

Mag - Bio - 11/02

UNIVERSITE DE TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES
Département de Biologie

THESE

*Pour l'obtention du diplôme de
Magister en Biologie
Option: Biologie Moléculaire et cellulaire*

Présentée par

Mme BABA-AHMED Fatima Zohra née RAHMOUN

Thème

Jusqu'à sous le N° 6970
Date: le 30/04/2013
Coue.

Etude in vivo de l'effet de l'amphotericine B liée
aux lipoprotéines «LDL» (low density lipoproteins)
et lipoprotéines «HDL» (high density lipoproteins)
sur quelques paramètres sériques et urinaires
chez les rats Wistar

Soutenue le 2000, devant le jury:



- Président** : M' S.M. BENYOUCEF Docteur ès-Sciences
Promoteur : M' D. CHABANE SARI Maître de Conférences
Examinateur : M' B. BENABADJI Docteur ès-Sciences
Examinatrice : M^{me} H. MERZOUK Maître de Conférences
Examinateur : M' R. DJAZIRI Chargé de Cours

Année Universitaire 1999 - 2000

DEDICACES

A mes parents.

*Pour toutes leurs affections et leurs tendresses
qu'ils ont su me donner avec tant de générosité.*

A mes beaux parents.

A mon mari Djamel Eddine.

qui m'a aidé par son soutien.

A ma fille Yasmine Rania.

A toute ma famille.

*A tous ceux qui éprouvent un sentiment d'amitié
envers moi.*

Je dédie ce travail.

REMERCIEMENTS

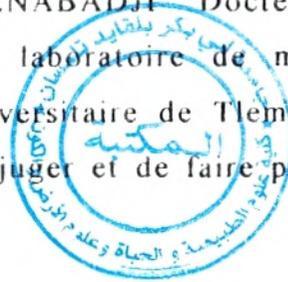
Je tiens à remercier en premier lieu, Monsieur CHABANE-SARI Daoudi, Maître de Conférence à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, mon Directeur de recherches de m'avoir encadré du début à la fin de cette thèse, je garde en mémoire ces conseils bienveillants, son enthousiasme et son soutien moral durant les moments difficiles. Qu'il trouve ici le témoignage sincère de ma reconnaissance et toute mon estime.

Mes sincères remerciements vont à Monsieur S.M. BENYOUCEF, Docteur ès-Sciences qui a bien voulu faire l'honneur de présider le jury de ce travail.

Aussi, je remercie toute l'équipe du laboratoire du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen, Service de Biochimie sous la direction de Monsieur BENYOUCEF, je lui exprime ma profonde reconnaissance et mon estime pour son importante aide.

Je remercie, Madame H. MERZOUK, Docteur en Physiologie animale à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, pour sa disponibilité à juger ce travail, je tiens à lui exprimer mes sincères reconnaissances scientifiques, ses précieux conseils et son soutien moral. Qu'elle trouve ici l'expression de toute mon estime.

Je remercie Monsieur B. BENABADJI Docteur ès-Sciences Pharmaceutiques, Chef de Service du laboratoire de microbiologie et d'immunologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen, qui a bien voulu lire ce travail en acceptant de le juger et de faire partie du jury de thèse.



Je remercie également Monsieur R. DJAZIRI Chargé de Cours à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, d'avoir accepté de siéger parmi les membres du jury. Qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

Je remercie Monsieur M.A. KHELIL, Professeur à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, pour son soutien moral et ses encouragements, je lui exprime toutes mes sincères reconnaissances.

Et enfin, je remercie tout ceux qui ont collaboré à la réalisation de cette thèse.

ABREVIATIONS

| | | |
|------------------------|---|---|
| Amp B | : | Amphotericine B |
| Amp B-desoxy | : | Amphotericine B desoxycholate |
| DNA | : | Desoxycholate de sodium |
| Hb | : | Hemoglobine |
| GR | : | Globule rouge |
| LDL | : | Lipoprotéines de faible densité (Low Density Lipoprotéins) |
| VLDL | : | Lipoprotéines de très faible densité (Very Low Density Lipoproteins) |
| HDL | : | Lipoprotéines lourde (High Density Lipoproteins) |
| g/l | : | Gramme par litre |
| mg/dl | : | milligramme par décilitre |
| Meq | : | milliéquivalent |
| mmole/l | : | millimole par litre |
| μ l/mm | : | micromole par minute |
| μ g/ml | : | microgramme par millilitre |
| GFR | : | Filtration glomérulaire rénale |
| FG | : | Filtration glomérulaire |
| EF% | : | Excrétion fractionnaire |
| \dot{V} | : | Débit urinaire |
| (U/P) _{créat} | : | Rapport de la créatinine urinaire et plasmatique |
| Na ⁺ | : | Sodium |
| K ⁺ | : | Potassium |
| Ca ⁺⁺ | : | Calcium |
| mn | : | Minute |
| LCAT | : | Lecithine cholesterol acyl transférase |

المخلص :

يهدف هذا العمل الى التقييم الحيوي لأثر مادة Amphotericine B-desoxycholate والمرتبطة بالبروتينات الدهنية الخفيفة (LDL) والثقيلة (HDL) على بعض المعايير الكلوية عند فئران Wistar .

علما أن مادة Amphotericine B. تؤثر على الغشاء البلازمي للخلايا الحقيقية والبدائية النواة محدثة تغيرات في تركيب و وظائف الخلايا.

مثل بقية المضادات الفطرية فإن مادة Amphotericine B ذات استخدامات شائعة وتحدث عدة آثار سامة وعلى إثر ذلك تم تطوير عدة أساليب في الشكل التجاري للتقليل من سمية Amphotericine B-desoxycholate والمسماة Fungizone لمعرفة الشكل المرتبط بالبروتينات الدهنية الداخلية لثبات الأثر المضاد للفطريات .

في إطار إيجاد استراتيجية لتطوير مجال استطبائي جديد تمت دراسة أثر Amphotericine B-desoxycholate المرتبطة بالبروتينات الدهنية على بعض المعايير الكلوية عند فئران Wistar .

في هذه الدراسة تم اعتماد طبيعة البروتينات الدهنية المستخدمة خاصة (LDL & HDL) والتي تم ترسيبها حسب تقنيات Burstein et al 1970 من ناحية ومن ناحية أخرى الأثر التصاعدي لتراكيز مادة Amphotericine B-desoxycholate على وظائف الكلية .

دلت نتائج هذه الدراسة على ما يلي :

• إن حقن مادة Amphotericine B-desoxycholate بتركيز

مختلفة 2.5 و 5.0 و 7.5 و 10 ميكروجرام / مل

بفئران Wistar في مدة قصيرة تحدث عدة تغيرات منها :

- تغير في خصائص الدم (الهيموجلوبين ، الكريات

الدموية الحمراء)

- تغير في كهربائية الغشاء البلازمي لخلايا الكلية.

- إعاقة وظائف الكلية .

• إضافة البروتينات الدهنية والجزيئات الكبيرة للكلى تتول

الى مراكز الارتباط مع المضاد الفطري أظهرت آثارا مختلفة

على سمية مادة Amphotericine B-desoxycholate تبعاً لنوعية

البروتينات الدهنية .

عند تركيز 10 ميكروجرام / مل مادة Amphotericine B-desoxycholate وبعد

ساعتين من الحقن فإن البروتينات الدهنية الثقيلة (HDL) وعند

7.88 غ/ل أحدثت حماية هامة مقارنة مع البروتينات الدهنية الخفيفة

(LDL) عند 1.33 غ/ل .

وأخيراً فإن التجارب الحيوية والمختبرية أظهرت نتائج متضاربة علماً أن :

♦ الإختبار الحيوي In Vivo فإن أثر حماية الخلايا الكلوية يمكن

الحصول عليه فقط مع البروتينات الدهنية الثقيلة (HDL) ضد سمية مادة

Amphotericine B-desoxycholate .

♦ الإختبار غير الحيوي In Vitro فإن النوعان من البروتينات

الدهنية تضمن الحماية للخلايا الحيوانية ضد سمية

Amphotericine B-desoxycholate .

RESUME

Le but de ce travail repose sur l'évaluation in vivo de l'effet de l'amphotericine B-desoxycholate liée aux lipoprotéines légères " LDL " et lipoprotéines lourdes " HDL " sur quelques paramètres sériques et urinaires chez le rat Wistar.

En effet il est admis que, l'amphotericine B agit sur les cellules eucaryotiques et procaryotiques en perturbant l'organisation de leurs membranes plasmiques entraînant ainsi une altération de structure et aussi de la fonction cellulaire.

Comme tous les antifongiques polyéniques, l'amphotericine B de large utilisation clinique induit d'importants effets toxiques ; C'est pourquoi beaucoup de stratégies ont été développées pour essayer de réduire la toxicité de la formulation commerciale (Amphotericine B-desoxycholate " Fungizone ") à savoir la forme complexée aux lipoprotéines endogènes stabilisant ainsi l'activité antifongale.

Dans le cadre de l'élaboration d'une stratégie de développement en vue d'une thérapeutique nouvelle, nous avons étudié l'effet de l'amphotericine B-desoxycholate associée aux lipoprotéines sériques sur quelques paramètres sériques et urinaires chez le rat Wistar.

Dans notre travail, nous nous sommes basés d'une part sur la nature des lipoprotéines utilisées notamment les lipoprotéines (LDL, HDL) qui ont été précipitées par la technique de (BURSTEIN et al, 1970), d'autre part l'effet de concentrations croissantes d'amphotericine B desoxycholate sur la fonction globale du rein

Il ressort de cette étude que :

- La perfusion de l'amp B-desoxycholate à différentes concentrations allant de 2,5 µg/ml – 5 µg/ml – 7,5 µg/ml – 10 µg/ml chez le rat Wistar à une courte durée induit des différentes perturbations :
 - Hématologiques (hémoglobine, globule rouge)
 - Troubles électrolytiques plasmatiques, urinaires
 - Troubles de la fonction rénale.
- L'addition des lipoprotéines sériques, macromolécules renfermant du cholestérol un site de fixation à l'antifongique, montrent des effets différents sur la toxicité de l'amp B suivant le type de lipoprotéines sériques.

A des concentrations d'amp B-desoxy de l'ordre de 10 µg/ml après 2 heures de perfusion, les lipoprotéines lourdes " HDL " à 7,88 g/l induisent un effet protecteur important qu'avec les lipoprotéines légères " LDL " à 1,33 g/l.

Enfin, des recherches faites in vivo et in vitro aboutissent à des résultats contradictoires à savoir :

- In vivo : l'effet protecteur des cellules rénales est assuré uniquement avec les lipoprotéines lourdes " HDL " contre la toxicité induite par l'amp B.
- In vitro : les deux types de lipoprotéines sériques assurent la protection des cellules animales contre la toxicité induite par l'amp B.

SOMMAIRE

| | Pages |
|---|----------|
| INTRODUCTION GÉNÉRALE..... | 1 |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES..... | 5 |
| I - MODELE EXPERIMENTAL..... | 5 |
| 1.1 - Choix de l'animal..... | 5 |
| 1.2 - Déroulement de l'expérience..... | 5 |
| 1.3 - Préparation des animaux - Protocole expérimental..... | 5 |
| 1.4 - Traitement des échantillons..... | 7 |
| 1-4-1. Mesure du débit urinaire..... | 7 |
| 1-4-2. Dosage de la créatinine, l'urée..... | 7 |
| 1-4-3. Dosage des électrolytes..... | 7 |
| 1-4-4. Dosage des protéines totales..... | 7 |
| 1-4-5. Dosage des triglycérides, cholestérol total et phospholipides..... | 7 |
| 1-4-6. Dosage d'hémoglobine et numération des globules rouges..... | 8 |
| 1.5 - Calcul, expression des résultats et analyse statistique..... | 8 |
| 1-5-1. Filtration glomérulaire..... | 8 |
| 1-5-2. Excrétions fractionnaires..... | 8 |
| 1-5-3. Analyse statistique..... | 9 |
| II - PREPARATION DES LIPOPROTEINES..... | 9 |
| II.1 - Séparation des lipoprotéines..... | 9 |
| II-1-1. Solution a préparer..... | 9 |
| II-1-2. Mode opératoire..... | 9 |

| | Pages |
|--|-----------|
| II.2 – Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur acétate de cellulose | 11 |
| II.3 – Analyse du contenu lipidique et protéique de chaque lipoprotéine..... | 12 |
| II-3-1. Dosage du cholestérol total | 12 |
| II-3-2. Dosage des triglycérides | 12 |
| II-3-3. Dosage des phospholipides | 13 |
| II-3-4. Dosage des protéines totales | 13 |
| III - PREPARATION DES SOLUTIONS ANTIFONGIQUES | 13 |
| IV - PREPARATION AMPHOTERICINE B-DESOXY – LIPOPROTEINES..... | 13 |
| INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS | 15 |
| DISCUSSION..... | 56 |
| CONCLUSION | 65 |
| RÉFÈRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 67 |



INTRODUCTION

INTRODUCTION

La prolifération des infections fongiques a fait des progrès considérables au cours des deux ou trois dernières décennies grâce à l'essor de la mycologie médicale qui est en pleine expansion avec l'augmentation importante du nombre des patients et par une grande diversité des espèces pathogènes (8).

En général les infections mycosiques sont dues à des champignons levuroformes responsables des lésions profondes (pulmonaires, rénales, cardiaque, nerveuses et intestinales) (35, 47, 88).

A l'heure actuelle les infections fongiques demeurent de plus en plus graves causant ainsi une morbidité des patients hospitaliers (82) ; parmi les causes de cette évolution on peut citer l'utilisation des aliments industriels, l'antibiothérapie prolongée, d'immuno-dépresseurs, le syndrome immuno-déficience (AIDS), ainsi que d'autres facteurs non cités peuvent être la cause à l'apparition des mycoses (36, 52).

Un phénomène aussi important est la sensibilité des fongis vis-à-vis des antifongiques ; de plus il s'est avéré que les mécanismes de résistance et de virulence des levures aux antifongiques demeurent pour l'essentiel inconnus (35, 104, 105). In vitro ces champignons sont entièrement inhibés à des concentrations allant de 0,3 à 1 µg/ml, par contre in vivo, aux doses utilisées en clinique chez l'homme l'amphotéricine B n'est que fongistatique elle n'a aucune action antibactérienne (3, 35, 73)

Depuis de nombreuses années, les chercheurs ont établi l'existence d'antifongiques agissant contre la plupart des infections fongiques (7, 26, 31, 44, 51, 60, 70, 108). Parmi ces antifongiques utilisés en clinique, on peut citer l'emploi des polyènes tels que la nystatine et l'amphotéricine B qui se limitent aux candida-système tels que (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatidis*) ; (en se liant et en déstabilisant les

membranes cellulaires responsables de l'effet fongicide). Les griseofulvines (se limitent aux dermatophytes par blocage des microtubules intracellulaires). Les fluocytosines (se limitent aux *Candida cryptococcus* par blocage de la synthèse ARN/ADN), et d'autres dérivés imidazoles (se limitent aux mycoses superficielles en inhibant la synthèse d'ergostérol composant essentiel des cellules fongiques (38, 39, 73, 106).

Parmi les antifongiques cités précédemment notre étude s'est portée sur un polyène : amphotéricine B. Par ses caractères physico-chimiques, biologiques, biochimiques, le mode d'administration etc..., l'amphotéricine B de large spectre agit sur les cellules des eucaryotes et procaryotes en perturbant l'organisation de leurs membranes plasmiques (27, 49, 96, 108).

Comme tous les antifongiques polyéniques, l'amphotéricine B agit en formant de véritables pores intra-membranaires par formation d'un complexe insoluble amphotéricine B-stérol (12, 15, 16) ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire de la cellule fongale, une perte d'ions et de protéines, une augmentation de l'activité enzymatique et une acidification interne par échange K^+/H^+ et par conséquent la lyse cellulaire (18, 19, 33, 34, 37).

Cependant, l'amphotéricine B reste un antifongique de choix très largement utilisée pour la thérapeutique des mycoses (65) qui prennent de plus en plus d'ampleur, car il est d'une grande efficacité, mais il pose un sérieux problème de toxicité chronique ou aigue tels que : l'effet hématologique – les troubles électrolytiques – l'effet hépatotoxique – l'effet métabolique (22, 32, 49).

L'atteinte rénale est ainsi observée lors de son utilisation, elle est dose-dépendante et peut devenir irréversible (le rein est l'organe cible critique lors d'une exposition chronique modérée à l'amphotéricine B par voie intraveineuse qui peut être à la base de tous ses effets néphrotoxiques; en modulant les critères de la filtration glomérulaire, le flux sanguin rénal et le désordre électrolytique etc... (5, 56, 63, 93)

Outre son action antifongique, l'amphotericine B exerce chez l'homme des effets immuno-stimulants à la fois sur l'immunité humorale et cellulaire (activation des macrophages) (77).

Même avec l'apparition de nouveaux médicaments, et les risques que présente l'amphotericine B lors de son utilisation en clinique ; elle reste toujours en général, le médicament de choix et le plus efficace pour les infections les plus sévères (95, 101) ; c'est pour cela beaucoup de recherches ont été faites pour essayer de réduire la cytotoxicité de la Fungizone : amphotericine B desoxycholate (Squibb) ; elle a la particularité d'être lipophile et son association avec les lipoprotéines conduit à une réduction de sa toxicité sans modifier son activité antifongale et tout en protégeant l'organisation de la cellule cible en particulier la membrane plasmique contre la cytotoxicité induite par l'amphotericine B desoxycholate (17, 71, 91, 99).

Selon les travaux de (BRAJTBURG et al, 1984) sur des expériences de comigration amphotericine B - lipoprotéines - cellules cibles, montrent que l'amphotericine B peut se complexer avec les lipoprotéines sériques renfermant du cholestérol non estérifié en modifiant ainsi l'interaction du polyène avec les cellules cibles et stabilisant ainsi l'activité cytotoxiques des antifongiques polyéniques. En effet, selon les travaux de (BOLARD, 1980, BOLARD, 1986), l'interaction amphotericine B - lipoprotéines est due aux phospholipides de la molécule vectrice. D'après (BRAJTBURG, 1984) l'amp B a une interaction plus rapide avec les lipoprotéines à basse densité « LDL » qu'avec celle de haute densité « HDL ».

Des modifications de l'interaction amp B - cellules cibles sont possibles en présence des lipoprotéines sériques. Ces modifications dépendent d'une part des caractéristiques des lipoprotéines utilisées comme molécules vectrices et protectrices et d'autre part du contenu en stérol de la cellule cible (89, 106)

Comme les fractions lipoprotéiques LDL (Low Density Lipoprotein) et HDL (High Density Lipoprotein) diffèrent par leur composition en

lipides et en apoprotéines selon la technique de précipitation de (BURSTEIN et al, 1970) et par la présence des récepteurs B/E membranaires pour les lipoprotéines légères LDL ; il est possible que l'interaction de l'amphotéricine B - cellule cible, soit différente. La réduction de l'effet cytotoxique serait due probablement à une stabilité des protéines de transport dans la membrane plasmique (ces protéines de transport peuvent être des pompes nécessitant de l'énergie $\text{Na}^+ \text{K}^+$ Atpase, ou des canaux ioniques), et rétablir ainsi les troubles électrolytiques.

Sur la base d'indications données, nous avons pensé dans le cadre de ce travail de faire une étude in vivo de l'effet de l'amphotéricine B-desoxy liée aux lipoprotéines légères ou « LDL » et les lipoprotéines lourdes ou « HDL » sur quelques paramètres sanguins et urinaires ; c'est pourquoi nous avons choisi les rats de types Wistar d'une part comme modèle de référence bien que le mécanisme de la cytotoxicité soit inconnu ; et d'autre part les lipoprotéines des rats qui sont des macromolécules assurant le transport des graisses d'origine exogènes ou endogènes sont bien décrites et faciles à isoler du sérum des rats (25, 28). Pour cela 10 groupes de rats Wistars (n=5) ont été étudiés dans les mêmes conditions expérimentales (voir matériel et méthodes).

M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I - MODELE EXPERIMENTAL

I.1 – Choix de l'animal

Notre étude a été effectuée sur les rats mâles de type (Wistar albinos) ayant un poids corporel de (150 et 300 g).

Ces animaux ont été élevés et suivis au sein de notre animalerie (Institut des Sciences de la Nature de Tlemcen), et nourris avec un aliment de commerce (type ONAB). L'eau et la nourriture sont fournis à volonté.

I.2 – Déroulement de l'expérience

Notre étude a porté sur 10 groupes de rats de cinq rats chacun (n=5).

- Un premier lot témoin : rats recevant une perfusion de la solution saline à 9 g/l à un débit de $30 \mu\text{l}.\text{mn}^{-1}$.
- Un deuxième lot expérimental : rats recevant une perfusion de la solution desoxychlorate de sodium à un débit de $10 \mu\text{l}.\text{mn}^{-1}$.
- Un troisième lot expérimental : rats recevant une perfusion de solution amphotéricine B-desoxy à différentes concentrations croissantes (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ — 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ — 7,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ — 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) à un débit de $10 \mu\text{l}.\text{mn}^{-1}$.
- Un quatrième lot expérimental : rats recevant une perfusion de la solution lipoprotéique légère LDL seule à un débit de $10 \mu\text{l}.\text{mn}^{-1}$.
- Un cinquième lot expérimental : rats recevant une perfusion de solution amphotéricine B-desoxy associée aux lipoprotéines légères LDL à un débit de $10 \mu\text{l}.\text{mn}^{-1}$.
- Un sixième lot expérimental : rats recevant une perfusion de solution amphotéricine B-desoxy associée aux lipoprotéines lourde HDL à un débit de $10 \mu\text{l}.\text{mn}^{-1}$.

I.3 – Préparation des animaux - Protocole expérimental

Le protocole expérimental consiste à mettre les animaux par groupe de cinq rats dans des cages.

Dix-huit heures avant l'expérience, les rats sont mis à jeun dans des cages à métabolismes.

Au début de la manipulation l'animal est pesé, puis anesthésié par injection intra-péritonale de penta-barbitol à 6% (NEMBUTAL).

Après anesthésie, l'animal est placé sur une table chauffante thermostatée, permettant de maintenir une température corporelle à 37 °C.

Une trachéotomie est effectuée, permettant une bonne respiration de l'animal anesthésié.

Un cathéter (PE 50) est introduit dans la veine jugulaire droite pour la perfusion de la solution saline à 9 g/l ; à un débit de 30 $\mu\text{l}\cdot\text{mn}^{-1}$ pour les rats témoins, et 20 $\mu\text{l}\cdot\text{mn}^{-1}$ pour tous les autres groupes de rats traités.

Un cathéter (PE 50) est introduit dans la veine jugulaire gauche recevant différentes solutions traitées pour les différents groupes de rats expérimentaux à un débit de 10 $\mu\text{l}\cdot\text{mn}^{-1}$.

Afin de pouvoir éviter une déshydratation de l'animal et de compenser les pertes liquidiennes liées à l'intervention chirurgicale 2 à 4 ml de la solution NaCl à 9 g/l sont administrés.

Un cathéter (PE 50) rempli d'une solution NaCl à 9 g/l héparinée est introduit dans l'artère fémorale pour effectuer des prélèvements sanguins toutes les 30 minutes, afin de pouvoir réaliser le dosage d'hémoglobine et la numération globulaire. Après chaque prélèvement sanguin l'échantillon est centrifugé, les globules rouges sont remis en suspension dans du NaCl à 9 g/l par la veine fémorale permettant de maintenir la pression artérielle à sa valeur initiale.

Enfin après l'ouverture de l'abdomen selon une incision longitudino-médiane, des cathéters (PE 50) sont introduits dans les artères droite et gauche pour le recueil de l'urine définitive.

A la fin de l'intervention une compresse imbibée de NaCl à 9 g/l est placée sur l'ouverture abdominale afin d'éviter la déshydratation des rats.

A la fin de l'expérience, un prélèvement sanguin est effectué au niveau de l'artère abdominale après centrifugation de ce dernier à

3000 tours/minute pendant 10 minutes. Le plasma est prélevé ensuite conservé à une température de 5 °C.

Les expériences de Clearance comportent 4 périodes. La première de celle-ci commençant 1 heure après le temps d'équilibration. La durée de chacune des périodes est de 30 minutes.

1.4 – Traitement des échantillons

1-4-1. Mesure du débit urinaire

Le débit urinaire (\dot{V}) est déterminé par pesée en assimilant la densité de l'urine à celle de l'eau. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{l}\cdot\text{mn}^{-1}$.

1-4-2. Dosage de la créatinine, l'urée

La concentration plasmatique et urinaire de la créatinine, et de l'urée est déterminée par la méthode colorimétrique (Kit Boehinger, Kit Prochima et par Automat) au service de biochimie du C.H.U de Tlemcen. Les résultats sont exprimés en $\text{mmole}\cdot\text{l}^{-1}$.

1-4-3. Dosage des électrolytes

Le dosage du sodium, potassium, calcium plasmatique et urinaire est réalisé au service de biochimie du C.H.U de Tlemcen. L'appareil utilisé est l'ionogramme de type (Beckman CX-3).

Les valeurs sont exprimées en $\text{mmole}\cdot\text{l}^{-1}$.

1-4-4. Dosage des protéines totales

La concentration de protéines plasmatiques est déterminée par la méthode colorimétrique de Biuret.

Les valeurs sont exprimées en $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

1-4-5. Dosage des triglycérides, cholestérol total et phospholipides

Le dosage des triglycérides, cholestérol total et phospholipides se fait par des méthodes enzymatiques (Kit Boehninger) et par l'Automat au service de biochimie du C.H.U de Tlemcen.

Les valeurs sont exprimées en $\text{mg}\cdot\text{dl}^{-1}$.

1-4-6. Dosage d'hémoglobine et numération des globules rouges

Le dosage d'hémoglobine se fait par la méthode Tall Kist.

Le dénombrement des hématies par les cellules de Thoma. Le comptage est réalisé au moyen d'un microscope optique à un grossissement $G = 40 \times 10$.

Les résultats sont exprimés en mg/dl pour l'hémoglobine et en $\text{mm}^3 \times 10^6$ pour les hématies.

1.5 – Calcul, expression des résultats et analyse statistique

1-5-1. Filtration glomérulaire

Elle se détermine par la Clearance de la créatinine

$$FG = \left(\frac{U}{P} \right)_{\text{creat}} \dot{V}$$

\dot{V} : le débit urinaire exprimé en $(\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1})$

$\left(\frac{U}{P} \right)$: rapport de la créatinine urinaire et plasmatique.

Elle définit le volume du plasma filtré en une minute au niveau du glomérule. Les résultats sont exprimés en $(\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1})$

1-5-2. Excrétions fractionnaires

Pour un élément donné (e), EF% représente le pourcentage de la quantité excrétée par rapport à la quantité filtrée dans l'urine.

L'excrétion fractionnaire est calculée selon la formule suivante :

$$EF_{\%} = \frac{\left(\frac{U}{P} \right)}{\left(\frac{U}{P} \right)_{\text{creat}}}$$

$\left(\frac{U}{P}\right)_e$: rapport de la concentration de l'élément (e) considéré dans l'urine et dans le plasma.

L'excrétion fractionnaire de l'eau est équivalente à l'inverse du rapport de la créatinine urinaire et plasmatique.

$$EF_{H_2O} = \frac{1}{\left(\frac{U}{P}\right)_{Crat}}$$

1-5-3. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne plus ou moins l'erreur standard. Les différentes moyennes sont comparées par le test de Student adapté aux petits échantillons.

Une différence est considérée comme significative pour $p < 0,05$.

II - PREPARATION DES LIPOPROTEINES

La précipitation des lipoprotéines se fait sur du sérum frais, non hépariné et non hémilysé, d'après la technique de (Burstein et coll, 1970) grâce aux polyanions : l'acide phosphotungstique (WO_3)₄ à 4% associé au chlorure de magnésium ($MgCl_2, 6H_2O$ 2M).

II.1 - Séparation des lipoprotéines

La précipitation des lipoprotéines se fait grâce aux polyanions principalement l'acide phosphotungstique qui se combine aux lipides des lipoprotéines et non aux apoprotéines (Burstein et coll, 1970).

II-1-1. Solution à préparer

a) solutions de précipitation

Solution A :

Acide phosphotungstique (4%) à pH = 7,6. 4 g d'acide phosphotungstique dans 50 ml d'eau distillée, ajouter 16 ml NaOH (1N), compléter à 100 ml avec l'eau distillée tout en vérifiant le pH.

Solution B :

MgCl₂, 6 H₂O 2M = 40,66 g dans 100 ml d'eau distillée.

b) solutions de solubilisation

Citrate trisodique → 3,87 g

NaCl → 0,64 g

Mettre dans 100 ml d'eau distillée

II-1-2. Mode opératoire

Dans un tube à essai, on introduit :

- * 2 ml de sérum frais
- * 25 µl de solution (A)
- * 100 µl de solution (B).

On mélange, on incube 15 minutes à température ambiante. On centrifuge 10 minutes à 600 tours/minute. On a formation d'un anneau brun foncé contenant les VLDL, on récupère le surnageant avec une seringue dans un tube sec.

On solubilise l'anneau contenant les VLDL dans 1 ml de solution de solubilisation

Au surnageant, on ajoute :

- 75 µl de solution (A)

On mélange et on incube 15 minutes à température ambiante. On centrifuge 10 minutes à 6000 tr/mn les LDL précipitées. Le culot est récupéré dans la solution de solubilisation.

Au surnageant contenant les HDL, on ajoute :

- 1 ml de solution (A)
- 100 µl de solution (B)

On mélange et on incube 1 heure à température ambiante, puis on centrifuge 10 minutes à 6000 tr/mn. On récupère le culot contenant les HDL qui sont solubilisées dans 1 ml de solution de solubilisation

II.2 – Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur acétate de cellulose

Principe

La préparation des lipoprotéines par électrophorèse sur acétate de cellulose se fait en fonction de leur mobilité électrophorétique. Sur acétate de cellulose, la séparation des fractions LDL et VLDL en particulier est très nette. Les chylomicrons restent au point du dépôt. Les HDL migrent le plus loin.

L'électrophorèse des lipoprotéines donne des renseignements d'ordre qualitatifs et semi-qualitatifs, permettant de donner les pourcentages réactifs, pour un échantillon donné. L'importance de différentes familles de lipoprotéines.

Dans notre travail, l'électrophorèse est effectuée après précipitation des lipoprotéines dans le but de déterminer la pureté de ces fractions isolées.

Réactifs utilisés

- Bandes d'acétate de cellulose Titan III lipo.
- Tampon " HR buffer " (1 sachet dilué dans 750 ml d'eau distillée)
- Rouge O.R.O (1 flacon dilué dans 100 ml de méthanol)
- Bande de fixation (lipo spray)
- Glycérine pure
- Méthanol pur
- Soude 1N
- Papiers buvards

Mode opératoire

- Le trempage des bandes d'acétate dans le tampon dure 30 minutes.
- 5 µl de sérum ou de fraction solubilisée sont déposés sur la bande, par une application centrale.
- Les bandes sont placées dans la cuve d'électrophorèse la migration dure 20-25 minutes à 180 Volts.

- Environ 5 minutes avant la fin de la migration, on prépare dans un bac le mélange suivant : 35 ml de rouge O.R.O + 10 ml de soude 1N.
- A la fin de la migration, les bandes sont mises dans ce mélange pendant 40 minutes.
- On les suit délicatement du colorant et à l'aide d'un coton mouillé, on retire doucement le précipité sur les deux faces des bandes. On les maintient sous un mince filet d'eau.
- Les bandes sont ensuite immergées 10 minutes dans un mélange composé de 80% de glycérine pure et 20% de méthanol
- Après égouttage et séchage, les bandes sont fixées par pulvérisation de la bande lipo spray.

Résultats

Sur le sérum trois fractions de lipoprotéines sont visualisées : HDL, LDL, ULDL. Les chylomicrons étant très rares. Figures n° 15 et n° 16

II.3 - Analyse du contenu lipidique et protéique de chaque lipoprotéine

Les lipoprotéines, précipitées sélectivement, sont solubilisées grâce à une solution de solubilisation, le contenu lipidique et protéique de chaque fraction lipoprotéique est analysé selon les méthodes suivantes :

II-3-1. Dosage du cholestérol total

Le dosage du cholestérol total est effectué sur les fractions lipoprotéiques selon la méthode enzymatique (Kit Boehringer) et Automat au Service de Biochimie du CHU de Tlemcen. Les valeurs sont exprimées en mg dl^{-1}

II-3-2. Dosage des triglycérides

Le dosage des triglycérides se fait par méthode colorimétrique enzymatique (Kit Boehringer) et par l'automat au Service de Biochimie du CHU de Tlemcen. Les valeurs sont exprimées en mg dl^{-1}

II-3-3. Dosage des phospholipides

Le dosage des phospholipides se fait par la méthode enzymatique colorimétrique (Kit Boehringer) et par l'automat au Service de Biochimie du CHU de Tlemcen. Les valeurs sont exprimées en mg dl^{-1} .

Les concentrations en phospholipides sont obtenues en multipliant celles-ci en phosphore par 25.

$$[\text{C}] \text{ phospholipides} = [\text{C}] \text{ phosphore} \times 25 \text{ (mg/l)}$$

II-3-4. Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales des fractions de lipoprotéines se fait par la méthode de Biuret.

III - PREPARATION DES SOLUTIONS ANTIFONGIQUES

L'antifongique polyénique utilisé dans notre travail est le fungizone : forme commercialisée de l'amphotéricine B provenant de Squibb présente sous forme de poudre jaune colloïdale.

Sa composition est la suivante :

50% d'amphotéricine B, 38,75% de desoxycholate de sodium, 10% de phosphate disodique et 0,887% de phosphate monosodique.

Les solutions ainsi préparées de concentration allant de $2,5 \mu\text{g/ml}$ - $5 \mu\text{g/ml}$ - $7,5 \mu\text{g/ml}$ - $10 \mu\text{g/ml}$ sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C pendant au moins 12 heures avant l'utilisation, pour assurer une meilleure solubilité.

IV - PREPARATION AMPHOTERICINE B-DESOXY - LIPOPROTEINES

Après avoir isolé les fractions lipoprotéiques LDL et HDL à partir du sérum sanguin frais par la méthode des précipitations. L'amphotéricine B est d'abord près incubé pendant 25-30 minutes à 37°C avec des lipoprotéines avant d'être utilisé à une concentration égale à $1,3 \text{ g/l}$ pour les lipoprotéines légères « LDL » et à $7,88 \text{ g/l}$ pour les lipoprotéines lourdes « HDL. »

| Lipoprotéine | Chylomicrons | VLDL | LDL | HDL |
|-------------------------------|------------------------------|---|--|--|
| Densité | < 0,94 | 0,95 - 1,006 | 1,006 - 1,063 | 1,063 - 1,21 |
| Mobilité electrophoretique | Origine | Pré- β | β | α |
| Masse (10^6 Da) | > 150 | 5 - 130 | 0,3 | 0,6 |
| Taille (nm) | 100 - 1000 | 30 - 75 | 20 | 10 - 75 |
| Apoprotéines principales | B, C, E | B, C, E | B | A _{1,2} , C |
| Origine | Intestin | Foie et intestin | Produit final du métabolisme des VLDL | Foie intestin |
| Fonction | Transport des TG exogènes | Transport TG endogènes aux cellules périphériques | Transport du cholestérol et des phospholipides aux cellules | Transport du cholestérol des cellules périphériques au foie |
| Composition % | | | | |
| PT | 2 | 10 | 23 | 50 |
| PL | 5 | 16 | 21 | 27 |
| CL | 1 | 7 | 11 | 4 |
| CE | 2 | 13 | 41 | 16 |
| TG | 90 | 54 | 4 | 3 |

Caractéristiques des lipoprotéines
d'après (LUC et al, 1991) ; (HOEG J.M et al, 1986).

INTERPRETATION

DES

RESULTATS

RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS

I – EFFET DE CONCENTRATIONS CROISSANTES D'AMPHOTERICINE B – DESOXY SUR LA FONCTION GLOBALE DU REIN

Le Tableau 1 et les Figure 1, 2 et 3 indiquent les valeurs du taux de l'hémoglobine (Hb) et le taux des globules rouges (GR) chez les rats témoins, et les rats recevant des concentrations croissantes d'amphotericine B-desoxy (2,5 µg/ml – 5 µg/ml – 7,5 µg/ml – 10 µg/ml).

Le taux de l'hémoglobine augmente significativement avec les concentrations croissantes d'amphotericine B-desoxy. Cette augmentation est fortement importante chez les rats traités par 7,5 µg/ml et 10 µg/ml d'amphotericine B-desoxy comparés aux rats témoins. Cette élévation du taux de l'hémoglobine est liée à l'hémolyse des globules rouges (forme dentelée) dont le nombre des hématies diminue significativement en présence des différentes concentrations d'amp B-desoxy par rapport aux rats témoins.

Aucune différence significative n'a été observée pour les protéines et l'urée plasmatique entre les différents groupes de rats étudiés (Tableau 2). En revanche la kaliémie tend à être significativement plus élevée en présence d'une solution de desoxycholate de sodium et aux doses circulantes de 7,5 µg/ml et 10 µg/ml d'amphotericine B-desoxy par rapport à celle retrouvées pour les groupes de rats témoins (Tableau 2, Figure 4).

Bien qu'il existe une légère augmentation de la créatinémie, la natrémie et la calcémie chez les groupes de rats traités ; aucune différence significative n'ait été observée comparativement aux rats témoins (Tableau 2, Figure 4).

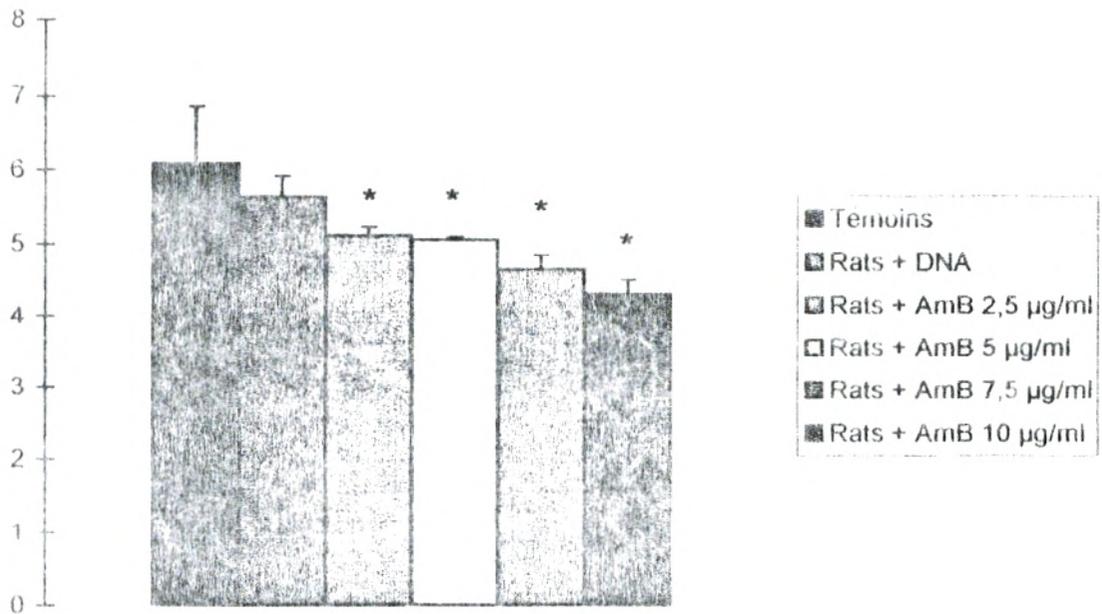
Par ailleurs, le bilan biochimique du plasma (Tableau 4) ne révèle aucune différence significative pour le cholestérol, les triglycérides et les phospholipides comparés aux rats témoins.

| Groupes | Paramètres | Hb (mg/dl) | GR (mm ³ × 10 ⁶) |
|-------------------------|------------|----------------|--|
| Témoins (n=5) | | 11,12 ± 0,57 | 6,09 ± 0,77 |
| Rat + DNA (n=5) | | 12,04 ± 0,14 * | 5,64 ± 0,27 |
| Rat+AmpB 2,5µg/ml (n=5) | | 12,26 ± 0,32 * | 5,12 ± 0,11 * |
| Rat+AmpB 5µg/ml (n=5) | | 13,34 ± 0,14 * | 5,06 ± 0,03 * |
| Rat+AmpB 7,5µg/ml (n=5) | | 14,18 ± 0,45 * | 4,65 ± 0,19 * |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | | 15,08 ± 0,23 * | 4,31 ± 0,19 * |

Tableau 1 Valeurs moyennes du taux de l'hémoglobine (Hb) et globules rouges (GR) chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-desoxy (2.5 – 5 – 7.5 – 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeurs moyenne obtenue pour chaque expérience P<0.05.

* : Différence significative par rapport aux rats témoins.

GR ($\text{mm}^3 \times 10^6$)



HB ($\text{mg} \cdot \text{dl}^{-1}$)

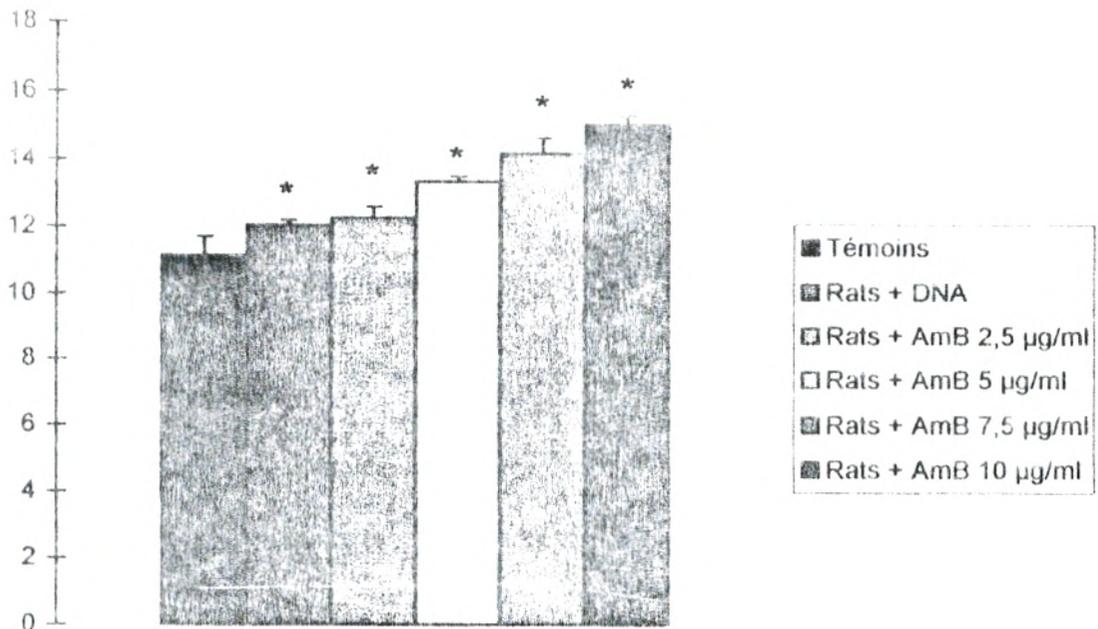


Figure 1: Valeurs moyennes du taux des globules rouges et de l'hémoglobine chez les rats recevant une concentration croissante d'Amphotéricine B-desoxy (2,5 - 5 - 7,5 - 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

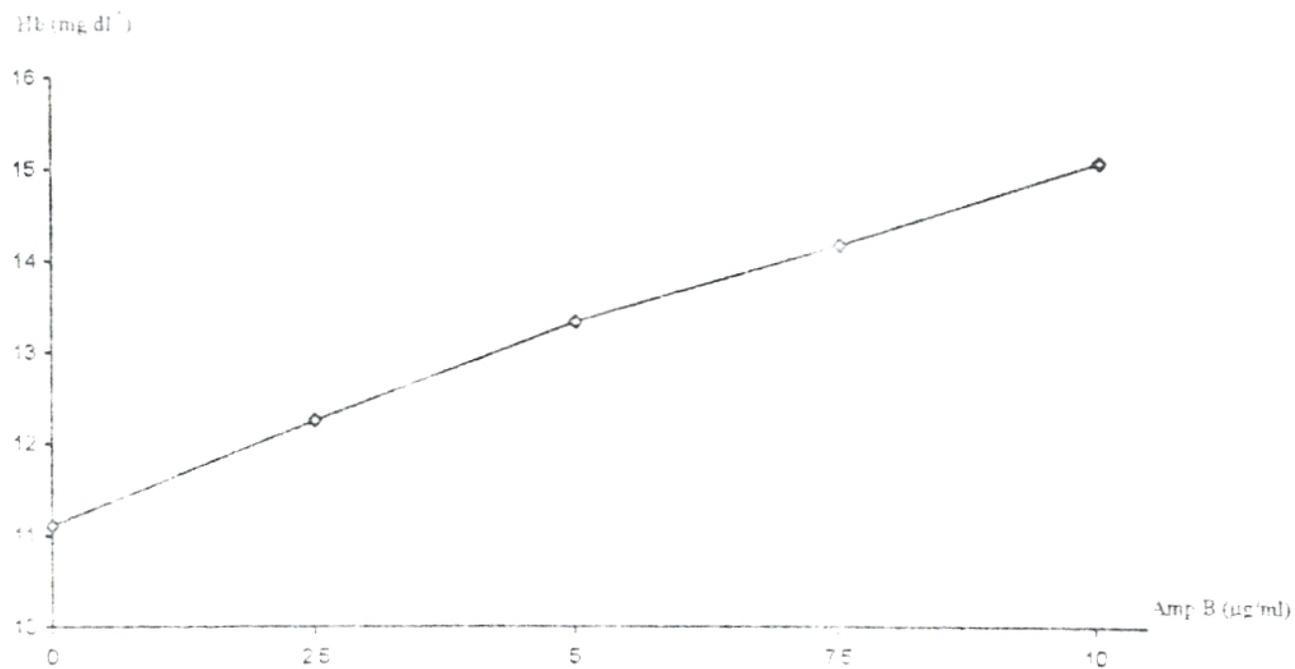


Figure 2 : Effet de l'amphotéricine B-desoxy à différentes concentrations sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez les rats Wistar.

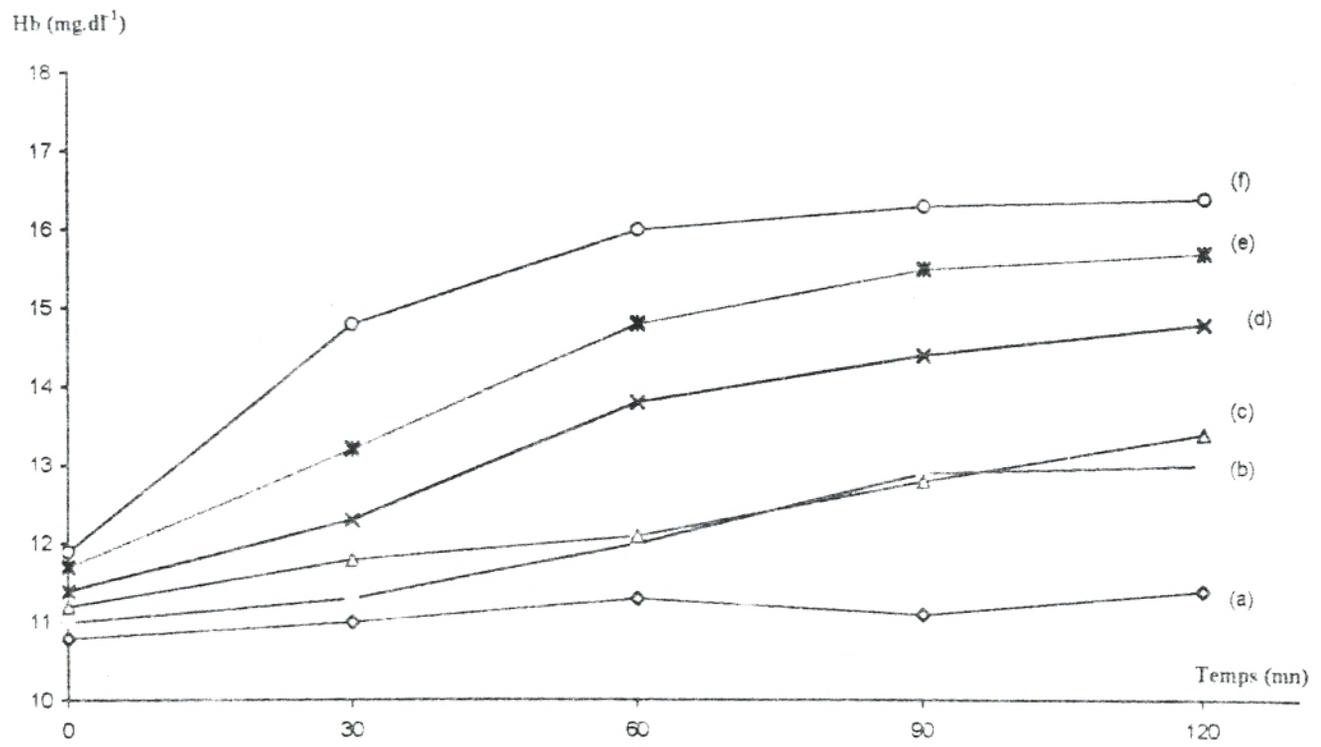


Figure 3 : Effet de l'Amphotericine B-desoxy sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez les rats Wistar.

(a): Témoins (b): Rat + Désoxycholate de sodium (c): Rat + Amp B à 2,5 µg/ml (d): Rat + Amp B à 5 µg/ml
(e): Rat + Amp B à 7,5 µg/ml (f): Rat + Amp B à 10 µg/ml

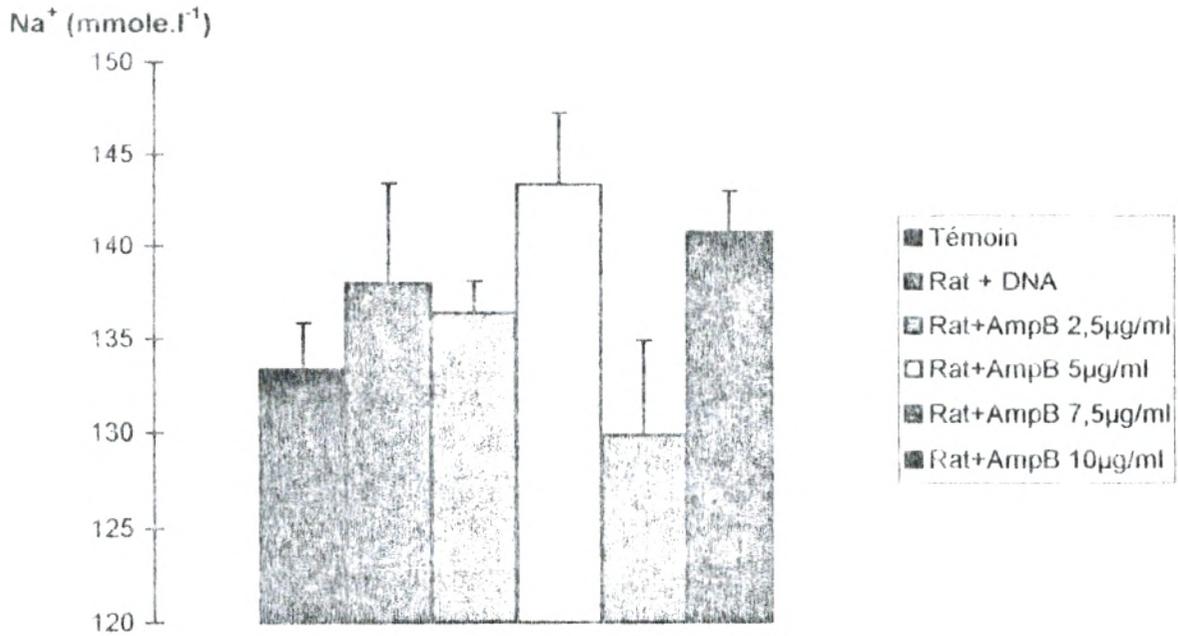
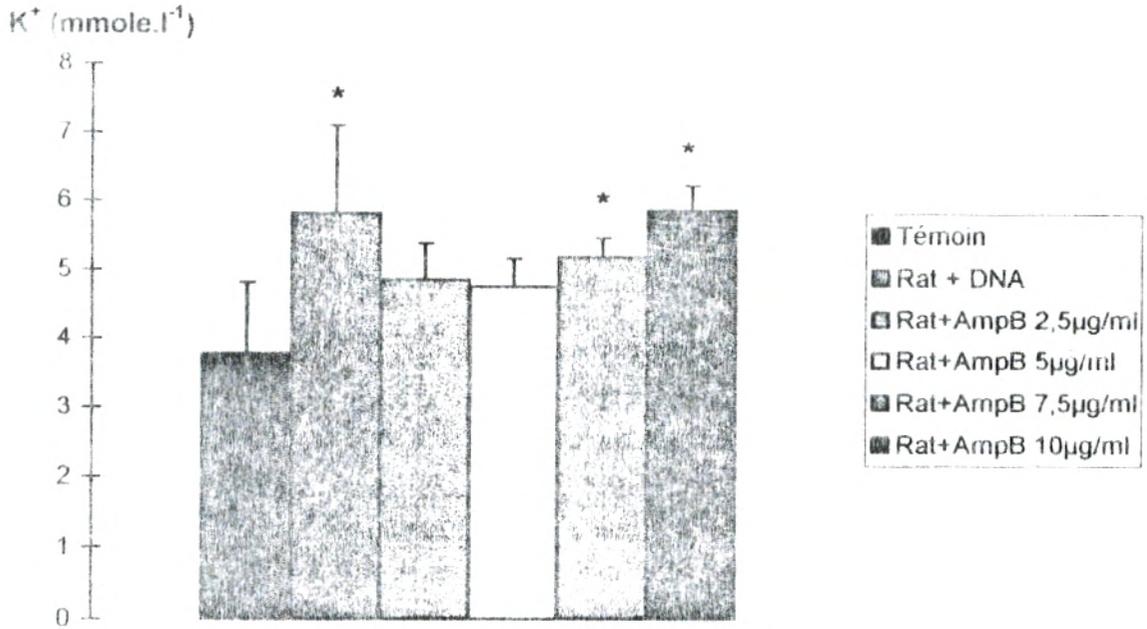


Figure 4 : Valeurs moyennes plasmatiques du potassium (K⁺), sodium (Na⁺) chez les rats recevant une concentration croissante d'AmbD-desoxy (2,5 - 5 - 7,5 - 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

| Groupes / Paramètres | Prot. (g/l) | Urée (Mmole/l) | Créat (mmole/l) | Na ⁺ (mmole/l) | K ⁺ (mmole/l) | Ca ⁺⁺ (mmole/l) |
|----------------------------|----------------|-------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Témoins (n=5) | 59.66 ± 3.51 | 7.72 ± 1.34 | 7.66 ± 2.51 | 133.33 ± 2.51 | 3.76 ± 1.06 | 2.90 ± 1.37 |
| Rat + DNA (n=5) | 60.18 ± 7.72 | 6.09 ± 0.49 | 6.66 ± 2.88 | 138.01 ± 5.45 | 5.82 ± 1.28 * | 2.52 ± 0.54 |
| Rat+AmpB 2,5µg/ml (n=5) | 52.88 ± 4.5 | 11.43 ± 0.48 | 6.23 ± 1.12 | 136.43 ± 1.69 | 4.86 ± 0.52 | 1.60 ± 0.41 |
| Rat+AmpB 5µg/ml (n=5) | 56.33 ± 5.86 | 6.60 ± 0.79 | 6.66 ± 2.88 | 143.43 ± 3.88 | 4.76 ± 0.40 | 1.91 ± 0.18 |
| Rat+AmpB 7,5µg/ml (n=5) | 55.83 ± 2.97 | 6.81 ± 1.40 | 9.33 ± 2.3 | 129.92 ± 5.04 | 5.19 ± 0.27 * | 2 ± 0.112 |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | 56.83 ± 3.81 | 7.15 ± 0.53 | 10.66 ± 1.54 | 140.86 ± 2.22 | 5.87 ± 0.35 * | 2.14 ± 0.07 |

Tableau 2 Compositions plasmatiques moyennes des protéines, urée, créatinine, sodium, potassium, calcium chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotericine B-desoxy (2,5 – 5 – 7,5 – 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* : Différence significative par rapport aux rats témoins

Une légère diminution de l'urée, créatinine urinaire (Tableau 3, Figure 3) est observée chez les rats traités par l'amp B-desoxy à une concentration allant de 2,5 µg/ml à 7,5 µg/ml comparés aux rats témoins.

Par contre, une légère augmentation de la concentration de l'urée urinaire a été notée chez les rats traités par 10 µg/ml d'amp B-desoxy par rapport aux rats témoins.

Le bilan électrolytique urinaire est représenté dans le Tableau 3. Aucune différence significative n'a été observée pour la natriurie chez les groupes de rats traités par différentes concentrations croissantes d'amphotéricine B-desoxy comparés aux rats témoins (Figure 5) ; bienqu'elle ait toute fois tendance à être plus faible chez les rats recevant une perfusion de 5 µg/ml et 10 µg/ml d'amphotéricine B par rapport aux autres groupes étudiés.

Par contre la kaliurie (Tableau 3, Figure 5) a tendance à être significativement élevée en présence d'une solution de desoxycholate de sodium (DNA) et en présence des différentes concentrations d'amphotéricine B-desoxy.

A une concentration circulante égale à 2,5 µg/ml et 5 µg/ml d'amphotéricine B la calciurie (Tableau 3) est significativement plus basse que chez les animaux non traités. Par contre à une concentration de 7,5 µg/ml à 10 µg/ml d'amp B-desoxy une légère augmentation de la quantité excrétée du calcium urinaire est observée par rapport aux rats témoins.

Le Tableau 5, et la Figure 6 indiquent les valeurs moyennes du débit urinaire (\dot{V}), du rapport de la créatinine urinaire à celui du plasma $(U/P)_{creat}$ de la filtration glomerulaire rénale (FGR) chez les rats témoins et les rats recevant des concentrations croissantes d'amphotéricine B-desoxy (2,5 µg/ml - 5 µg/ml - 7,5 µg/ml - 10 µg/ml)

La filtration glomerulaire (FG) ainsi que le débit urinaire (\dot{V}) diminuent significativement chez les rats recevant une perfusion d'amphotéricine B-desoxy à une concentration de 7,5 µg/ml et 10 µg/ml comparés aux témoins.

| Paramètres Groupes | Urée (mmole/l) | Créat. (Mmole/l) | Na ⁺ (mmole/l) | K ⁺ (mmole/l) | Ca ⁺⁺ (mmole/l) |
|----------------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Témoins (n=5) | 418.08 ± 61.66 | 1408.33 ± 579.51 | 138.78 ± 9.03 | 70.33 ± 2.80 | 5.87 ± 0.19 |
| Rat + DNA (n=5) | 428.58 ± 55.45 | 991.66 ± 576.80 | 128 ± 4.09 | 78.70 ± 8.42 | 5.05 ± 0.98 |
| Rat+AmpB 2,5µg/ml (n=5) | 362.5 ± 63.23 | 1290 ± 411.66 | 144.62 ± 5.19 | 89.88 ± 5.08 | 4.92 ± 0.50 * |
| Rat+AmpB 5µg/ml (n=5) | 398.9 ± 137.57 | 835 ± 123.18 | 135.06 ± 10.42 | 90.17 ± 7.76 * | 5.05 ± 0.28 * |
| Rat+AmpB 7.5µg/ml (n=5) | 407.52 ± 38.26 | 869.16 ± 217.57 | 132.84 ± 5.97 | 97.83 ± 4.78 * | 6.55 ± 2.11 |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | 635.08 ± 248.43 | 1204.16 ± 609.85 | 131.08 ± 5.13 | 104.6 ± 9.55 * | 5.87 ± 1.03 |

Tableau 3 : Composition urinaire moyenne de l'urée, créatinine, sodium, potassium, calcium chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-desoxy (2.5 – 5 – 7.5 – 10 µg ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* Différence significative par rapport aux rats témoins

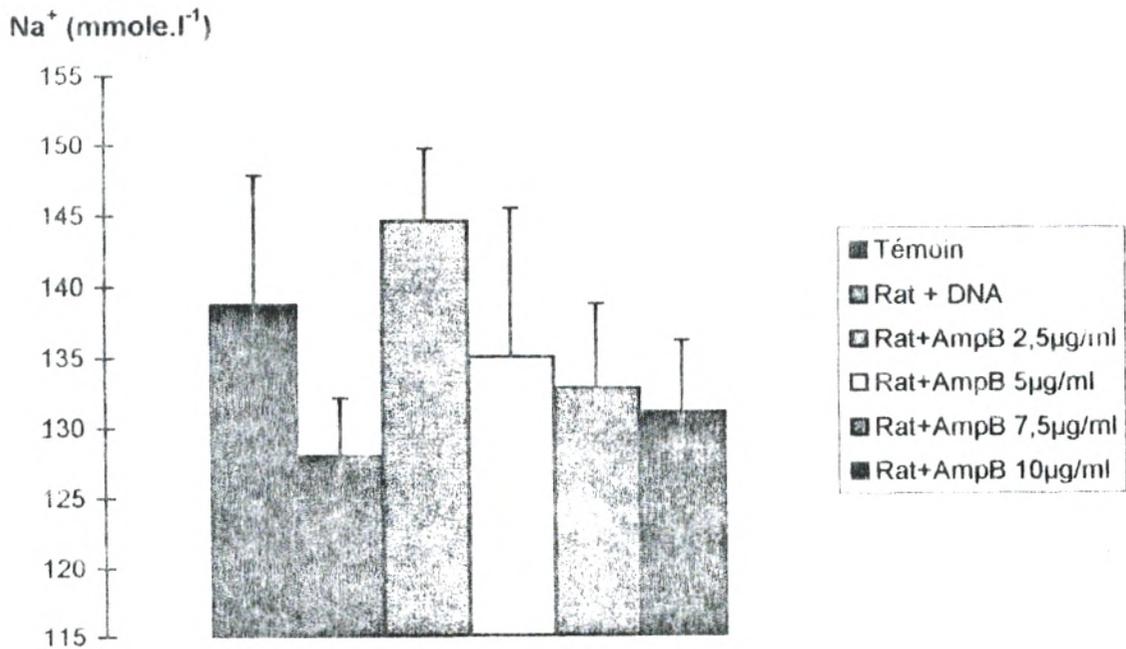
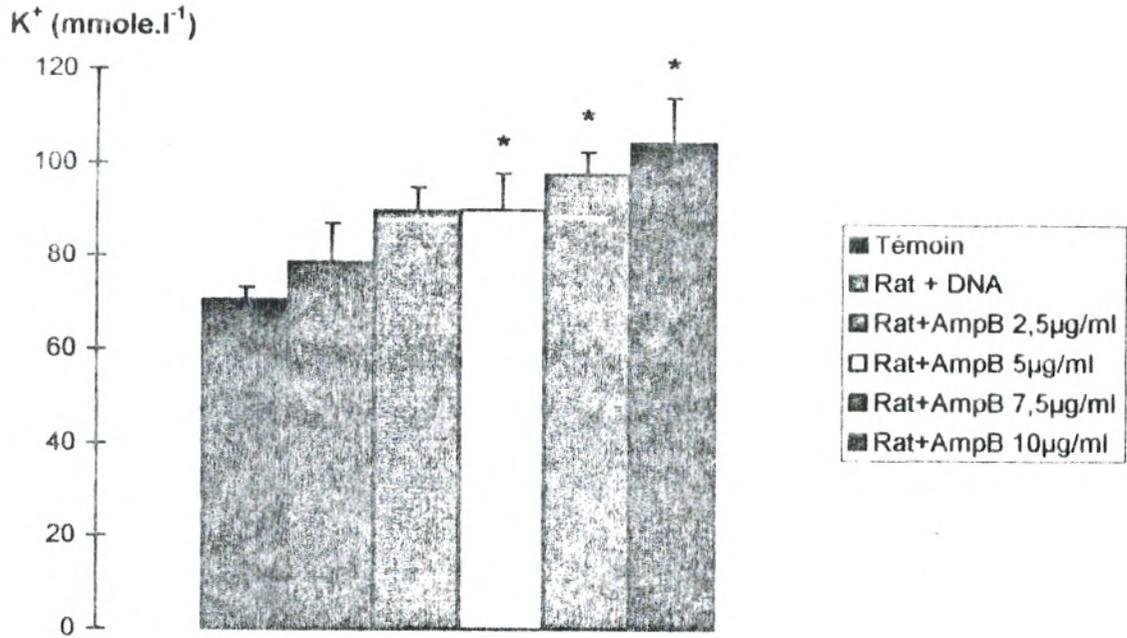


Figure 5 : Valeurs moyennes urinaires du potassium (K⁺), sodium (Na⁺) chez les rats recevant une concentration croissante d'Amb-desoxy (2,5 - 5 - 7,5 - 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. p < 0,05

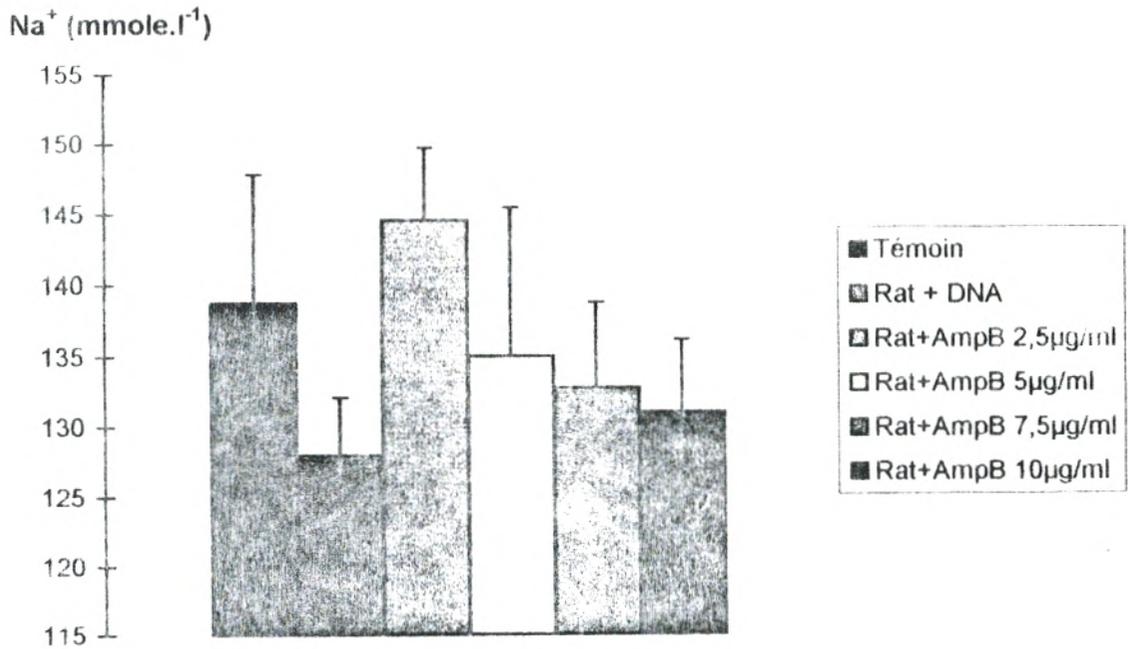
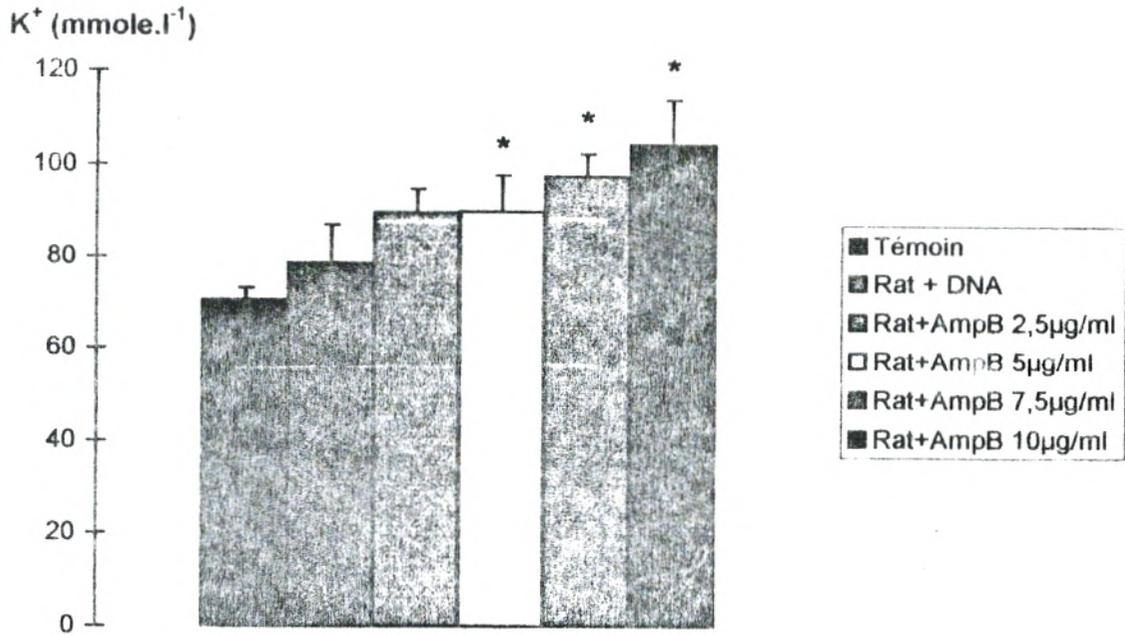


Figure 5 : Valeurs moyennes urinaires du potassium (K⁺), sodium (Na⁺) chez les rats recevant une concentration croissante d'AmB-desoxy (2,5 - 5 - 7,5 - 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. p < 0,05

| Groupes / Paramètres | Cholestérol mg/dl | Triglycerides mg/dl | Phospholipides mg/ml |
|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|
| Témoins (n=5) | 82 ± 3 | 80.33 ± 1.08 | 164.13 ± 9.12 |
| Rat + DNA (n=5) | 75.66 ± 8.73 | 72.95 ± 5.23 | 167.23 ± 6.39 |
| Rat + AmpB 2,5µg/ml (n=5) | 77 ± 7 | 70.86 ± 9.73 | 170 ± 20.82 |
| Rat + AmpB 5µg/ml (n=5) | 79.6 ± 7.23 | 78.06 ± 10.88 | 158.5 ± 12.55 |
| Rat + AmpB 7.5µg/ml (n=5) | 80.5 ± 1.5 | 79.9 ± 12.97 | 165.03 ± 12.76 |
| Rat + AmpB 10µg/ml (n=5) | 80.53 ± 6.83 | 69.85 ± 16.80 | 150.55 ± 20.91 |

Tableau 4 Composition plasmatique moyenne du cholestérol, triglycérides, phospholipides chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-desoxy (2,5 – 5 – 7.5 – 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0.05.

| Groupes / Paramètres | \dot{V} ($\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1}$) | $(U/P)_{\text{creat}}$ | FG ($\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1}$) |
|--|---|------------------------|--|
| Témoins (n=5) | 2.71 ± 0.40 | 186.87 ± 61.18 | 430.31 ± 88.17 |
| Rat + Desoxycholate de sodium (n=5) | 2.62 ± 1.28 | 148.33 ± 28.86 | 360.85 ± 194.8 |
| Rat + AmpB 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=5) | 2.04 ± 0.79 | 204.76 ± 34.87 | 437.87 ± 134.53 |
| Rat + AmpB 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=5) | 2.32 ± 0.28 | 158.66 ± 52.53 | 342.47 ± 121.84 |
| Rat + AmpB 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=5) | 1.75 ± 0.25 * | 95.58 ± 30.07 * | 162.85 ± 37.72 * |
| Rat + AmpB 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=5) | 1.76 ± 0.42 * | 110.17 ± 55.80 * | 250.92 ± 188.66 * |

Tableau 5 Valeurs moyennes du débit urinaire (\dot{V}), du rapport de la créatinine urinaire à celui du plasma $(U/P)_{\text{creat}}$ de la filtration glomérulaire (FG) chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-desoxy (2,5 – 5 – 7,5 – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. $P < 0,05$

* : Différence significative par rapport aux rats témoins.

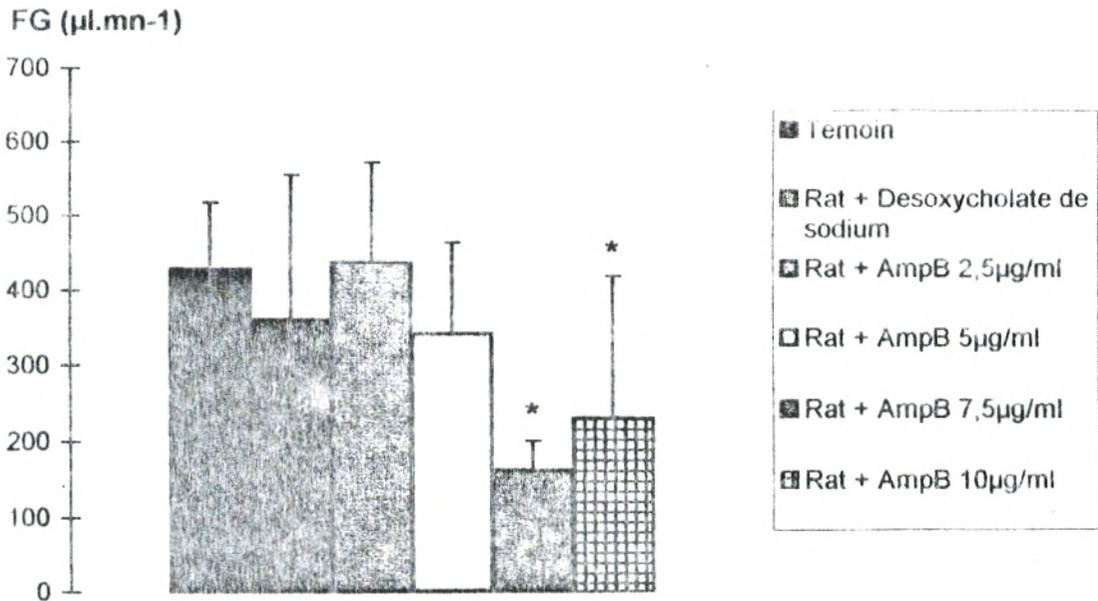
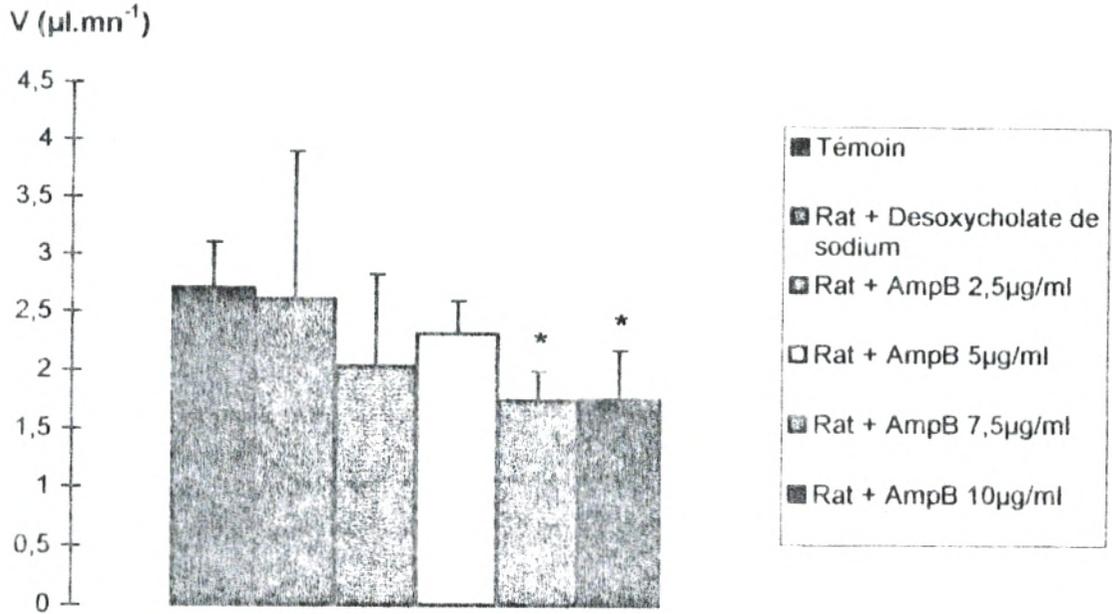


Figure 6 : Valeurs moyennes du débit urinaire (V), de la filtration glomérulaire (FG) chez les rats recevant une concentration croissante d'Amp B-desoxy (2,5 - 5 - 7,5 - 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

| Paramètres Groupes | EF% H ₂ O | EF% Urée | EF% Na ⁺ | EF% K ⁺ | EF% Ca ²⁺ |
|--|----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Témoins (n=5) | 0.79 ± 0.39 | 34.82 ± 9.29 | 0.64 ± 0.16 | 11.81 ± 2.73 | 1.44 ± 0.60 |
| Rat + Desoxycholate de sodium (n=5) | 0.74 ± 0.15 | 54.90 ± 17.18 | 0.71 ± 0.18 | 10.22 ± 1.53 | 1.31 ± 0.52 |
| Rat + AmpB 2.5µg/ml (n=5) | 0.98 ± 0.75 | 17.15 ± 4.703 * | 0.58 ± 0.005 | 9.87 ± 2.23 | 1.65 ± 0.66 |
| Rat + AmpB 5µg/ml (n=5) | 1.39 ± 0.70 | 48.94 ± 17.00 | 0.78 ± 0.27 | 25.56 ± 12.87 | 2.15 ± 0.84 |
| Rat + AmpB 7.5µg/ml (n=5) | 1.20 ± 0.36 | 71.78 ± 8.50 | 1.14 ± 0.34 | 20.51 ± 6.66 | 5.32 ± 4.27 * |
| Rat + AmpB 10µg/ml (n=5) | 1.25 ± 0.57 | 92.9 ± 21.71 * | 1.17 ± 0.57 | 21.43 ± 9.78 | 3.31 ± 1.13 * |

Tableau 6 Valeurs moyennes de l'excrétion fractionnaire de l'H₂O (EF% H₂O), sodium (EF% Na⁺), (potassium EF% K⁺), Urée (EF% Urée) et calcium (EF% Ca²⁺) chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-desoxy (2,5 – 5 – 7,5 – 10 µg/ml). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* : Différence significative par rapport aux rats témoins

Par ailleurs l'excrétion fractionnaire de l'eau rapportée à la quantité filtrée (Tableau 6) ne varie pas. Le même résultat a été observé pour l'excrétion de sodium et l'excrétion de potassium.

Puisque l'urée, reste l'une des substances osmotiquement active au niveau du rein, sa quantité reste liée à certains critères tels (climats, régime, métabolisme, température, etc...), celui ci reste significativement élevé en présence d'amphotéricine B-desoxy à des concentrations de 7,5 µg/ml et 10 µg/ml par rapport aux rats témoins (Tableau 6). Le même résultat a été observé pour l'excrétion fractionnaire du calcium.

II - EFFET DE LIPOPROTEINES SERIQUES SUR LA FONCTION GLOBALE DU REIN INDUITE PAR L'AMPHOTERICINE B-DESOXY A UNE CONCENTRATION DE 10 µg/ml.

Dans cette série expérimentale, nous avons étudié l'effet d'une dose circulante de 10 µg/ml d'amphotéricine B-desoxy complexée aux lipoprotéines. Pour cela nous avons utilisé les lipoprotéines, légères " LDL " et lourdes " HDL ", qui ont été précipitées selon la technique de (BURSTEIN et col, 1970).

Le Tableau 7, et les Figures 7, 8, 9 et 10 représentent le taux de l'hémoglobine et le taux des globules rouges chez les rats témoins et chez les rats traités par l'amphotéricine B-desoxy à 10 µg/ml complexés ou non aux lipoprotéines LDL ou HDL.

Une augmentation significative du taux de l'hémoglobine a été observée chez les rats en présence d'amphotéricine B-desoxy complexée aux lipoprotéines LDL. Cette augmentation de l'hémoglobine est suivi d'une hémolyse des globules rouges comparées aux témoins.

Par ailleurs, l'association d'amphotéricine B-desoxy à 10 µg/ml complexée aux lipoprotéines HDL, le taux des hémoglobines tend à se réduire comparés aux rats traités par l'amphotéricine B-desoxy complexée au lipoprotéine LDL. Le même résultat est observé pour le taux des globules rouges.

| Groupes | Paramètres | Hb mg/dl | GR mm ³ ×10 ⁶ |
|---------|---|----------------|-------------------------------------|
| | Témoins (n=5) | 11,12 ± 0,57 | 6.09 ± 0,77 |
| | Rats + LDL (1,56 g/l) (n=5) | 10,94 ± 0,24 | 6.78 ± 0,89 |
| | Rats + HDL (9,45 g/l) (n=5) | 11,34 ± 1,56 | 6.06 ± 0,24 |
| | Rats + Amp-B 10µg/ml (n=5) | 15.08 ± 0,23 * | 4.31 ± 0,19 * |
| | Rats + Amp-B 10µg/ml + LDL (1,3 g/l) (n=5) | 15.76 ± 0,28 * | 4.15 ± 0,81 * |
| | Rats + Amp-B 10µg/ml + HDL (7.88 g/l) (n=5) | 12.64 ± 0.22 | 5.16 ± 0.45 |

Tableau 7 : Valeurs moyennes du taux de l'hémoglobine (Hb) et globules rouges (GR) chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-desoxy (2,5 – 5 – 7,5 – 10 µg/ml) Les valeurs ont été calculées en prenant la valeurs moyenne obtenue pour chaque expérience P<0,05.

*: Différence significative par rapport aux rats témoins.

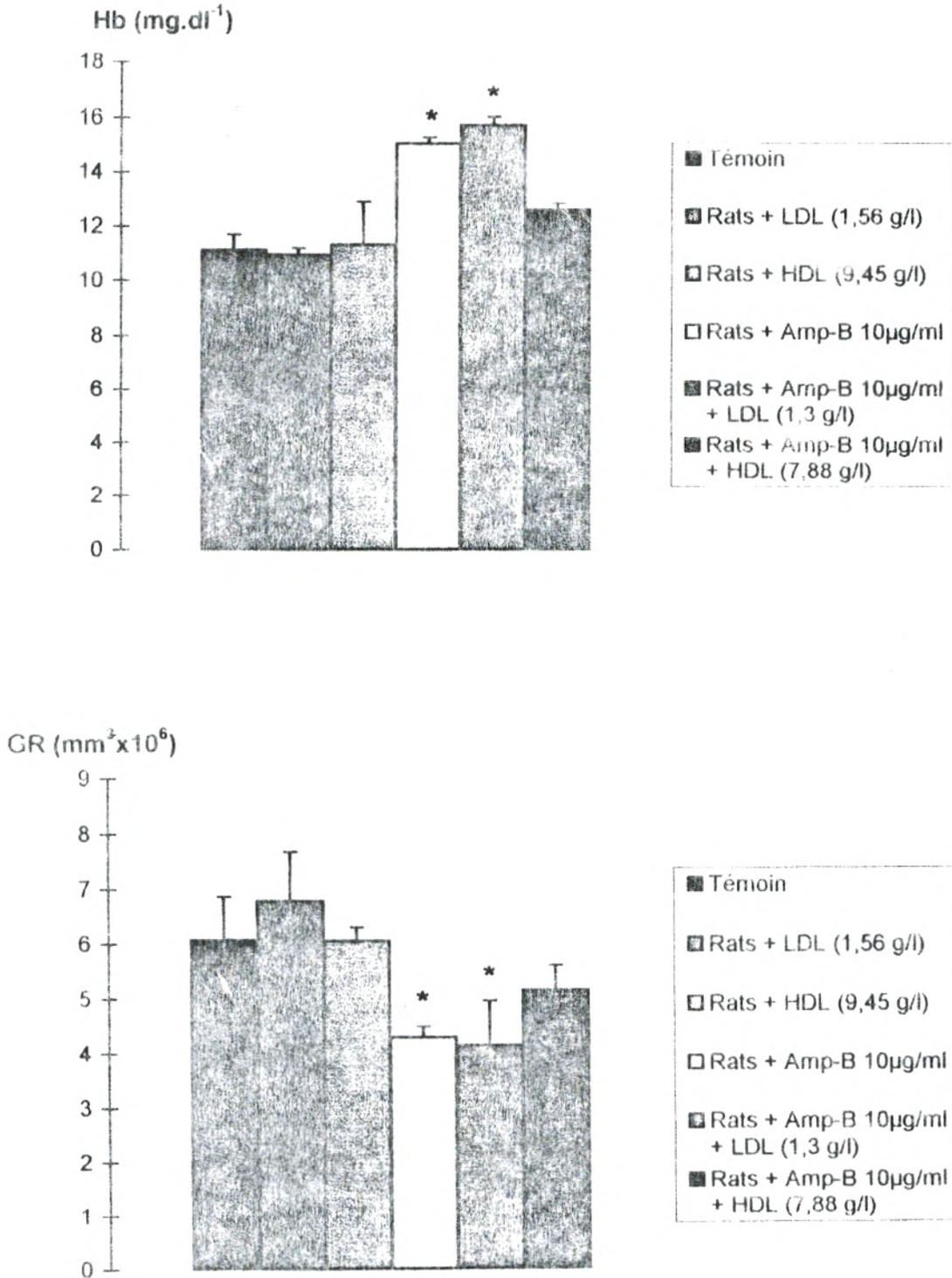


Figure 7 : Valeurs moyennes du taux de l'hémoglobine et le taux des globules rouges chez les différents lots de rats wistars. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

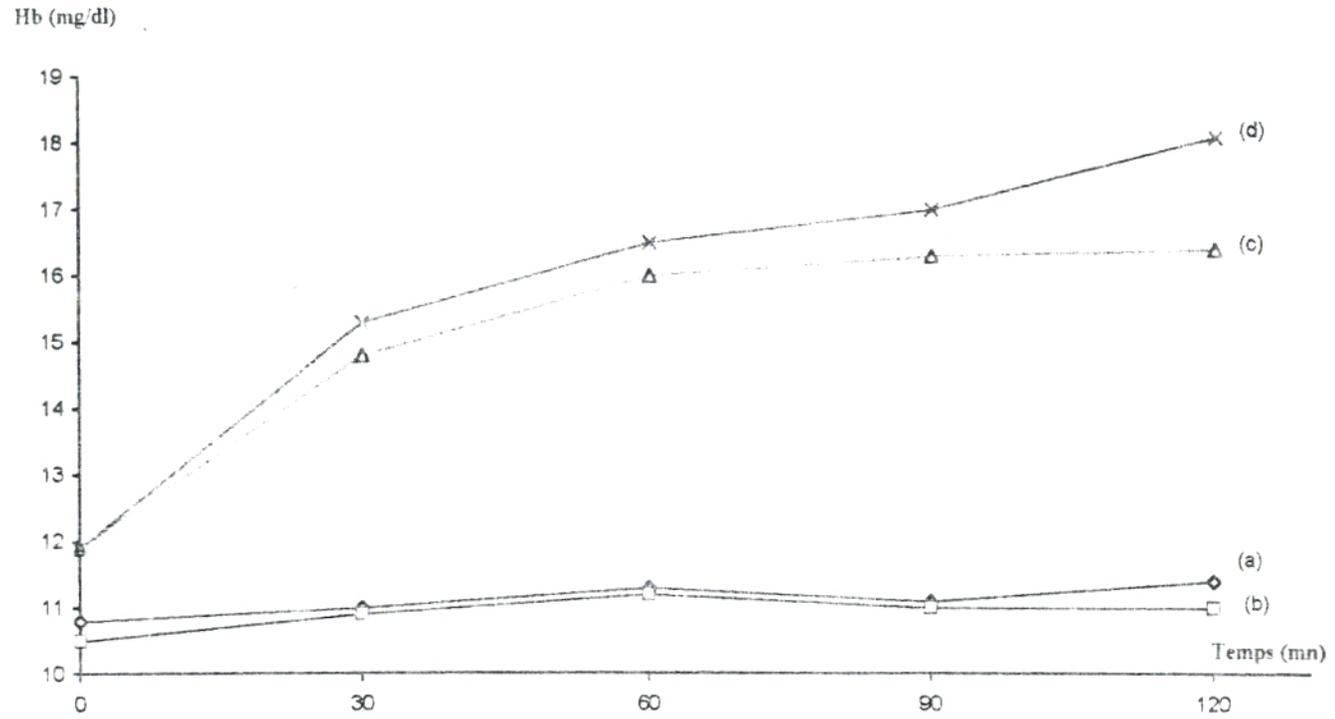


Figure 8 : Effet de l'amphotéricine B-desoxy complexée aux lipoprotéines LDL sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez le rats wistars.

(a): Témoins (b): Rat + LDL (1,56 g/l) (c) : Rat + Amp B-desoxy à 10 µg/ml (d): Rat + Amp B-desoxy (à 10 µg/ml) + LDL (1,3 g/l)

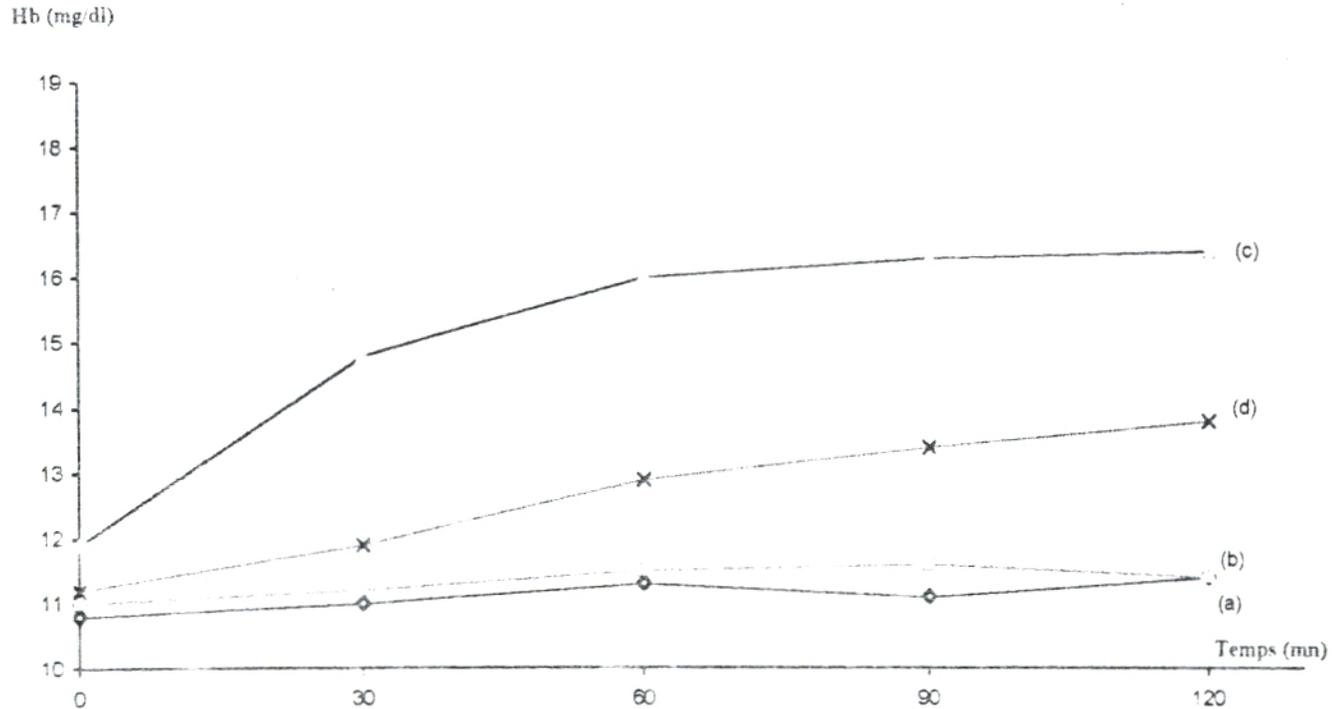


Figure 9 : Effet de l'amphotéricine B-desoxy complexée aux lipoprotéines HDL sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez le rats.

(a): Témoins (b): Rat + HDL (9.45 g/l) (c): Rat + Amp B-desoxy à 10 µg/ml (d): Rat + Amp B-desoxy (à 10 µg/ml) + HDL (7.88 g/l)

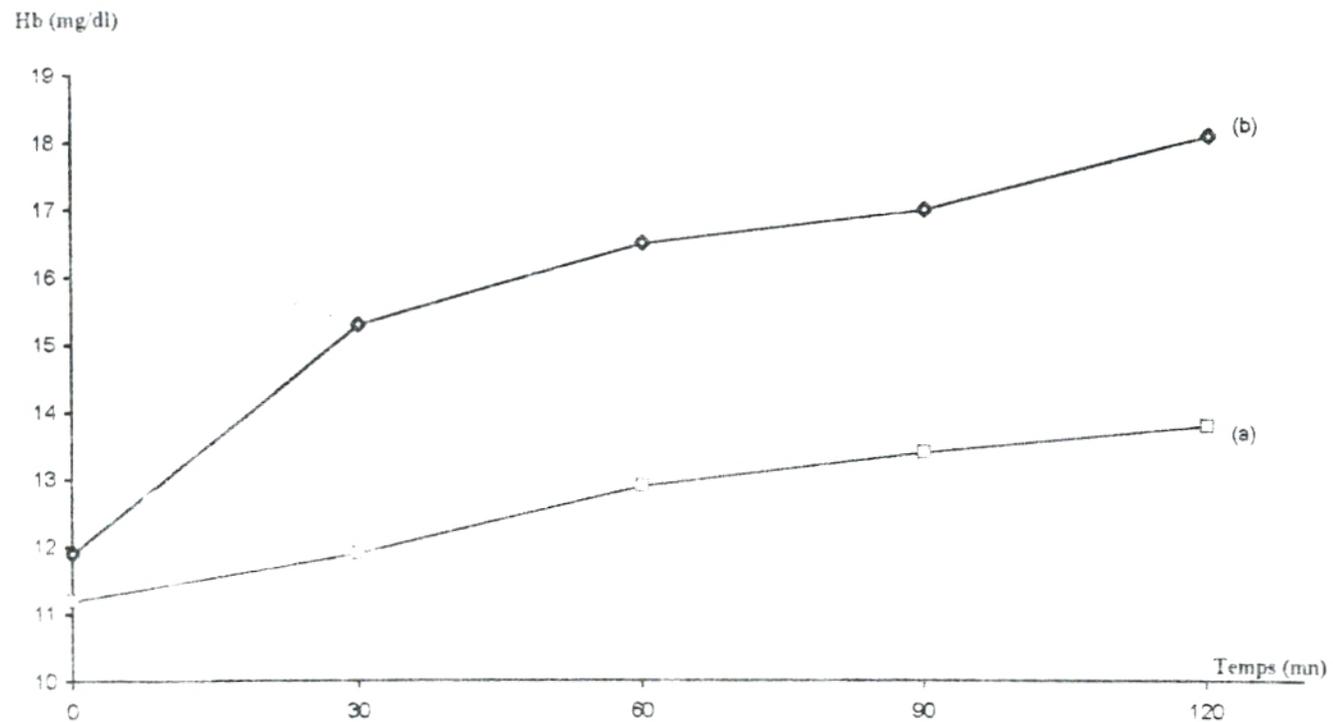


Figure 10 : Effet de l'amphotéricine B-desoxy complexée aux lipoprotéines LDL et aux lipoprotéines HDL sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez les rats.

(a): Rat + Amp B-desoxy à 10 µg/ml + LDL (1,3 g/l) (b): Rat + Amp B-desoxy à 10 µg/ml + HDL (7,88 g/l)

Aucune différence significative n'a été observée chez les groupes de rats étudiés pour les protéines plasmatiques ainsi que la créatinine (Tableau 8). Par contre l'urée a tendance à être significativement plus faible en présence d'amphotéricine B-desoxy à 10 µg/ml complexés aux lipoprotéines LDL.

L'addition d'amphotéricine B-desoxy associée aux lipoprotéines HDL (Tableau 8) n'a pas tendance à modifier le taux des protéines, de l'urée et de la créatinine plasmatique par rapport aux rats témoins.

Aucune différence significative des électrolytes (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺) (Tableau 8) n'a été observée après administration des lipoprotéines LDL ou HDL comparés aux témoins. Contrairement une augmentation significative des sodium, potassium est notée chez les rats traités par l'amphotéricine B-desoxy à 10 µg/ml complexée aux LDL comparés aux rats témoins (Figure 11).

Le bilan biochimique du plasma (cholestérol, triglycérides, phospholipides) ne révèle aucune différence significative entre les différents groupes de rats étudiés (Tableau 10).

Dans cette série expérimentale, on n'observe aucune différence significative pour l'urée urinaire (Tableau 9) ainsi que pour la créatinine et le calcium urinaire. Pour la natriurée et la kaliurée une différence est significative en présence d'amp B-desoxy à 10 µg/ml complexée aux lipoprotéines légères ou « LDL » par rapport aux rats témoins (Figure 12).

Le Tableau 11 et la Figure 13 indiquent les valeurs du débit urinaire (V), de la filtration glomérulaire (FG), du rapport de la créatinine urinaire à celui du plasma (U/P)creat chez les rats en présence d'une concentration de 10 µg/ml d'amphotéricine B en présence ou en absence des lipoprotéines légères " LDL " et lourdes " HDL ".

Aucune différence significative du débit urinaire n'a été notée chez les groupes de rats recevant une solution des lipoprotéines légères " LDL " et une solution de lipoprotéines lourde " HDL " comparés aux rats témoins ; le même résultat a été observé pour la filtration glomérulaire. Par

| Paramètres Groupes | Protéines (g/l) | Urée (mmole/l) | Créat. (Mmole/l) | Na ⁺ (mmole/l) | K ⁺ (mmole/l) | Ca ⁺⁺ (mmole/l) |
|--|--------------------|-------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Témoins (n=5) | 59.66 ± 3.51 | 7.72 ± 1.34 | 7.66 ± 2.51 | 133.33 ± 2.51 | 3.76 ± 1.06 | 2.90 ± 1.37 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 57.33 ± 5.03 | 6.93 ± 0.50 | 9.66 ± 0.57 | 134.55 ± 0.91 | 4.54 ± 0.56 | 2.16 ± 0.23 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 62 ± 5.65 | 6.82 ± 0.53 | 7.33 ± 1.52 | 135.2 ± 3.89 | 4.52 ± 0.47 | 2.34 ± 0.05 |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | 56.83 ± 3.81 | 7.15 ± 0.59 | 10.66 ± 1.54 | 140.86 ± 2.22 | 5.87 ± 0.35 * | 2.14 ± 0.07 |
| Rat+AmpB 10µg/ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 57.66 ± 4.93 | 5.66 ± 0.88 | 10.66 ± 1.73 | 142.6 ± 2.6 * | 6.1 ± 0.45 * | 2.56 ± 0.28 |
| Rat+AmpB 10µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 57.33 ± 7.02 | 6.60 ± 0.53 | 9.33 ± 1.55 | 140.2 ± 1.95 | 5 ± 0.11 | 1.85 ± 0.24 |

Tableau 8 Compositions plasmatiques moyennes des protéines, urée, créatinine (Creat), sodium (Na⁺), potassium (K⁺), calcium (Ca⁺⁺) chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

*. Différence significative par rapport aux rats témoins

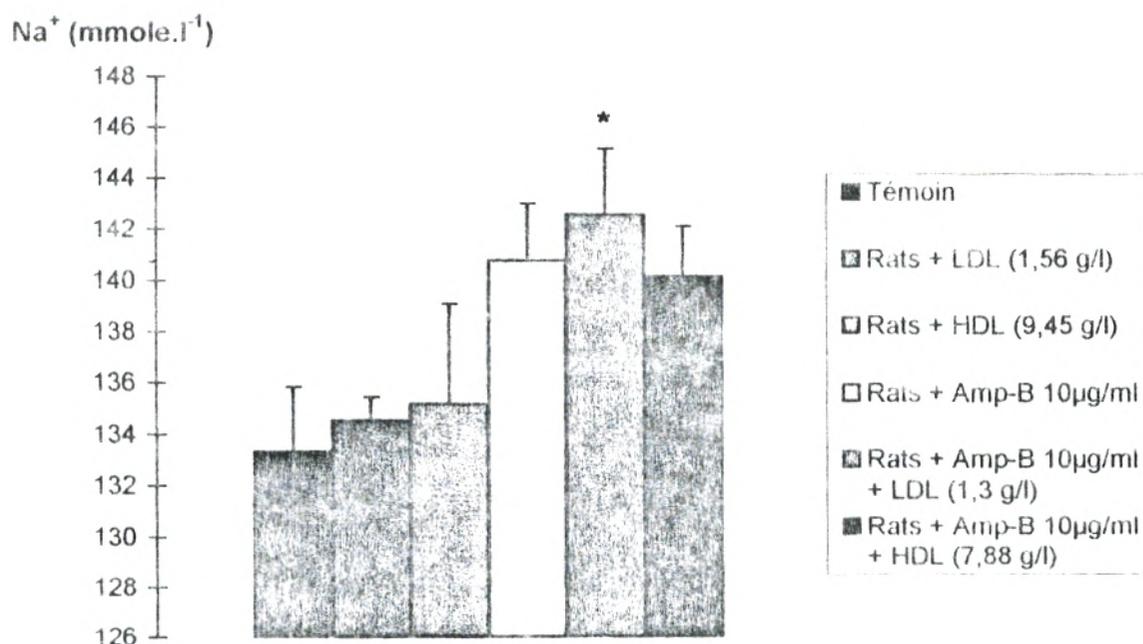
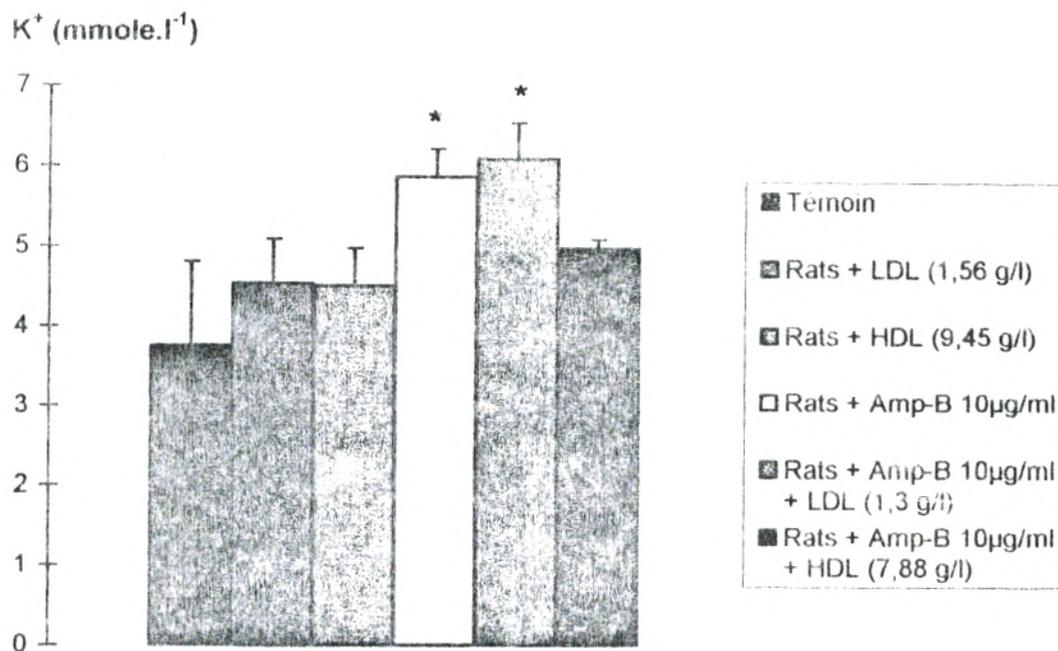


Figure 11 : Valeurs moyennes plasmatiques du potassium (K^+), du sodium (Na^+) chez les différents lots de rats Wistars. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

| Paramètres Groupes | Urée (mmole/l) | Créat. (Mmole/l) | Na ⁺ (mmole/l) | K ⁺ (mmole/l) | Ca ⁺⁺ (mmole/l) |
|--|-------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Témoins (n=5) | 418.08 ± 61.66 | 1408.33 ± 579.51 | 138.78 ± 9.03 | 70.33 ± 2.80 | 5.87 ± 0.19 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 339.13 ± 40.61 | 925 ± 213.6 | 138.79 ± 5.61 | 67.66 ± 1.98 | 5.17 ± 0.18 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 348 ± 35.88 | 1048.33 ± 77.51 | 129.85 ± 6.06 | 70.23 ± 2.63 | 5.38 ± 0.92 |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | 635.08 ± 248.43 | 1204.16 ± 609.85 | 131.08 ± 5.13 | 104.6 ± 9.55 * | 5.87±1.03 |
| Rat+AmpB 10µg/ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 334.01 ± 64.67 | 1606.66 ± 478.15 | 134.26 ± 3.77 * | 110.33 ± 6.76 * | 4.56 ± 0.51 |
| Rat+AmpB 10µg ml ⁻¹ +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 331.85 ± 51.62 | 808.33 ± 51.62 | 137.16 ± 3.46 * | 77.04 ± 3.06 * | 7.89 ± 2.5 |

Tableau 9 Composition urinaire moyenne de l'urée, créatinine (Créat), sodium (Na⁺), potassium (K⁺), calcium (Ca⁺⁺) chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

*. Différence significative par rapport aux rats témoins

Rachana et Deshpande

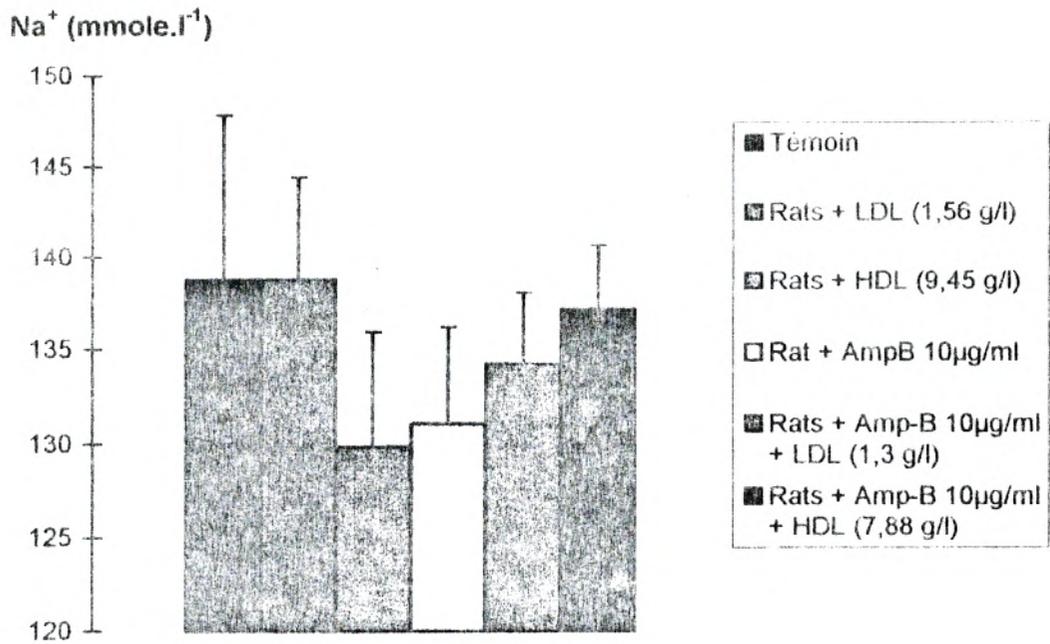
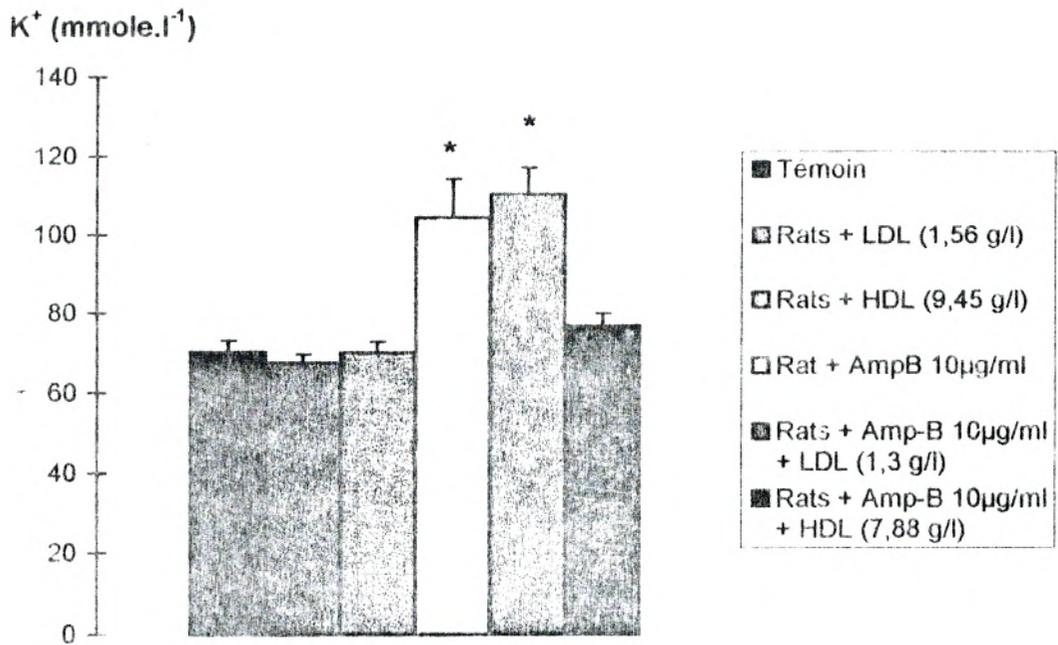


Figure 12 : Valeurs moyennes urinaires du potassium (K^+), du sodium (Na^+) chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

| Paramètres Groupes | Cholestérol total mg dl | Triglycerides mg ml | Phospholipides mg/dl |
|--|----------------------------|------------------------|-------------------------|
| Témoins (n=5) | 82 ± 3 | 80.33 ± 1.08 | 164.13 ± 9.12 |
| Rat + LDL (1,56 g/l) (n=5) | 72.9 ± 5.91 | 70.12 ± 17.93 | 160.91 ± 4.34 |
| Rat + HDL (9,45 g/l) (n=5) | 80 ± 0.41 | 77.56 ± 8.41 | 159 ± 9.42 |
| Rat + AmpB 10 µg/ml (n=5) | 80.53 ± 6.86 | 69.85 ± 16.80 | 150.55 ± 20.91 |
| Rat + AmpB 10 µg/ml + LDL (1.3 g/l) (n=5) | 68.66 ± 9.87 | 82 ± 4.67 | 170.17 ± 2.25 |
| Rat + AmpB 10 µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 73.5 ± 11.75 | 76.44 ± 4.53 | 169.56 ± 17.99 |

Tableau 10 Composition plasmatique moyenne du cholestérol, triglycérides, et phospholipides chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

| Paramètres Groupes | \dot{V} ($\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1}$) | $(U/P)_{\text{creat}}$ | FG ($\mu\text{l} \cdot \text{mn}^{-1}$) |
|--|---|------------------------|--|
| Témoins (n=5) | 2.71 \pm 0.40 | 186.87 \pm 61.18 | 430.31 \pm 88.17 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 2.53 \pm 1.29 | 165.66 \pm 21.45 | 424.19 \pm 157.54 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 2.82 \pm 0.40 | 172.43 \pm 55.40 | 491.54 \pm 48.60 |
| Rat+AmpB 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (n=5) | 1.76 \pm 0.42 * | 110.17 \pm 55.80 * | 230.92 \pm 188.66 * |
| Rat+AmpB 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +LDL (1,3 g/l) (n=5) | 1.97 \pm 0.04 * | 87.5 \pm 12.5 * | 193.75 \pm 23.48 * |
| Rat+AmpB 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 2.08 \pm 0.31 | 152.77 \pm 53.99 | 309.79 \pm 86.55 |

Tableau 11 : Valeurs moyennes du débit urinaire (\dot{V}), du rapport de la créatinine urinaire a celui du plasma $(U/P)_{\text{creat}}$ de la filtration glomerulaire (FG) chez les differents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. $P < 0,05$.

* : Difference significative par rapport aux rats temoins.

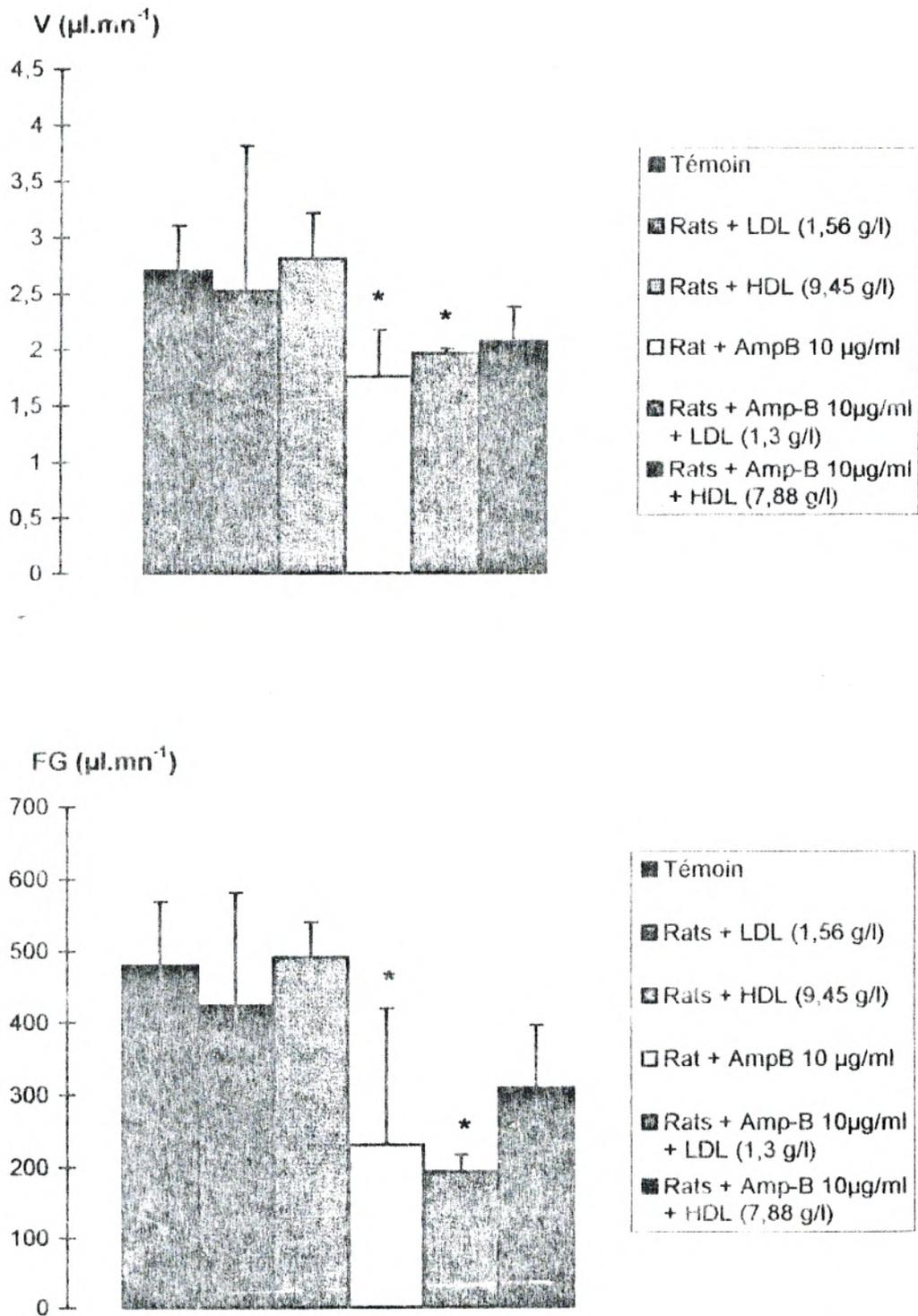


Figure 13 : Valeurs moyennes du débit urinaire (V), de la filtration glomérulaire (FG) chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

| Paramètres Groupes | EF% H ₂ O | EF% Urée | EF% Na ⁺ | EF% K ⁺ | EF% Ca ²⁺ |
|---|----------------------|-----------------|---------------------|--------------------|----------------------|
| Témoins (n=5) | 0.79 ± 0.39 | 34.82 ± 9.29 | 0.64 ± 0.16 | 11.81 ± 2.73 | 1.44 ± 0.60 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 0.94 ± 0.51 | 57.52 ± 27.6 | 0.85 ± 0.27 | 12.69 ± 4.85 | 1.34 ± 0.47 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 0.87 ± 0.49 | 41.33 ± 14.17 | 0.72 ± 0.11 | 12.67 ± 1.59 | 1.71 ± 0.37 |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | 1.25 ± 0.57 | 92.9 ± 21.71 | 1.176 ± 0.57 | 21.43 ± 9.78* | 3.31 ± 1.13 |
| Rat+AmpB 10µg/ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 1.56 ± 0.68 | 71.59 ± 27.69 * | 1.14 ± 0.25 | 29.24 ± 4.5* | 5.85 ± 2.7 * |
| Rat+AmpB 10µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 1.18 ± 0.44 | 49.21 ± 12.23 | 1.16 ± 0.53 | 12.21 ± 3.70 | 1.4 ± 0.28 |

Tableau 12 : Valeurs moyennes de l'excretion fractionnaire de l'H₂O (EF% H₂O), sodium (EF% Na⁺), potassium (EF% K⁺), Urée (EF% Urée) et calcium (EF% Ca²⁺) chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* : Différence significative par rapport aux rats témoins.

contre l'addition d'amphotéricine B-desoxy à une concentration égale à 10 µg/ml complexée aux lipoprotéines légères "LDL." le débit urinaire diminue significativement. Le même résultat a été observé pour la filtration glomérulaire comparés aux rats témoins

Le comportement rénal des solutés est résumé dans le (Tableau 12) indiquant respectivement les valeurs d'excrétions fractionnaires d'eau, de l'urée, sodium, potassium et calcium chez les différents groupes de rats étudiés.

Aucune différence n'a été observée pour l'excrétion fractionnaire de l'eau chez les rats en présence d'amphotéricine B-desoxy à 10 µg/ml complexée ou non aux lipoprotéines légères « LDL. » ou aux lipoprotéines lourdes « HDL. » ; parallèlement à l'excrétion fractionnaire de sodium

Une forte augmentation de l'excrétion fractionnaire du potassium est notée chez les rats traités par l'amphotéricine B-desoxy à une concentration égale à 10 µg/ml associée aux lipoprotéines légères « LDL. » comparées aux rats témoins. Le même résultat a été observé pour l'excrétion fractionnaire du calcium.

Enfin les teneurs sériques en lipides et en protéines du sérum total et les fractions des lipoprotéines VLDL, LDL, HDL et les masses sériques sont représentés dans les Tableaux 13, 14, 15, 16 et Figure 14

On ne note aucune différence significative des lipides et des protéines du sérum totale des VLDL, LDL et HDL chez les groupes de rats étudiés comparés aux rats témoins. Le même résultat est observé pour les masses sériques des différentes fractions lipoprotéines (Tableaux 17, 18, 19, 20 , Figure 16).

| Paramètres Groupes | Cholestérol total (mg/dl) | Triglycérides (mg/dl) | Phospholipides (mg/dl) | Protéines (g/l) |
|---|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------|
| Témoins (n=5) | 8.63 ± 4.09 | 64 ± 4 | 27 ± 2.07 | 0.23 ± 0.079 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 4.5 ± 2.29 | 62.45 ± 4.81 | 30.96 ± 2.03 | 0.29 ± 0.02 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 6.91 ± 2.47 | 68.9 ± 6.45 | 31.74 ± 2.92 | 0.19 ± 0.04 |
| Rat+AmpB 10µg/ml (n=5) | 6.2 ± 1.9 | 68.5 ± 5 | 26.8 ± 2.00 | 0.37 ± 0.01 |
| Rat+AmpB 10µg/ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 6.09 ± 1.35 | 67.2 ± 5.94 | 27.9 ± 3.24 | 0.35 ± 0.09 |
| Rat+AmpB 10µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 5 ± 1.74 | 68.2 ± 3.23 | 25.8 ± 1.8 | 0.29 ± 0.078 |

Tableau 13 : Teneurs moyennes en lipides et en protéines des VLDL sériques chez les rats témoins et chez les rats recevant différentes solutions : - une solution de lipoprotéines LDL (1,56 g/l) - une solution de lipoprotéines de HDL (9,45 g/l) - amphotéricine B-desoxy (10 µg/ml) - amp B-desoxy + LDL (1,3 g/l) - amp B-desoxy + HDL (7,88 g/l). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

| Paramètres Groupes | Cholestérol total (mg/dl) | Triglycérides (mg/dl) | Phospholipides (mg/dl) | Protéine total (g/l) |
|--|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Témoins (n=5) | 15.66 ± 2.11 | 2 ± 0.52 | 28.22 ± 8.08 | 0.19 ± 0.062 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 19.5 ± 0.65 | 2.6 ± 0.56 | 26.9 ± 1.36 | 0.18 ± 0.03 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 18 ± 3.60 | 1.87 ± 0.47 | 23.22 ± 1.89 | 0.16 ± 0.02 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml (n=5) | 15.9 ± 2.9 | 1.98 ± 0.31 | 27 ± 4.1 | 0.19 ± 0.09 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 16.21 ± 3.87 | 2.64 ± 0.03 | 24 ± 2 | 0.21 ± 0.03 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 14.53 ± 2.67 | 0.87 ± 0.15 | 24 ± 3 | 0.19 ± 0.062 |

Tableau 14 : Teneurs moyennes en lipides et en protéines des LDL sériques chez les rats témoins et chez les rats recevant différentes solutions : – une solution de lipoprotéines LDL (1.56 g/l) – une solution de lipoprotéines de HDL (9.45 g/l) – amphotéricine B-desoxy (10 µg/ml) – amp B-desoxy + LDL (1.3 g/l) – amp B-desoxy + HDL (7.88 g/l). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0.05.

| Paramètres Groupes | Cholestérol total (mg/dl) | Triglycérides (mg/dl) | Phospholipides (mg/dl) | Protéine total (g/l) |
|--|------------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Témoins (n=5) | 48 ± 7.54 | 7.08 ± 1.10 | 124.32 ± 24.48 | 1.6 ± 0.045 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 45.56 ± 5.31 | 6.1 ± 0.25 | 121.72 ± 10.77 | 1.55 ± 0.63 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 39.4 ± 11.9 | 5.01 ± 0.56 | 109.94 ± 10.02 | 2.15 ± 0.38 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml (n=5) | 47.4 ± 7.5 | 6.9 ± 0.21 | 120 ± 4 | 1.59 ± 0.44 |
| Rat+ AmpB 10µg ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 46.95 ± 7.59 | 5.31 ± 0.95 | 108.74 ± 9.63 | 1.59 ± 0.44 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 56.4 ± 11.46 | 6.08 ± 0.54 | 121.92 ± 4.2 | 1.5 ± 0.45 |

Tableau 15 : Teneurs moyennes en lipides et en protéines des HDL sériques chez les rats témoins et chez les rats recevant différentes solutions : - une solution de lipoprotéines LDL (1.56 g/l) - une solution de lipoprotéines de HDL (9.45 g/l) - amphotéricine B-desoxy (10 µg/ml) - amp B-desoxy + LDL (1.3 g/l) - amp B-desoxy - HDL (7.88 g/l). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0.05.

Rachid et al. 2000

| Paramètres Groupes | VLDL (g/l) | LDL (g/l) | HDL (g/l) | Masse totale sérique (g/l) |
|--|---------------|--------------|--------------|-------------------------------|
| Témoins (n=5) | 1.22 ± 0.065 | 0.65 ± 0.047 | 3.94 ± 0.262 | 5.81 ± 1.758 |
| Rat + LDL (1.56 g/l) (n=5) | 1.26 ± 0.101 | 0.67 ± 0.030 | 3.23 ± 0.485 | 5.22 ± 1.340 |
| Rats + HDL (9.45 g/l) (n=5) | 1.26 ± 0.103 | 0.58 ± 0.055 | 3.68 ± 0.537 | 5.52 ± 1.62 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml (n=5) | 1.39 ± 0.041 | 0.63 ± 0.080 | 3.62 ± 0.696 | 5.66 ± 1.55 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml +LDL (1.3 g/l) (n=5) | 1.35 ± 0.085 | 0.63 ± 0.075 | 3.20 ± 0.578 | 5.18 ± 1.325 |
| Rat+ AmpB 10µg/ml +HDL (7.88 g/l) (n=5) | 1.28 ± 0.092 | 0.66 ± 0.095 | 3.54 ± 0.528 | 5.28 ± 1.402 |

Tableau 16 : Masse sériques en lipoprotéines des VLDL, LDL, HDL chez les rats témoins et chez les rats recevant différentes solutions : – une solution de lipoprotéines LDL (1.56 g/l) – une solution de lipoprotéines de HDL (9.45 g/l) – amphotéricine B-desoxy (10 µg/ml) – amp B-desoxy + LDL (1.3 g/l) – amp B-desoxy + HDL (7.88 g/l). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0.05.

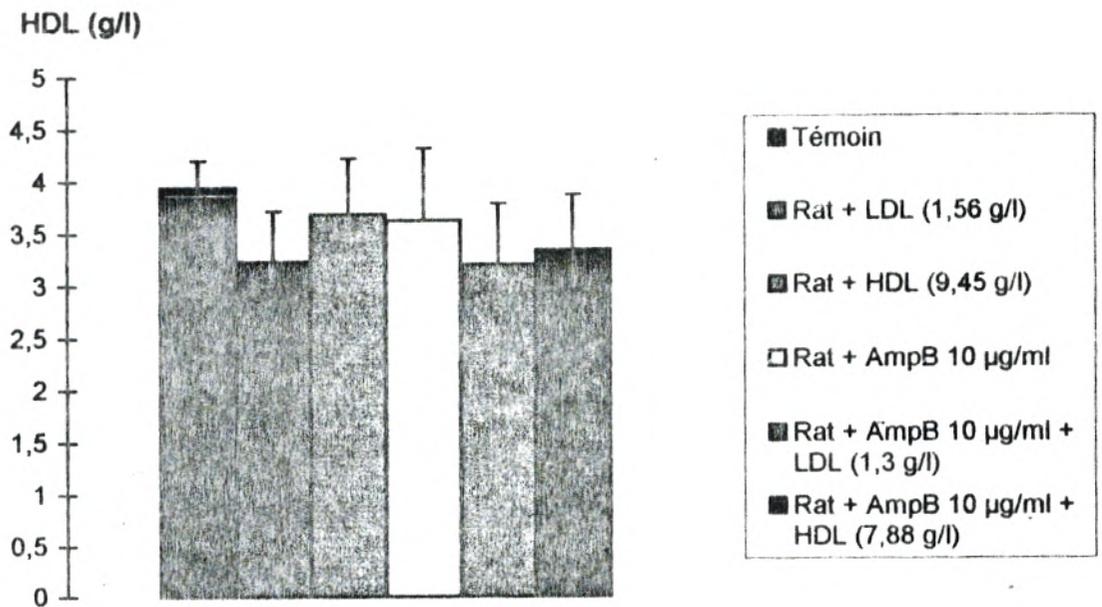
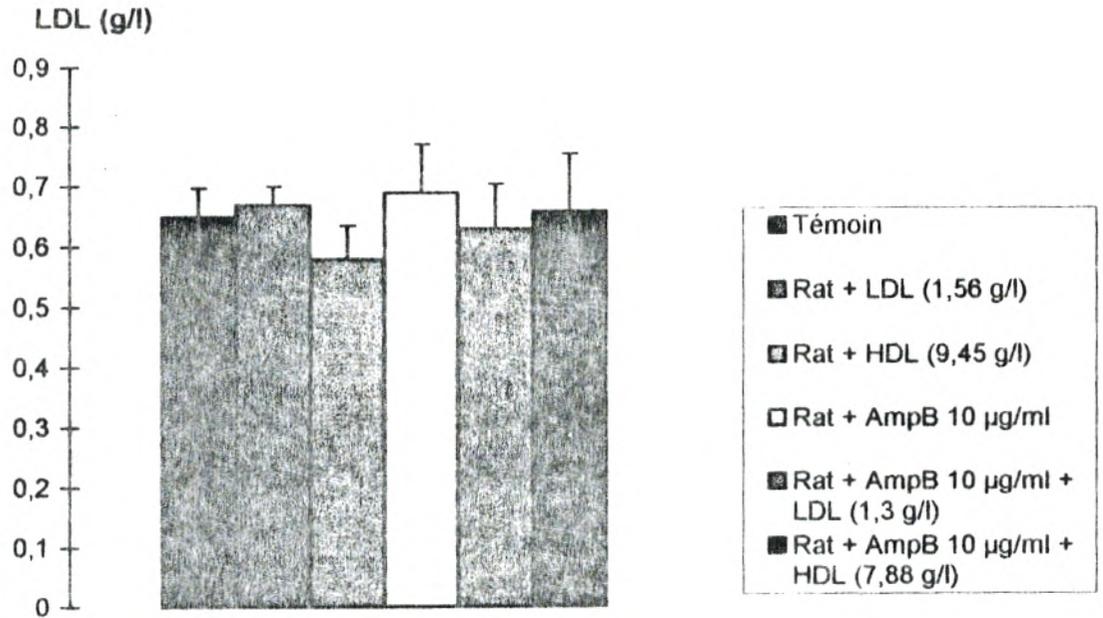


Figure 14 : Masses sériques totales en lipoprotéines des LDL et HDL chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue dans chaque expérience. $p < 0,05$

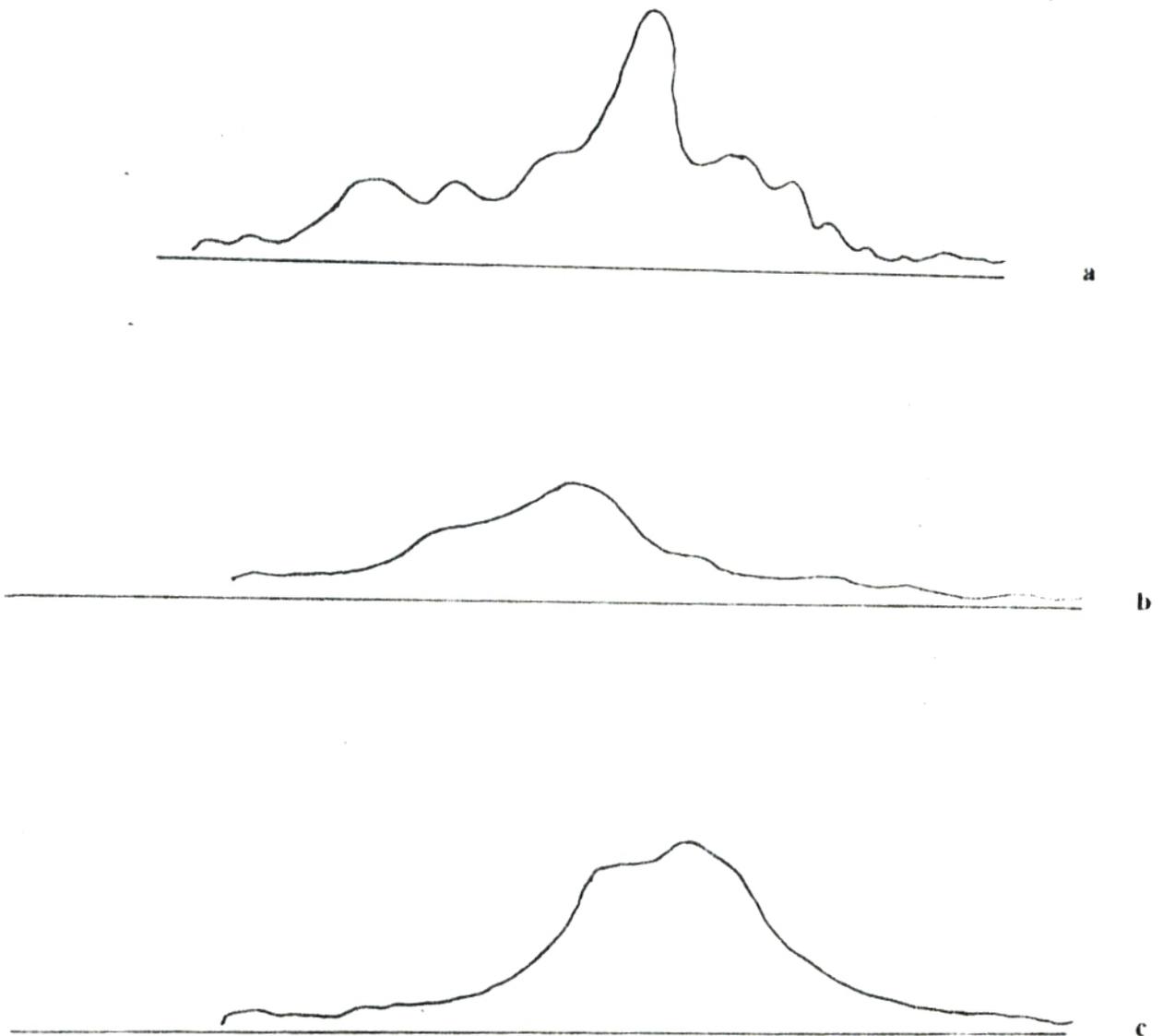


Figure 15 : - a - Profil densitométrique des fractions lipoprotéiques du sérum total chez le rat Wistar
- b - Profil densitométrique de la fraction lipoprotéique légère « LDL »
- c - Profil densitométrique de la fraction lipoprotéique lourde « HDL »

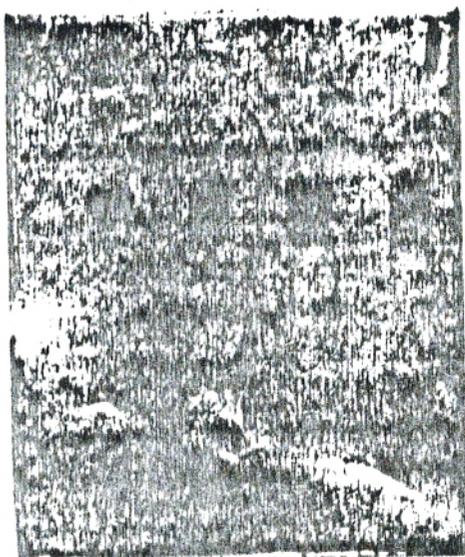


Figure 16 : Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose chez les rats témoins.



Figure 17 : Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose chez les rats recevant de lipoprotéine « LDL » à 1,5 g/l.

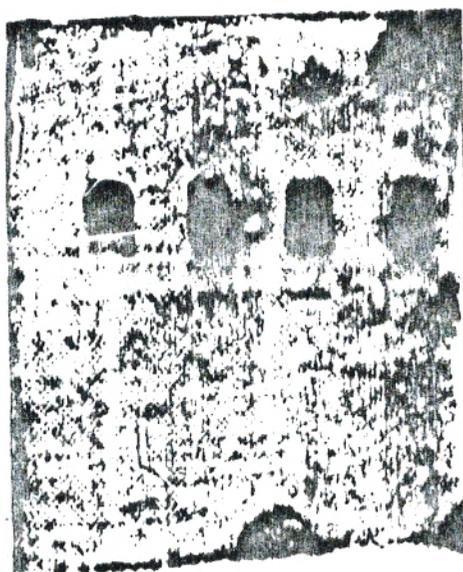


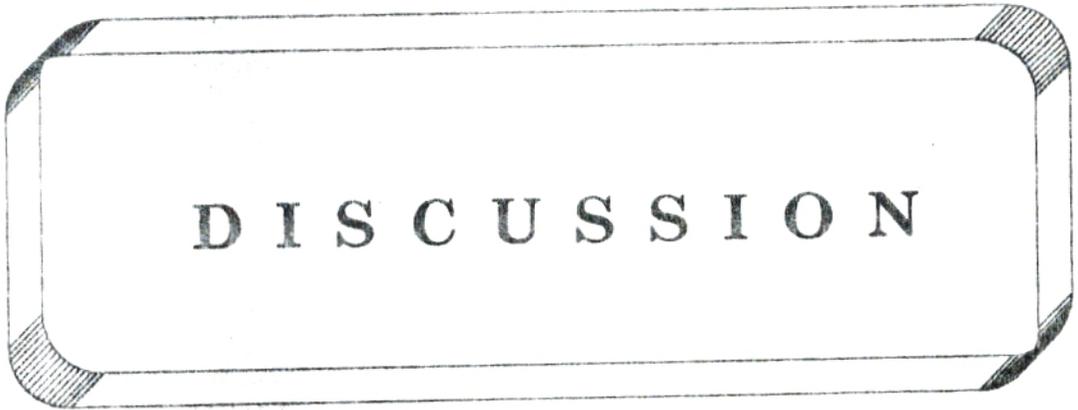
Figure 18 : Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose chez les rats recevant une concentration d'amphotéricine B à 10 $\mu\text{g/ml}$ associée aux HDL à 7,88 g/l.



Figure 19 : Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose chez les rats recevant une concentration d'amphotéricine B à 10 $\mu\text{g/ml}$ associée aux LDL à 1,3 g/l.



Figure 20 : Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose chez les rats recevant de lipoprotéines « HDL » à 9.45 g/l.



D I S C U S S I O N

DISCUSSION

I - INTRODUCTION

Il est largement accepté, que l'amphotéricine B un antibiotique polyène agit sur les cellules des eucaryotes et des procaryotes en modifiant la perméabilité de la membrane cellulaire par formations des pores conduisant à une perte d'éléments intracellulaires (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , PO_4^{3-} , ...) provoquant ainsi la mort ou la lyse cellulaire (34, 43, 62, 70, 69, 108)

L'activité antifongique des polyènes en général, et de l'amphotéricine B en particulier a motivé jusqu'à présent plusieurs chercheurs. Il est pour une large part lié à l'interaction de cette molécule de caractère amphiphile aux lipides des membranes cellulaires (45), il s'agit de l'ergostérol pour les levures et les fongis, et du cholestérol pour les cellules animales ce qui serait à l'origine de l'effet toxique chez la cellule cible (11, 12, 55, 64, 66, 80, 96)

Selon les travaux de (BOLARD, 1986) réalisés in vitro sur le *Candida-albicans* et les erythrocytes de souris montrent que, l'amphotéricine B est sélectivement plus toxique vis à vis des cellules fongiques à des concentrations de l'ordre de 1,8 μ M que vis-à-vis des cellules animales à des concentrations de l'ordre de 6 μ M. Cette toxicité sélective des polyènes macrolides aux cellules fongiques est liée par la sensibilité de l'action des sterols des membranes biologiques et artificielles (54, 59).

En effet, un nombre d'études récentes ont contribué à une meilleure compréhension du mécanisme par lequel l'amphotéricine B exerce son effet néphrotoxique, ceci est le facteur majeur limitant l'utilisation médicale de cet antifongique (10, 30, 75).

Cependant, l'amphotéricine B modifie la perméabilité des membranes des cellules tubulaires rénales par interactions aux stérols des membranes luminales (93, 113). Par ailleurs des changements hémodynamiques, renaux

surviennent (97). Ceux ci se manifestent : par une chute de la filtration glomérulaire (FGR), une réduction du flux sanguin rénal, acidose tubulaire distale et des troubles électrolytiques en général (42, 48, 58, 63, 75, 81, 94, 102).

En outre, l'utilisation de l'amp B est dose dépendante (1, 2, 98). L'administration d'antifongique intraveineuse à une concentration de 0,5 mg/kg/jour chez le chien entraîne une néphrotoxicité permanente provoquant ainsi la mort de l'animal (92).

En revanche, chez les humains à une forte dose d'amp B, l'atteinte rénale est constante (5, 24). Cependant un apport en sel (1 litre à 0,9% de NaCl) reste l'une des mesures pouvant améliorer la néphrotoxicité chez les humains traités par l'amphotéricine B (78)

En raison de son caractère fortement hydrophobe, son insolubilité dans le milieu aqueux, son instabilité, et sa haute toxicité ont mené les auteurs à étudier la structure physico-chimique de la molécule en modifiant ainsi les différentes formes d'amphotéricine B à savoir la forme " monomère soluble ", " oligomères soluble " et " agrégat insoluble " en entraînant alors une modification de l'interaction de l'antifongique avec les membranes des cellules cibles (hôte) et par conséquent une réduction de l'effet cytotoxique.

Cependant les formes monomères et oligomères solubles montrent leur effet toxique important chez les cellules fongiques. Par contre l'ampB sous forme d'agrégats exprime son effet toxique chez les cellules animales notamment les globules rouges et les cellules rénales (6, 11, 76)

Par ailleurs, beaucoup de stratégies ont été développées pour essayer de réduire la toxicité de la formulation commerciale. L'amphotéricine B-desoxycholate (Fungizone) représente une nouvelle approche pouvant améliorer son index thérapeutique ; l'ampB est lipophile et son association avec les liposomes (composés de dimyristoyl phosphatidyl choline " DMPC " et dimyristoyl phosphatidyl glycérol " DMPG ") et la formulation d'une émulsion lipidique dans des modèles animaux " rats "

conduit à un effet protecteur basé sur la modification de l'affinité de l'ampB, et diminue sur transfert sélectif du complexe lipidique aux cellules animales contenant du cholestérol, tout en présentant la haute efficacité contre les cellules fongiques (4, 46, 61, 74, 90, 91, 110, 111).

Cependant, des études ultérieures sont nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité de ces nouvelles formulations possible de l'ampB : c'est la forme complexée aux lipoprotéines endogènes.

L'utilisation de ces macromolécules circulantes, très actives, de structure sphérique de 7 à 25 nm de dimension et chargée de cholestérol (41, 67, 72) offrent à la molécule d'amphotéricine B d'une part un environnement hydrophobe (triglycéride, cholestérol estérifié) ce qui rend la molécule plus soluble dans le milieu biologique, et d'autre part par leur cholestérol non estérifié (hydrophile) un site de fixation à l'antifongique (BRAJTBURG 1990). Les lipoprotéines sériques peuvent modifier l'interaction de l'amphotéricine B avec les cellules cibles qui sont à l'origine de l'effet toxique, selon le même auteur l'interaction de l'amphotéricine B est plus rapide avec les lipoprotéines à basse densité " LDL " qu'avec celle de haute densité " HDL " (71).

C'est dans cette optique que plusieurs recherches ont été réalisées :

En effet selon les travaux de BRAJTBURG (1984, 1986) faits in vitro sur les erythrocytes humaines, montrent que l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B est réduit en présence des lipoprotéines sériques " LDL " ou les lipoprotéines sériques " HDL ".

Par ailleurs, chez les cellules animales telle que les globules rouges (BOUCHERIT Z., 1995) montre in vitro, que l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines réduit la cytotoxicité induite par l'antifongique. Cependant, l'effet protecteur des lipoprotéines légères " LDL " est inférieur à celui observé avec les lipoprotéines lourdes ou " HDL ".

En effet chez les levures : exemple *Saccharomyces cerevisiae* (BEDRANE, M.A, 1997) montre que l'amp B garde son effet toxique sur la levure. En effet, la croissance cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* est

fortement inhibée par l'amp B liée aux lipoprotéines sériques à une concentration de 2 µg/ml.

En outre, les travaux antérieurs de (WASAN, 1994 ; WASAN, 1995) sur les cellules rénales montrent que, l'amphotéricine B associée aux lipoprotéines lourdes ou " HDL " réduit l'effet cytotoxique par rapport aux lipoprotéines légères ou " LDL " (86).

Dans ce contexte, nous avons entrepris une étude in vivo sur l'influence des lipoprotéines légères " LDL " et lipoprotéines lourdes " HDL " sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez les " rats Wistars " comme modèle expérimental (voir matériels et méthodes), en réalisant quelques dosages biochimiques, hématologiques et sur le comportement rénal des solutés.

II - EFFET DE L'AMPHOTERICINE B-DESOXY SUR LE TAUX DE L'HEMOGLOBINE

Dans les études présentes, nous avons examiné l'influence des lipoprotéines lourdes à haute densité " HDL " et les lipoprotéines légères à basse densité ou " LDL " sur le taux de l'hémoglobine induite par l'amphotéricine B-desoxy qui est considérée comme l'une des premières étapes de toxicité cellulaire de l'antifongique.

Selon nos résultats expérimentaux (chapitre interprétation des résultats) il semble que l'utilisation des lipoprotéines lourdes HDL à une concentration de 7,88 g/l pure assure probablement un effet protecteur du taux de l'hémoglobine contre l'hémolyse induite par l'amphotéricine B-desoxy à une dose de 10 µg/ml chez les rats Wistar. Cette protection est presque nulle quand l'amphotéricine B est associée aux lipoprotéines LDL à 1,3 g/l, cela est probablement due selon (MILLER, 1975 ; SHAW, 1987 et BRAJTBURG, 1990) à la présence du cholestérol non estérifié qui est un site de fixation de l'amphotéricine B pour les lipoprotéines lourdes ou HDL, alors que les LDL constituent la forme d'apport du cholestérol vers les différents tissus (foie, rein,...). La présence des lipoprotéines augmente le volume de distribution de l'amphotéricine B dans l'organisme

Par ailleurs, selon les expériences faites *in vitro* sur le globule rouge humain selon (BOUCHERIT Z., 1995) suggère que, les deux types de lipoprotéines " HDL " et " LDL " assurent la protection du globule rouge contre la fuite de l'hémoglobine induite par l'antifongique à une concentration de 5 µg/ml.

Selon les expériences de (KOTLER, BRAJBURG, 1979) faites sur les erythrocytes humaines, celles des rats et des lapins, suggèrent une relation entre la fuite des ions potassium et l'hémolyse induite par l'amphotéricine B. La libération de l'hémoglobine observée est due probablement à la libération du potassium entraînant alors la lyse de la cellule.

III - EFFET DE L'AMPHOTERICINE B-DESOXY SUR LE METABOLISME DES ELECTROLYTES

Le rein des mammifères en général est un organe principal dans la régulation hydro-électrolytique dont le dysfonctionnement peut engendrer des troubles ioniques importants provoquant la lyse cellulaire (68).

L'hyperkaliémie observée dans nos expériences pendant une courte durée de perfusion d'amphotéricine B-desoxy chez les rats Wistar, reflète probablement des modifications dans la perméabilité au potassium des membranes cellulaires, se traduisant probablement par une fuite exagérée du potassium urinaire. Cela soutient probablement l'hypothèse suivante que : la toxicité de l'antifongique est dirigée aux cellules tubulaires distales, qui à ce niveau se fait la régulation de l'excrétion du K⁺ en fonction des conditions métaboliques, semble être altérée par l'amphotéricine B-desoxy (27, 96).

Par ailleurs, plusieurs auteurs confirment une hypokaliémie pendant la thérapie de l'amphotéricine B ; des niveaux aussi bas que 0,8 meq/l ont été enregistrés. Cela soutient l'idée que l'amphotéricine B augmente la perméabilité au potassium des cellules tubulaires distales.

Cependant, selon les travaux de (NICHOL, 1994 ; HARDI, 1991 ; BUTLER, 1969) sur des études faites *in vivo* chez les rats, chez l'homme,

et in-vitro dans les préparations isolées de vessies de tortues, montrent que l'amphotéricine B engendre une perte de potassium rénal en augmentant la perméabilité des cellules tubulaires distales provoquant ainsi la lyse cellulaire.

IV – EFFET DE L'AMPHOTERICINE B-DESOXY SUR LA FILTRATION GLOMERULAIRE RENALE (FGR)

Le rein participe à l'élimination de nombreux médicaments tels que l'amphotéricine B par l'excrétion urinaire, par le biais d'un transport tubulaire et d'une filtration glomérulaire mise en évidence par les expériences de clearance (27, 94).

La chute dans la filtration glomérulaire mesurée par la clearance de la créatinine chez les rats Wistar traités par l'amphotéricine B-desoxy à différentes concentrations pourrait être due à l'effet de cet antifongique sur les cellules mesangiales du glomérule ainsi que sur la modification de l'aspect hemodynamique influencé par plusieurs facteurs tels que la pression de filtration, le débit urinaire etc... Nos résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de (BUTLER, 1964 ; HEIDMAN, 1983 ; SABRA, 1990) confirmant une chute importante de la filtration glomérulaire FGR suivie d'une réduction du flux plasmatique rénal FPR chez les patients traités par l'amphotéricine B à une courte durée de perfusion.

En revanche l'injection d'amphotéricine B chez les rats à une dose d'antifongique égale à 1 mg/Kg/h entraîne une diminution du FGR (TOLIN, 1991 ; TOLIN, 1988). Par ailleurs les mêmes résultats ont été observés chez les chiens après une perfusion d'amphotéricine B égale à 5 µg/Kg / 30mn (BUTLER, 1961).

V – ETUDE QUANTITATIVE DES LIPOPROTEINES SERIQUES LEGERES " LDL " ET LOURDES " HDL " EN ABSENCE ET EN PRESENCE D'AMPHOTERICINE B-DESOXY A 10 µg/ml

Dans cette partie du travail nous avons entrepris une étude quantitative des lipoprotéines légères " LDL " des lipoprotéines lourdes " HDL " en absence et en présence d'amphotericine B-desoxy dans le but de déterminer les teneurs et les compositions de ces deux types de lipoprotéines sériques.

Il ressort des résultats obtenus jusqu'à présent dans nos expériences que le profil lipoprotéiques des rats Wistars normaux est différent de celui de l'homme adulte (Figure 15). En effet il est caractérisé par des taux bas en LDL, le rat dépend de sa richesse en HDL pour livrer le cholestérol et des phospholipides aux tissus (voir chapitre interprétation des résultats). Nos résultats confirment les études montrées par (FAEGERMAN et MECHILLI, 1989) qui montrent que la majorité des VLDL est catabolisé dans le foie et seule une petite partie est dégradée en LDL : d'où faible teneur sérique en LDL chez les rats comparés à l'homme adulte où la majorité des VLDL est convertie en LDL. Selon (HA. Y, 1990 ; MORTON, 1990) l'enzyme LCAT responsable de l'activité de transfert de l'ester du cholestérol entre HDL et LDL est absent chez le rat d'où une faible teneur en LDL comparée à l'homme.

Le profil lipoprotéique à la suite d'une électrophorese des lipoprotéines chez les rats Wistars après injection d'une dose circulante d'amphotericine B égale à 10 µg/ml n'est pas différent de celui des rats témoins. Cependant peu de recherches ont été effectuées dans ce domaine, mais il semble que l'antifongique polyénique n'a aucune action sur la quantité du contenu en lipides et en protéines (apoprotéine) des lipoprotéines sériques, leur rôle est donc de vecteur et de protecteur modifiant ainsi l'interaction de l'amphotericine B – cellule cible par la présence du cholestérol non estérifié des lipoprotéines sériques qui est un site de complexation à l'amphotericine B.

Par ailleurs, il serait probable de moduler l'interaction amphotéricine B – lipoprotéines – cellules cibles par modification de la qualité de la molécule lipoprotéine vectrice, conduisant à une baisse de toxicité de l'amphotéricine B ; cela a été vérifié récemment par (SOUZA, 1994), qui montre *in vivo* chez les souris, et les humains traités à l'amphotéricine B qu'une émulsion riche en triglycéride (chylomicrons, VLDL et LDL) ont un effet protecteur et réduisent la toxicité de l'amphotéricine B (29). Il reste à chercher, si l'interaction de l'amphotéricine B aux lipoprotéines observée sous des conditions d'administration chronique et l'alimentation aurait des effets miscibles à long terme.

A travers nos résultats expérimentaux, il semble que l'effet protecteur des lipoprotéines légères, LDL observé chez les rats Wistars est minime (réduit) par rapport à celui observé pour les lipoprotéines lourdes ou HDL au niveau des cellules rénales, cela est due probablement selon (WASAN, 1994) (111) à l'internalisation par phénomène d'endocytose de l'amphotéricine B véhiculé par les LDL qui ont un récepteur B/E membranaire spécifique situé dans des sites particuliers de la surface cellulaire, ces LDL sont constitués essentiellement de cholestérol estérifié qui est dégradé (hydrolysé) en cholestérol non estérifié (libre) constituant un site de fixation à l'amphotéricine B et de ce fait renforce la toxicité intracellulaire de l'antifongique dans les cellules cibles.

Enfin, il est possible donc de moduler l'internalisation de l'amphotéricine B – lipoprotéine LDL en réalisant de nombreuses mutations génétiques portant sur le récepteur LDL sa synthèse et son transport à la surface membranaire rendant impossible l'endocytose du complexe LDL – récepteur et donc une non fixation de l'amphotéricine B – lipoprotéine LDL par conséquent une diminution de l'effet cytotoxique, jusqu'à présent ce type de mécanisme n'a jamais été mis en évidence cette proposition mérite une enquête dans les prochaines études.

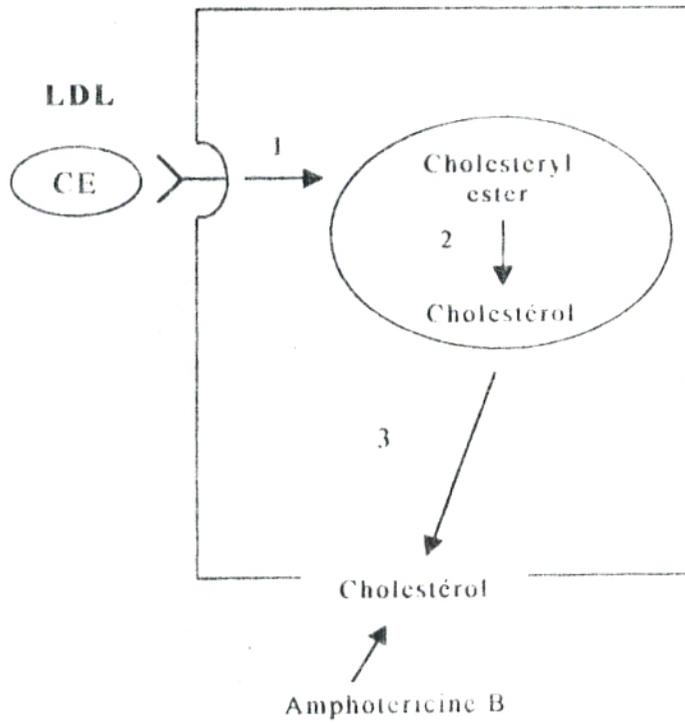
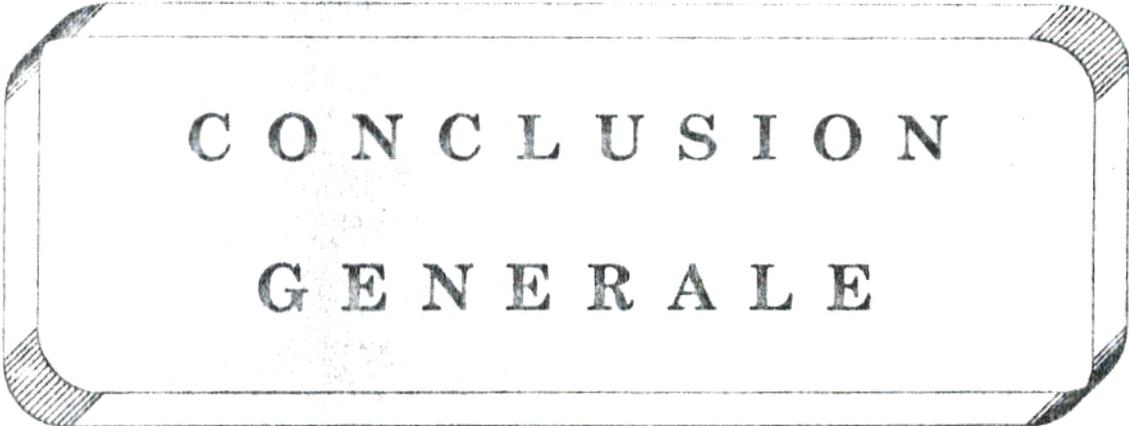


Figure 21 : Interaction directe de lipoprotéines – LDL – Amp B – cellule rénale (D'après WASAN et al., 1995)



C O N C L U S I O N
G E N E R A L E

CONCLUSION

Le travail réalisé nous a permis d'évaluer l'effet de l'amp B-desoxycholate complexée aux lipoprotéines sériques sur la toxicité induite par l'antifongique chez le rat Wistar

Comme tous les polyènes, l'amp B se lie aux stéroïdes et destabilise les membranes cellulaires avec formation des pores et une augmentation de la perméabilité cellulaire responsable de l'effet fongicide (12, 37, 96, 108).

En effet, il est largement admis que, l'amp B de caractère amphiphile permet aux lipoprotéines sériques renfermant du cholestérol une meilleure fixation à l'antifongique conduisant probablement à une réduction de sa toxicité et une conservation de l'efficacité de l'amphotéricine B avec les cellules cibles (91).

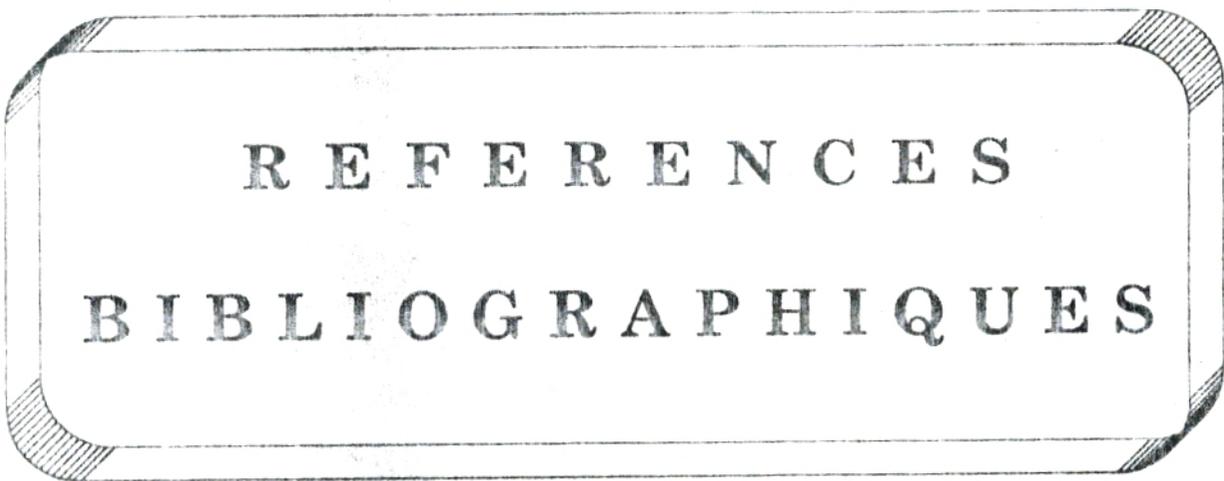
Récemment, des études physiologiques effectuées *in vivo* et *in vitro* ont permis de connaître les effets cytotoxiques de l'amp B envers la cellule cible ; c'est pour cela nous nous sommes proposés ici d'étudier l'influence des lipoprotéines " LDL ", " HDL " sur la toxicité induite par l'antifongique et de résumer quelques progrès récents en comprenant son effet sur la fonction globale du rein chez le rat Wistar

Les résultats que nous avons obtenus chez les rats traités par l'amp B-desoxy après deux heures de perfusion montrent que

- L'amp B-desoxy à différentes concentrations 2,5 µg/ml - 5 µg/ml - 7,5 µg/ml - 10 µg/ml induit des perturbations hématologique (hémoglobine, globule rouge) - troubles électrolytiques plasmatiques, urinaires. Ces perturbations obtenues sont de plus en plus importantes selon les concentrations croissantes d'amp B-desoxy utilisées.
- L'addition des lipoprotéines sériques natives montrent des effets différents sur la toxicité suivant le type de lipoprotéines sériques

- A une concentration d'amp B-desoxy de l'ordre de 10 $\mu\text{g/ml}$, les lipoprotéines lourdes ou HDL à 7,88 g/l induisent un effet protecteur important qu'avec les lipoprotéines légères ou LDL à 1,33 g/l.
- Ces résultats sont en accord avec (WASAN 1994, WASAN 1995) qui confirment que l'effet protecteur observé chez les cellules rénales est assuré avec les lipoprotéines lourdes, HDL induite par l'amphotéricine B.

Sur la base de ces données, en vu d'une thérapeutique antifongique, la stratégie serait donc une étude approfondie de l'effet de l'amp B liée aux lipoprotéines sériques LDL sur la toxicité en changeant la configuration des récepteurs aux LDL qui est la principale cible moléculaire affectée, ou alors une diminution du nombre des récepteurs membranaires aux LDL et par conséquent une réduction de l'effet cytotoxique induite par l'amp B. Ce type de mécanisme n'a jamais été mis en évidence chez la cellule animale en général.



REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ADEDOYIN. A, BERNARDO. J.F, SWENSON. C.E, BOLSACK. I.E, HORWITZ. G, DEWIT. S, KELLY. E, KLASTERSKY. J, SCULIER. J.P, DEVALERIOLA. D, ANAÏSSIE. E, LOPEZ-BERESTEIN. G, LLANOS-CUENTAS. A, BOYLE. A, and BRANCH. R.A (1997)**
Pharmacokinetic profile of amphotericin B lipid complex injection. Combined experience from phase I and phase II studies.
Antimicrobial Agents and chemotherapy. Vol. 41, N° 40. p. 2201-2208.
2. **ALLENDE. M.C, LEE. J.W, FRANCIS. P, GARRETT. K, DOLLEMBERG. H.H, REREMGUER. J, LYMAN. C.A, PIZZO. P.A, and WALSH. T.J (1994)**
Dose dependent antifungal activity and nephrotoxicity of amphotericin-B colloidal dispersion in experimental pulmonary aspergillosis.
Antimicrob. chemother. (38). N° 3. p. 518-22.
3. **ANAÏSSIE.E.J, KARYOTAKIES.N.C, HACHEM. R, DIGNANI. M.C, and PAETZNICK. (1994)**
Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida*-species.
Med. (107). N° 2 : 9-384.
4. **ANDRIOLE. V.T, and PATTERSON. T.F (1989)**
The rôle of liposomal Amphotericin B in the treatment of systemic fungal infections.
J. clinique. (25). N° 2 : 63-68.
5. **ATKINSON. A.J, and BENNETT. J.E (1978)**
Amphotericin B pharmacokinetics in humans.
Antimicrobial. Agents chemother (13) : 271-276.
6. **BAREWIZ. J, CHRISTIAN. S, and GRUDA. I (1992)**
Effect of aggregations state of amphotericin B on its toxicity to mice.
Antimicrob. chemother. (36). 2310-2315.

7. **BEAR. H.W, RICHERT. J.H, and TAYLOR. R.R (1960)**
The treatment of deep mycotic infections with amphotericin B with particular emphasis on drug toxicity.
Am. Rev. Dis (81) : 43-51.
8. **BECK- SAGUE. C.M, and JARVIS. W.R (1993)**
The major opportunistic fungal pathogen candida-albicans is normally found as a commensal organism in the oral cavity and gastro-intestinal tract of humans.
Infect. Dis (167) : 1247.
9. **BEDRANE. M.A (1997)**
Effet des lipoprotéines sériques sur la cytotoxicité induite par les polyènes macrolides exemple l'Amphotéricine B chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae*
Thèse de Magister - Biochimie. Université de Tlemcen
10. **BELL. N.H, ANDRIOLE. V.T, SABESIN. S.M, and UTZ.J.P (1962)**
On the nephrotoxicity of amphotericin B in man
Am. J. Med (33) : 64-69.
11. **BOLARD. J, LEGRAND. J, 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.
12. **BOLARD. J (1986)**
How do the polene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties ?
Biochim. Biophys. Acta (864) : 257-304.
13. **BOLARD. J, SEIGNEMENT. M, and BOUDET. G (1980)**
Interaction between phospholipid bilayer membrane and polyene antibiotic amphotericin B.
Biochim. Biophys. Acta (599) : 280-293.
14. **BOUCHERIT. Z (1995)**
Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée aux lipoprotéines du serum sanguin chez des cellules de globules rouges humaines.
Thèse de Magister - Biochimie. Université de Tlemcen

15. **BRAJTBURG. J, POWDERLY. W.C, KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1990)**
Amphotericin B : current understanding of mechanisms of action
Antimicrobial. Agents and chemother. (34). N°2 : 138-188.
16. **BRAJTBURG. J, POWDERLY. W.C, KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1990)**
Amphotericin B : Delivery systems
Antimicrobial. Agents and chemther. (34). N°3 : 381-384.
17. **BRAJTBURG. J, ELEBERG. S, BOLARD. J, KOBAYASHI. G.S, LEVY. R.A, OSTLUND. R.E, SCHILESSINGER. D, and MEDOFF. G (1984)**
Interaction of plasma, proteins and lipoproteins with amphotericin B
J. Infect. Dis. (149). N°6 : 986-997.
18. **BRAJTBURG. J, MEDDOF. J, KOBAYASHI. G.S, SCHILESSINGER. D, and MEDOFF. G (1984)**
Stimulatory, permeabilising and toxic effect of Amphotericin B on L cells
Antimicrobial. Agent and chemotherapy. p : 892-897.
19. **BRAJTBURG. J, MEDOF. J, KOBAYASHI. G., and ELBERG. S (1980)**
Influence of extracellular K^+ or Mg^{2+} on the stage of antifungal. Effects of amphotericin B and Fillipin.
Antimicrobial. Agents and chemother (18). N°4 : 593-597
20. **BRAJTBURG. J, POWDERL. W.G, KOBAYASHI. G.S and MEDOFF. G (1986)**
Effet of serum lipoproteins on damage to erythrocytes and Candida-albicans cells by polyene antibiotics.
J. Infect. Dis (153). N°3 : 623-626.
21. **BURSTEIN. M, SCHOLMICK. H.R, and MORFIN. R (1970)**
Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanion.
J- Lipid. Research (11) : 383-393.
22. **BUTLER. W.T (1966)**
Pharmacology. Toxicity and therapeutic usefulness of amphotericin-B
JAMA. (195) : 371-375.

- 23. BUTLER. W.T, BENNETT. J.E, ALLING. D.W, WERTLAKE. P.T, and UTZ. J.P (1964)**
Nephrotoxicity of amphotericin B. early and late events in 81 patients
Annals of international Med. (61) : 178-187.
- 24. CABOR. G.S., PAZDUR. R., VALERIOTE. F.A., and BATER. H.H. (1989)**
Pharmacokinetic and toxicity of continuous infusion of amphotericin B in Cancer patients.
J. pharmacology. Science (78) : 307-310.
- 25. CAMUS. M.C, AUBERT. R, BOURGEOIS. F, HERZOG. T, ALEXIN. A, and LEMONNIER. D (1988)**
Serum lipoproteins and apolipoproteins profiles of the genetically obese ob/ob mouse
Biochim. Biophys. Acta (961) : 53-64.
- 26. CANIAUX. I, VILLARD. J, POKTE. M, and ODDOUX. I. (1984)**
Les antifongiques utilisés en thérapeutique humaine.
Lyon. Pharmaceutique (35). N° 3 : 131-141.
- 27. CARLSON. M.A, and CONDON. R.E (1994)**
Nephrotoxicity of amphotericin B.
J. of the American College of Surgeons (179) : 361-375.
- 28. CHAPMAN. N.J (1980)**
Animals lipoproteins : chemistry, structure and comparative aspects
J. lipid. Research (21) : 789.
- 29. CHAVANET. P, JOLY. V, RIGAUD. D, BOLARD. J, CARBON. C, and YENI. P (1994)**
Influence of diet on experimental toxicity of amphotericin B desoxycholate
Antimicrobial Agents. Chemother. Vol. 38. N°5. p 963-968.
- 30. CHENG. J.T , WITTY. R.T, ROBINSON. R.P, and YARGER.W.E (1982)**
Amphotericin B Nephrotoxicity : increased renal resistance and tubule permeability.
Kidney Int (22) : 626-633

- 31. CIPOLLE. R.T, and SOLOMKIN. J.S (1990)**
Amphotericin B in Taylor. W.T, and DIERS-CARVINESS. M.H.
Text book for the clinical application of therapeutic drug monitoring. Abbot.
Irving. Tx. p : 321-328.
- 32. CLEMENT. J.S, and PEACOCK. J.E (1990)**
Amphotericin B revisited : reassessment of toxicity.
Am. J. Med (88) : 22-27.
- 33. CYBULSKA. B, BOROWSKI. E, PRIGENT. Y, and GARY-BOBO. C.M (1981)**
Cation permeability induced by two automatic heptaenes vacidi A and Candicidin-D
on phospholipid unilamellar vesicles.
The journal of antibiotics vol XXXIV. N° 7. p : 884-891.
- 34. CYBULSKA. B, MAZERSKI. J, BOROWSKI. E, and GARY-BOBO. CM (1984)**
Haemolytic and activity macrolide antifungal antibiotics
Biochem and pharmac. (33). N° 1 : 41-46.
- 35. DEI-CAS. E, FRVIT. J, POULAIN. D, DUTOIT. E, CHENDID. H, VERNES. A,
FRANCOIS. N, and POPEYE. R (1984)**
Infections à levures : espèces concernées et concentrations minimales inhibitrices des
antifongiques usuels.
- 36. DENNING. D.W (1991)**
Epidemiology and pathogenesis of systemic fungal infections with immuno
compromised host.
J. Antimicrobial. chemother. (28). p : 1-16.
- 37. DEUTJKE. B, KIM. M, and ZOLLNER. C (1993)**
The influence of amphotericine B on the permeability of mammalian erythrocytes to
monoelectrolytes, anions cations.
Biochem. Biophys. Acta. (318) : 345-359
- 38. DISMUKES. W.E (1992)**
Antifungal therapy : from amphotericine B to present
Ann. Climatol. Assoc (104) : 166-177.

39. ELEWSKI. B.E (1993)

Mechanisms of action of systemic antifungol agents.
Dermatology. (28) : 528-534.

40. FAERGERMAN. O, SATA. T, KANE. J.R, and HAVEL. R.J (1975)

Metabolism of apoprotein B of plasma very low density lipoprotein in rat
J. clin. In. Vest. (56) : 1396.

41. FIEVET. H, and FRUCHART. J.C (1989)

Lipides, lipoproteines, apolipoproteines et risques cardiovasculares.
J. In SEM Biology. (35) : 18-21.

42. FISHER. M.A, TALBOT. G.H, MAISLIN. G, MC KEON. B.P, TYMAN. K.P, and STROM. B (1989)

Risk factors for amphotericin B associated nephrotoxicity.
Am. J. Med. (87) : 547 - 552.

43. GALE. E.F (1974)

The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics
J. Gen. Microbiol (80) : 451 - 465.

44. GALLIS. H.A, DREW. R.H, and PICHARD. W.W (1990)

Amphotericin B : 30 years of clinical experience.
Rev. Infect. Dis (12) : 308 - 329.

45. GARY-BOBO. C.M (1989)

Polyene - sterol interaction and selective toxicity
Biochemie. (71) : 37 - 47.

46. GATES. G, and PINNEY. R.J (1993)

Amphotericin B and its delivery by liposomal and lipid formulation
J. Clin. Pharmacol - Therapy. Vol. 18. N° 3 : 147-53

47. GEORGOPAPADAKOV. N.H, and WALSH. T.J (1994)

Human mycoses : drugs and targets for emerging pathogens.
Vol. 246 p : 371 - 373.

48. GIL. F.Z, and MALNIC. G. (1989)
Effect of amphotericin B on renal tubular acidification in the rat.
Arch (413) : 280 – 286.
49. GIRAUD. J.I, and MATHE. S (1988)
Pharmacologie clinique. Base de la thérapeutique.
Expansion scientifique française. 2^{ème} édition.
50. HA. Y, and BARTER. P (1982)
Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species.
Comp. Biochem. and Physiol. (71B) : 265 – 269.
51. HAY. R.J (1991)
Overview of the treatment of disseminated fungal infections.
J. antimicrob, chemother. (28) : 17 – 25.
52. HEBEKA. E.K, and SOLOTOROVSKY. M (1965)
Developpement of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans*
J. Bacteriol (89) : 1533 – 1539.
53. HEIDMANN. H.Th, GERKENS. G.F, SPICKARD. W.A, JACKSON. E.K, and
BRANCH. R.A (1983)
Amphotericin B nephrotoxicity in humans decreased by salt repletion.
American Journal of Medecine (75) : 476-481
54. HERVE. M, DEBOUZY. T.C, BOROWSKI. E, CYBOLSKA. B, and GARY-
BOBO. C.M (1989)
The role of the carboxyl and amino-groupes of polyene macrolide in their
intractions with sterols and their selective toxicity. A ³¹P-N M.R. study.
Biochem. Biophys. Acta (980) p : 261 – 272.
55. HERVE. M, WIETZERBIN. J, COURTOIS. A, and TRAN-DINH. S (1994)
Effets et mode d'action de l'amphotericine B sur le métabolisme cellulaire. Etude
par la spectroscopie R.M.N multinoyaux.
Société française de microbiologie (colloque Mars) : 91.

- 56. HEYMAN. S.N, STILLMAN. I.E, BREZIS. M, EPSTEIN. F.H, SPOKES. K, and ROSEN. S (1993)**
Chronic amphotericin B nephrotoxicity. Morphometric, electron microscopic and functional studies.
J. Am. Soc. Nephrol (4) : 69-80.
- 57. HOEG. J.M, and BREWER. H.B (1986)**
Human lipoprotein metabolism and the liver.
Prog. Liver. Dis. (8) : 51.
- 58. HOLEMAN. C.W Jr, and EINSTEIN. H (1963)**
The toxic effects of amphotericin B in man.
Calif. Med. (99) : 90 - 93.
- 59. HSUCHEN. C.C, and FEINGOLD. D.S (1973)**
Selective membrane toxicity of polyene antibiotics : studies on natural membranes.
Antimicrob. Agents chemother. (4) : 309 - 315
- 60. JULIANO. R.L, DAOD. S, KRAUSE. H. S and GRANT. C. W. M (1987)**
Membrane to membrane transfer of lipophilic drug used against cancer or infectious disease.
Annals New York Academy of Sciences. p : 89-103.
- 61. JULLIEN. S, BRAJTBURG. J, and BOLARD. J (1990)**
Affinity of amphotericin B for phosphatidyl - choline vesicles as a determinant of invitro cellular toxicity liposomal preparations
Biochimi. Biophys. Acta (1021) : 39-45.
- 62. KASUMOV. K.M, and LIBERMAN. E.A (1973)**
Ionic permeability of biomolecular membrane in the presence of polyenic antibiotics.
Biophys. (18). p : 64-271.
- 63. KAVLOCK. R.J, REHNBERG. B, ROGERS. E.H (1985)**
Amphotericin B and folic acid induced nephropathies developing rats.
Toxicol. Application pharmacology (81) : 407-415.

64. KERRIDGE. D (1986)

Mode of action of clinically important antifungal drugs.
Advances in microbial, physiol (27) : 1-64

65. KHOO. S.H, ROND. J, and DENNING. D.W (1994)

Administering amphotericin B. A practical approach.
J. Antimicrob. Chemother 33 (2) : 203-213.

66. KITO. M, AKUTSU. H, GOKU. Y, SOHN. D.H, and YU. B.S (1987)

Association of polyene antibiotics with sterols.
Chem. Biol. Interactions (64) : 61-70.

67. KLIMOV. A.N, and NIKIFOROVA. A.A (1972)

Interaction of polyene antibiotics and serum lipoproteins.
Antibiotics (29) : 661-663.

68. KNEPPER. M, and BURG. M (1983)

Organisation of nephrom function.
Am. J. physiol (244). p : 579-589.

69. KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1977)

In vivo and in vitro effet of the polyene.
Microbiology (31) : 291-308.

70. KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1977)

Antifungal agents : recent developments.
Ann. Rev. Microbiol. (31) : 291-308.

71. KOLDIN. M.H, KOBAYASHI. G.S, BRAJTBVRG. J, and MEDOFF. G (1985)

Effect of elevation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipaproteins on amphotericin B induced toxicity in rabbits
Antimicrob. Agents chemother (28) : 144-145

72. KONA VEN. P.T (1985)

Le contrôle du cholestérol.
J. la Recherche (172) : 1472-1480.

- 73. KOTLER-BRAJTBURG. G-J, MEDOFF. G, KOBAYACHI. G.S, BOGGS. S, SCHLESSINGER. D, PANDEY. R.C, and RINGBART. K.I. (1979)**
Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects.
Antimicrob. Agents chemother. (15). Nº5 : 716-722
- 74. KRAUSE. H.J, and JULIANO. R.L (1988)**
Interactions of liposome incorporated amphotericin B with Kidney epithelial cell cultures.
Pharmacol (34) : 286-297.
- 75. KREFT. B, DEWIT. C, MARRE. R, and SACK. K (1991)**
Experimental studies on the nephrotoxicity of amphotericin B in rats.
J. antimicrobiol. chemother. (28) : 271-281.
- 76. LEGRAND. P, ROMERO. E, COHEN. B, and BOLARD. J (1992)**
Effects of aggregation and solvent on the activity of amphotericin B on human erythrocytes.
Antimicrob. Agents. Chemother. (36) : 2518-2522.
- 77. LITTLE. J.R, BLANKE. J.J, and MEDOFF. G (1978)**
Im Immune modulation and control of neoplasia by adjuvant therapy.
RAVEN. Press. New York . (80) : 381-387.
- 78. LIANOS. A, CIEZA. J, and BERNARDO. J (1991)**
Efect of salt supplementation on amphotericin B nephrotoxicity.
Kidney Int (40) : 302-308.
- 79. LUC. G, LECERT. J.M, BARD. J.M, HACHULLA. E, FRUCHART. J.C, and DEVULDER. B (1991)**
Abrégés du cholestérol et atherosclérose.
- 80. MADDUX. M.S, and BARRIERE. S.I. (1980)**
A review of complications of amphotericin B therapy - recommendations for prevention and management
Drug intelligence and clinical pharmacy (14) : 177-181

81. MC. CURDY. D.K, FREDERIC. M, and ELKINTOM. J.R (1986)

Renal tubular acidosis due to Amphotericin B.
J. Méd. (278) : 124-131.

82. MC GOWAN. J.E (1985)

Changing etiology of nosocomial bacteremia and fungemia and other hospital acquired infections.
Rev. Infect Dis (7) N°2 p : 357-370.

83. MEGHELLI. M, BOQUILLON. M, and BELLEVILL. E.J (1989)

Serum lipoprotein composition and amounts during the consumption of two different low protein diets followed by a balanced diet.
J. Nutrition Vol. (39) : 323-343.

84. MILLER. G.J and MILLER. N.E (1975)

Serum lipoproteins analysis.
Lancet I : 16-19.

85. MORTON. R.E (1990)

Interaction of lipid transfer protein with plasma lipoproteins and cell membranes.
Experientia (46) : 552-560.

**86. NENSETER. M.S, MYKLEBOST. O, BLOMHOFF. R, DREVSON. C.A,
NILSSON. A, NORUM. K.R, and BERG. T (1989)**

Low-density-lipoprotein receptors in different rabbit liver cells.
Biochem. (261) : 587 - 598.

87. NICHOLL. T, PHILLIPS. P, and JEWESSON. P.J (1994)

Amphotericin B use in a major acute care hospital
Clin - ther 16 (1) : 28-40.

88. PARKER J.C (1982)

The potentially lethal problem of cardiac-candidosis.
Am. J. clin. pathol (79) : 356.

89. PERKINS; W.R, MINCHEY. S.R, BOWL. C.T, SWENSON. C.E, POPESCU. M.C, PASTERNAK. R.F, and JANNOFF. A. (1992)
Amphotericin B-phospholipid interactions responsible for reduced mammalian cell toxicity.
Biochim. Biophys. Acta (1107) : 271 - 282.
90. POLIKANDRITOV LAMBROS. M, BOURNE. DWA, SYED. A.A, and JOHNSON. D.L (1997)
Disposition of aerosolized liposomal amphotericin B
J. Pharmaceutique Sciences. Vol. 86, N°9, p : 1066-1069
91. RAPP. R.P, GUBBINS. P.O, EVANS. M.E (1997)
Amphotericin B lipid complex.
Pharmacotherapy. Vol. 31, N. 10, p : 1174 - 1186.
92. RUBIN. S.I, KRAWIEC. D.R, GELBERG. H, and SHANKS. R.D (1989)
Nephrotoxicity of amphotericin B in dogs : a comparison of two methods of administration.
J. Veterinary. Research (53) : 23 - 28.
93. SABRA. R, and BRAUCH. R.A (1990)
Amphotericin B nephrotoxicity.
Durg safety. 5 (2) : 94 - 108.
94. SABRA. R.K, TAKAHASHI. K, BRANCH. R.A, and BADR. K (1990)
Mechanism of amphotericin B induced reduction of the glomerular filtration rate :
A micropuncture study.
J. pharmacol Exp ther (253) : 34 - 37
95. SAROSI G.A (1990)
Amphotericin B : still the gold standard for antifungal therapy
Post grad. Med (88) : 151 - 152, 155 - 161, 165 - 166
96. SAWAYA. B.P, BRIGGS. J.P, and SCHMERMANN J (1995)
Amphotericin B nephrotoxicity : the adverses consequences of altered membrane properties.
J. Am. Nephrol. Vol. 6, N. 2, p : 154 - 169.

97. SCHELL. R.E, TRAN. N.V, and BRAMHALL. J.S (1989)
Amphotericin B induced changes in renal membrane permeation : a model of nephrotoxicity.
Biochim. Biophys. Res (159) : 1165-1170.
98. SEABURG. J.H, and DASCNUBE. H.E (1960)
Experience with amphotericin B.
Ann. N.Y. Academy of Sciences (89) : 202 - 220.
99. SHAW. J.M, SHAW. K.V, YANOVICH. S, IWANIK. M, FUTCH. W.S, ROSOWISKY. A, and SHOOCK. L.B (1987)
Delivery of lipophilic drugs using lipoproteines.
Ann. N.Y. Academy of Sciences (81) : 507 - 527.
100. SOUZA. L.C, MARAMHAO. R.C, SCHREIER. S, and COMPA. A (1993)
In vitro and in vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with a triglyceride rich emulsion.
J. Antimicrob. Agents. Chemother. (32) : 123-132.
101. TERRELL. C.L and HERMANS. P.E (1987)
Antifungal agents used for deep seated mycotic infections.
Moy. clin Proc (62) : 1116 - 1128.
102. TOLIN J.P, RAIJ. L (1988)
Adverse effect of amphotericin B administration on renal hemodynamics in the rat.
J. Pharmacol. Exp. Ther (245) : 594 - 599.
103. TOLIN. J.P and RAIJ. L (1991)
Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat - protective effect of calcium channel blockade.
J. Am Soc. Nephrol. (2) : 98 - 102.
104. VERNES. A, and DEICAS. E (1989)
Sensibilité des levures aux antifongiques en milieu hospitalier : Evaluation au milieu liquide sur 394 souches sauvages.
J. Med. (10) : 340.

105. **VERNES. A, JACQUEMANT. P, and CAILLAUX. M (1978)**
Stabilité de la sensibilité de *Candida* à la 5-FC dans le nord de la France
Mycol. Med. (7) : 207.
106. **VERTUT. CROQUIN. A, BOLARD. J, CHABBERT. M, and GARY-BOBO. C. M (1983)**
Difference in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol - or ergosterol - containing phospholipid vesicles.
Biochimistry. (22) : 2939-2944.
107. **WANTANAKUMAKORN. C (1982)**
Treatment of systemic fungus infections.
Compr. ther (8) : 35-43.
108. **WARNOCK. D.W (1991)**
Amphotericin B : an introduction
J. Antimicrob. Chemother 28(suppl B) : 27-28.
109. **WASAN. K.M, and LOPEZ-BERESTEIN. C (1995)**
Modification of amphotericin B therapeutic index by increasing its association with serum high-density lipoproteins.
J. Sciences. Vol. 730. N°14. p 93-106.
110. **WASAN. K.N, BRAZEAU. G.A, KEYHANI. A, HAYMAN. A.C and LOPEZ-BERESTEIN. G (1993)**
Rôle of liposome composition and temperature on the distribution of amphotericin B in serum lipoproteins.
Antimicrob. Agents. Chemother. Vol. 37. N°2 : 246-250.
111. **WASAN. K.M, MORTON. R.E, ROSENBLUM. M.G, LOPEZ-BERESTEIN. G (1994)**
Decreased toxicity of liposomal amphotericin B due to association of amphotericin B with high density lipoproteins - Rôle of lipid transfer protein.
J. Pharmacol. Vol. 83. N°7. p : 1006-1011.
112. **WASAN. K.M, ROSENBLUM. M.G, CHEUNG. I, and LOPEZ-BERESTEIN. G (1994)**
Influence of lipoprotein associated amphotericin B on its renal cytotoxicity and antifungal activity.
Antimicrob. Agents. Chemother. Vol. 38. N°2. p 223-227.

113. YANO. Y, MONTEIRO J.L, and SEGURO. A.C (1994)

Effect of amphotericin B in water and urea transport in the Inner medullary collecting duct.

J. Am. Soc. Nephrol. Vol. 5, N° 1, p : 68-74