effet des solutions d'AmB à 10^{-4} M préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8(la concentration finale d'AmB étant de 2 μ g/ml), aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire sur la figure N°53 et par l'évolution de la masse protéique sur la figure N°54.

- Les courbes(a) des figures N°53 et N°54 représentent la culture témoin sans aucune addition, qui se déroule à pH 5.9(pH initial du sabouraud).
- La courbe(d) de la figure N°53 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8, qui correspond au volume des solutions antifongiques ajoutées. La culture est menée à pH 6.2. Nous remarquons une phase de latence de 2 heures suivie par une phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 8 heures d'incubation où le nombre de cellules atteint le taux maximum(100%). Ensuite, la levure est en phase stationnaire jusqu'à 10 heures d'incubation. Nous constatons alors que les courbes (a) et (d) de la figure N°53 sont parfaitement superposables et par conséquent le shift de pH du milieu à 6.2 provoqué par l'addition du tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH10.8, n'induit pas une inhibition de la croissance de la levure.

- Les courbes(b) des figures N°53 et N°54 représentent l'effet de la solution mere d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8, préparée à température ambiante. La culture est ainsi réalisée à pH 6.2. Nous remarquons que la phase de latence est prolongée de 4 heures par rapport au témoin, ensuite le nombre de cellules augmente pour être autour de 10% après 8 heures d'incubation. Ce taux se stabilise durant 2 heures. La masse protéique est constante ; elle est autour de 10%. L'inhibition dans ce cas est de 90%.
- Les courbes(c) des figures N°53 et N°54 représentent l'effet de la solution antifongique préchauffée 20 minutes à 70°C, la culture étant menée à pH 6.2. Après une phase de latence de 4 heures, le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre un maximum autour de 20% après 8 heures d'incubation. La masse protéique est parallèle au nombre de cellules ; elle est autour de 20% après 6 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 80%.

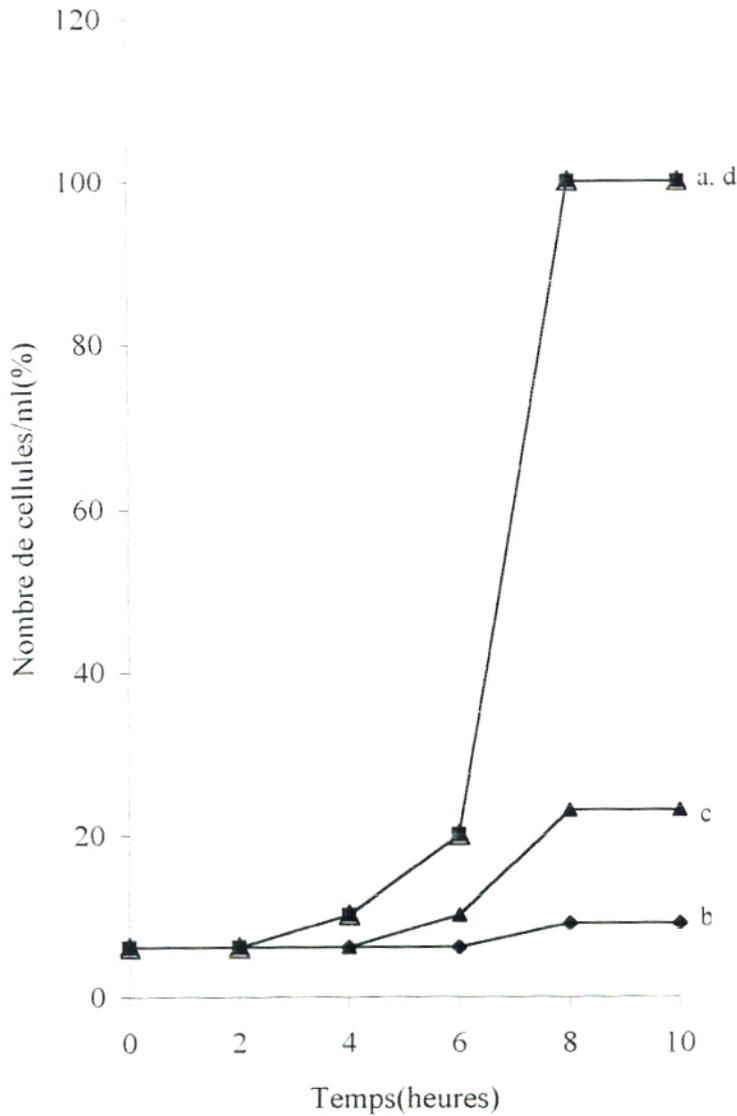
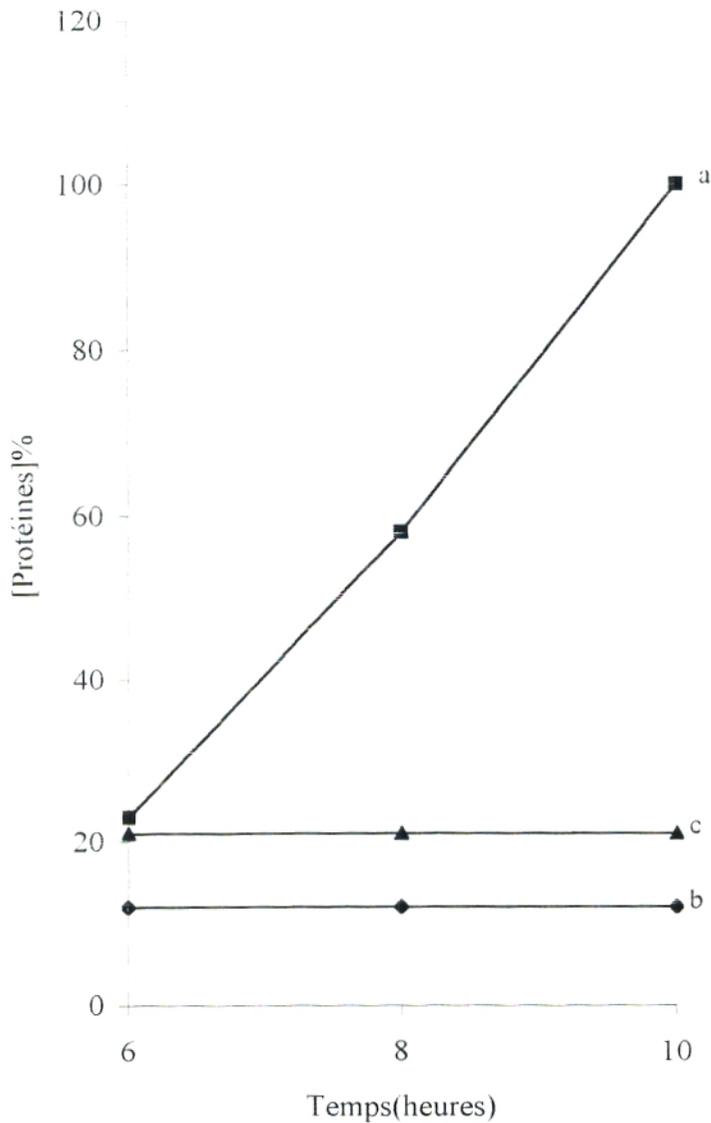


Figure N°53: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10.8(10mM), préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM) préparée à température ambiante
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM) préchauffée 20' à 70°C
- △— Courbe(d): Contrôle pH10.8(10mM)(volume de tampon ajouté correspondant au volume des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)



FigureN°54: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10.8 (10mM), préparées aux différentes températures, sur la masse protéique de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM) préparée à température ambiante

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM) préchauffée 20' à 70°C

De ces résultats, il ressort que la solution d'AmB préparée à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8, à température ambiante est pleinement active vis à vis du *C. albicans* (90% d'inhibition de la croissance). Par contre, lorsque cette solution est préchauffée 20 minutes à 70°C , on observe une perte de 10% de l'activité antifongique de la molécule. Par conséquent, la dissociation des agrégats à pH 10.8 (DUPONT et al., 1977) n'entraîne pas une diminution de l'activité antifongique de l'AmB.

DUPONT et al. (1977) démontrent qu'après neutralisation des solutions d'AmB préparées à pH supérieur à 10 où l'AmB n'est que faiblement associée, il y a restitution de la plus grande partie des caractéristiques physico-chimiques de la solution neutre.

Sur la base de cette donnée, le maintien de l'activité antifongique de l'AmB préparée à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8, pourrait être expliqué par l'acidification de la solution antifongique par incorporation dans le milieu de culture à pH 5.9 et qui permettrait la restitution des caractéristiques physico-chimiques de la solution à pH 5.9.

Pour ce qui est de la perte d'activité après le préchauffage des solutions, cela peut être dû au fait que l'élévation de la température empêcherait la réversibilité du phénomène de dissociation des agrégats, ou dégraderait tout simplement un certain nombre de molécules d'AmB.

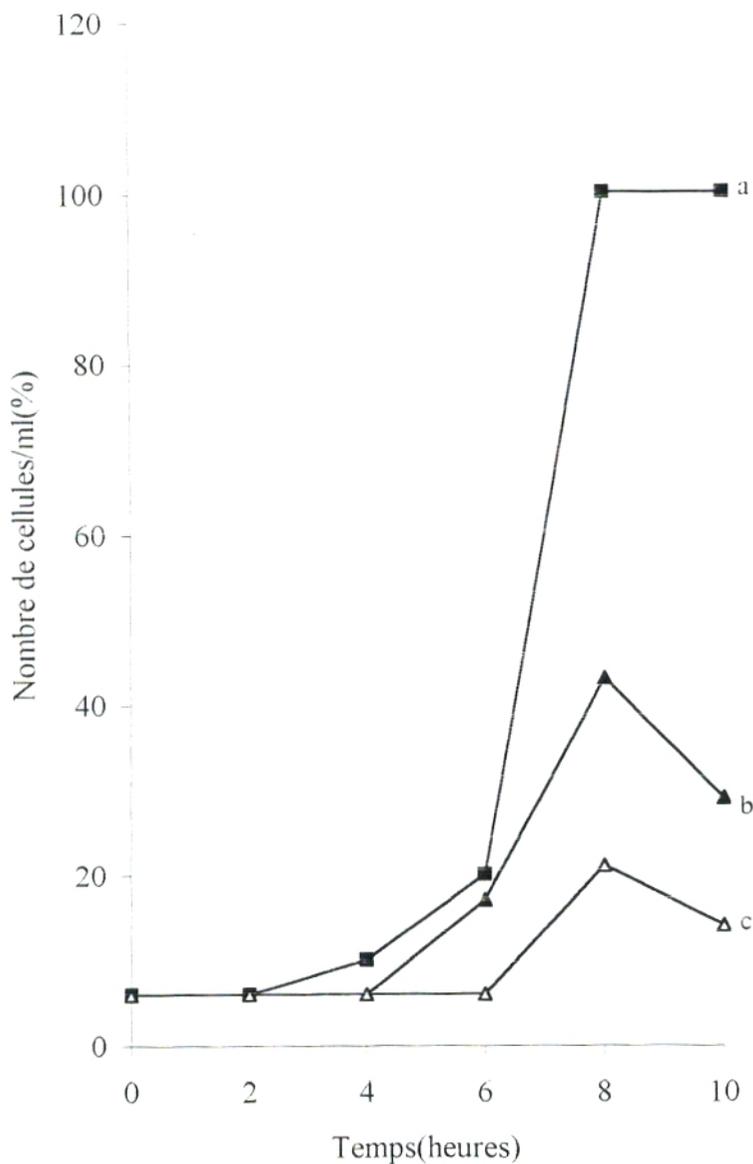
- 2- Dans un second temps, nous avons utilisé le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 à la concentration de 100mM. L'addition de ce tampon au milieu de culture entraîne un shift de pH important, le milieu passant de pH 5.9 à pH 7.

La figure N°55 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 (la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$), préparée à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe (a) de la figure N°55 représente la culture témoin effectuée dans du sabouraud liquide pH 5.9 sans aucune addition.
- La courbe (b) de la figure N°55 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, qui correspond au volume des solutions antifongiques ajoutées. La culture se déroule à pH 7. Nous remarquons que la phase de latence est de 4 heures. Ensuite, le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre un taux maximum au tour de 40% en 8 heures.

d'incubation et chute brusquement au bout de 10 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 60%.

- La courbe(c) de la figure N°55 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M préparée dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8. La croissance est ainsi menée à pH 7. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures. Le nombre de cellules augmente ensuite jusqu'à atteindre les 20% au bout de 8 heures d'incubation, puis chute rapidement après 10 heures. Le taux d'inhibition est de 80%. Cette inhibition est due à l'accumulation de l'effet du tampon et de l'AmB. Par conséquent, nous pouvons déduire l'effet inhibiteur de la drogue seule ;il est estimé à 20%.



FigureN°55: Effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10.8 (100mM), préparée à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ▲— Courbe(b): Contrôle tampon pH10.8(100mM)(volume de tampon ajouté correspondant au volume de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$)
- △— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(100mM)

De ces résultats, il ressort d'une part qu'il y a une inhibition de la croissance de la levure due au tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, d'autre part, il y a une inhibition réduite liée à l'effet de l'AmB ; ce qui suggère que dans ces conditions expérimentales, il y ait une forte réduction de l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*.

La question immédiate qui se pose est de savoir si l'inhibition de la croissance due uniquement à l'addition du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 est réversible ou non.

C'est pourquoi nous avons effectué une autre série de tests qui consistent à ajouter au milieu de culture après l'addition de la solution antifongique préparée dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, de l'acide chlorhydrique 1N (concentration finale inférieure à 3mM) afin de ramener le pH du milieu de culture à pH 5.9.

La figure N°56 représente l'effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 (la concentration finale d'AmB étant de 2µg/ml), préparées à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans* en fonction du pH du milieu de culture. La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°56 représente la culture témoin sans aucune addition. Elle se déroule à pH 5.9.
- La courbe(b) de la figure N°56 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, correspondant au volume ajouté des solutions mères. La culture se déroule à pH 7.
- La courbe(c) de la figure N°56 représente l'effet de la solution mère à 10^{-4} M d'AmB dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8. La culture se déroule à pH 7.
- La courbe(d) de la figure N°56 représente la culture contrôle qui consiste à suivre la croissance de *C. albicans* en absence d'AmB et en présence de tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, et à laquelle on ajoute du HCl(1N) pour ramener le pH du milieu de culture à 5.9. Nous remarquons une phase de latence de 4 heures, suivie par une phase exponentielle où le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre 50% après 8 heures d'incubation. Ce nombre se stabilise dans une phase stationnaire allant jusqu'à 10 heures d'incubation l'inhibition dans ce cas est de 50%.

- La courbe(e) de la figure N° 56 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, et en présence de HCl(1N). La croissance se déroule à pH 5.9. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures, ensuite le nombre de cellules atteint 10% au bout de 8 heures d'incubation. La levure entre alors en phase stationnaire qui s'étend jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition dans ce cas est de 90%, mais en tenant compte de l'effet inhibiteur du tampon seul, nous pouvons estimer que l'inhibition propre à l'AmB n'est que de 40%.

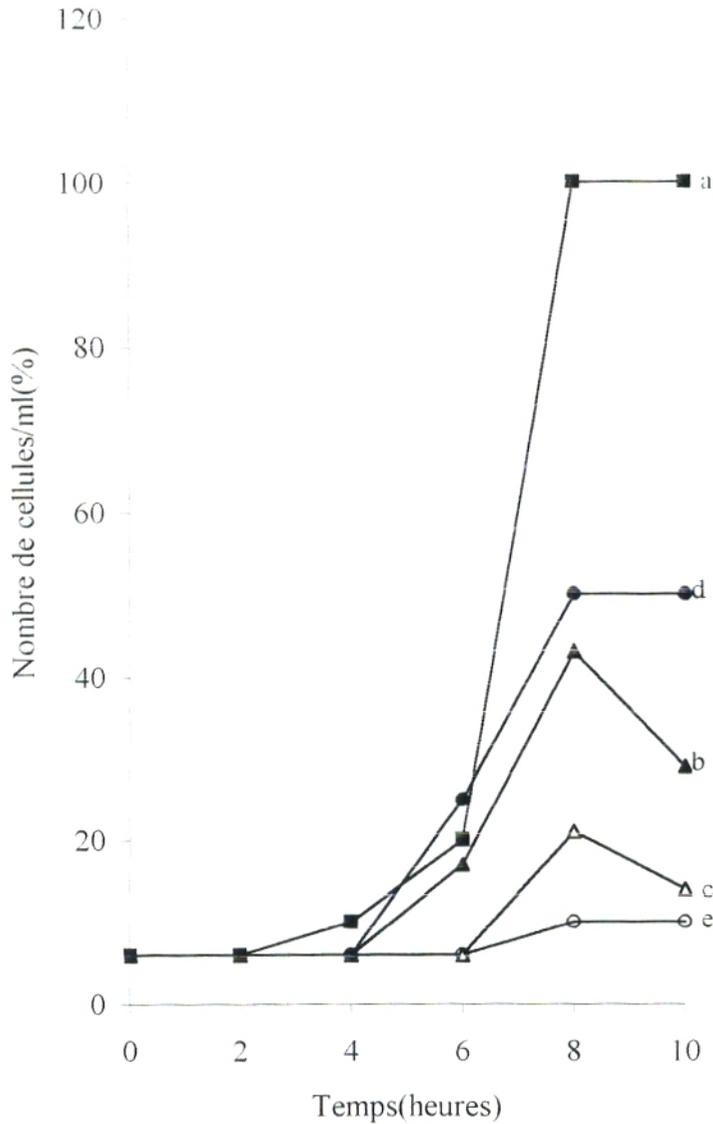


Figure N°56: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10.8 (100mM), préparées à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans*, en fonction du pH du milieu de culture (la concentration finale d'AmB est de $2\mu\text{g/ml}$).

- Courbe(a): Témoin
- ▲ Courbe(b): Contrôle tampon pH10.8(100mM)
- △ Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/ tampon pH10.8(100mM)
- Courbe(d): Contrôle tampon pH10.8(100mM)+HCl(1N)
- Courbe(e): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(100mM)+HCl(1N)

Rq: Pour les tests contrôles, le volume de tampon ajouté correspond au volume de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M ajouté au milieu à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$.

A la différence des expériences menées avec le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 dans lesquelles le retour du milieu au pH d'origine entraîne une réversibilité de l'inhibition de la croissance, avec le tampon à pH 10.8 l'inhibition est irréversible, en revanche l'activité antifongique de l'AmB est retrouvée.

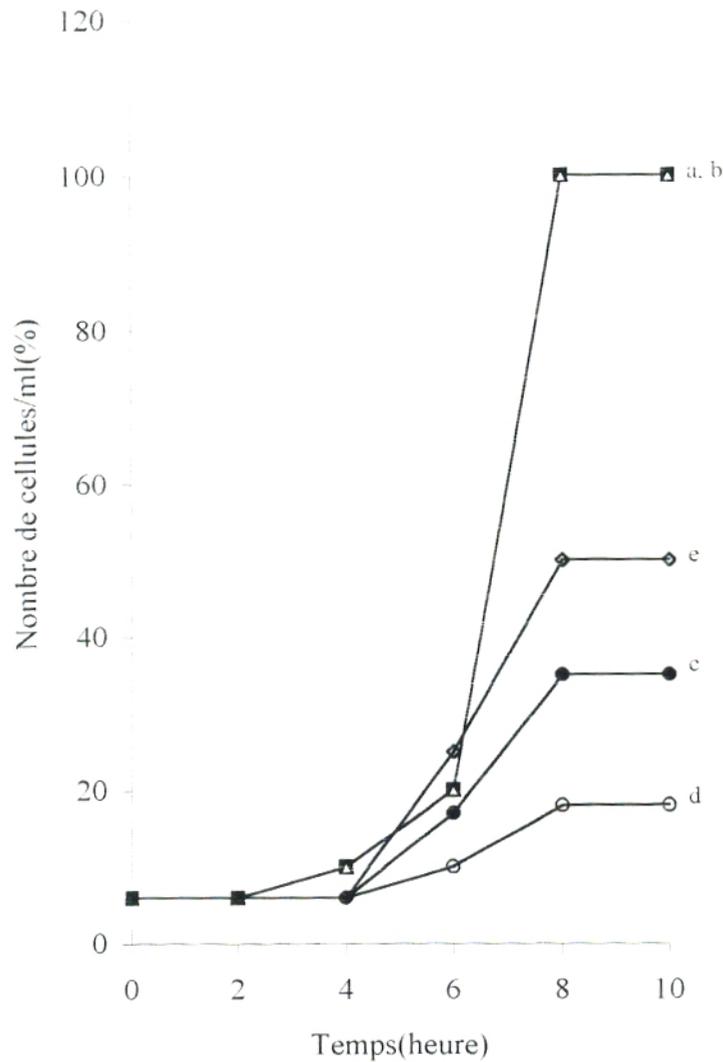
Il nous a alors semblé indispensable de savoir si l'inhibition de la croissance de *C. albicans* est due à l'alcalinité du milieu de culture et que l'irréversibilité de cette inhibition prenait son origine dans une dégradation de certains constituants du milieu ou si la force ionique du tampon y jouait un rôle.

C'est pour cela qu'en premier lieu, nous avons utilisé à nouveau la solution mère d'AmB préparée à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8, à température ambiante, et utilisée à la concentration finale de 2 μ g/ml. Après addition de cette solution, nous ajoutons de la soude 1N (concentration finale inférieure à 3mM) au milieu de culture afin de déplacer le pH de ce dernier à la valeur pH obtenu par l'addition du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, c'est à dire pH 7.

La figure N°57 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8, préparée à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans* ; la culture étant menée à pH 7 (la concentration finale d'AmB étant de 2 μ g/ml).

- La courbe(a) de la figure N°57 représente la culture témoin qui se déroule dans le milieu sabouraud de pH 5.9, sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°57 représente la culture contrôle à laquelle nous avons ajouté un volume de tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8. La croissance se déroule à pH 6.2 (100% de croissance).
- La courbe(c) de la figure N°57 représente la culture contrôle qui consiste à suivre la croissance de la levure en présence du tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8 (le volume ajouté correspond au volume ajouté des solutions antifongiques) et de la soude 1N pour ramener le pH du milieu de culture à 7. Nous remarquons après une phase de latence de 4 heures, que le nombre de cellules augmente et atteint 35% après 8 heures d'incubation. Ensuite, il se stabilise dans une phase stationnaire qui va jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 65%. On n'observe pas de différences significatives entre ce taux et celui obtenu après l'addition du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 et qui est de 60% (représenté par la courbe(b) de la figure N°55).

- La courbe(d) de la figure N°57 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8 (la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$) et en présence de NaOH(1N). La culture est menée à pH 7. Nous remarquons que la phase de latence est de 4 heures. Ensuite, le nombre de cellules augmente pour être autour de 20% après 6 heures d'incubation. Il se stabilise alors jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition dans ce cas est de 80% mais l'inhibition propre à l'AmB peut être estimée à 20%.



FigureN°57: Effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH10.8 (10mM), sur la croissance de *C. albicans*; la culture étant menée à pH7(la concentration finale d'AmB est de $2\mu\text{g/ml}$).

- Courbe(a): Témoin
- ▲— Courbe(b): Contrôle tampon pH10.8(10mM)
- Courbe(c): Contrôle tampon pH10.8(10mM)+NaOH(1N)
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM)+NaOH(1N)
- ◇— Courbe(e): Contrôle tampon pH10.8(10mM)+NaOH(1N)+HCl(1N)

Rq: Pour les tests contrôles, le volume de tampon ajouté correspond au volume de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M ajouté à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$.

Il ressort de ces résultats que la croissance de *C. albicans* est fortement inhibée lorsqu'elle est menée dans un milieu à pH 7 aussi bien en présence du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 à la concentration de 100mM(courbe(b) de la figure N°55), qu'en présence de ce même tampon à la concentration de 10mM(courbe(d) de la figure N°57).

C'est pourquoi, en second lieu, nous avons effectué une autre culture contrôle à laquelle nous avons ajouté du tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8 et de la soude 1N (concentration finale inférieure à 3mM) pour ramener le pH du milieu de culture à pH 7. Après ce shift de pH, nous ajoutons du HCl 1N(concentration finale inférieure à 3mM) pour revenir à nouveau au pH initial du milieu c'est à dire pH 5.9. Cette culture est représentée par la courbe(e) de la figure N°57. Nous remarquons après une phase de latence de 4 heures, que le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre 50% au bout de 8 heures d'incubation. Ce taux d'inhibition est identique à celui obtenu lorsque la croissance est menée en présence du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 et de HCl(1N).

Par conséquent, la croissance de *C. albicans* est fortement inhibée lorsqu'elle est menée à pH 7 et cela aussi bien en présence du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 à la concentration de 100mM(60% d'inhibition) qu'avec ce même tampon à la concentration de 10mM(50% d'inhibition). Cette inhibition est totalement irréversible dans les deux cas après le retour du milieu au pH initial c'est à dire pH 5.9. Cette irréversibilité peut être due à une dégradation partielle de certains constituants du milieu de culture à pH 7 et non pas à la force ionique du tampon à pH 10.8. D'un autre côté, l'activité antifongique de l'AmB à pH 7 est réduite. Elle n'inhibe qu'à 20% la croissance de la levure, lorsque les solutions sont préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate à pH 10.8.

Par ailleurs, comme nous observons après l'addition du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, que les levures sont en phase de latence durant 4 heures, il nous a paru intéressant de voir si en prolongeant le temps de contact entre le tampon et le milieu de culture au-delà de 10 heures, il y a une dégradation plus importante des constituants du milieu de culture et par conséquent il y aurait un prolongement de la phase de latence des levures mises en culture dans ces conditions.

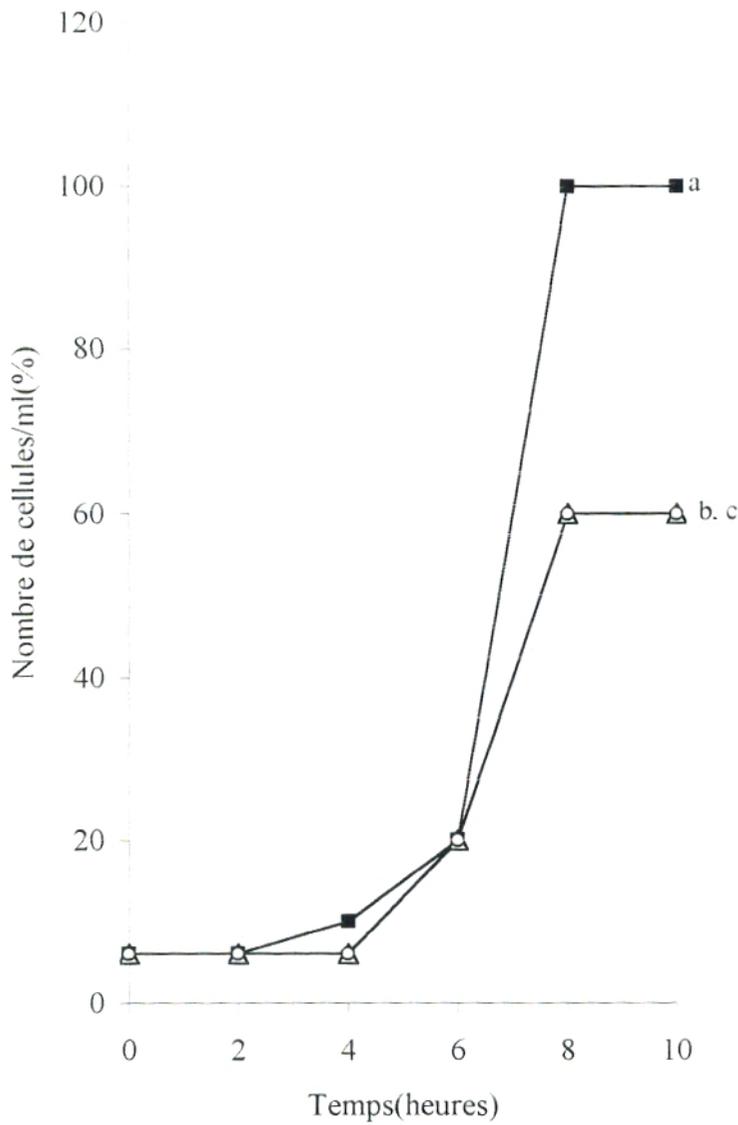
Pour cela, nous avons d'une part mis le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 en contact avec le milieu de culture pendant 19 heures à 4°C et à l'abri de la lumière avant d'incorporer l'inoculum au milieu. D'autre part, après avoir incubé le tampon dans le milieu

de culture pendant 19 heures à 4°C et à l'abri de la lumière, nous avons ajouté du HCl 1N (concentration finale inférieure à 3mM) au milieu pour ramener le pH du milieu à 5.9.

La figure N°58 représente l'effet du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8 après un temps de contact de 19 heures avec le milieu de culture, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire. Il est à noter que le volume du tampon ajouté correspond au volume des solutions antifongiques à 10⁻⁴M d'AmB ajoutées au milieu à la concentration finale de 2µg/ml.

- La courbe(a) de la figure N°58 représente la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes (b) et (c) de la figure N°58 représentent les cultures auxquelles nous avons ajouté le tampon pH 10.8 et le tampon pH 10.8 additionné de HCl(1N) respectivement. Nous observons dans les deux cas, une phase de latence de 4 heures suivie par une phase exponentielle où le nombre maximum de cellules atteint est autour de 60% au bout de 8 heures d'incubation, pour se stabiliser ensuite jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition est de l'ordre de 40% dans les deux conditions expérimentales.

Ces résultats montrent que l'inhibition de la croissance de *C. albicans* induite par le pH 7 du milieu de culture est irréversible et que le temps de contact entre le milieu et le tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8, ne modifie pas l'action inhibitrice due à ce pH 7. En effet, dès le déplacement du pH du milieu vers pH 7, il y a une dégradation partielle du milieu de culture induisant une inhibition irréversible de la croissance.



FigureN°58: Effet du tampon carbonate/bicarbonate pH10.8(100mM de concentration saline) après un temps de contact de 19 heures avec le milieu de culture, sur la croissance de *C. albicans*.

- Courbe(a): Témoin
- △— Courbe(b): Contrôle tampon pH10.8(100mM),(temps de contact 19 heures)
- Courbe(c): Contrôle tampon pH10.8(100mM)(temps de contact 19 heures)+HCl(1N)

Rq: Pour les tests contrôles, le volume de tampon ajouté correspond au volume de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M, ajouté au milieu de culture à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$.

Il ressort de l'analyse des résultats obtenus à ce niveau de l'étude, lorsque la culture est menée à pH 5.9, que l'activité antifongique des solutions d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 préparées à température ambiante et utilisées à la concentration finale de $2\mu\text{g}$ d'AmB/ml, est maintenue vis à vis du *C. albicans*. Ce qui laisse suggérer que la dissociation des superagrégats à pH 10.8 n'entraîne pas une modification de l'activité antifongique de l'AmB vis à vis de la levure. Par contre, le préchauffage de ces solutions à 70°C pendant 20 minutes induit une perte de 10% de l'activité antifongique.

De plus, l'action inhibitrice des solutions d'AmB préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 dépend de la force ionique du tampon. Effectivement, lorsque la concentration de ce tampon est de 10mM, l'AmB inhibe à 90% la croissance de la levure, alors qu'à la concentration de 100mM, l'AmB n'induit que 40% d'inhibition.

Par ailleurs, la croissance de *C. albicans* est inhibée à 60% lorsqu'elle est menée à pH 7 ; cette inhibition est irréversible après le retour du milieu au pH initial de 5.9.

Des tests de contrôle menés aussi bien avec le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 à la concentration de 10mM qu'avec ce même tampon à la concentration de 100mM, montrent d'une part que l'irréversibilité de l'inhibition de la croissance de la levure en milieu sabouraud pH 7 est due à une dégradation partielle des constituants du milieu de culture et non pas à la force ionique du tampon. D'autre part, cette dégradation se fait dès le shift de pH.

Dans ces conditions défavorables de croissance (pH 7), l'activité antifongique de l'AmB vis à vis de la levure est fortement réduite. Le taux d'inhibition dans ce cas est estimé à 20% seulement.

3. Effet de la variation de pH de la solution mère sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B

Dans cette partie de l'étude, nous avons fixé le pH du milieu de culture à 5.9 et c'est le pH des solutions mères que nous faisons varier. Pour cela nous avons préparé à partir d'une solution d'AmB à 10^{-2} M dans le DMSO une série de solutions mères d'AmB diluées à la concentration de 10^{-4} M dans différents solvants de pH différents.

Les solvants que nous avons choisis sont :

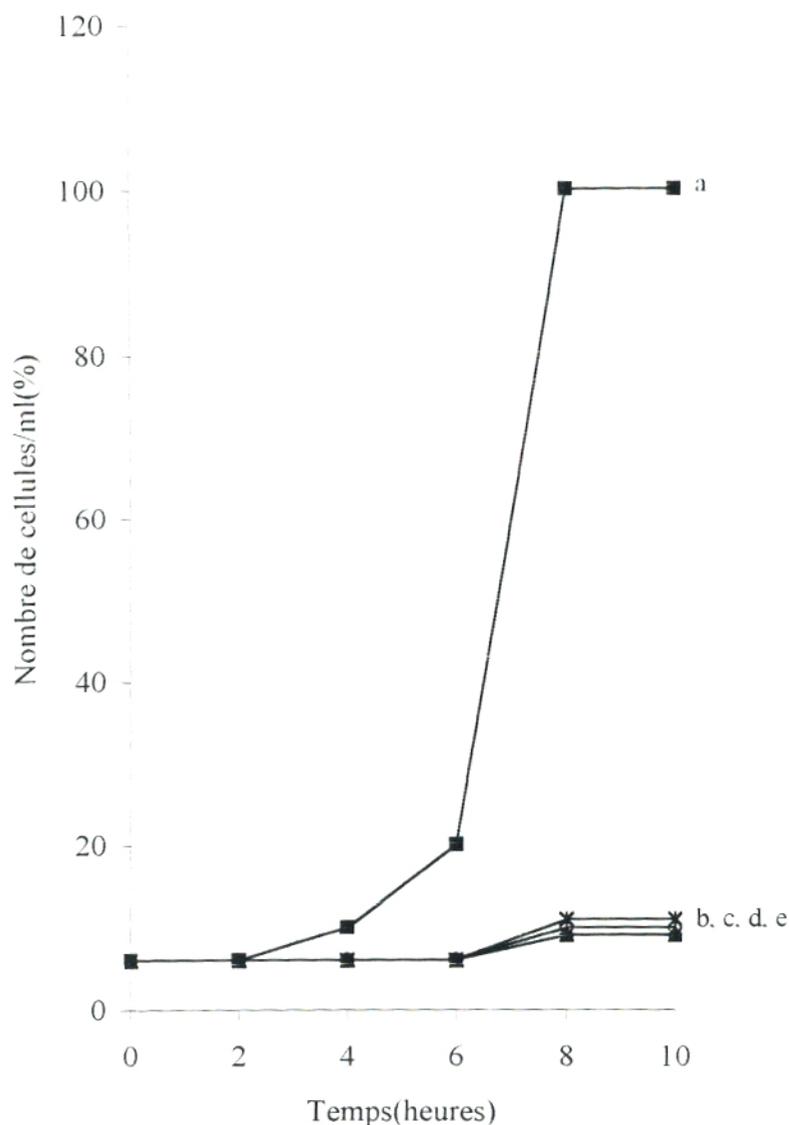
- Le sabouraud de pH 5.9 puisque c'est le milieu de culture utilisé dans les conditions expérimentales et que c'est un pH acide proche du pH 5.4 qui selon l'étude de BOUCHERIT(1995) permet une protection du globule rouge de l'effet cytotoxique de l'AmB.
- L'eau physiologique de pH 7 puisque les solutions utilisées cliniquement sont préparées dans ce solvant.
- Le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 qui permet la formation de superagrégats.
- Le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 dans lequel il y a une dissociation des superagrégats.

Il est à noter que les tampons carbonate/bicarbonate utilisés sont de concentration de 10mM afin de ne pas faire intervenir l'action de la force ionique du tampon sur l'activité antifongique de l'AmB.

Les solutions antifongiques sont ajoutées au milieu de culture à une concentration finale de 2 μ g/ml.

La figure N°59 représente l'effet des solutions d'AmB préparées à 10^{-4} M aux différents pH, à température ambiante et utilisées à 2 μ g d'AmB/ml final, sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°59 représente la culture témoin sans aucune addition.
- Les courbes (b), (c), (d) et (e) de la figure N°59 représentent l'effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M préparées à pH 10.8, pH 10, pH 7 et pH 5.9 respectivement. Nous remarquons que la phase de latence est de 6 heures pour chacune des cultures. Ensuite les levures entrent en phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 8 heures d'incubation où le nombre de cellules est autour de 10%. L'inhibition dans ce cas là est de l'ordre de 90%.



FigureN°59: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans des solvants à différents pH, préparées à température ambiante, sur la croissance de *C. albicans* ; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

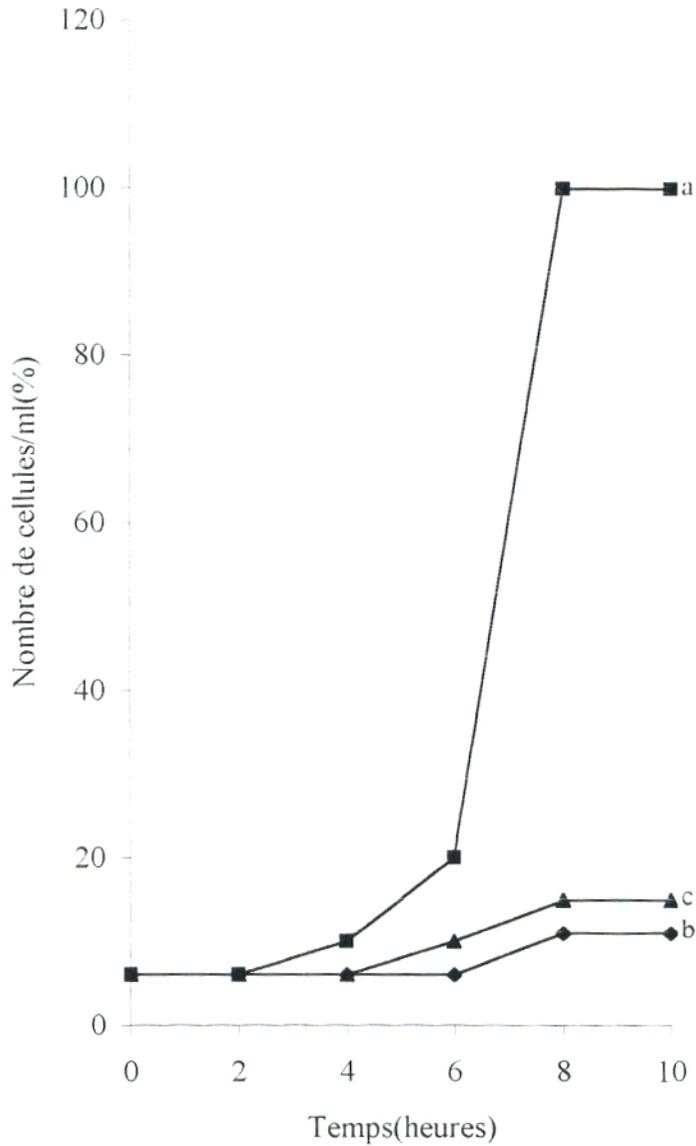
- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM)
- ▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM)
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/eau physiologique(pH7)
- *— Courbe(e): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/sabouraud(pH5.9)

De ces résultats, il ressort que quel que soit le pH de la solution mère variant de pH 5.9 à pH 10.8, lorsque la croissance est menée à pH 5.9, l'activité antifongique de la solution d'AmB à 10^{-4} M préparée à température ambiante et utilisée à $2\mu\text{g/ml}$ final, vis à vis du *C. albicans* est maintenue. L'inhibition est autour de 90%.

Nous avons ensuite testé ces mêmes solutions mères d'AmB préparées comme cela a été décrit précédemment, mais préchauffées 20 minutes à 70°C .

La figure N°60 représente l'effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le sabouraud(pH 5.9), préparées à température ambiante ou préchauffées 20 minutes à 70°C et utilisées à la concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°60 représente la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°60 représente l'effet de la solution d'AmB à 10^{-4} M dans le sabouraud(pH 5.9), préparée à température ambiante. Nous remarquons une phase de latence de 6 heures, suivie par une phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 8 heures d'incubation où le taux maximum de cellules est autour de 10%. L'inhibition dans ce cas est de l'ordre de 90%.
- La courbe(c) de la figure N°60 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans le sabouraud(pH 5.9) préchauffée 20 minutes à 70°C . Nous remarquons une phase de latence de 4 heures, ensuite le nombre de cellules augmente et atteint 15% au bout de 8 heures d'incubation. L'inhibition est de l'ordre de 85%. Ce taux ne diffère pas significativement de celui obtenu avec la solution maintenue à température ambiante(90%).



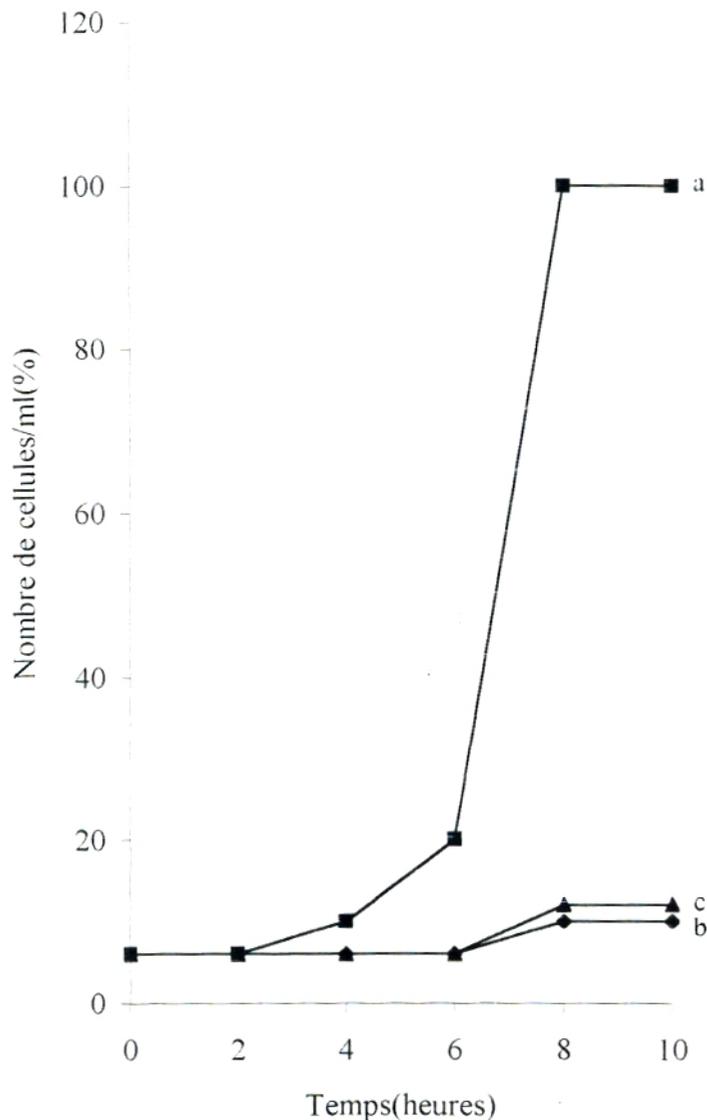
FigureN°60: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans le sabouraud(pH5.9), préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/sabouraud(pH5.9), préparée à température ambiante
- ▲ Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/sabouraud(pH5.9), préchauffé 20' à 70°C

Nous constatons alors que le préchauffage de la solution d'AmB à 10^{-4} M en solution aqueuse de pH 5.9 ne modifie pas l'activité antifongique de la molécule vis à vis du *C. albicans*.

La figure N°61 représente l'effet des solutions d'AmB à 10^{-4} M dans l'eau physiologique (pH 7) préparées aux différentes températures et utilisées à la concentration finale d'AmB de 2 μ g/ml, sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°61 représente la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°61 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans l'eau physiologique (pH 7) préparée à température ambiante. Nous remarquons après une phase de latence de 6 heures que le nombre de cellules augmente ; il est autour de 10% après 8 heures d'incubation. La levure entre alors en phase stationnaire durant 2 heures. Le taux d'inhibition est de 90%.
- La courbe(c) de la figure N°61 représente l'effet de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M dans l'eau physiologique (pH 7) préchauffée 20 minutes à 70°C. Après une phase de latence de 6 heures, nous remarquons une phase exponentielle qui s'étend jusqu'à 8 heures d'incubation où le taux maximum de cellules est autour de 10%. L'inhibition dans ce cas est de 90%.



FigureN°61: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans l'eau physiologique(pH7), préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/eau physiologique(pH7), préparée à température ambiante

—▲— Courbe(c): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/eau physiologique(pH7), préchauffée 20' à 70°C

De ces résultats, il apparaît que le préchauffage de la solution mère d'AmB à 10^{-4} M en solution aqueuse de pH 7 ne modifie pas l'activité antifongique de la drogue vis à vis du *C. albicans*.

Le préchauffage des solutions d'AmB à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 ne modifie pas l'activité antifongique de la molécule vis à vis du *C. albicans*(voir figures N°48 et N°49 décrites plus haut), alors que le préchauffage de la solution antifongique préparée à 10^{-4} M dans le tampon carbonate/bicarbonate 10mM pH 10.8 induit une perte de l'ordre de 10%(voir figures N°53 et N°54 décrites plus haut).

De la figure N°62 qui rapporte l'effet des différentes solutions mères d'AmB à 10^{-4} M en solutions aqueuses de pH variant de 5.9 à 10.8 préchauffées 20 minutes à 70°C et utilisées à 2µg/ml final, sur la croissance de *C. albicans*, il ressort lorsque le pH de la solution mère varie de pH 5.9 à pH 10, que l'activité antifongique de l'AmB est maintenue. Les courbes(c), (d) et (e) de la figure N°62 représentant l'effet des solutions mères préparées à 10^{-4} M en solutions aqueuses de pH 10, pH 7 et pH 5.9 respectivement, montrent que l'inhibition de la croissance est autour de 90%. En revanche, lorsque le pH de la solution antifongique est de 10.8, nous observons une perte d'activité estimée à 10% par rapport aux autres solutions antifongiques comme nous pouvons le constater sur la courbe(b) de la figure N°62 qui représente l'effet de la solution d'AmB préparée dans ces conditions là, sur la croissance de *C. albicans*. Mais cette perte d'activité est négligeable puisque l'AmB reste pleinement active vis à vis du *C. albicans*(80% d'inhibition de la croissance).

De ce fait, l'utilisation de solutions antifongiques au pH variant de pH 5.9 à pH 10.8 permet de maintenir l'activité de l'AmB vis à vis du *C. albicans*, que les solutions soient préparées à température ambiante ou bien préchauffées 20 minutes à 70°C. Par conséquent, la formation des superagrégats d'AmB aux pH alcalins(DUPONT et al., 1977) ne diminue pas l'activité antifongique de la molécule.

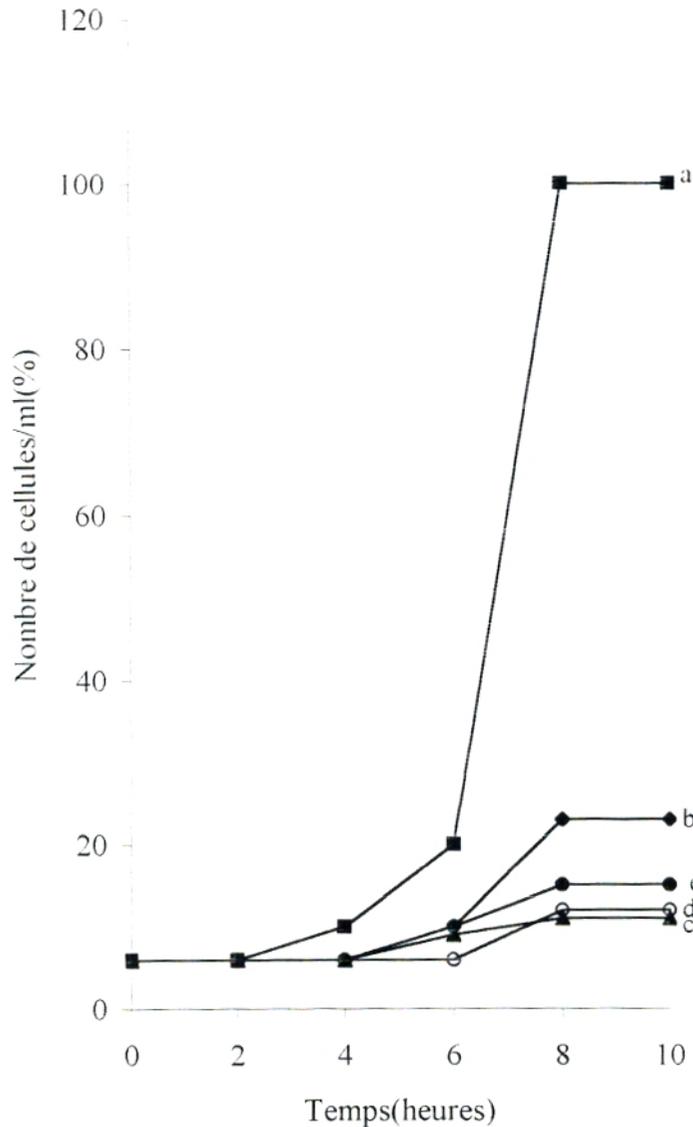


Figure N°62: Effet des solutions mères d'AmB à 10^{-4} M dans des solvants à différents pH, préchauffées 20 minutes à 70°C , sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10.8(10mM), préchauffée 20' à 70°C
- ▲— Courbe (c) : [SM] à 10^{-4} M d'AmB/tampon pH10(10mM), préchauffée 20' à 70°C
- Courbe(d): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/eau physiologique(pH7), préchauffée 20' à 70°C
- Courbe(e): [SM] à 10^{-4} M d'AmB/sabouraud(pH5.9), préchauffée 20' à 70°C

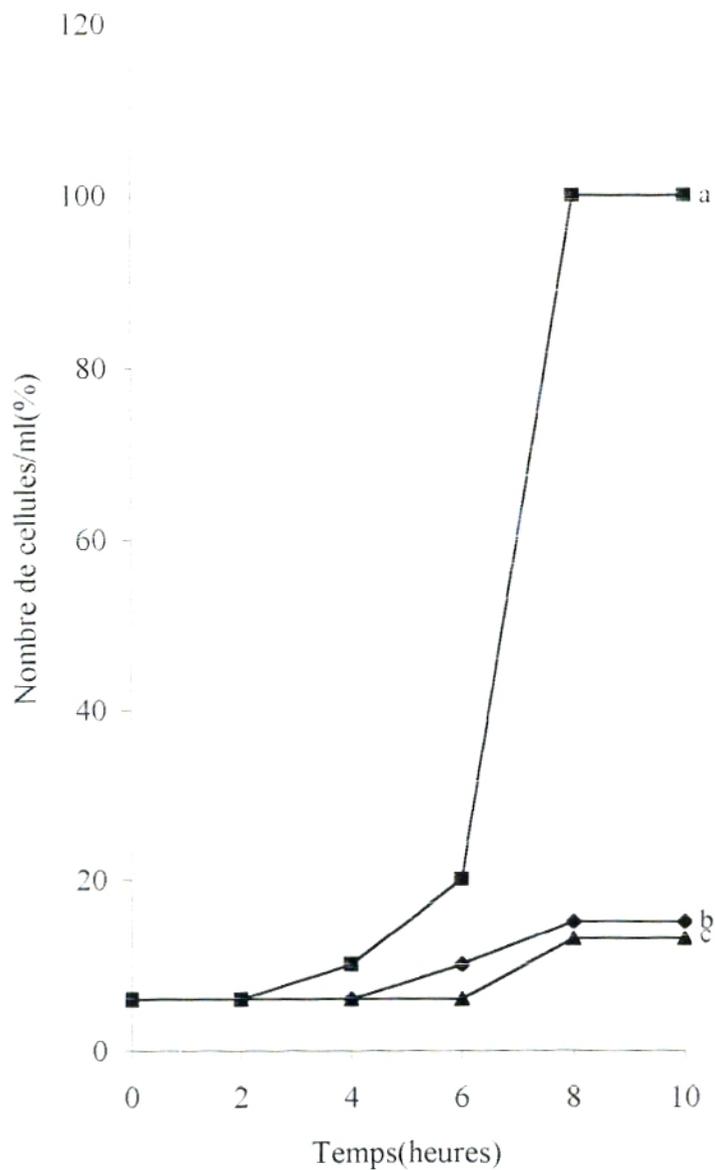
Le maintien de l'activité antifongique de la molécule d'AmB aussi bien aux pH fortement alcalins (pH 10 et pH 10.8) qu'à pH acide (pH 5.9) ou encore neutre (pH 7) nous laisse supposer deux explications possibles :

- 1- La première se base sur les résultats de DUPONT et al. (1977), qui suggèrent que la neutralisation des solutions fortement alcalines (pH supérieur à 10) conduit à la restitution de la plus grande partie des caractéristiques physico-chimiques de la solution neutre. Par conséquent, l'acidification de la solution antifongique préparée à pH 10.8 par le milieu de culture de pH 5.9 pourrait permettre la restitution des caractéristiques physico-chimiques de la solution à pH 5.9. Il y aurait alors une réversibilité de la dissociation des superagrégats (dissociation observée aux pH supérieurs à pH 10).
- 2- D'autre part, il se pourrait que la formation des superagrégats observés à pH alcalin (pH 10), soit aussi obtenue à pH acide (pH 5.9) ; car à un pH voisin (pH 5.4) on observe une protection du globule rouge de la lyse et de la fuite de potassium (K^+) induite par l'AmB comparé au pH neutre (pH 7.4) (BOUCHERIT, 1995). Or ce sont les superagrégats qui sont les moins toxiques vis à vis des cellules animales. Il se pourrait alors que la formation des superagrégats suit une courbe miroir où aux pH extrêmes il y aurait une dissociation des superagrégats alors que les pH fortement acides ou fortement alcalins permettraient la formation de superagrégats moins toxiques pour les cellules animales, mais tout à fait actifs sur la levure.

En dernier lieu, nous avons voulu savoir si la Fungizone[®] préparée à 10^{-4} M dans l'eau physiologique (condition expérimentale proche de l'utilisation clinique) et dans le sabouraud (pH de la solution proche du pH qui permet une protection du globule rouge), à température ambiante ou préchauffée 20 minutes à 70°C , se comportée vis à vis du *C. albicans* de la même manière que l'AmB pure dans les mêmes conditions. Les solutions de Fungizone[®] sont utilisées à la concentration finale de $2\mu\text{g}$ d'AmB/ml.

La figure N°63 représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans l'eau physiologique (la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g}/\text{ml}$), préparée aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*. La croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°63 représente la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°63 représente l'effet de la solution de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans l'eau physiologique préparée à température ambiante. Nous remarquons après une phase de latence de 4 heures que le nombre de cellules augmente et atteint un maximum aux environs de 15% au bout de 8 heures d'incubation. L'inhibition est de 85%.
- La courbe(c) de la figure N°63 représente l'effet de la Fungizone[®] à 10^{-4} M dans l'eau physiologique et préchauffée 20 minutes à 70°C . Nous remarquons une phase de latence de 6 heures suivie d'une phase exponentielle où le nombre de cellules atteint un taux maximum autour de 15%. La croissance est inhibée à 85%.



FigureN°63: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans l'eau physiologique(pH7), préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans*; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

—■— Courbe(a): Témoin

—◆— Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/eau physiologique(pH7), préparée à température ambiante

—▲— Courbe(c) : [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/eau physiologique(pH7), préauffée 20' à 70°C

De ces résultats, il apparaît que les solutions de Fungizone[®] préparées à 10^{-4} M dans l'eau physiologique et utilisées à une concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$, sont parfaitement actives vis à vis du *C. albicans* et cela aussi bien avec celles préparées à température ambiante qu'avec celles préchauffées 20 minutes à 70°C . Le taux d'inhibition est autour de 85%. Ce taux ne diffère pas significativement de celui obtenu avec les solutions d'AmB pure préparées dans les mêmes conditions (90% d'inhibition).

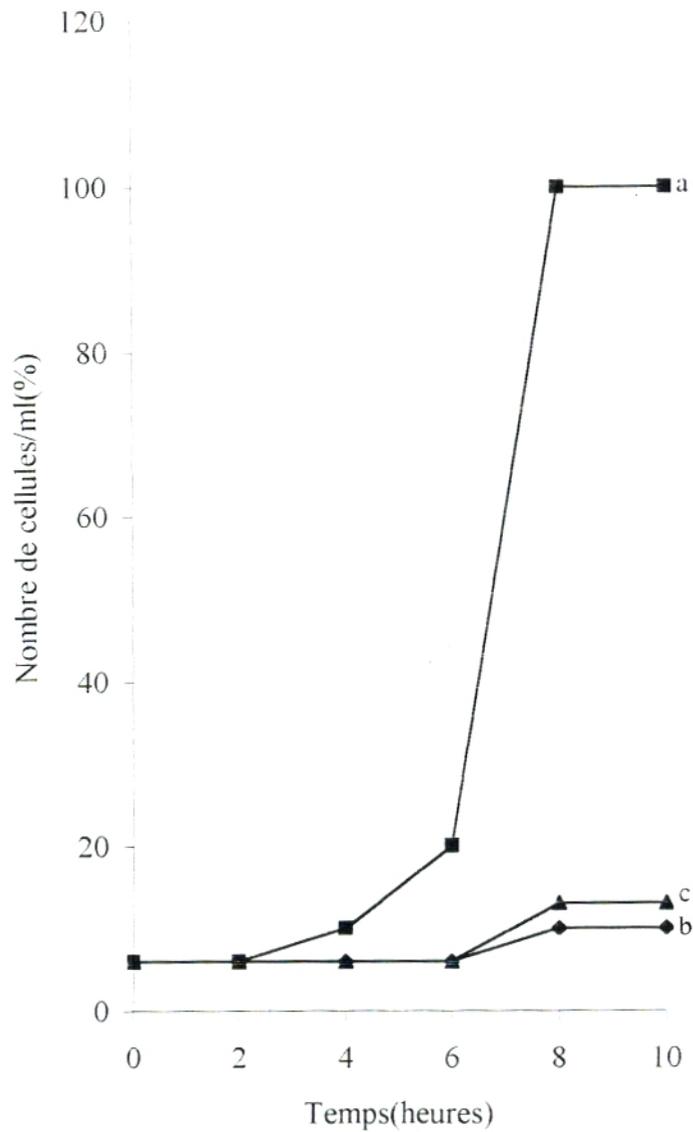
La figure N°64 représente l'effet des solutions mères de Fungizone[®] préparées à 10^{-4} M dans le sabouraud (pH 5.9) aux différentes températures et utilisées à la concentration finale de $2\mu\text{g/ml}$, sur la croissance de *C. albicans*. Cette croissance est suivie par la numération cellulaire.

- La courbe(a) de la figure N°64 représente la culture témoin sans aucune addition.
- La courbe(b) de la figure N°64 représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans le sabouraud préparée à température ambiante et la courbe(c) de la figure N°64 représente l'effet de la solution antifongique préchauffée 20 minutes à 70°C . Nous remarquons dans les 2 conditions qu'après une phase de latence de 6 heures, le nombre de cellules augmente jusqu'à atteindre un maximum autour de 10% en 8 heures d'incubation. Les cellules entrent alors en phase stationnaire jusqu'à 10 heures d'incubation. L'inhibition est de l'ordre de 90% dans les 2 cas.

Il ressort de ces résultats que les solutions de Fungizone[®] à 10^{-4} M dans le sabouraud et utilisées à raison de $2\mu\text{g}$ d'AmB/ml final, sont parfaitement actives vis à vis du *C. albicans*. Cela aussi bien avec les solutions préparées à température ambiante qu'avec celles préchauffées 20 minutes à 70°C . Le taux d'inhibition ne diffère pas significativement de celui obtenu avec les solutions d'AmB pure préparées dans les mêmes conditions (85% d'inhibition).

Des résultats obtenus, il apparaît que les solutions antifongiques à 10^{-4} M dans le sabouraud (pH 5.9) ou dans l'eau physiologique (pH 7), préparées aussi bien avec de l'AmB pure ou bien avec de la Fugizone[®], utilisées à une concentration finale de $2\mu\text{g}$ d'AmB/ml, induisent une inhibition totale de la croissance.

Cette inhibition est maintenue lorsque les solutions antifongiques sont préchauffées 20 minutes à 70°C .



FigureN°64: Effet des solutions mères de Fungizone à 10^{-4} M dans le sabouraud(pH5.9), préparées aux différentes températures, sur la croissance de *C. albicans* ; la concentration finale d'AmB étant de $2\mu\text{g/ml}$.

- Courbe(a): Témoin
- ◆ Courbe(b): [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/sabouraud(pH5.9), préparée à température ambiante
- ▲ Courbe(c) : [SM] à 10^{-4} M de Fungizone/sabouraud(pH5.9), préchauffée 20' à 70°C

Dans le cadre de la recherche des conditions optimales de formation de superagrégats, les résultats de DUPONT et al.(1977) montrent que la taille des agrégats d'AmB augmente aux pH fortement alcalins. Ces superagrégats sont caractérisés par une augmentation du rayon de giration alors que la masse apparente est constante. Par ailleurs, aux pH supérieurs à pH 10, les superagrégats se dissocient.

Il ressort des résultats que nous avons obtenus lors de l'utilisation de solutions antifongiques à 10^{-4} M, aux pH fortement alcalins et utilisées à $2\mu\text{g}$ d'AmB/ml final, que l'activité antifongique de l'AmB est maintenue aussi bien avec le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 que le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 utilisés comme solvants.

Par ailleurs cette activité antifongique vis à vis du *C. albicans* dépend du pH du milieu de culture dans lequel se déroule la croissance. En effet, lorsqu'elle est menée à pH 5.9(pH initial du milieu sabouraud) les solutions d'AmB préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10, aussi bien chauffées 20 minutes à 70°C que non chauffées, sont pleinement actives vis à vis du *C. albicans*(90% d'inhibition). Les superagrégats obtenus à pH 10(DUPONT et al., 1977) maintiennent l'activité antifongique de l'AmB.

Pour ce qui est des solutions d'AmB préparées dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8(la croissance étant menée à pH 5.9), leur activité dépend de la force ionique du tampon. En effet, avec le tampon à la concentration de 10mM, l'AmB est pleinement active vis à vis du *C. albicans*. De plus le préchauffage 20 minute à 70°C de ces solutions antifongiques ne réduit pas de façon importante l'activité de l'AmB vis à vis de la levure puisque le taux d'inhibition dans ce cas est de l'ordre de 80%. Par contre, le tampon pH 10.8 à la concentration de 100mM, réduit fortement le pouvoir inhibiteur de l'AmB(la croissance est inhibée à 40% par l'AmB dans ce cas).

D'un autre côté, la croissance de la levure menée à pH alcalin(pH 6.6 et pH 7) est fortement inhibée.

A pH 6.6 la croissance de la levure est inhibée à 50%. Cette inhibition est réversible après le retour du milieu au pH initial c'est à dire pH 5.9. D'autre part, l'activité antifongique de l'AmB dissoute dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10 dans ces conditions de croissance dépend de la force ionique du tampon; pour une concentration de

100mM(concentration du tampon), les résultats observés suggèrent une perte totale de l'activité de l'AmB vis à vis du *C. albicans*, alors qu'à la concentration de 10mM, l'AmB maintient son activité vis à vis de la levure.

A pH 7, la croissance de la levure est inhibée à 60%, mais contrairement aux résultats obtenus à pH 6.6 de croissance avec le tampon carbonate/bicarbonate pH 10, l'inhibition induite à pH 7 en présence du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 est irréversible après le retour du milieu au pH initial(pH 5.9). Cette irréversibilité est due à une dégradation partielle du milieu de culture et non pas à la force ionique du tampon carbonate/bicarbonate pH10.8. De plus, l'activité antifongique de la solution d'AmB préparée dans le tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 dans les conditions de culture à pH 7 est fortement réduite par rapport à celles menées à pH 5.9(pH initial du milieu sabouraud)

Il ressort alors que l'activité antifongique de l'AmB vis à vis du *C. albicans* est fortement réduite lorsque les cultures sont menées à des pH alcalins. Ces résultats sont en accord avec les résultats de JOHNSON et al.(1978) d'après lesquels on observe une réduction de la fuite de potassium(K^+) induite par l'AmB chez les levures mises en culture à des pH plus élevés que le pH habituel de croissance(pH 7).

Par ailleurs, lorsque les levures sont en conditions de pH favorable à leur croissance (pH 5.9), l'activité antifongique des solutions d'AmB aussi bien chauffées que non chauffées, préparées à 10^{-4} M en solutions aqueuses à des pH variant de 5.9 à 10.8 et utilisées à une concentration finale de 2 μ g/ml, est maintenue vis à vis du *C. albicans*. Par conséquent, la formation des superagrégats à pH 10 ou leur dissociation à pH 10.8 ne diminue pas l'activité antifongique de l'AmB.

Le maintien de l'activité antifongique au pH fortement alcalins(pH 10.8) pourrait s'expliquer par une réversibilité des caractéristiques physico-chimiques de la solution antifongique après son acidification par le milieu de culture(DUPONT et al., 1977).

D'autre part, en tenant compte des résultats de BOUCHERIT(1995) selon lesquels la toxicité de l'AmB vis à vis du globule rouge est fortement réduite à pH acide(pH 5.4), nous pouvons supposer que la formation des superagrégats se fait aux pH alcalins mais aussi aux pH acides.

CONCLUSION GENERALE

Le but qui avait été défini pour le présent travail été la détermination *in vitro* de conditions physico-chimiques permettant de favoriser la ou les formes de l'amphotéricine B les plus actives sur une levure pathogène chez l'homme, le *C. albicans*.

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 agrégées insolubles qui sont les moins toxiques vis à vis des cellules animales (BOLARD et al., 1991), on a en revanche très peu d'information sur l'efficacité antifongiques des formes solubles ou des formes agrégées.

Un certain nombre de paramètres favorisant la formation d'agrégats et de superagrégats non toxiques pour les cellules animales ont été testés sur le plan de l'activité antifongique.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

1- La toxicité de l'amphotéricine B vis à vis du *C. albicans* augmente avec l'augmentation de la concentration de la solution mère, et cela aussi bien avec les solutions antifongiques préparées dans le DMSO, dans le DMF, dans l'éthanol ou encore dans le méthanol. Mais cette augmentation d'activité est beaucoup plus frappante avec les alcools utilisés comme solvants. Cependant, la solution antifongique préparées à 10^{-4} M dans l'éthanol ne semble pas suivre ce phénomène puisque c'est à cette concentration ; la plus diluée par rapport à la concentration de $5 \cdot 10^{-4}$ M ou de 10^{-3} M que l'amphotéricine B est la plus active vis à vis du *C. albicans*. Or, plus la concentration de la solution antifongique augmente, plus le taux d'agrégats augmente (LEGRAND et al., 1992).

2- A toutes les concentrations de solutions mères d'amphotéricine B testées (de 10^{-2} M à 10^{-4} M), la nature du solvant joue un rôle important dans l'activité de l'amphotéricine B vis à vis des levure. Mais, c'est aux faibles concentrations ($5 \cdot 10^{-4}$ M et 10^{-4} M) que la modulation de l'activité antifongique de la solution d'amphotéricine B est la plus marquante. Ainsi, les solvants utilisés ont pu être classés en fonction de la toxicité croissante de la solution antifongique, vis à vis du *C. albicans* comme suit :

Ethanol < Méthanol < DMF \leq DMSO

Le DMSO est alors le solvant qui permet une meilleure activité de l'amphotéricine B vis à vis de la levure. Ceci est probablement lié à un taux d'agrégats (LEGRAND et al., 1992) plus important avec ce solvant

3- Le préchauffage des solutions antifongiques à 70°C pendant 20 minutes permet d'augmenter l'activité de l'amphotéricine B vis à vis du *C. albicans*. Cette augmentation se traduit essentiellement par un prolongement de la phase de latence par rapport aux solutions préparées à température ambiante. Or les travaux de ERNST et al.(1978) et de GABORIAU et al.(1997a) montrent que l'augmentation de la température induit une augmentation de la taille des agrégats aboutissant à des superagrégats qui constituent une combinaison d'agrégats et de monomères.

De plus, la nature du solvant des solutions antifongiques joue un rôle dans l'activité de ces solutions préchauffées. En effet le DMSO permet une meilleure activité antifongique vis à vis de la levure. L'inhibition de la croissance induite dans ces conditions là est 2 fois supérieure à celle induite avec les solutions antifongiques préparées dans l'éthanol. Par ailleurs, les tests de stabilité montrent que le préchauffage des solutions antifongiques induit une perte d'activité au bout d'une semaine de conservation à 4°C et à l'abri de la lumière. Mais cette perte est négligeable lorsqu'il s'agit des solutions préparées avec de l'amphotéricine B pure, puisque l'activité observée est d'une part de même amplitude que celle observée à température ambiante, d'autre part, la phase de latence est toujours prolongée d'au moins 4 heures par rapport aux solutions non préchauffées. En revanche, lorsque les solutions sont préparées avec de la Fungizone[®], l'activité antifongique est réduite après la conservation des solutions à 4°C pendant 1 semaine. Alors que la solution de Fungizone[®] préparée à température ambiante perd 20% de son action inhibitrice, celles préparées dans les mêmes conditions et préchauffées 20 minutes à 70°C perdent toute activité vis à vis du *C. albicans*. Par conséquent, il est important de contrôler les conditions de préparation des solutions antifongiques ainsi que leur durée de conservation.

4- L'action inhibitrice de l'amphotéricine B vis à vis du *C. albicans* est maintenue lorsque la solution est préparée dans des conditions fortement alcalines(pH 10 et pH 10.8). De plus, le préchauffage des solutions antifongiques à 70°C pendant 20 minutes n'entraîne pas une baisse d'activité de l'amphotéricine B. Aux pH alcalins allant jusqu'à pH 10, il y a apparition de superagrégats caractérisés par une augmentation du rayon de giration sans modification de la masse apparente. Au delà de pH 10, les superagrégats se dissocient(DUPONT et al., 1977)

- Par ailleurs, l'activité de l'amphotéricine B dépend dans ces conditions, du pH du milieu de culture. Lorsque la croissance est menée à pH 5.9, l'amphotéricine B issue d'une solution mère aqueuse à pH 10 est pleinement active sur la levure, alors que l'activité de

l'amphotéricine B en solution aqueuse à pH 10.8 dépend de la force ionique du tampon. Lorsque la concentration du tampon carbonate/bicarbonate pH 10.8 est faible (10mM), l'amphotéricine B est pleinement active sur la levure, alors que l'utilisation de ce même tampon à la concentration de 100mM entraîne une forte réduction du pouvoir antifongique de l'amphotéricine B.

- D'un autre côté, la croissance de la levure menée à pH 6.6 et pH 7 est fortement inhibée. A pH 6.6 (pH obtenu en présence du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10), la croissance de *C. albicans* est inhibée à 50%. Cette inhibition est réversible lorsque le pH du milieu revient au pH d'origine (pH 5.9). L'activité antifongique dans ces conditions dépend de la force ionique du tampon pH 10 : lorsque la concentration du tampon est de 100mM, l'amphotéricine B perd tout pouvoir inhibiteur vis à vis de la levure, alors qu'à la concentration de 10mM, l'amphotéricine B maintient son activité.

- A pH 7 (pH obtenu en présence du tampon carbonate/bicarbonate 100mM pH 10.8), la croissance est inhibée de façon irréversible à 60%. Cette irréversibilité observée après le retour du milieu de culture au pH initial peut être due à une dégradation partielle du milieu, mais non pas à la force ionique du tampon pH 10.8. L'activité de la solution d'amphotéricine B dans ces conditions alcalines est fortement réduite.

- En comparant entre elles les solutions d'amphotéricine B préparées en solutions aqueuses à pH 5.9, pH 7, pH 10 et pH 10.8, il apparaît aussi bien avec les solutions préchauffées 20 minutes à 70°C qu'avec celles préparées à température ambiante, que l'activité antifongique de l'amphotéricine B est maintenue.

Il ressort de notre étude que la modulation de l'environnement physico-chimique en vue d'obtenir des agrégats et des superagrégats, ne réduit pas l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis à vis du *C. albicans*. Il est à souligner que ces conditions favorables à la formation des agrégats et des superagrégats sont précisément celles qui induisent une diminution de la toxicité des cellules animales hôtes [(LEGRAND et al., 1992), (GABORIAU et al., 1997b), (PETIT et al., 1998)].

En définitive, la préparation de nouvelles formulations basées sur la modulation de ces facteurs physico-chimiques, semble être une solution possible parmi d'autres, qui a l'avantage d'être facile d'accès et peu onéreuse et qui permet une augmentation de l'index thérapeutique.

On peut envisager de prolonger ce travail en :

- étendant l'étude à d'autres levures pathogènes,
- vérifiant si des résultats d'activité antifongiques analogues sont retrouvés *in vivo* c'est à dire chez l'animal contaminé,
- étudiant l'influence de nouveaux paramètres physico-chimiques de l'environnement de l'amphotéricine B tels que l'oxygène du milieu, la lumière, le pH acide, la concentration en stérols et la concentration en acides gras ; sur l'état d'agrégation de la molécule d'amphotéricine B et sur son activité biologique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1- ARCHER D.B. and GALE E.F. (1975).

Antagonism by sterol of the action of amphotericin and filipin on the release of potassium ions from *Candida albicans* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *Capri*.

Journal of General Microbiology(90) :187-190.

2- BENYACOUB F. et HACHEMI N. (1998).

Effet des solvants organiques sur la toxicité de la Fungizone[®] chez le *Saccharomyces cerevisiae*. Mémoire de D.E.S en Biochimie. Institut des sciences de la nature.

Université Aboubekr Belkaid Tlemcen.

3- BOLARD J. (1986).

How do the polyene macrolidde antibiotics affect the cellular membrane permeability ?

Biochim. Biophys. Acta (864) :258-303.

4- BOLARD J. (1991).

Mechanism of action of an anti-*Candida* drug : amphotericin B and its derivatives.

Ed. R. Prasad :214-238.

5- 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.

6- BOLARD J. and 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.

7- BOLARD J. and MILHAUD J. (1996).

Interaction of the anti-*Candida* amphotericin B(and other polyene antibiotics) with lipids.

CRC Press, Inc :254-270.

8- BOLARD J., JOLY V. et YENI P. (1997).

Amphotéricine B : ancien médicament, nouveaux concepts.

Médecine thérapeutique(3). N°3 :207-213.

9- BOUCHERIT Z. (1995).

Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée aux lipoprotéines du sérum sanguin chez des cellules de globules rouges humaines. Thèse de Magister. Institut de Biologie. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen.

10- BOURIN M., LIEVRE M. et ALLAIN H. (1993).

Cours de pharmacologie.

Ed. Ellipses :327-331.

11- BRATJBURG J., ELBERG S., BOLARD J., KOBAYASHI G.S., LEVY R.A., OSTLUND R.E. Jr., SCHLESSINGER D. and MEDOFF G. (1984).

Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B.

J. Infec. Dis.(149) : 986-997.

12- 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). N°2 : 172-176.

13- BRATJBURG J., POWDERLY W.G., KOBAYASHI G.S. and MEDOFF G. (1990a).

Amphotericin B : current understanding of mechanisms of action.

Antimicrob. Agents and Chemother.(34). N°2 :183-188.

14- BRATJBURG J., POWDERLY W.G., KOBAYASHI G.S and MEDOFF G. (1990b).

Amphotericin B delivery systems.

Antimicrob. Agents and Chemother.(34). N°3 :381-384.

15- BRATJBURG J. and BOLARD J. (1996).

Carrier effects on biological activity of anphotericin B.

Clinical Microbiology Reviews(9). N°4 : 512-531.

16- BRYSKIER A. (1999).

Antibiotiques :agents antibactériens et antifongiques.

Ed. Ellipses :1104-1132.

17- BUDAVARI S., O'NEIL M. J., SMITH A., HECKEMAN P. E. and KINNEARY J. F. (1996).

The MERCK INDEX :An encyclopedia of chemicals, drug and biologicals.

Ed. Merck Research Laboratories.

18- CANIAUX I., VILLARD J., PORTE M. et ODDOUX L. (1984).

Les antifongiques utilisés en thérapeutique humaine.

Lyon pharmaceutique(35) : 131-141.

19- CARBON C., REGNIER B., SAIMOT G., VALIDE J.L. et YENI P. (1994).

Antifongiques : données générales.

Ed. Médecine Science Flammarion : 449-461.

20- CLEJAN S. and BITTMAN R. (1985).

Rates of amphotericin B and filipin association with sterols : a study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicules.

The journal of biological chemistry(260). N°5 :2884-2889.

21- CLEMENTS J.S., CLEMENTS Jr. and PEACOCK Jr. (1990).

Amphotericin B revisited : reassessment of toxicity.

Am. J. Med.(88) :522-527.

22- CYBULSKA B., BOLARD J., SEZSEK O., CZERWINSKI A. and BOROWSKI E. (1995).

Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene macrolide antibiotics of the heptane group influencing the ionic selectivity of the permeability pathways formed in the red cell membrane.

Biochim. Biophys. Acta(1240) :167-178.

23- DEMAÏMAY R., ADJOU K., LASMEZAS C., LAZARINI F., CHERIFI K., SEMAN M., DESLYS J. P. and 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.

24- DROUHET E. (1978).

Antifongiques : pharmacologie clinique base de la thérapeutique.

Expansion Scientifique Française.: 1187-1206.

25- DUPONT G., RINNERT H. et LEMATRE J. (1977).

Etude physico-chimique de l'amphotéricine B en milieu alcalin.

C. R. Acad. Sc. Paris, t. 284 :853-856.

26- 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.

C. R. Aca. Sc. Paris, t. 286 :175-178.

27- 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.

28- 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). N°11 :2345-2351.

29- 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.

30- HAMMOND S.M. (1977).

Biological activity of polyene antibiotics.

Progress in medical chemistry(14). Ed. G. P. BLLIS and G. R. WEST :106-164.

31- HARTSEL S. and BOLARD J. (1996).

Amphotericin B : a new life for an old drug.

TiPS (17) : 445-44.

32- HERVE M., DEBOUZY J.C. , BOROWSKI E., CYBULSKA B. and 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.

33- HUNG C.T., LAM F.C., PERRIER D.G. and SOUTER A. (1988).

A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorial design.

International Journal of Pharmaceutics(44) :117-123.

34- JOHNSON B., WHITE R.J. and WILLIAMSON G.M. (1978).

Factors influencing the susceptibility of *Candida albicans* to the polyenic antibiotics nystatin and amphotericin B.

Journal of General Microbiology(104) :325-333.

35- JOLY V., SAINT-PIERRE-CHAZALET M., SAINT-JULIEN L., BOLARD J., CARBON C. and YENI P.(1992).

Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture.

J. Infec. Dis.(165) : 337-343.

36- KERRIDGE D. (1986).

Mode of action of clinically important antifungal drugs.

Advances in microbial physiology(27) :1-64.

37- 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.

38- KITO M., AKUTSU H., SUGETA H., KYOGOKU Y., SOHN D.H. and SUL YU B. (1987).

Association of polyene antibiotics with sterols.

Chem. Biol. Interactions(64) :61-70.

39- KOENIG H. (1995).

Guide de mycologie médicale.

Ed. Ellipses :37-44.

40- KOLDIN M.K., KOBAYASHI G.S., BRATJBURG J. and 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.

41- LASIC D.D. (1992).

Mixed micelles in drug delivery.

Nature(355) :279-280.

42- LEGRAND P., ROMERO E.A., COHEN E. and BOLARD J. (1992).

Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes.

Antimicrob. Agents and Chemother.(36). N°11 : 2518-2522.

43- LEGRAND P., CHERON M., LEROY L. and BOLARD J. (1997).

Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells.

Journal of Drug Targeting(4). N°5 :311-319.

44- 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.

45- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A. and RANDALL R.J. (1951).

J. Biochem. :265-275.

46- 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). N°1 : 13-22.

47- MASUDA H., TANAKA T., KIDO A. and KUSABA I. (1991).

Potentialiation of cisplatin against sensitive and resistant human ovarian cancer cell line by amphotericin B.

Cancer J.(4) :119-124.

48- MAZERSKI J., BOLARD J. and BOROWSKI E. (1982).

Self-association of some polyene macrolide antibiotic in aqueous media.

Biochim. Biophys. Acta(719) : 11-17.

49- MEDOFF G., VALERIOTE F. and DIECKMAN J. (1981).

Potentialiation of anticancer agents by amphotericin B.

JNCI(6) :131-135.

50- Mc KENZIE D., KACZKOWSKI J., MARSH R. and AIKEN J. (1994).

Amphotericin B delays both scrapie agent replication and Pr P-res accumulation early in infection.

J. Virol.(68). N°11 :7534-7536.

51- PETIT C., CHERON M., JOLY V, RODRIGUES J.M., BOLARD J. and GABORIAU F. (1998).

In-vivo therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of deoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy(42) : 779-785.

52- PETIT C., YARDLEY V., GABORIAU F., BOLARD J. and CROFT S.L. (1999).

Activity of heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate(Fungizone[®]) against *Leishmania donovani*.

Antimicrob. Agents and Chemother.(43). N°2 :1-3.

53- PLESKOFF O., SEMAN M. and ALIZON M. (1995).

Amphotericin B derivative blocks human immunodeficiency virus type 1 after CD4 binding :effect on virus-cell fusion but not on cell-cell fusion.

J. Virol.(69). N°1 :570-574.

54- POL D.(1996).

Travaux pratiques de : biologie des levures.
Ed. Ellipses :43-49.

55- PONTANI D.R., SUN D., BROWN J. W., SHAHID S. I., PLESCIA O. J., SCHAFFNER C. P., LOPEZ-BERESTEIN G. and SARIN P. S. (1989).

Inhibition of HIV replication by liposomal encapsulated amphotericin B.
Antiviral Res.(11). N°3 :119-125.

56- 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.

57- RIDENTE Y., AUBARD J., BOLARD J. (1999).

Absence in amphotericin B-spiked human plasma of free monomeric drug, as detected by SERS.
Sous presse :1-10.

58- SAFE L.M., SAFE S.H., SUBDEN R.E. and MORRIS. (1977).

Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*.
Can. J. Microbiol.(23) :398-401.

59- SCHOLER H.J. and POLAK A. (1984).

Resistance to systemic antifungal agents.
Antimicrobial Drug Resistance.
Academic Press. Inc :394-426.

60- SEOANE R., MINONES J., CONDE O., CASAS and 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.

61- SOKOL-ANDERSON M.L., BRATJBURG J. and MEDOFF G. (1986).

Amphotericin B-induced oxydative damage and killing of *Candida albicans*.
J. Infec. Dis.(154). N°1 :76-83.

62- SOKRANE K. et SOUIDI F. (1998).

Solubilité de l'amphotéricine B et sa toxicité chez le globule rouge humain. Mémoire de D.E.S. en biochimie. Institut des sciences de la nature. Université Aboubakr Belkaid Tlemcen.

63- SPERRY P.J., CUA D.J., WETZEL S.A. and ADLER-MOORE J.P. (1998).

Antimicrobial activity of AmBisome and non-liposomal amphotericin B following uptake of *Candida glabrata* by murine epidermal Langerhans cells.
Medical Mycology(36) :135-141.

64- VERTUT-DOÏ A., OHNISHI S.I. and BOLARD J. (1994).

The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B
Antimicrob. Agents and Chemother.(38). N°10 :2373-2379.

65- WASAN K.M., ROSENBLUM M.G., CHEUN L. and LOPEZ-BERESTEIN G. (1994).

Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B.
Antimicrob. Agents and Chemother.(38). N°2 :223-227.

66- WIETZERBIN J., SZPONARSKI W., BOROWSKI E. and GARY-BOBO. (1990).

Kinetic study of interaction between [¹⁴C]amphotericin B derivatives and human erythrocytes : relationship between binding and inducing K⁺ leak.
Biochim. Biophys. Acta(1026) :93-98.

67- WONG-BERINGER A., JACOBS R.A. and GUGLIELMO B.J. (1998).

Lipid formulations of amphotericin B : clinical efficacy and toxicities.
Clinical Infectious Diseases(27) :603-618.

Résumé :

L'amphotéricine B reste l'antifongique de choix dans le traitement des mycoses profondes et systémiques. Cependant, il présente une forte toxicité vis à vis des cellules animales. Cette toxicité est liée pour une large part à son insolubilité en milieu aqueux. Dans ce milieu, trois formes de l'amphotéricine B sont en présence : les monomères solubles, les oligomères solubles et les agrégats insolubles.

D'après plusieurs études, il apparaît que ce sont les agrégats d'amphotéricine B qui sont les moins toxiques vis à vis des cellules animales. D'autre part, la proportion des différentes formes de l'amphotéricine B en milieu aqueux dépend de l'environnement physico-chimique de la molécule. C'est pourquoi, dans le cadre d'une stratégie de développement de l'amphotéricine B et tenant compte de ce qui précède, nous avons étudié l'influence de la modulation de l'environnement physico-chimique de la molécule sur son activité chez *C. albicans*.

Il ressort de notre étude qu'en favorisant la formation d'agrégats ou de superagrégats, soit par le choix du solvant utilisé ou bien par l'augmentation de la concentration de la solution mère, ou en préchauffant la solution antifongique à 70°C pendant 20 minutes, ou encore par l'utilisation de pH fortement alcalins, nous n'observons pas de réduction de l'activité antifongique vis à vis du *C. albicans*.

Mots clefs : Amphotéricine B, toxicité, solubilité, environnement physico-chimique, Amphotéricine B -concentrations, amphotéricine B-solvants, amphotéricine B-température, amphotéricine B-pH, *Candida albicans*.