

Mog-Bio-28/02

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE DE TLEMCEN
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

Pour l'obtention du
DIPLOME DE MAGISTER

En Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Biochimie

PAR:

BEDRANE Mohammed El Amine

THEME

EFFET DES LIPOPROTEINES SERIQUES SUR LA
CYTOTOXICITE INDUITE PAR LES POLYENES MACROLIDES
EXEMPLE DE L'AMPHOTERICINE B, CHEZ LES CELLULES
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Soutenue le

Septembre 1996



Jury

- | | | |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|
| PRESIDENT | M ^{me} EL KEBIR E.Z. | Professeur |
| EXAMINATEUR | M' BENABADJI B. | Docteur ès.sciences |
| EXAMINATEUR | Mr CHABANE SARI D. | Maître de conférences |
| PROMOTEUR | Mr BENYOUCEF S.M | Docteur ès.sciences |

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

THESE

Présentée devant
L'UNIVERSITE DE TLEMCEN
INSTITUT DES SCIENCES DE LA NATURE

Pour l'obtention du
DIPLOME DE MAGISTER

En Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Biochimie

PAR:

BEDRANE Mohammed El Amine

THEME

EFFET DES LIPOPROTEINES SERIQUES SUR LA
CYTOTOXICITE INDUITE PAR LES POLYENES MACROLIDES
EXEMPLE DE L'AMPHOTERICINE B, CHEZ LES CELLULES
DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Soutenu le

Septembre 1996

Jury

PRESIDENT

M^{me} EL KEBIR E.Z.

Professeur

EXAMINATEUR

M' BENABADJI B.

Docteur ès.sciences

EXAMINATEUR

Mr CHABANE SARI D.

Maître de conférences

PROMOTEUR

Mr BENYOUCEF S.M

Docteur ès.sciences

REMERCIEMENTS

Ce travail a été entrepris aux laboratoires de biochimie de l'institut des sciences de la nature, de l'institut de médecine et du centre hospitalo-Universitaire de Tlemcen sous la direction de Monsieur M. BENYOUSSEF Docteur ès-sciences naturelles.

J'ai eu le privilège de travailler à ses côtés au laboratoire. J'ai toujours été impressionné par ses connaissances qu'il m'a généreusement prodiguées pour la préparation de mon mémoire. Il m'est agréable aujourd'hui de pouvoir lui exprimer tous mes remerciements.

- Madame EL KEBSIR F.Z, professeur en biologie à l'institut des sciences de la nature de l'université d'Oran.

- Monsieur BENABADJ J. B. , Docteur ès-sciences pharmaceutiques, chef de service du laboratoire de microbiologie et d'immunologie du centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

- Monsieur CHABANE-SARJ, Maître de conférence à l'institut des sciences de la nature de Tlemcen.

- Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail. Je vous prie de croire à mon profond et respectueux attachement.

- J'exprime tous mes remerciements à monsieur BOUCHERJF. K, directeur de l'institut des sciences de la nature de Tlemcen pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté et je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect.

- Mes remerciements les plus distingués vont particulièrement à tous les responsables de l'institut des sciences de la nature de Tlemcen.

- J'exprime ma gratitude à monsieur BOUDJLMJ, directeur du laboratoire vétérinaire de Tlemcen qui m'a accueilli dans son laboratoire.

- Je remercie très sincèrement tout le personnel de l'institut des sciences de la nature et tout le personnel du laboratoire de biochimie du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen pour leur aide précieuse.

SOMMAIRE

Introduction : Synthèse bibliographique	01
I . Caractéristiques de l'amphotericine B	02
II . Les lipoprotéines du sérum sanguin	07
1 - Classification	07
2 - Composition chimique	08
III . Saccharomyces cerevisiae, modèle de levure	09
1 - Transport membranaire de cations	09
2 - Métabolisme cellulaire du glucose	10
Matériel et méthodes	14
1 - Matériel biologique	14
1.1 - Cellules de saccharomyces cerevisiae	14
1.2 - Conditions de croissance	14
1.3 - Préparation de sphéroplastes	14
1.4 - Isolement des lipoprotéines sériques	15
1.4.1 - Réactifs	15
1.4.2 - Mode opératoire	16
2 - Préparation de solutions de travail	22
2.1 - Suspension cellulaire de saccharomyces cerevisiae	22
2.2 - Solution d'amphotericine B	22
2.3 - Solutions de lipoprotéines sériques	22
3 - Conditions expérimentales générales	22
3.1 - Expériences sur les cellules en phase de croissance	22
3.1.1 - Méthodes	23
3.1.2 - Dosages	23
a) Dosage de lipoprotéines totales	23
b) Dosage des lipides	23
3.2 - Expériences sur les cellules en état stationnaire	24

3.2.1 - Méthodes	24
a) Cas de lipoprotéines natives	24
b) Cas de lipoprotéines diluées	24
3.2.2 - Dosages	25
a) Dosage de potassium	25
b) Dosage des protéines totales	25
3.3 - Expérience au niveau du métabolisme cellulaire	25
3.3.1 - Méthodes	25
3.3.2 - Dosages	26
Résultats et discussion	27

Chapitre I : Effet des lipoprotéines sériques sur la cytotoxicité de l'amphotéricine B au niveau de la cellule entière, de saccharomyces cerevisiae en phase de croissance

1 - Introduction	27
2 - Effet des lipoprotéines lourdes, HDL sur l'inhibition de la croissance cellulaire de saccharomyces cerevisiae induite par 1µg/ml l'amphotéricine B	29
2.1 - Conclusion	30
3 - Effet des lipoprotéines lourdes, HDL sur l'action inhibitrice de la croissance cellulaire de saccharomyces cerevisiae à 2µg/ml d'amphotéricine B	33
3.1 - Conclusion	35
4 - Effet de doses croissantes d'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL	39
4.1 - Conclusion	43
5 - Effet du type de lipoprotéines (HDL) ou LDL, sur l'inhibition de la croissance cellulaire de saccharomyces cerevisiae, induite par 5µg/ml d'amphotéricine B	43
5.1 - Conclusion	48

Chapitre II : Effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité membranaire des cellules de saccharomyces cerevisiae en état stationnaire induite par l'amphotericine B

1 - Effet de l'amphotericine B libre sur la perméabilité membranaire au potassium des cellules de saccharomyces cerevisiae.....	51
1.1 - Cinétique de la fuite de potassium intracellulaire de cellules de saccharomyces cerevisiae induite par l'amphotericine B.....	51
1.1.1 - Cinétique de la fuite potassique durant 1h d'incubation.....	51
1.1.2 - Effet de l'amphotericine B sur la perméabilité membranaire au potassium pendant 2h d'incubation.	52
1.2 - Effet dose réponse.....	54
1.2.1 - Conclusion.....	55
2 - Effet de la croissance cellulaire	55
3 - Effet d'addition d'une source d'énergie	59
4 - Effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité au potassium induite par l'amphotericine B.....	62
4.1 - Cinétique de fuite du potassium intracellulaire	62
4.1.1 - Conclusion.....	65
4.2 - Effet dose-réponse de concentrations croissantes de lipoprotéines.....	66
4.2.1 - Effet de doses croissantes de l'amphotericine B	67
4.2.2 - Conclusion.....	72
5 - Effet de doses croissantes de lipoprotéines sur la perméabilité du potassium induite par l'amphotericine B.....	79
5.1-Effet des lipoprotéines sériques sur les cinétiques de fuite de potassium	80
5.2 - Effet de doses croissantes de lipoprotéines sériques sur l'étatstationnaire du potassium.....	85

6 - Conclusion	92
----------------------	----

**Chapitre III : Effet de l'amphotericine B sur le métabolisme cellulaire
de saccharomyces cerevisiae**

1 . Introduction	95
2 . Effet de l'amphotericine B sur la production du pyruvate.....	97
3 . Effet de l'amphotericine B au niveau de la glycolyse anaérobie.....	99
4 . Effet de l'amphotericine B au niveau du cycle de Krebs	106
5 . Conclusion	112
Discussion Générale	114
Conclusion Générale	120
Annexe	124
Références Bibliographiques.....	131

INTRODUCTION

Synthèse Bibliographique

Les infections dues aux levures et champignons sont diverses, et de plus en plus fréquentes. Malgré le nombre limité d'espèces pathogènes pour l'homme, celles-ci peuvent parfois être à l'origine des mycoses graves telles que les mycoses profondes ou généralisées, mettant souvent en jeu le pronostic vital, ces formes graves posent de difficiles problèmes thérapeutiques.

Les complications dues aux traitements antifongiques sont loin d'être négligeables. La néphrotoxicité est le majeur effet interne, parfois irréversible suite à la chimiothérapie antifongique. NEWMAN M. 1990.

Parmi les antifongiques utilisés en clinique, très peu sont suffisamment non-toxiques KERRIDGE D. 1986. Trois groupes majeurs de composés antifongiques, font l'objet d'une utilisation clinique : les polyènes, les dérivés azolés, et les allylamines thiocarbamate GEORGOPAPADAKOU N.H et WALSH T.J 1994.

Les antifongiques autres que les polyènes s'avèrent peu efficaces vis à vis des mycoses graves KIRRIDGE D. 1986, beaucoup sont d'applications exclusivement topiques, comme c'est le cas des dérivés azolés NEWMAN M. 1990, GEORGOPAPADAKOU N.H et WALSH T.J 1994. Les antifongiques polyènes, agissent contre la plupart des infections fongiques. Ces antifongiques sont, soit très toxiques, comme filipine, GRUDA I. et al 1980, soit efficaces, peu ou non toxiques, mais d'une utilisation très restreinte, qui est due souvent à l'apparition de résistance chez certains microorganismes, qui ne cesse d'augmenter. A titre d'exemple, la griseofulvine, antifongique efficace, se limite aux infections cutanées KOBAYASHI G.S et MEDOFF G. 1977. L'amphotéricine B est le seul polyène utilisé en clinique particulièrement approprié au traitement des mycoses profondes et généralisées en dépit de son importante toxicité aiguë et chronique, KERRIDGE D. 1986, JULIANO et al 1987, DROUHET E, et DUPONT B. 1988, BRAJTBURG J. et al 1990, GEORGOPAPADAKOU et WALSH TJ 1994.

L'absence de drogue efficace et non toxique, reste le problème majeur de la chimiothérapie antifongique. L'amphotéricine B reste jusqu'à présent l'antifongique de choix dans le traitement des infections fongiques systémiques GEORGOPAPADAKOU et WALSH 1994. Cependant, les complications qui peuvent résulter de traitements à l'amphotéricine B limitent fréquemment son utilisation. La néphrotoxicité et son effet majeur interne, MADDUX M. S et BARRIERE S.L 1980, GEORGOPAPADAKOU N.H et WALSH T.J 1994.

Une meilleure compréhension du mécanisme d'action et du mécanisme de toxicité sélective des macrolides polyéniques pourrait probablement permettre d'augmenter l'index thérapeutique, par une réduction de la toxicité aiguë et une conservation de l'efficacité antifongique.

I - Caractéristiques de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est un polyène macrolide extrait de streptomyces Nodosus. Sur le plan structural, l'amphotéricine B possède un noyau fermé par lactonisation (macrolactone), avec sept doubles liaisons conjuguées (heptaène), de caractère lipophile et une chaîne hydrophile renfermant des groupements hydroxyles libres, liés à un sucre aminé, la mycosamine (liaison β -glycoside), et à un groupement carboxylique, insoluble dans l'eau et de poids moléculaire élevé. La présence des groupements hydroxyles polaires et les doubles liaisons hydrophobes sur la face opposée du noyau macrolide, confère au polyène le caractère amphiphile, en plus des caractères chimiques KOBAYASHI et MEDOFF 1977, Vanden BOSSCHE H.V et al 1987.

Il est probable que le caractère amphiphile de l'amphotéricine B joue un rôle important dans le mode d'action des polyènes macrolides, vu leur action antifongiques vis à vis de systèmes biologiques variés, comme les levures et fongis, les cellules animales (globules rouge), les vésicules lipidiques etc ...

KOBAYASHI G.S et MEDOFF G. 1977. L'existence d'une importante face hydrophobe limite considérablement la solubilité de l'amphotericine B en milieu aqueux à un PH compris entre 6 et 7 où l'activité antifongique est maximale. L'amphotericine B est sous forme monomérique en phase aqueuse à des concentrations inférieures à $5 \cdot 10^{-8}$ M. A des concentrations supérieures, ces formes monomériques tendent à former des oligomères, puis des agrégats à partir de 10^{-6} M. NORMAN A. W et al 1972, RINNERT H. et al 1977, VERTUT CROQUIN. A. et al 1983. En revanche, l'amphotericine B est soluble dans des solvants organiques comme le diméthylsulfoxyde (DMSO ; 30 à 40mg/ml ou le diméthylformamide (DMF).

L'amphotericine B, fait partie des polyènes "larges", selon la taille du noyau macrolide LAMPEN et ARNOW 1963 in KOTLER. BRAJTBURG et al 1979. A de faibles concentrations, l'amphotericine B est fongistatique ($0,3 \mu\text{g/ml}$). La lyse cellulaire, ou effet fongicide n'est obtenu qu'à des concentrations beaucoup plus élevées ($2 \mu\text{g/ml}$) KOTLER BRAJTBURG J et al 1979. La concentration minimale inhibitrice (C.M.I), est comprise entre $0,25$ à $2 \mu\text{g/ml}$ (diagnostic de sensibilité du candida albicans, agar test). Bergan T. et VANGDAL M. 1983 in VANDEN BOSSCHE H. et al 1987.

Au début des années 1960, plusieurs laboratoires indépendamment présentent des expériences tardant à prouver que les polyènes, à faibles ou moyennes doses augmentent la perméabilité de la membrane cellulaire de plusieurs organismes, entraînant la fuite d'un nombre important de constituants cellulaires suivie à dose supérieure de la mort de la cellule JULIANO R.L et al 1987, CHERON M et al 1988, HARTSEL S.C et al 1991. Ces effets dépendent de la fixation des polyènes sur la membrane cellulaire. KOBAYASHI G.S et MEDOFF G 1977. Cependant, les polyènes sur la membrane cellulaire KOBAYASHI G. S et MEDOFF G 1977. Cependant, les polyènes sont actifs seulement sur les cellules eucaryotes. Ils sont sans effet sur les bactéries et protoplastes. BOLARD J. 1986. La présence de stérois membranaires ayant la fonction $3 \beta\text{-OH}$ et une chaîne latérale paraît être une exigence pour la sensibilité aux polyènes NORMAN A.W et al 1972. En effet,

certaines mycoplasmes pratiquement exempt de stérols par croissance en milieu dépourvu de cholestérol, sont insensibles à l'action polyénique, ils sont rendus sensibles, lorsque leurs membranes plasmiques sont enrichies en stérols par croissance en milieu contenant des concentrations variables en cholestérol ou en ergostérol. LAMPEN et al 1963, WEBER et KINSKY 1965 in GALE E.F 1974.

L'influence des stérols membranaires sur l'action polyénique est aussi observée, en comparant les pourcentages du flux de protons. VERTUT CROQUIN et al 1983, ou de cations BOLARD J. 1986 des vésicules membranaires en présence de l'amphotéricine B. Une fuite importante est alors enregistrée seulement quand les stérols sont présents. L'intensité de la perméabilité aux protons ou aux cations, dépend non seulement de la concentration en stérols, mais aussi de la nature du stérol incorporé. L'interaction polyène - stérol est également observée en solution aqueuse, Norman. A.W, et al 1972, Rinnert. H et al 1977, Gruda. I et al 1980, Kito.M et al 1987. L'induction de la perméabilité cellulaire réversible puis irréversible, ne serait due qu'à une action ionophorique de l'amphotéricine B à des doses faibles ou moyennes. En revanche, la mort cellulaire paraît être due à des dommages oxydatifs notamment des lipides membranaires, et à la fuite de constituants cellulaires essentiels. SOKOL-ANDERSON M.L et al 1986, BRAJTHBURG J et al 1990.

Il est généralement admis que l'amphotéricine B est sélectivement plus toxique vis à vis des cellules fongiques que vis à vis des cellules de mammifères. En utilisant comme index de toxicité la perméabilité induite de cations, notamment au potassium, cette toxicité intervient à des concentrations de l'ordre de 10^{-7} M chez les levures et fongis et à des concentrations de 10^{-6} M seulement chez les cellules mammifères. BOLARD J 1986. Cette toxicité sélective est attribuée à la présence d'ergostérol dans les membranes de cellules fongiques et de cholestérol dans les membranes de cellules mammifères. GRUDA T et al 1980, BOLARD J 1986, MARIKO KITO et al 1987, HARTSEL S.C et al 1991.

L'interaction polyène-stérol est hydrophobe impliquant en grande partie la chaîne des doubles liaisons du polyène. CHERON M et al 1988. La formation du complexe polyène-stérol induit un changement local de l'état physique de la membrane VANDEN BOSSCHE et al 1987. Actuellement, il est généralement admis que l'action de l'amphotéricine B sur les cellules eucaryotes, se traduit par une formation de complexes insolubles avec les stérols de la membrane cellulaire formant ainsi des pores, permettant la fuite des ions. LAMPEN J.O 1966 in DROUHET F et DUPONT B 1988, ANDREOLI T.E 1973, KOBAYASHI G.S et MEDOFF G 1977, BRAJTBURG J. et al 1990, HARTSEL S.C et al 1991. Cependant, les vésicules lipidiques sans stérols sont sensibles à l'amphotéricine B : ainsi une fuite significative de protons, CYBULSKA B et al 1981, ou de cations HARTSEL et al 1991, est enregistrée à une faible concentration de l'antibiotique. Les lipides autres que les stérols peuvent influencer la sensibilité des cellules à l'action polyénique, ainsi les résultats obtenus par GOPALA RAO. T.V et al 1985, montrent que l'enrichissement spécifique en phospholipides protège les cellules de *saccharomyces cerevisiae* contre l'action des polyènes. La présence de protéines et autres constituants membranaires peut aussi être essentielle à la fixation du polyène et à son interaction GOPALA Rao T.V et al 1985.

D'autre part, les polyènes exercent aussi des effets métaboliques : ils induisent en particulier une modification de la respiration cellulaire, caniaux I. et al 1984, se traduisant par une stimulation de la consommation d'oxygène, une dégradation de l'ATP en ADP, une diminution de la synthèse des composés azotés, des réserves glucidiques, des polyphosphates et des métabolites essentiels Drouhet E et al 1960 in DROUHET et DUPONT B. 1988.

En ce qui concerne les mécanismes d'action, selon JANOFF et al 1988, BRAJTBURG J et al 1990, la cytotoxicité de l'amphotéricine B semble être liée à la présence d'amphotéricine B libre, en quantité importante sous forme d'agrégats. Ces formes libres, selon JULIANO R.L et al 1987, peuvent facilement interagir avec les membranes des cellules fongiques et les membranes des cellules mammifères, induisant la toxicité chez les deux types de cellules.

La faible affinité du solvant désoxycholate vis à vis de l'amphotéricine B (Fungizone), ne permet pas, selon BOLARD J. 1986, d'augmenter la sélectivité de cet antifongique vis à vis des cellules fongiques.

En raison de son caractère fortement hydrophobe, l'amphotericine B est insoluble en phase aqueuse et instable. Une meilleure solubilisation de l'amphotericine B, pourrait réduire ces inconvénients, et une augmentation de la toxicité sélective de cet antifongique.

C'est dans cette optique que les fractions lipoprotéiques du sérum, structure chargée de cholestérol sont utilisées. En offrant un environnement hydrophobe, les lipoprotéines sériques peuvent réduire les formes d'agrégats de l'amphotericine B qui sont à l'origine de l'effet cytotoxique chez les cellules de l'hôte.

L'utilisation de l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines sériques, modifient probablement l'interaction de l'amphotericine B sous forme libre avec les cellules sensibles, par conséquent son effet cytotoxique. Les modifications de l'interaction implique aussi un changement des quantités de l'amphotericine B libres et leurs distribution en phase aqueuse entre les cellules cibles et les fractions lipoprotéiques. De telles modifications sont attendues, d'une part, sur la base du mécanisme d'interaction de l'amphotecine B, impliquant en grande partie les lipides membranaires, d'autre part, la composition chimique des fractions lipoprotéiques, utilisées comme molécules véctrices. Ainsi, l'interaction Amphotericine B cellule cible, peut être modulée suivant l'affinité de l'amphotericine B, vis à vis des fractions lipoprotéiques. Cette affinité varie en fonction d'une part du type de fractions lipoprotéiques et d'autre part, de leur concentration initiale dans la solution d'essai. BRAJTBURG J. et al 1990. Selon les mêmes auteurs, plus l'affinité de l'amphotericine B aux lipoprotéines sériques est importante, plus la concentration de l'amphotericine B libre en phase aqueuse est faible, et inversement. C'est un système à trois compartiments, l'amphotericine B libre en phase aqueuse se répartit entre, d'une part les cellules cibles, d'autre part les fraction lipoprotéiques. L'amphotericine B complexée aux lipoprotéines sériques, est en équilibre avec l'amphotericine B sous forme libre en phase aqueuse. La concentration de l'amphotericine B libre disponibles d'interagir avec les membranes des cellules cibles, peut être moduler d'une part, par la présence de quantités plus au moins

.....

importante de lipoprotéines sériques, d'autre part par l'effet compétitif des cellules cibles et des lipoprotéines vis à vis de l'antifongique.

Les phospholipides de la lipoprotéine véctrice peuvent influencer l'interaction de l'amphotericine B aux fraction lipoprotéiques. BRAJTBURG J. et al 1984.

En utilisant des lipoprotéines lourdes, HDL et des lipoprotéines légères, LDL qui sont différentes par leur composition en lipides et en protéines et par leur rapport cholestérol/phospholipides, il est possible que l'interaction de l'amphotericine B- cellules cibles soit différente. L'effet cytotoxique étant lié à l'interaction, Amphotericine B - cellules cibles, il est intéressant de savoir, si la présence de lipoprotéines sériques modifie la cytotoxicité induite par l'amphotericine B chez le saccharomyces cerevisiae.

II - Les lipoprotéines du sérum sanguin

Vu l'intérêt de l'utilisation des lipoprotéines sériques dans notre étude, nous avons pensé utile de donner un bref aperçu.

Les lipoprotéines sériques représentent la forme sous laquelle la plupart des lipides sont transportés dans le plasma PAPADOPOULOS N.M et KINTZIOS J.A 1969. Schématiquement, ces macromolécules sont constituées de phospholipides, de cholestérol libre et de protéines (ou apolipoprotéines), le noyau central étant constitué de lipides hydrophobes comme les esters de cholestérol et les glycérides. FRUCHART J.C 1984.

1 . Classification

Quatre grandes classes de lipoprotéines sériques, selon les critères élèctrophorétiques ou d'ultracentrifugation sont connues :

- Les chylomicrons qui migrent peu restent pratiquement au niveau du dépôt d'élèctrophorèse.

- Les Very low density lipoprotéins (VLDL) ou lipoprotéines de très faible densité correspondent aux pré-bêta lipoprotéines et migrent au niveau des α_2 globulines.

-
- Les low density lipoprotéins (LDL) ou lipoprotéines de faible densité ou bêta-lipoprotéines qui migrent au niveau des β globulines.
 - Les high density lipoprotéins (HDL) ou lipoprotéines lourdes ou α -lipoprotéines qui migrent au niveau des α 1 globulines.

2 . Composition chimique (Puchois P et al 1985)

Les lipoprotéines 'lourdes, HDL contiennent approximativement 50% de protéines et 50% de lipides (constitués eux-mêmes pour moitié de phospholipides, pour un quart de cholestérol estérifié pou 20% de triglycérides et pour 5 % d'acides gras on estérifiés). Elles assurent le transport sanguin des phostpholipides et, à un degré moindre, du cholestérol

Des lipoprotéines légères, LDL contiennent environ 25% de protéines pour 75% de lipides (constitués eux-mêmes par 20% de phospholipides, 15% de triglycérides, 50% de cholestérol estérifié, 12% de cholestérol libre et 3% d'acides gras non estérifié). Ces lipoprotéines transportent essentiellement du cholestérol.

Les lipoprotéines très légères, VLDL sont constituées de 10% de protéines et 90% de lipides (constitués eux-mêmes par 20% de phospholipides, 15% de cholestérol estérifié, 8% de cholestérol libre, 50% de triglycérides et 7% d'acides gras non estérifié.

Les chylomicrons sont composées de 1% de protéines pour 99% de lipides (constitués de 85% de triglycérides, 10% de phospholipides et 5% de cholestérol). Elles assurent le transport sanguin des triglycérides.

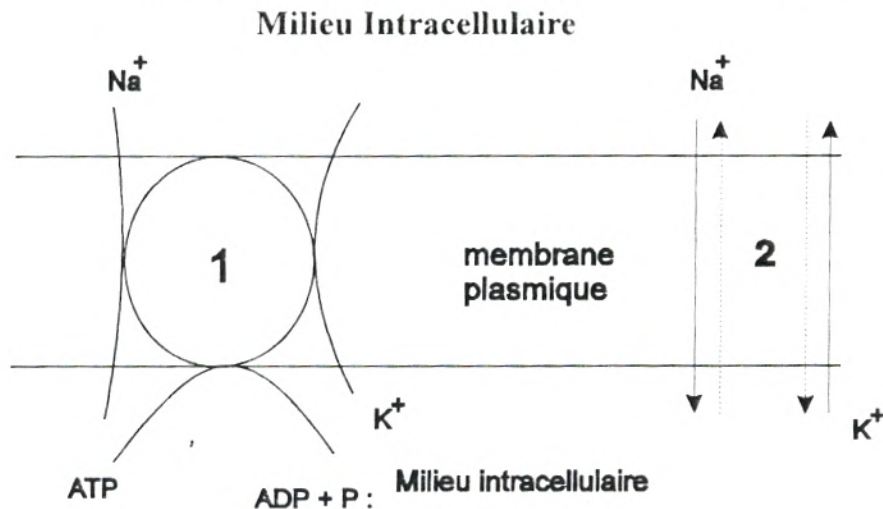
L'objectif principal de notre étude consiste en une estimation de la cytotoxicité de cette nouvelle formulation de l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines sériques vis à vis des levures. Dans notre travail nous avons utilisé les cellules de *saccharomyces cerevisiae*.

III - Saccharomyces cerevisiae, modèle de levures.

Les *Saccharomyces cerevisiae* (ascomycete) sont des cellules eucaryotes, hétérotrophes, non pathogènes, et ont fait l'objet de plusieurs investigations. Leur croissance se fait par bourgeonnement. Leur paroi cellulaire rigide est constituée essentiellement de polysaccharides, de chitine, de mannanes (polymères de mannose) et de glucanes (polymères de glucose). Leur membrane plasmique est semblable à celle des autres cellules eucaryotes. Le stérol majeur est l'ergostérol, avec une prédominance de la forme non estérifiée. Le *saccharomyces cerevisiae*, comme les autres levures, a un vrai noyau avec une membrane ou enveloppe nucléaire, des mitochondries, des vacuoles et un appareil de Golgi. La synthèse des macromolécules, la réplication de chromosomes, etc ... sont similaires aux processus des organismes supérieurs. STEWART G.G et RUSSELL I 1982.

1 . Transport membranaire de cations.

Le passage des ions Na^+ et K^+ à travers la membranaire est régi par les gradients ioniques, eux-mêmes dépendant de l'énergétique cellulaire. La présence d'une ATPase membranaire contribue à expulser les ions Na^+ hors de la cellule et à faire rentrer les ions K^+ , en utilisant l'énergie produite par la cellule sous forme d'ATP. (figure n° 1). De même des transports actifs souvent couplés (par exemple, celui du glucose couplé à celui de Na^+), sont liés à la présence de transporteurs, protéines transmembranaires à liaison spécifique mais temporaire. METAIS P et al 1980.



1 - Processus actif maintenant les gradients ioniques est constitué par une ATPase localisé dans la membrane qui requiert est des ions Na⁺, K⁺ et mg²⁺ pour son activité maximale.

2 - Diffusion passive ou le transport couplé des ions Na⁺ et leur entrée dans la cellule ou la sortie d'ions K⁺.

Figure 1 Transport membranaire de cations. Métais P et al 1980

2 Métabolisme cellulaire de saccharomyces cerevisiae

Le saccharomyces cerevisiae peut fermenter un grand nombre de sucres tels que le saccharose, le glucose, le fructose, le galactose, le maltose et le maltotriose. La première étape d'utilisation de plusieurs sucres par les levures et généralement :

- son passage intacte à travers la membrane, ou
- initialement hydrolysé dans le milieu extracellulaire, suivie par l'entrée dans le milieu intracellulaire de la plupart ou l'ensemble des produits hydrolysés. STEWART G.G et RUSSELL I. 1982.

Le glucose est dégradé par voie enzymatique (glycolyse) aboutissant à l'acide pyruvique dont la destinée diffère en fonction du milieu d'incubation. LEHNINGER A.L 1985.

- Voie anaérobie. L'acide pyruvique est réduit en acide lactique (fermentation lactique) catalysé de façon réversible par une lactico-déhydrogénase.

Dans le cas d'une fermentation alcoolique, l'acide pyruvique est réduit en éthanol + CO_2 . Dans un premier temps, le pyruvate issue de la dégradation du glucose subit une décarboxylation, catalysée par la pyruvate decarboxylase, Mg^{2+} dépendante, et fournit l'acetaldehyde qui sera réduit en éthanol et CO_2 . Dans cette étape le coenzyme, thiamine pyrophosphate (TPP), joue le rôle de transporteur du groupement aldéhyde issue de l'acide acétique.

- Voie aérobie. Processus intramitochondriale, le pyruvate subit une decarboxylation oxydative aboutissant à l'acetyl-coenzyme A, précurseur du cycle de Krebs.

Au niveau du cycle tricarboxylique, la condensation de l'acétyl co-A avec l'oxalo-acétate fournit de nouveau, le même substrat (oxaloacetate), par phosphorylation et décarboxylation de produits intermédiaires par une chaîne de réaction enzymatique (LEHNINGER A.L 1985). (Voir schéma n°1)

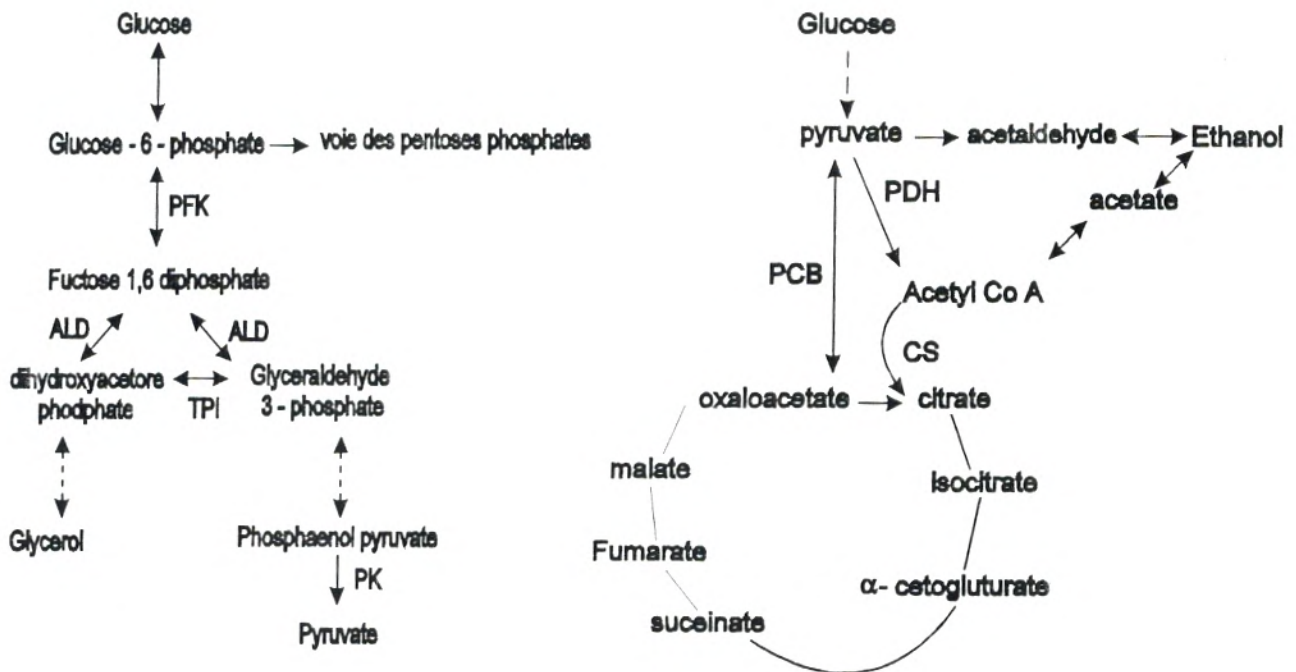


Schéma n° 1 : schéma simplifié des voies du métabolisme du glucose chez *Saccharomyces cerevisiae*, PFK, phosphofuctokinase ; TPI, triose phosphate isomérase ; PK, pyruvate kinase ; PCB, pyruvate carboxylase ; PDH, pyruvate dehydrogenase ; citrate synthase, WIETZERBIN J. et al 1992.

Une étude comparative de l'effet de l'amphotéricine B libre et complexé à des lipoprotéine sériques, alpha et bêta lipoprotéines, a été entreprise à trois niveaux :

1 . Effet sur la croissance cellulaire

Nous avons vérifié dans un premier temps, l'effet des lipoprotéines sériques sur l'action inhibitrice de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, induite par l'amphotéricine B. L'action inhibitrice de l'amphotéricine B, au niveau de la cellule entière de *saccharomyces cerevisiae* en phase de croissance, peut être suivie par une inhibition de la synthèse des protéines et des lipides (triglycérides).

2 . Effet sur la perméabilité ionique

Dans un deuxième temps, et pour évaluer les conditions expérimentales optimales de l'action cytotoxique de l'amphotéricine B sous sa forme libre, et de l'effet des lipoprotéines sériques, sur cette cytotoxicité, au niveau membranaire des cellules de *saccharomyces cervisiae*. Nous avons entrepris une étude comparative, au niveau de la perméabilité membranaire au potassium intracellulaire de ces cellules, en état stationnaire, comme index de l'effet toxique des polyènes antifongiques vu sa haute sensibilité.

Concernant l'amphotéricine B sous forme libre, l'effet d'état d'énergisation de la cellule de *saccharomyces cervisiae* et de l'effet de la concentration cellulaire sur la perméabilité au potassium induite par l'amphotéricine B ont été évalués.

Dans le cas, de l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines sériques, nous avons testé, d'une part, l'effet de concentrations croissantes de lipoprotéines sur l'action cytotoxique de l'amphotéricine B de concentration constante, aussi bien au niveau des cinétiques de fuite de potassium intracellulaire, qu'au niveau de l'état stationnaire de potassium. D'autre part, l'effet de concentrations croissantes de l'antifongique, en gardant la concentration des lipoprotéines sériques fixe.

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* sont isolées de leur milieu de culture en phase exponentielle et maintenues en état stationnaire dans un milieu salin de composition définie.

3. Effet sur le métabolisme, cellulaire

Enfin, pour une meilleure connaissance du mécanisme d'action et du mécanisme de toxicité de l'amphotéricine B, nous avons évalué l'impact de l'effet toxique de cet antifongique au niveau du métabolisme cellulaire de sphéroplastes de *saccharomyces cervisiae*. Des dosages enzymatiques de quelques métabolites de la glycolyse et du cycle de Krebs sont effectués.

Les sphénoplastes sont préparées à partir de cellules de *saccharomyces cervisiae* en phase de croissance exponentielle, lavées et resuspendues dans un milieu de composition définie.

MATÉRIEL & MÉTHODES



1. Matériel biologique :

1.1 - Cellules de *saccharomyces cerevisiae* :

Les cellules sont maintenues à 4°C dans la gélose sabouraud inclinée (de l'institut pasteur d'Algérie). Les cellules sont transférées dans le milieu d'épreuve, sabouraud liquide stérile (D⁺ glucose 20g/l, extrait de levures 3g/l, peptone 10g/l, PH 5,6)

1.2 - Conditions de croissance :

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* de la gélose sabouraud sont transférées en conditions stérile, dans 10ml de milieu de culture sabouraud liquide, PH 5,6 et incubées dans l'étuve à 37°C pendant 18 heures. Environ 0,5ml de la suspension cellulaire, sont introduits dans 10ml de milieu de culture stérile (préculture). Généralement 2 à 3 précultures sont effectuées pour une bonne viabilité cellulaire. La croissance étant suivie par des mesures de la densité optique, et la numération cellulaire (cellule de Thoma).

1.3 - Préparation de sphéroplast :

A la suspension concentrée cellulaire (dans environ 20ml de tampon phosphate 10mmol/l, PH 7,5 contenant le mannitol 0,9M), on ajoute 5ml de la solution de lyticase (100 unité par ml) (laboratoire sigma). Le mélange est incubé, sous agitation douce au bain-marie, 37°C pendant 1 heure, puis centrifugé à 1500 tr/min pendant 6 minutes. Le culot ainsi récupéré, est resuspendu dans une solution tampon tris-HCl 50 mmol/l, PH 7,5 contenant le mannitol 0,9 M/l et le sulfate de magnésium 10 mmol/l. La suspension de sphéroplast lavée avec le même tampon, puis centrifugée à 1500tr/min pendant 6 minutes. Le culot contenant essentiellement les sphéroplast est finalement resuspendu dans le tampon phosphate 100mmol/l PH 7,4 contenant le NaCl à 50 mmol/l (suspension d'épreuve de sphéroplast).

Le nombre de sphéroplaste viable (lecture à l'hémocytomètre, coloration au bleu de méthylène à 0,5%, de l'Institut Pasteur d'Algérie), est autour de $1,1 \times 10^9$ cellules ml⁻¹, correspondant à une concentration de 2,5 à 3,5 mg/ml de protéines cellulaires.

1.4 - Isolement des lipoprotéines sériques :

A défaut d'ultracentrifugation qui est la méthode de référence, nous avons isolé les fractions de lipoprotéines du sérum humain, par des méthodes de précipitation sélective. Ces méthodes permettent néanmoins d'isoler à l'état pur les lipoprotéines sériques. A forces ionique appropriée, les polyanions, en présence de certains cations bivalents précipitent sélectivement, les différentes lipoprotéines sériques. BURSTEIN M. et SAMAILLE J 1957, 1960 ; BURSTEIN M 1962, 1963 ; BURSTEIN M et al 1970.

1.4.1 - Réactifs

- a) solution de phosphotungstate sodique (origine Fluker), à 4%, PH7,6.
- b) Solution deux fois molaire de MgCl₂.

En utilisant la méthode de BURTEIN et al 1970, les quatres principales classes de lipoprotéines, sériques peuvent être séparées par des méthodes rapides et sélectives, qui dépendent de la précipitabilité des lipoprotéines par les polyanions en présence de cations bivalents. Le phosphotungastate, en présence de cations bivalents précipite les lipoprotéines sériques. L'acide phosphotungstiques est un hétéropolyacide inorganique qui possède, comme les polysaccharides sulfatés, des groupes polaires à forte charge électronégative, et exerce une activité de type héparinique. On peut ainsi précipiter les lipoprotéines à PH 7,6 avec un faible taux de phosphotungstate, en introduisant des cations bivalents. BURSTEIN M. 1963.

La précipitation des lipoprotéines à PH 7,6 en présence d'un taux approprié de phosphotungstate et de MgCl_2 , est complète et sélective. Le précipité séparé à partir d'un volume donné du sérum se redissout dans 1/10 de NaCl à 4p.100 de ce même volume, dans 1/20 d'oxalate de sodium 0,1M, dans du citrate de sodium 0,2M.

1.4.2 -Mode opératoire

A 1ml de sérum on ajoute 50 μl de la solution de MgCl_2 2M (concentration finale 0,1M), et après mélange, 12,5 μl de la solution de phosphotungstate à 4% (concentration finale 0,05%), (le tableau 1, résume les différentes concentrations finales des réactifs utilisés). Un trouble apparaît immédiatement, on centrifuge après 10 minutes à environ 6 000tr/min (centrifugeuse BEKMAN). Le sous-nageant parfaitement clair renferme les alpha et bêta lipoprotéines. Les VLDL flocculent à la surface du tube. En cas de sérum lipémique, les chylomicrons flocculent également Burstein et Samaille 1960. On peut flocculer sélectivement les VLDL et chylomicrons en abaissant soit le taux de phosphotungstate, soit celui de MgCl_2 BURSTEIN M. 1963. L'électrophorese du culot sur acétate de cellulose, avec la coloration des lipides au rouge ORO, montre la disparition de la bande des alpha et bêta lipoprotéines (fig. 2, d).

A 1ml du sous-nageant (concentrations finales 0,1M, 0,05% de MgCl_2 et phosphotungstate respectivement), on ajoute 47,5 μl de la solution de phosphotungstate à 4% (concentration finale 0,20%). Apparition d'un trouble après centrifugation pendant 10 minutes à 6000 tr/min, les bêta lipoprotéines se déposent au fond du tube. Le précipité ou culot renferme essentiellement les LDL, alors que le surnageant clair, exempt des lipoprotéines légères, renferme les alpha-lipoprotéines (HDL). L'électrophorèse du surnageant sur acétate de cellulose montre la disparition de la bande des bêta-lipoprotéines, avec persistance des alpha-lipoprotéines (fig.2a). De même, la solubilisation du culot, montre à l'électrophorèse la persistance de la bande des bêta-lipoprotéines, avec disparition de la bande des alpha-lipoprotéines (fig.2c).

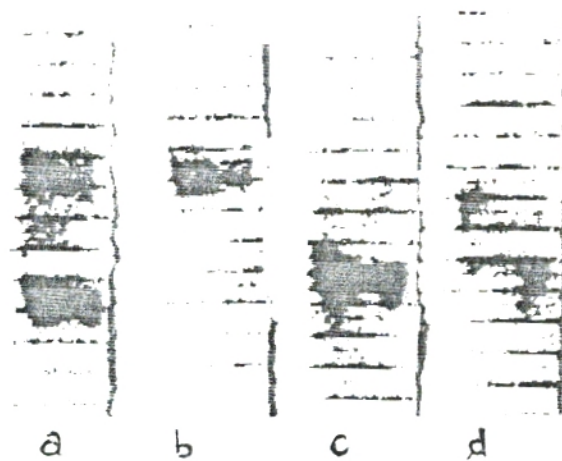


Fig.2 Electrophorese sur acetate de cellulose, du serum normal, avant et apres precipitation des fractions lipoprotéique par le phosphotungstate et $MgCl_2$ PH neutre, (coloration des lipides ou rouge ORO) (protéine, $\approx 5g/100$ ml, cholestérol $\approx 2g/l$).

a) serum avant la precipitation, **b)** même serum débarrassé des lipoprotéines de faible densité (HDL) **c)** β lipoprotéines (LDL), **d)** pré-B lipoprotéines (VLDL).

Tableau n° 1 : Concentration finales des réactifs pour la précipitation des lipoprotéines (Burstein M. et al 1970).

Réactifs	Chylomicrons plus VLDL	LDL	HDL
phosphotungstate (4%)	≈ 0,05 %	0,2 %	2,0 %
Mgcl ₂ (2M)	≈ 0,1 M	0,1 M	0,2 M

Cette précipitation est sélective, dans les mêmes conditions, sur sérum dépourvu de β lipoprotéines ne donne aucun trouble. Le taux minimum de phosphotungstate (Mgcl₂, 0,1M) est pratiquement indépendant du taux des B. lipoprotéines Burstein 1963. La lecture de la bande d'acétate de cellulose au densitomètre (Hélène) à 525nm, montre les différents pics des fraction lipoprotéiques isolées (fig.3, fig4) à partir du même sérum dont la figure 5 représente.

La concentration protéique du sérum et des fractions lipoprotéiques est estimée par la méthode de biuret. Le cholestérol total, est déterminé par la méthode enzymatique (KIT BOEHRINGER). Dans le tableau n° 2, sont réunis les données concernant la composition en pourcentage (protéines, cholestérol) des α et β lipoprotéines utilisées (5 préparations).

Tableau n° 2 composition des lipoprotéines isolées

a) teneur en protéines %, b) concentration en stérols (cholestérol) au %, c) rapport protéines/cholestérol.

Numéros	α - Lipoprotéines (HDL)			β - Lipoprotéines (LDL)		
	A	b	c	A	b	c
1	81,5	16	5,1	12,1	59,1	0,20
2	82,5	16,11	5,12	12,0	58,3	0,20
3	77,98	18	4,33	12,16	65,5	0,18
4	82,56	16,66	4,95	11,71	54,28	0,21
5	81,13	17,08	4,75	10,40	56,28	0,18
Moyenne	81,1	16,8	4,85	11,7	58,7	0,19

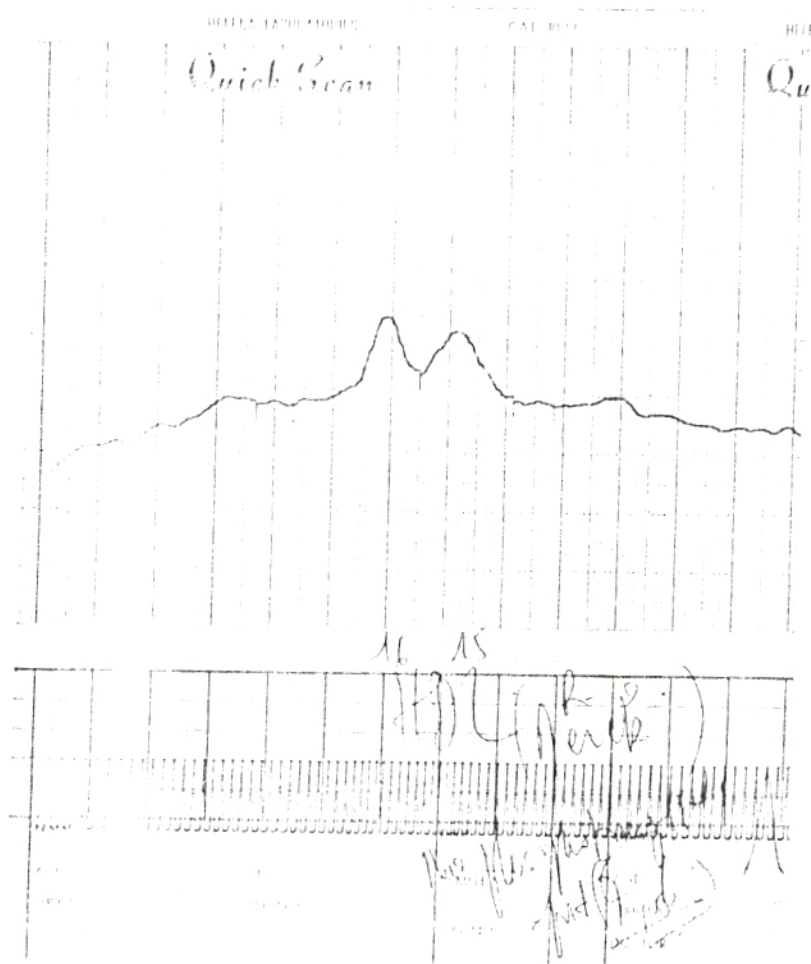


Fig 3 : Pics correspondant aux α lipoprotéines. (HDL).
précipitation par le phosphotungstate et $MgCl_2$.
(conc. finales 0,2% et 0,1M respectivement).

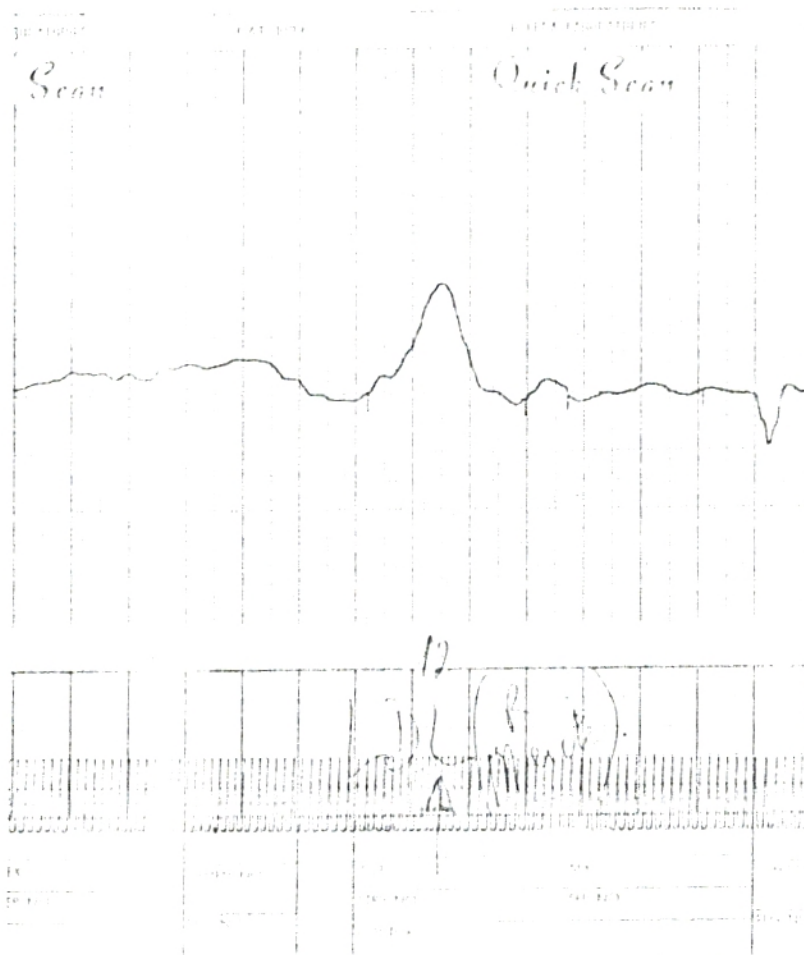


Fig4 : Pic correspondant au β lipoprotéines (LDL)
après précipitation par le phosphotungstate et le $MgCl_2$

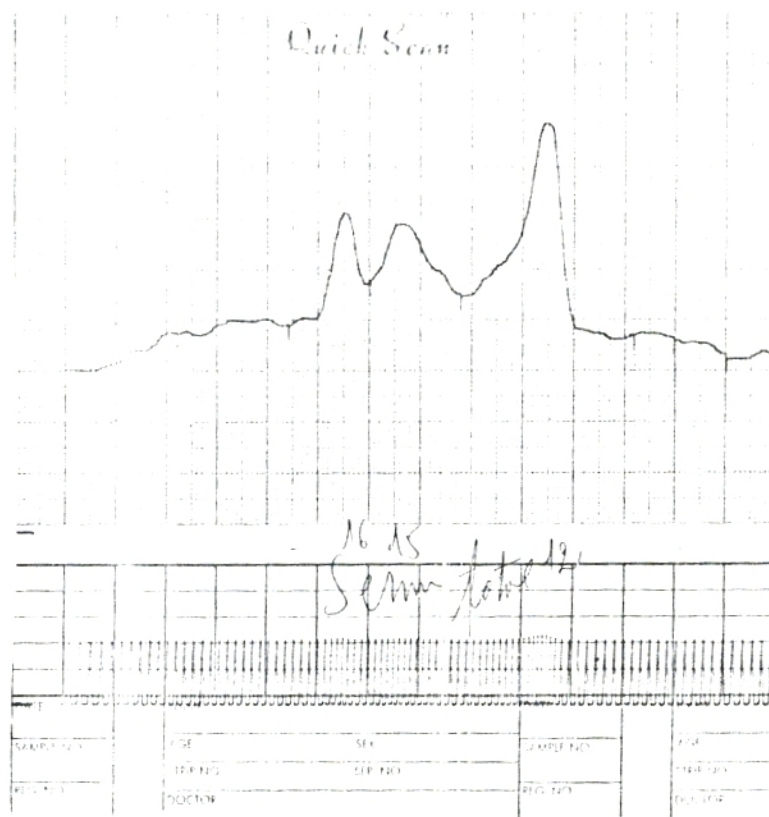


Fig.5 Tracé relatif aux fraction lipoprotéiques du sérum normal avant la précipitation.

2 . Préparation de solutions de travail

2.1 - Suspension cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*.

Les cellules sont incubées dans le milieu de culture sabourand liquide, PH 5,6 dans l'étuve à 37°C pendant environ 17 heures (1ere préculture). Deux à trois précultures sont généralement effectuées. Environ 0,5 ml du milieu de culture contenant des cellules *s.cerevisiae* de la dernière préculture sont introduits dans des fioles stériles, contenant environ 350ml de milieu de culture sabourand pH 5,6. Les cellules en phase exponentielle très sensibles aux antibiotiques polyéniques, (NDZINGE et al 1977) sont recueillis, par centrifugation pendant 10 minutes à 5000 tr/min, et lavées au tampon tris-Hcl, 50 mmol/l, pH 7,4. Le culot cellulaire est finalement resuspendu dans le même tampon (suspension cellulaire concentrée).

2.2 - Solution d'amphotericine β :

1mg d'amphotericine B pur (laboratoire Sigma) ou l'équivalent de 1mg sous forme désoxycholate (Laboratoire Squibb) est solubilisé dans 1ml de la solution de dimethyl sulfoxide.

2.3 - Solutions de lipoprotéines sériques :

Les fractions lipoprotéiques, HDL et LDL, fraîchement préparées sont filtrées aux fitres 0,50 μm , puis aux 0,22 μm (filtre millipore). Les fractions lipoprotéiques, HDL et LDL sont préincubées en présence de la solution d'amphotericine B dans l'étuve à 37°C pendant 30 minutes, avant d'être ajoutées au milieu contenant la suspension cellulaire de *saccharomyces cervisiae*

3 . Conditions expérimentales générales

3.1 - Expérience sur les cellules en phase de croissance

Les cellules de *saccharomyces cervisiae* sont incubées dans environ 10ml de milieu de culture sabourand liquide, pH 5,6, dans l'étuve à 37°C pendant environ 18h (préculture). Deux à trois précultures sont généralement effectués. Environ 0,5 ml de milieu de culture contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* de la

.....

dernière préculture, sont introduits dans une fiole stérile, contenant le milieu de culture sabouraud concentré deux fois (solution d'épreuve).

3.1.1 - Méthodes

En routine, un volume de milieu de culture concentré contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* (solution d'épreuve), en ajoute un volume de :

- Solution de NaCl - à 9 ‰ (cellule de contrôle)
- Solution de NaCl à 9 ‰ contenant la solution de l'amphotéricine B
- Solution de lipoprotéines lourdes, HDL stérile,
- Solution de lipoprotéines légères, LDL stérile,
- Solution de lipoprotéines lourdes, HDL stérile, préincubées à l'amphotéricine B pendant 30 minutes à 37°C.
- Solution de lipoprotéines légères, LDL stérile, préincubées à l'amphotéricine B pendant 30 minutes à 37°C.

Les fioles, contenant les différents solutions sont maintenues à l'étuve à 37°C pendant toute la durée de l'épreuve. Les cellules de chaque fiole sont récupérées séparément par centrifugation à environ 5000 tr/min pendant 10 minutes, lavées puis resuspendues dans une solution contenant le NaCl 9 ‰, et Mg Cl₂ 150 mmol/l. Le détergent S.D.S à 5% est ajouté après chauffage au bain marie bouillant pendant 2 minutes.

3.1.2 - Dosages

a - Dosage des protéines totales

La teneur en protéines totales est estimée en pourcentage, ou en unité arbitraire selon la méthode de biuret (méthode très peu sensible).

b - Dosage des lipides

La teneur en lipides (triglycérides, stérols) est estimée par la méthode enzymatique spécifique (KIT BOEHRINGER). Principe et mode opératoire (voir partie Annexe).

3.2 - Expériences sur les cellules en état stationnaire

3.2.1 - Méthode : le procédé expérimental diffère légèrement, selon que les lipoprotéines sériques sont utilisés sous forme natives ou diluées.

a - Cas de lipoprotéines natives :

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* fraîchement préparées, mises en suspension dans le tampon tris-Hcl, 50 mmol/l, PH 7,5 sont recueillie, par centrifugation à environ 5000 tr/min pendant 5 à 10 minutes. Le culot cellulaire est de nouveau resuspendu selon les conditions suivantes :

- Solutions de NaCl 9 ‰, sans amphotericine B et sans lipoprotéines (contrôle),
- Solution de NaCl 9 ‰, contenant la solution d'amphotericine B,
- Solution de lipoprotéines lourdes, HDL native préincubées à 37°C pendant 30 minutes en présence d'amphotericine B,
- Solution de lipoprotéines légères, LDL native préincubées en présence de l'amphotericine B pendant 30 minutes à 37°C.

b - Cas de lipoprotéines diluées :

A un volume de lipoprotéines sériques (préincubées à l'amphotericine B pendant 30 minutes à 37°C) on ajoute 1 volume dans le cas d'une dilution au 1/2 etc... de la suspension cellulaire concentrée. Les conditions sont identiques de celle du premier cas.

Dans les deux cas cités ci-dessus ; les tubes sont maintenus au bain-marie à 37°C pendant la période de la réaction. Chaque tube, contient environ 10mmol/l de glucose comme source d'énergie. Les tubes à essais sont ensuite centrifugés à environ 5000 tr/min pendant 3 minutes. Le culot cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, sur lequel sont entrepris les dosages est resuspendu dans 1ml de la solution de NaOH (2N), puis chauffé au bain marie bouillant pendant 2 minutes avant d'introduire finalement 1,5 ml de la solution du détergent triton X100, 0,5 %.

Le nombre de cellules viables de la suspension cellulaire de chaque conditions est déterminé par la lecture sur lame de l'hemocytomètre (cellule Thoma) après coloration au bleu de méthylène (0,5%) pendant 10 minutes à la température ambiante. La densité de la concentration cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* est ajustée à environ $1,5 \cdot 10^8$ à $5 \cdot 10^8$ cellules viables-ml⁻¹, l'équivalent de 0,65 à 2g/l de protéines cellulaires.

3.2.2 - Dosages :

a) Dosage du potassium :

Le dosage du potassium est réalisé par photométrie de flamme, spectrophotomètre de flamme (Eppendorf) au service de biochimie du CHU de Tlemcen.

b) Dosage des protéines totales :

La teneur en protéine totales est estimée par la méthode de LOWRY et al 1951, (réactif de Folin).

3.3 - Expérience au niveau du métabolisme cellulaire

3.3.1 - Méthode :

La suspension de sphéroplastes (solution d'épreuve), est répartie dans deux tubes à essai en partie égale, puis placés dans le bain marie à 37°C durant la période de la réaction.

Le tube à essai, sans amphotéricine B est utilisé comme référence, le second contient environ 5µg/ml d'amphotéricine B (concentration finale).

L'ajout du glucose dans chacun des deux tubes, comme source de carbone (concentration finale, de 100mmol/l de solution), marque le début de la réaction.

L'échantillonnage s'effectue comme suit : Un volume de suspension de sphéroplastes est introduit dans quatre volumes de la solution de NaCl 150 mmol/l contenant le $MgCl_2$ à 2mmol/l glacée. On centrifuge dans les minutes qui suivent pendant 10 minutes entre 4000 et 5000 tr/min. Le culot cellulaire de sphéroplaste récupérés est lysé par une solution d'acide perchlorique 1,5m/l. Le pH est neutralisé dans les secondes qui suivent par la solution tris-basique, 2M/l (V/V).

3.3.2 - Dosages :

La concentration des différents métabolites (pyruvate, Lactate, citrate, iso-citrate, acétate) est estimée par la méthode enzymatique (KIT BOEHRINGER), avant et après l'addition du glucose. (Principe et mode opératoire, calcul, voir partie Annexe).

La concentration en protéines cellulaires est déterminée par la méthode de Lawry et al 1951, au réactifs de FOLIN.

RÉSULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE I

Effet des lipoprotéines sériques sur la cytotoxicité
de l'amphotéricine B au niveau de la cellule entière,
S.Cerevisiae en phase de croissance

1 Introduction

L'effet inhibiteur de la croissance cellulaire par des polyènes macrolides est fortement modulé par l'environnement in vitro. Kerridge D. 1986, Gottlieb et al 1958 sont les premiers à avoir rapporté que l'addition de stérols dans le milieu de culture protège les cellules fongiques de l'action inhibitrice des polyènes. Cette protection résulte, in vitro d'une interaction entre polyène et stérols, avec une diminution conséquente de la concentration efficace du polyène (Lamper et al 1960).

Des expériences de comigration Amphotéricine-lipoprotéines, montrent que l'amphotéricine B peut se complexer aux lipoprotéines sériques. (KLIMOV et NIKO FOROVA 1972 BRAJTBURG J et al 1984). L'interaction de l'amphotéricine B aux fractions lipoprotéiques, stabilisent l'activité cytotoxique des antifongiques polyènes.

Selon KLIMOV et NIKOFOROVA 1972, BRAJTBURG J et al 1984, 1990, le cholestérol non-esterifié des lipoprotéines sériques constitue le site de complexation à l'amphotéricine B. La différence d'affinité selon le type de fractions lipoprotéiques, induit une différence de l'interaction Amphotéricine B-lipoprotéines. D'après Brajtborg et al 1990, l'interaction est plus importante avec les lipoprotéines légères, LDL qu'avec les lipoprotéines lourdes, HDL.

Des modifications de l'interaction Amphotéricine B- cellule cible sont possibles en présence de lipoprotéines sériques. Ces modifications dépendent d'une part des caractéristiques des lipoprotéines sériques utilisées comme molécules vectrices, d'autre part, du contenu en stérols de la cellule cible en question.

Il est connu que l'amphotéricine B, présente une grande affinité aux membranes contenant de l'ergostérol (stérol majeur des membranes fongiques). De ce fait, l'amphotéricine B sous forme libre est très toxique vis à vis des levures et fongis. Comme les fractions lipoprotéiques (HDL, ou LDL), diffèrent dans leur composition qualitative et quantitative, en lipides (triglycérides, phospholipides, stérols) et en protéines (apoprotéines) elles sont susceptibles de moduler différemment les quantités d'amphotéricine B libre dans le milieu et par la même ,

l'interaction de l'antifongique avec la cellule cible responsable de l'effet toxique. Ces modifications peuvent conduire à une concentration de l'antifongique libre suffisante pour induire un effet toxique chez les cellules fongiques, mais insuffisante pour affecter les cellules de l'hôte. C'est sous cet angle que plusieurs investigations ont été menées.

Les études de l'effet des lipoprotéines sériques sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez des cellules animales montrent que :

- Chez le globule rouge (Mme BOUCHERIT), l'addition des lipoprotéines dans le milieu, réduit la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B. Les lipoprotéines sériques, HDL ou LDL, assurent la protection du globule rouge humain même en présence de concentrations élevées d'amphotéricine B (10 fois la CMI). Cependant, l'effet protecteur des lipoprotéines légères, LDL est inférieure à celui observé avec les lipoprotéines lourdes, HDL.

- Chez les cellules rénales (WASAN K.M et al 1994), c'est seulement l'amphotéricine B liée aux lipoprotéines lourdes, HDL qui réduit l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B.

Dans le cadre d'une thérapeutique, la réduction de l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B liée aux lipoprotéines sériques, aussi bien chez le globule rouge que chez les cellules rénales, est un résultat encourageant.

Mais, avant d'aller plus avant et de chercher à élucider les mécanismes d'action, il est nécessaire, en utilisant les mêmes conditions que chez le globule rouge, c'est à dire des lipoprotéines lourdes HDL ou des lipoprotéines légères, LDL de vérifier si l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines garde son efficacité sur les levures.

La croissance des cellules de *saccharomyces, cerevisiae* sur milieu sabouraud liquide glucosé, en l'absence ou en présence d'amphotéricine B libre ou complexée aux lipoprotéines est suivie par la mesure de la densité optique, et par la production des protéines et des lipides. La production de lipides est suivie par un seul élément, triglycérides.

2 Effet des lipoprotéines lourdes, HDL sur l'inhibition de la croissance de *saccharomyces cerevisiae*, induite par 1 µg / ml d'amphotericine B.

Les figures n° 6 et 7, représentent l'effet des lipoprotéines lourdes, HDL (de concentration en cholestérol total de l'ordre de 0,16 g/l) sur l'effet inhibiteur de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* induit par 1µg/ml d'amphotericine B. Cet effet est suivi par l'évolution de la densité optique ($\lambda = 710$ nm), figure n° 6 et celle de protéines cellulaires (figure n° 7). Les cellules sont incubées pendant 15h30 minutes à 37°C :

- Soit en l'absence aussi bien de lipoprotéines, que de l'amphotericine B(courbe a).
- Soit en présence de lipoprotéines lourdes, HDL à une concentration en cholestérol total de moitié celle du plasma sanguin (courbe b).
- Soit en présence de lipoprotéines lourdes, HDL préincubées avec 1µg/ml d'amphotericine B pendant 30 minutes à 37°C (courbe c).
- Soit en présence de l'amphotericine B à 1µg/ml (courbe d).

- La courbe (a) des figures n° 6 et 7, montrent qu'en l'absence Amphotericine B et de lipoprotéines sériques, aussi bien la densité optique que la concentration de protéines, varient de façon sigmoïdale en fonction du temps. L'introduction de l'inoculum au temps zéro, dans le milieu de culture sabouraud liquide glucosé, montre un début de croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* après une phase de latence de l'ordre de 1h30 minutes, et un temps de génération d'environ 1h. La phase de latence étant suivie par une phase exponentielle à partir de 2h d'incubation, où la production de protéines devient importante et atteint un maximum au bout de 12h d'incubation, suivie de la phase stationnaire, la concentration en protéines reste constante jusqu'à 15h30 d'incubation.
- L'addition de l'amphotericine B sous forme libre à 1µg/ml (courbe d), dans le milieu de culture au même temps que l'inoculum (temps zéro) induit une augmentation de la phase de latence et du temps de génération qui passent respectivement de 1h30min à 11h et de 1h à 4h. L'estimation de la concentration

protéique, montre que l'amphotéricine B, induit une inhibition totale de la production protéique pendant toute la durée d'incubation. Cet effet apparaît nettement à 12h d'incubation par rapport aux cellules sans traitement préalable à l'amphotéricine B qui montrent un maximum de production protéique.

- En revanche, la présence de l'amphotéricine B à 1µg/ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL (courbe c), au même moment que l'inoculum au temps zéro, induit une réduction importante de la phase de latence et du temps de génération qui passent respectivement de 11h à 30min et de 4h à 40min par rapport aux cellules traitées à l'amphotéricine B seulement (courbe d).

La production protéiques est globalement similaire à celle des cellules intactes, sans traitement ni à Amphotericine B, ni aux lipoprotéines sériques. Cependant un maximum de production protéique n'est atteint qu'au bout de 14h d'incubation à 37°C.

- L'addition de lipoprotéines lourdes, HDL en l'absence d'amphotéricine B (courbe b), stimulent de manière significative la croissance des cellules de *saccharomyces cerevisiae*. Cet effet apparaît aussi bien au niveau de la densité optique, que de la production protéique. En effet, une réduction importante de la phase de latence et du temps de génération qui passent respectivement de 1h30min à 30min et de 1h à 40 min, et une production importante de protéines, environ 40% de plus au bout de 14h d'incubation par rapport aux cellules intactes.

2.1 Conclusion

L'amphotéricine B sous forme libre induit une forte inhibition de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*. Cet effet apparaît nettement aussi bien au niveau de la densité optique que de la production de protéines. Cependant, la présence de lipoprotéines lourdes, HDL, induit un effet protecteur important. Cet effet apparaît par une réduction importante de la phase de latence et du temps de génération, et par une évolution importante de protéines par rapport aux cellules traitées à l'amphotéricine B seulement.

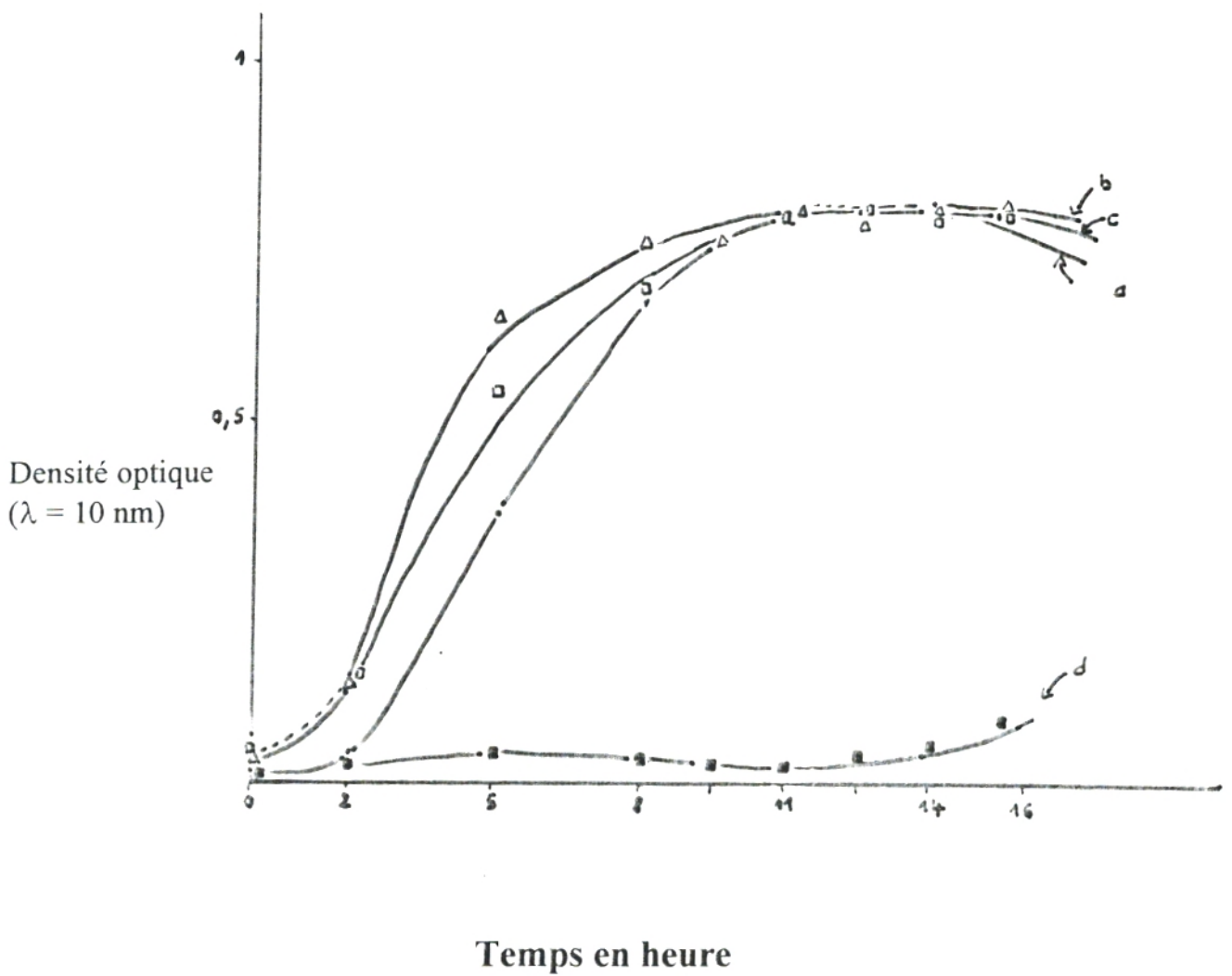


Fig N°6 : Effet des lipoprotéines lourdes sur la croissance du saccharomyces cerevisiae en présence de $1\mu\text{g/ml}$ d'amphotericine B.

- (Courbe a) : Cellules saccharomyces. cerevisiae seule.
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae en présence de lipoprotéines lourdes, HDL.
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B ($1\mu\text{g/ ml}$) complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL.
- (Courbe d) : Cellules S. cerevisiae traitées à l'amphotericine B ($1\mu\text{g/ ml}$).

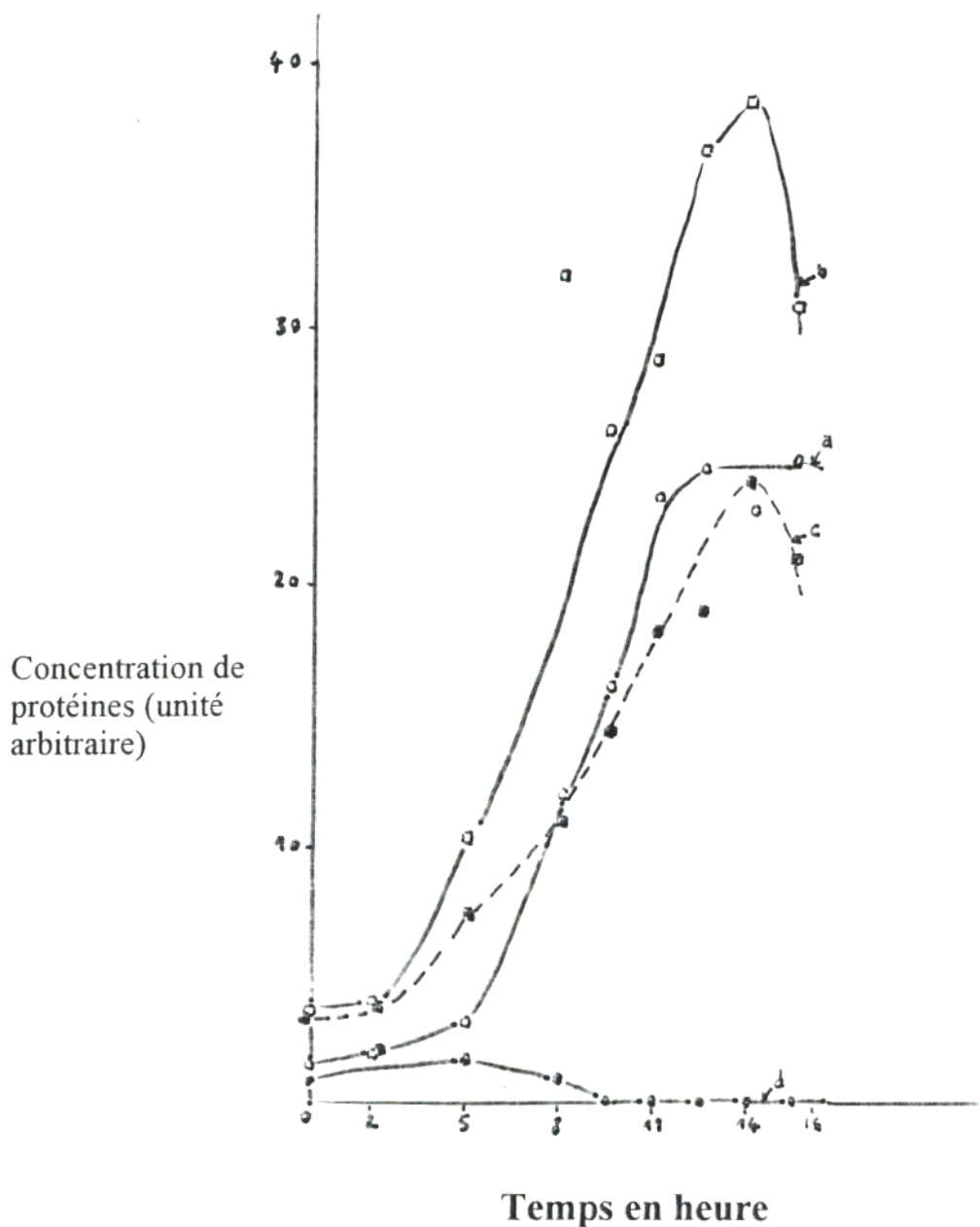


Fig N°7 : Effet des lipoprotéines sur l'inhibition de la synthèse protéique induite par (1µg / ml) d'amphotericine B

- (Courbe a) : Cellules saccharomyces. cerevisiae seule.
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae en présence de lipoprotéines lourdes, HDL.
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B (1µg / ml) complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL.
- (Courbe d) : Cellules S. cerevisiae traitées à l'amphotericine B (1µg / ml).

La présence de lipoprotéines lourdes HDL, en l'absence de l'amphotéricine B, stimulent fortement la croissance de *saccharomyces cerevisiae*, en induisant une forte production protéique et une réduction du temps de génération et de la phase de latence.

En effet, les lipoprotéines sériques sont susceptibles d'échanger les lipides et les protéines qu'elles renferment. Le sens des échanges peut être conditionné, en présence de l'amphotéricine B suivant les valeurs relatifs du rapport cholestérol/phospholipides. BRAJTBURG J et al 1984.

Dans nos conditions expérimentales, l'addition de lipoprotéines sériques au milieu de culture, modifie d'une part la croissance des cellules de *saccharomyces cerevisiae* en l'absence d'amphotéricine B (stimulation de la croissance cellulaire), et d'autre part, protègent les cellules de l'effet inhibiteur de cet antifongique sous forme libre. A $1\mu\text{g/ml}$ d'amphotéricine B, il est fort probable que l'antifongique polyène se trouve entièrement lié aux lipoprotéines sériques. Nous pouvons conclure, que les lipoprotéines sériques augmentent la solubilité de l'amphotéricine B, et diminuent par conséquent sa toxicité due à l'amphotéricine B libre en phase aqueuse. JANOFF et al 1988, BRAJTBURG et al 1990.

Une augmentation de la concentration de l'amphotéricine B, pourrait permettre de modifier l'affinité de cet antifongique vis à vis des lipoprotéines sériques, et par conséquent moduler l'interaction Amphotéricine B- cellule cible.

3 Effet des lipoprotéines lourdes, HDL sur l'action inhibitrice de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, à $2\mu\text{g/ml}$ d'amphotéricine B.

Les figures n° 8, 9 et 10, représentent l'effet de l'amphotéricine B à $2\mu\text{g/ml}$, sur la croissance des cellules de *saccharomyces cerevisiae* pendant 18h d'incubation à 37°C , en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes, HDL à une concentration de cholestérol total d'environ $0,15\text{g/l}$.

Les lipoprotéines sériques sont préincubées en présence de l'amphotericine B à 37°C pendant 30 minutes, avant être ajoutées dans le milieu de culture de *saccharomyces cerevisiae*.

- L'introduction de l'inoculum dans le milieu de culture sabouraud liquide glucosé, en l'absence de l'amphotericine B et de lipoprotéines, montre une évolution de la densité optique et une augmentation de la concentration de protéines et de lipides (triglycérides), en fonction du temps. Les courbes obtenues sont représentées sur les figures 8, 9 et 10 (courbe a).

La mesure de la densité optique montre un début de la phase exponentielle de croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, d'un temps de génération de l'ordre de 40 minutes, précédant une phase de latence d'environ 2h d'incubation. La phase stationnaire n'est atteinte qu'à partir de 14h d'incubation. La phase exponentielle montre une évolution importante de protéine et de lipide (triglycérides). Un maximum de production protéiques est observé au bout de 16h d'incubation, et seulement 10h30min sont nécessaire de production en triglycéride, soit environ 0,9g/l de solution.

- L'addition de l'amphotericine B sous forme libre à 2µg/ml (courbe d), dans le milieu de culture au même temps que l'inoculum (temps zéro), induit une augmentation de la phase de latence et du temps de génération qui passent respectivement de 2h à 9h et de 40min à 4h30min. L'amphotericine B libre induit une inhibition totale de la production de protéines et de triglycéride pendant 18h d'incubation à 37°C.
- L'introduction de l'inoculum au même temps que l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL (courbe b) montre aussi une augmentation de la phase de latence et du temps de génération cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* qui passent de 2h à 4h30min et de 40min à 4h respectivement. L'effet inhibiteur de la croissance cellulaire, induit par l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL apparaît nettement, aussi bien au niveau de la production de protéines que de lipides (triglycérides). En effet 10% de la

production de protéines et seulement 4% de lipides, soit environ 40mg/l de solution, par rapport aux cellules intactes, qui montrent un maximum de production au bout de 16h et de 10h30 min d'incubation respectivement. On note une inhibition totale de la production en triglycérides au bout de 18h d'incubation.

3.1 Conclusion :

L'amphotéricine B sous forme libre à 2µg/ml, induit une forte inhibition de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, observée par une inhibition totale de la production de protéines et de lipides (triglycérides), au bout de 18h d'incubation à 37°C.

L'addition de l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL dans le milieu de culture de *saccharomyces cerevisiae*, produit le même effet inhibiteur net. Cet effet est nettement observé au niveau de la production de protéines et de triglycérides.

La présence de lipoprotéines lourdes, HDL ne modifie pas l'effet inhibiteur de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, induit par 2µg/ml d'amphotéricine B. En effet, moins de 5% de la production de protéines et de triglycérides sont enregistrées durant 12h d'incubation à 37°C, par rapport aux cellules intactes n'ayant été traitées ni à l'amphotéricine B, ni aux lipoprotéines sériques. A 2µg/ml d'amphotéricine B, l'effet protecteur des lipoprotéines sériques, HDL est réduit.

Il ressort des résultats obtenus jusqu'à présent, que l'effet protecteur des lipoprotéines lourdes, HDL observé à 1µg/ml d'amphotéricine B, se réduit considérablement pour une concentration double. Selon Brajtburg J et al 1990, l'affinité des lipoprotéines sériques vis à vis de l'antifongique polyène varie d'une part en fonction du type de fractions lipoprotéiques utilisées (HDL ou LDL) et d'autre part de leur concentration initiale dans la solution de travail.

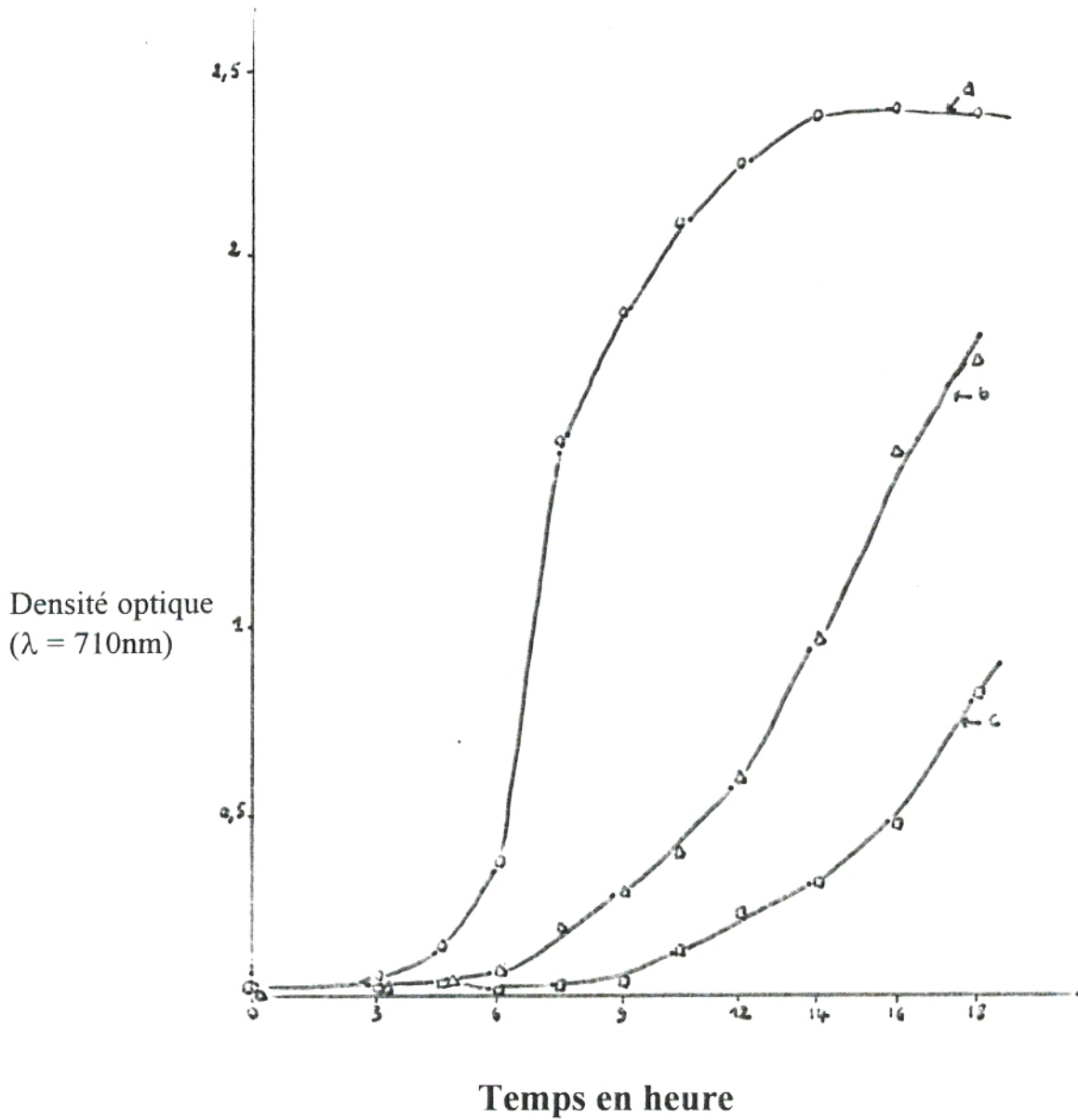


Fig N° 8 : Effet de l'amphotericine B sur la croissance du saccharomyces cerevisiae en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes, HDL.

- (Courbe a) : Saccharomyces seule (contrôle).
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae traité à l'amphotericine B à 2 µg / ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL.
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae traité à l'amphotericine B à 2 µg / ml

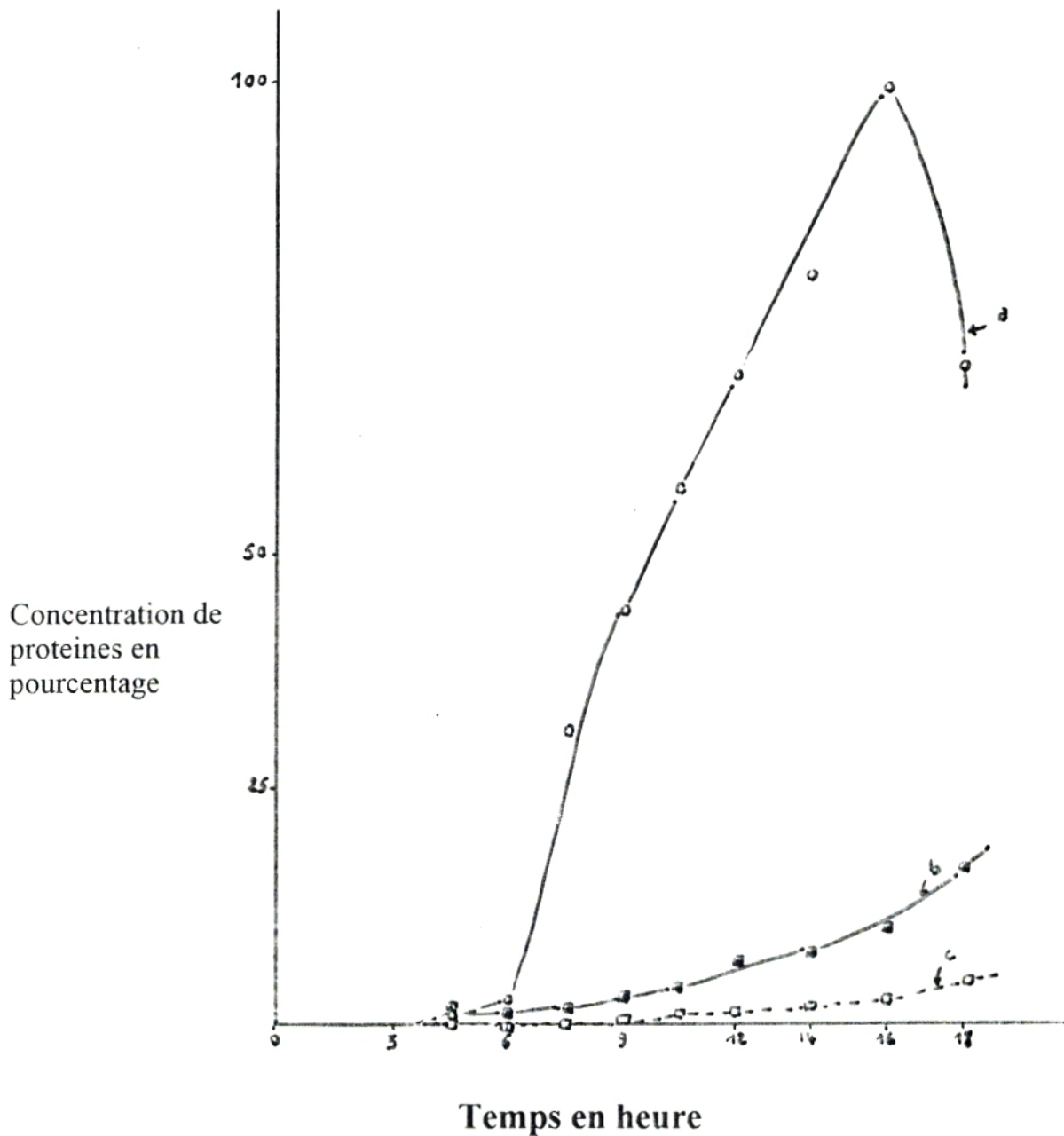


Fig N° 9 : Effet des lipoprotéines (HDL) sur l'effet inhibiteur de la synthèse protéique des cellules en phase de croissance par l'amphotericine B

- (Courbe a) : Saccharomyces seule (contrôle).
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae traité à l'amphotericine B à 2 µg / ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL.
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae traité à l'amphotericine B à 2 µg / ml

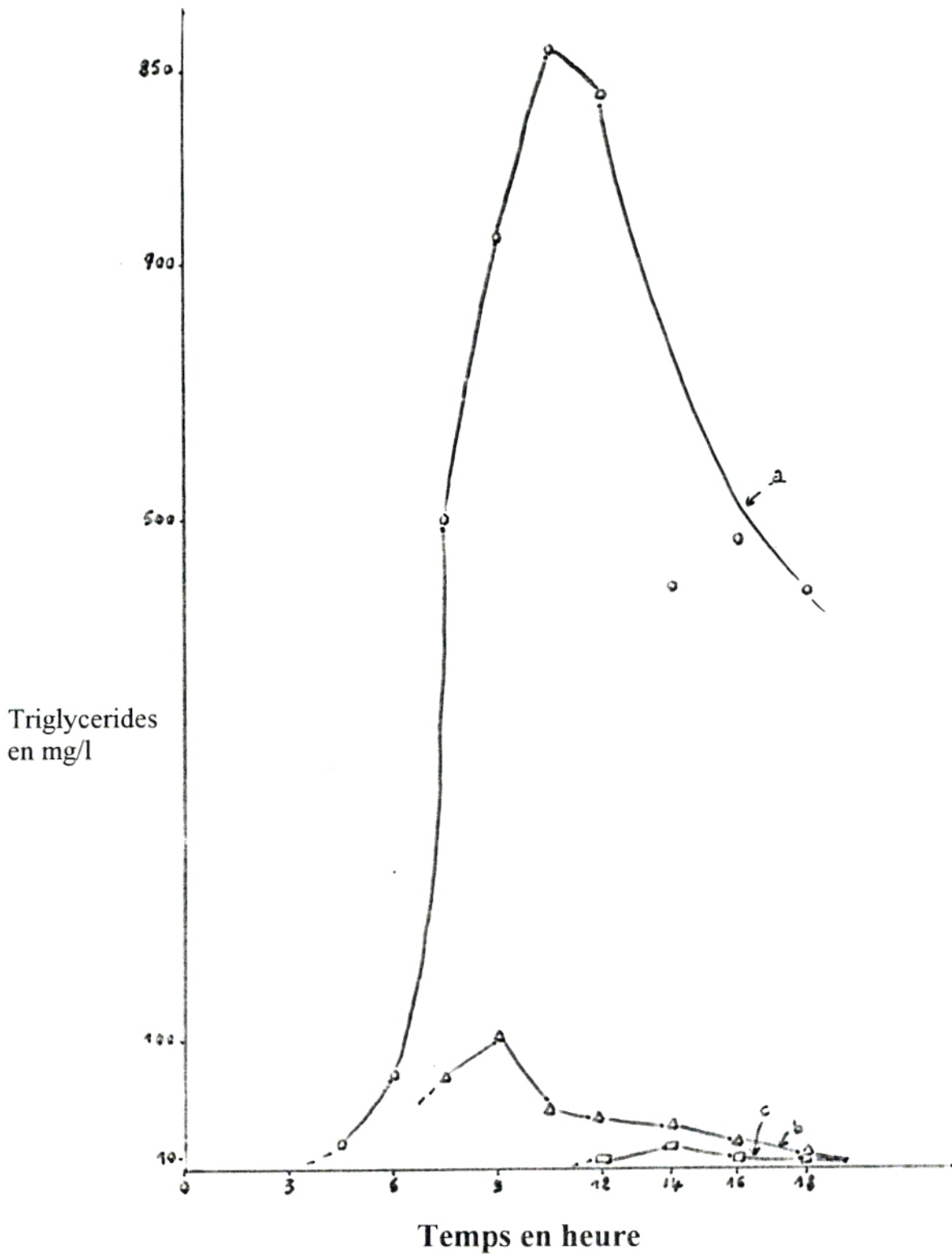


Fig N° 10 : Effet des lipoprotéines (HDL) sur l'amphotericine B, en induisant une inhibition de la synthèse des triglycérides chez le *Saccharomyces cerevisiae*.

(Courbe a) : *Saccharomyces* seule (contrôle).

(Courbe b) : *Saccharomyces cerevisiae* traité à l'amphotericine B à 2 µg / ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL.

(Courbe c) : *Saccharomyces cerevisiae* traité à l'amphotericine B à 2 µg / ml

Pour cela, dans un premier temps nous avons entrepris une étude comparative, de l'effet des lipoprotéines lourdes, HDL sur l'inhibition de la croissance de *saccharomyces cerevisiae* induit par l'amphotéricine B de concentration croissante (2µg/ml et 5µg/ml), et dans un deuxième temps l'effet de lipoprotéines lourdes, HDL et de lipoprotéines légères, LDL par l'effet toxique de l'amphotéricine B à une concentration donnée de 5µg/ml.

4 . Effet de doses croissantes d'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL

Les figures 11, 12 et 13 représentent l'effet des lipoprotéines lourdes, HDL sur l'effet inhibiteur de la croissance de cellules de *saccharomyces cerevisiae* pendant 10h d'incubation à 37°C, induit par 2µg/ml et 5µg/ml d'amphotéricine B. Les lipoprotéines sériques étant préincubées à l'amphotéricine B pendant 30 minutes à 37°C.

Les figures 11, 12 et 13 (courbe a), montrent que l'absence de l'amphotéricine B et de lipoprotéines sériques aussi bien la densité optique que la concentration de protéines et de lipides varie en fonction du temps d'incubation.

La phase de latence de l'ordre de 1h30min, est suivie de la phase exponentielle d'un temps de génération d'environ 45 minutes. A ce niveau, les cellules montrent une production importante de protéines et de triglycérides. Un début de la phase stationnaire n'est observé qu'au niveau de la densité optique à partir de 9h d'incubation.

- L'addition de l'amphotéricine B à 5µg/ml complexée aux lipoprotéine lourdes, HDL (courbe c), dans le milieu de culture au même temps que l'inoculum, induit une inhibition de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*. Contrairement au mesure de la densité optique, cet effet apparaît nettement au niveau de la production de protéines et de lipides (triglycérides). En effet seulement 15% de la production de protéines et 10% de production de triglycérides sont enregistrées

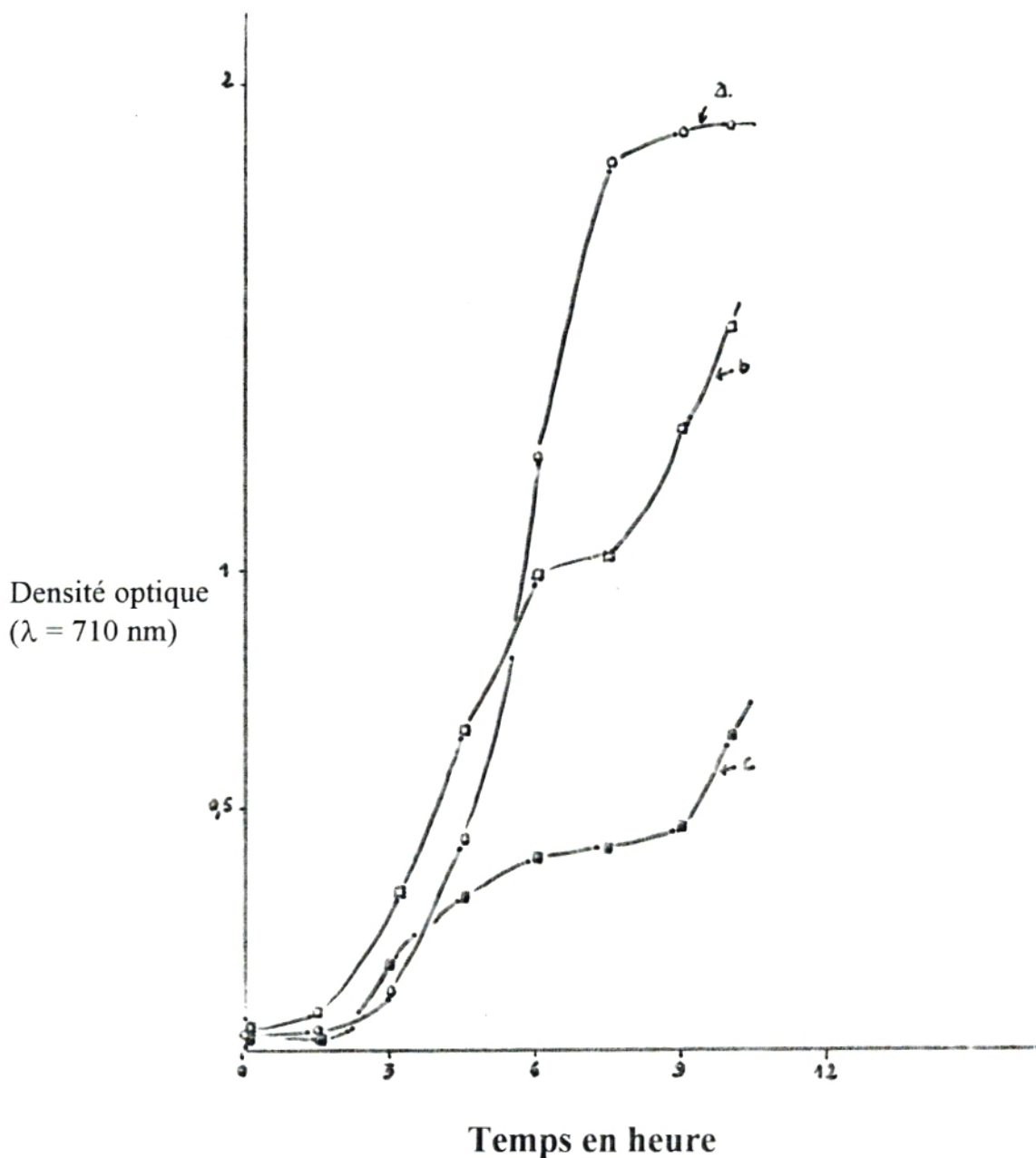


Fig N°11 : Effet des lipoprotéines lourdes sur l'inhibition de la croissance cellulaire induite par l'amphotericine B de concentrations croissantes

- (Courbe a) : Cellules de Saccharomyces seule.
- (Courbe b) : Cellules de Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B à 2 $\mu\text{g} / \text{ml}$ complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL
- (Courbe c) : Cellules de Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B (5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL

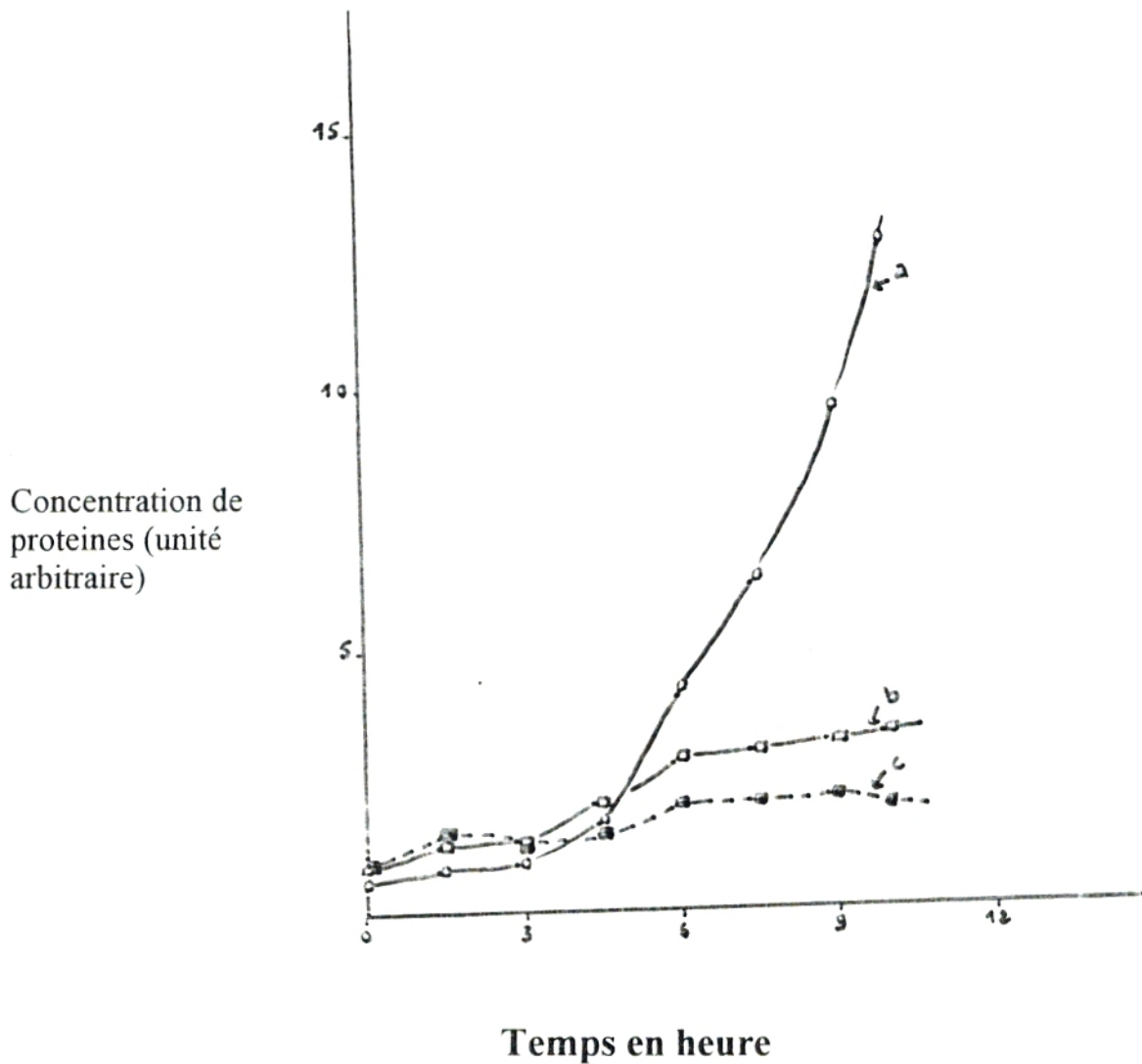


Fig N°12 : Effet des lipoprotéines lourdes sur l'inhibition de la production protéique induite par l'amphotericine B (2 µg/ml et 5 µg/ml).

- (Courbe a) : Cellules de Saccharomyces seule.
- (Courbe b) : Cellules de Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B à 2 µg / ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL
- (Courbe c) : Cellules de Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B (5µg/ml). complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL

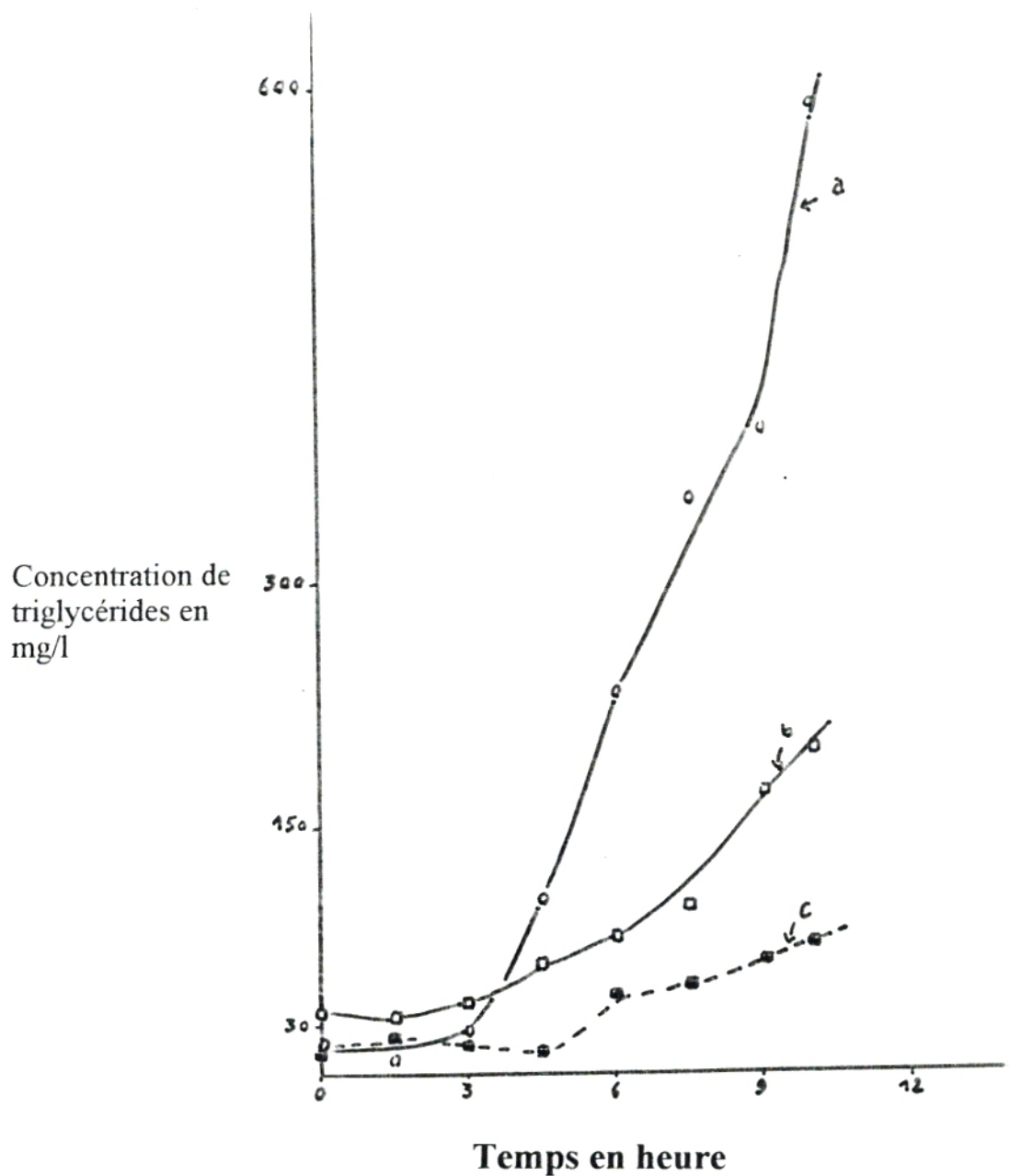


Fig N°13 : Effet des lipoprotéines sur l'inhibition de la production des triglycérides induite par l'amphotericine B à 2 µg/ml et 5 µg/ml.

- (Courbe a) : Cellules de Saccharomyces seule.
- (Courbe b) : Cellules de Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B à 2 µg / ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL
- (Courbe c) : Cellules de Saccharomyces cerevisiae traitées à l'amphotericine B (5µg/ml). complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL

pendant 10h d'incubation à 37°C par rapport aux cellules intactes qui montrent un maximum de production.

- L'addition de l'amphotéricine B à 2µg/ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL (courbe b), au milieu de culture au même temps que l'inoculum, induit une inhibition de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*. Cet effet est traduit par une inhibition de la production de protéines et de triglycérides. Les valeurs en pourcentages, sont respectivement 25% et 30% par rapport aux cellules de contrôle sans amphotéricine B et sans lipoprotéines.

4.1 Conclusion :

L'effet de l'amphotéricine B à 5µg/ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL montre une inhibition totale de la croissance des cellules de *saccharomyces cerevisiae* incubées pendant 10h à 37°C. Cet effet, est nettement observé, aussi bien au niveau de la production de protéines que de lipides (triglycérides). En revanche, l'addition de lipoprotéines lourdes, HDL en présence de l'amphotéricine B à 2µg/ml, montrent un effet intermédiaire d'inhibition de la croissance cellulaire, si on le compare à l'effet de 1µg/ml et 5µg/ml d'amphotéricine B complexées aux lipoprotéines lourdes HDL.

L'effet toxique de l'amphotéricine B, complexée aux lipoprotéines lourde, HDL d'induire une inhibition de la croissance de *saccharomyces cerevisiae*, est en effet lié à la concentration initiale de l'antifongique utilisée. Ainsi, plus on augmente la concentration de l'amphotéricine B, plus l'effet inhibiteur de la croissance cellulaire en présence de lipoprotéines sériques devient important.

5. Effet du type de lipoprotéines (HDL ou LDL), Sur inhibition de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, induit par 5µg/ml d'amphotéricine B.

Il ressort des figures n° 14, 15 et 16 que :

- (courbe a), l'introduction de l'inoculum, au temps zéro, au milieu de culture, en l'absence de l'amphotéricine B et de lipoprotéines, montre un début de

croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*, après une phase de latence de l'ordre de 2h d'incubation, suivie d'une phase exponentielle de temps de génération de 1h30min. Cette phase est suivie de production importante de protéine et de lipides (triglycérides).

- courbe (d et e), l'addition de l'amphotéricine B à 5µg/ml complexée soit aux lipoprotéines lourdes, HDL soit aux lipoprotéines légères, LDL, dans le milieu de culture, au même temps que l'inoculum, induit une augmentation importante du temps de latence qui passe de 2h à 5h. 1/4 de la production protéique est enregistrée des cellules de *saccharomyces cerevisiae* en présence aussi bien de lipoprotéines lourdes, HDL que le lipoprotéines légères, LDL pendant 8h d'incubation par rapport au contrôle. Une inhibition beaucoup plus importante est cependant obtenue au niveau de la production de lipides, suivie par la mesure de la concentration en triglycérides. En effet, moins de 3% de la concentration en triglycéride est enregistrée au bout de 9h d'incubation à 37°C, par rapport aux cellules intactes. (contrôle).
- (Courbe b et c) En revanche, l'introduction de l'inoculum au temps zéro, dans le milieu contenant les lipoprotéines sériques (HDL ou LDL), en l'absence d'amphotéricine B, montrent une réduction de la phase de latence et du temps de génération. Les lipoprotéines légères, LDL stimulent mieux la croissance de *saccharomyces cerevisiae*, que ne le font les lipoprotéines lourdes, HDL. Cet effet est observé nettement au niveau de la production de protéines et de triglycérides. En effet, la production de protéines des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, pendant 8h d'incubation sont respectivement 91%, 71% et 62% en présence, de lipoprotéines légères, LDL, de lipoprotéines lourdes, HDL, ou en l'absence de lipoprotéines (contrôle). Les concentrations en triglycérides respectives, pendant 6h30min d'incubation sont de l'ordre de 90mg/l, 75mg/l et 30mg/l.

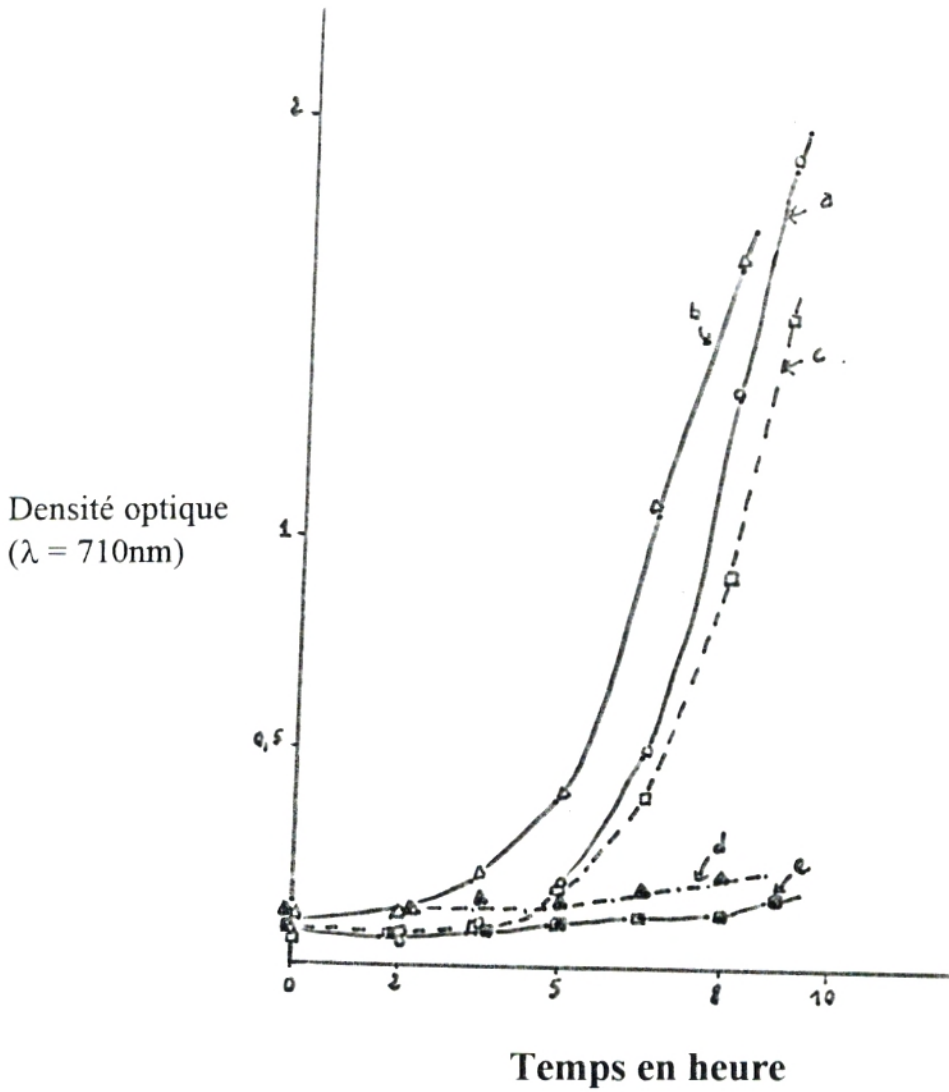


Fig N°14 : Effet des lipoprotéines lourdes, HDL et des lipoprotéines légères LDL sur l'action inhibitrice de la croissance des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par 5 μg / ml d'amphotericine B

- (**Courbe a**) : *Saccharomyces cerevisiae* seule.
- (**Courbe b**) : *Saccharomyces cerevisiae* en présence de LDL
- (**Courbe c**) : *Saccharomyces cerevisiae* en présence de HDL.
- (**Courbe d**) : *Saccharomyces cerevisiae* en présence de l'amphotericine B à 5 μg /ml complexée aux LDL
- (**Courbe e**) : *Saccharomyces cerevisiae* en présence de l'amphotericine B à 5 μg /ml. complexée aux HDL

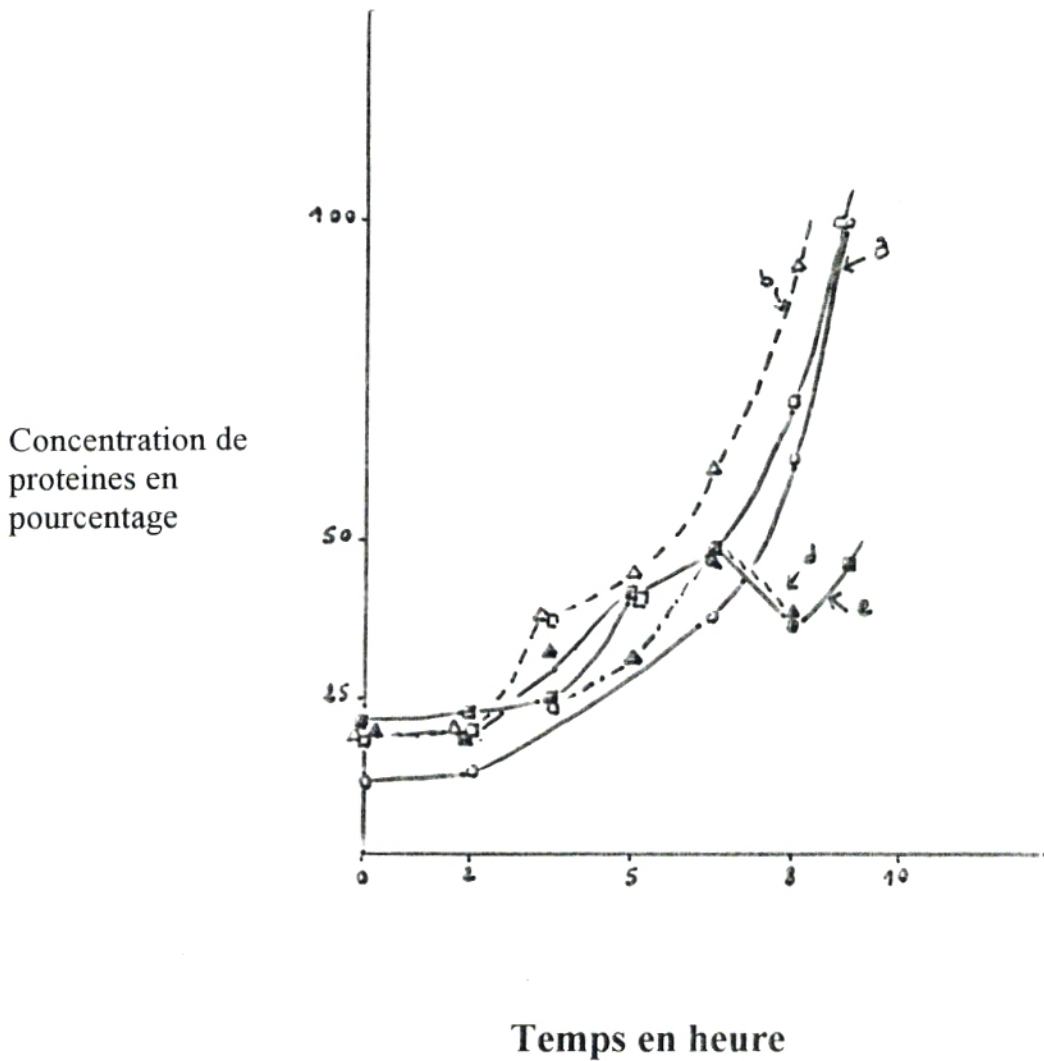


Fig N°15 : Effet des lipoprotéines sériques, (HDL ou LDL)
sur l'action inhibitrice de la production protéique
induite par 5 µg / ml d'amphotericine B

- (Courbe a) : Saccharomyces cerevisiae seule.
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae en présence de LDL
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae en présence de HDL.
- (Courbe d) : Saccharomyces cerevisiae en présence de l'amphotericine B à 5µg/ml complexée aux LDL
- (Courbe e) : Saccharomyces cerevisiae en présence de l'amphotericine B à 5µg/ml. complexée aux HDL

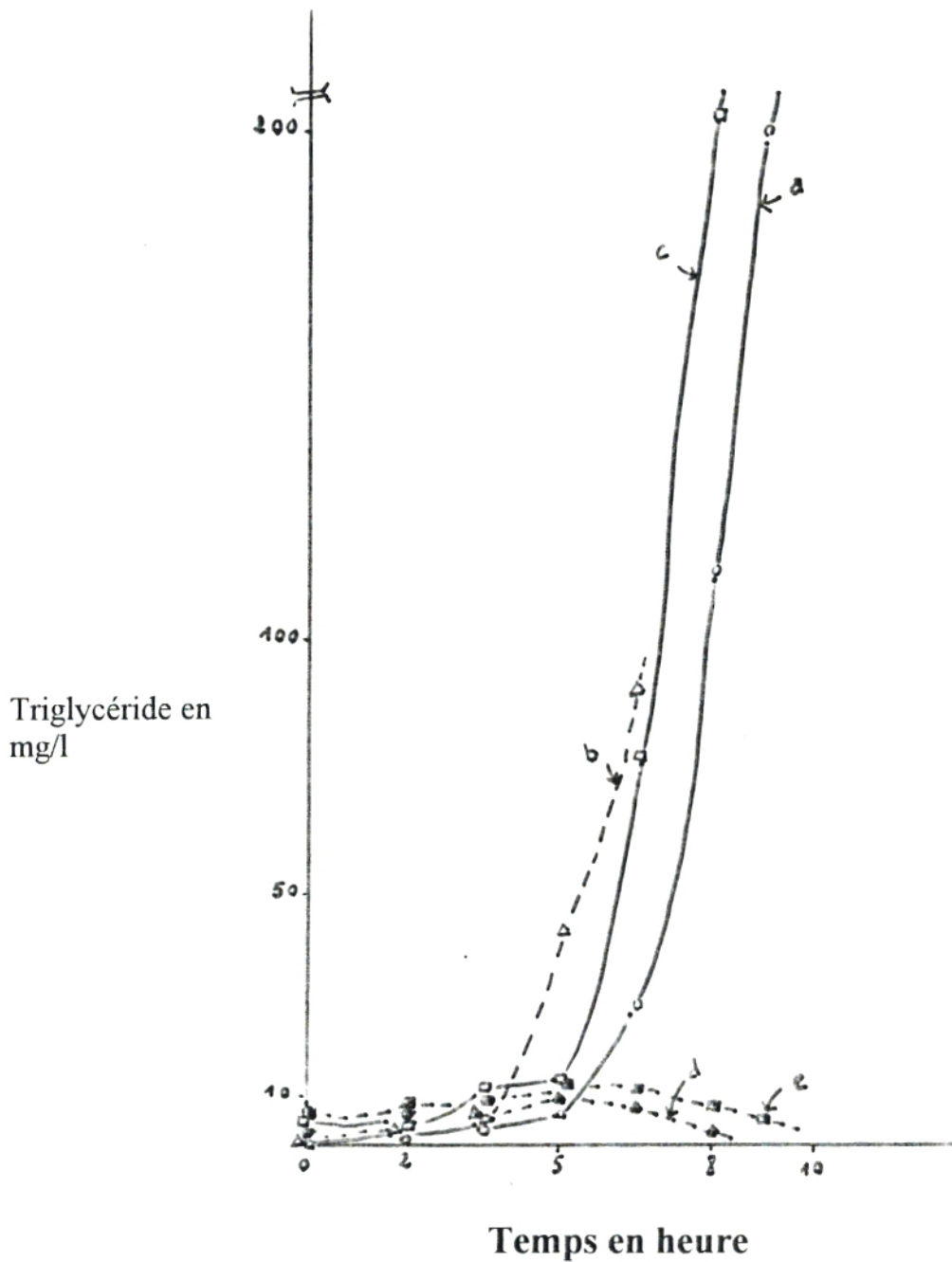


Fig N°16 : Effet des lipoprotéines sériques, sur l'inhibition de la production de lipides (triglycérides) induite par 5 µg / ml d'amphotericine B

- (Courbe a) : Saccharomyces cerevisiae seule.
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae en présence de LDL
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae en présence de HDL.
- (Courbe d) : Saccharomyces cerevisiae en présence de l'amphotericine B à 5µg/ml complexée aux LDL
- (Courbe e) : Saccharomyces cerevisiae en présence de l'amphotericine B à 5µg/ml. complexée aux HDL

5.1 Conclusion :

Au niveau de la cellule entière de *saccharomyces cerevisiae*, en phase de croissance, dès que la concentration de l'amphotéricine B devient supérieur ou égale à 1µg/ml, l'amphotéricine B sous forme libre induit une inhibition totale de la croissance cellulaire, objectivée par une inhibition de la production des protéines et de lipides (triglycérides). Des travaux, GALE E.F 1974, JULIANO R.L et al 1987, HARTSEL S.C et al 1991 suggèrent qu'il y a une fuite des métabolites essentiels nécessaires à la croissance cellulaire à la suite de l'interaction du polyène aux stérois membranaires des cellules fongiques.

En revanche, en présence de lipoprotéines sériques, les concentrations de l'ordre de 2µg/ml sont nécessaires pour obtenir le même effet inhibiteur net. Des résultats similaires sont obtenus par les auteurs Wasan et al 1994, de l'effet des lipoprotéines lourdes, HDL et de lipoprotéines légères, LDL sur l'inhibition de la croissance des cellules du *candida. albicans*, induit par l'amphotéricine B entre 0,1 µg/ml à 2µg/ml. L'amphotéricine B sous forme libre ou lié aux lipoprotéines sériques montrent une toxicité identique chez les cellules fongiques. Selon les mêmes auteurs, la présence de lipoprotéines sériques n'altère pas l'activité antifongique de l'amphotéricine B.

En revanche, pour des concentrations inférieures à 2µg/ml, les lipoprotéines lourdes, HDL sont capables d'induire un effet protecteur important de l'action inhibitrice de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotéricine B libre.

L'addition des lipoprotéines sériques seules, stimulent la croissance de *saccharomyces cerevisiae*. Cet effet est plus marqué lorsqu'on utilise les lipoprotéines légères, LDL.

CHAPITRE II

Effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité membranaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* en état stationnaire, induite par l'amphotéricine B

Les résultats rapportés dans le chapitre précédent montrent clairement que l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines du sérum sanguin garde son activité cytotoxique vis à vis des cellules de *saccharomyces cerevisiae* en inhibant leur croissance dès que la concentration d'amphotéricine B devient supérieure à 2µg/ml de solution.

Pour évaluer les conditions expérimentales optimales de l'action cytotoxique de l'amphotéricine B sous sa forme libre et sous forme complexée aux lipoprotéines sériques chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, nous avons entrepris une étude comparative de l'effet de ces deux formes sur la perméabilité membranaire au potassium intracellulaire de ces levures après leur isolement du milieu de culture et leur resuspension dans une solution saline tamponnée.

Dans un premier temps, avant l'utilisation des lipoprotéines sériques, nous avons évalué les conditions optimales de l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B sous sa forme libre en utilisant différentes concentrations, chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae*. Différents paramètres ont servi à évaluer l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B :

- La comparaison des cinétiques de fuite potassique observées lors de l'addition de différentes concentrations d'amphotéricine B allant de 0 à 50 µg/ml.
 - La comparaison des niveaux stationnaires de distribution de potassium obtenus après utilisation de concentrations croissantes d'amphotéricine B.
 - Le rôle de l'état d'énergisation de la cellule.
 - Le rôle de différentes densités de suspension cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*.
- Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'effet des lipoprotéines sériques (HDL ou LDL) sur l'action cytotoxique de l'amphotéricine B à deux niveaux :

- Au niveau des cinétiques de fuite de potassium intracellulaire de cellules de *saccharomyces cerevisiae* induites par différentes concentrations d'amphotericine B.

- Au niveau de l'état stationnaire de distribution de potassium.

Des expériences du type dose réponse ont été effectuées, d'une part en faisant varier les concentrations de l'amphotericine B, et en gardant celles de lipoprotéines fixe. D'autre part, la concentration de l'amphotericine B restant fixe à 5µg/ml, et on fait varier celles de lipoprotéines sériques.

A cet effet, les cellules de *saccharomyces cerevisiae* sont recueillies en phase exponentielle lavées et resuspendues dans le tampon tris-HCl, 50mmol/l, pH 7,4 en présence de 10mmol/l de glucose comme source d'énergie. L'ensemble des épreuves sont effectuées à une température de 37°C. Dans les expériences utilisant l'amphotericine B complexée, l'antifongique est préincubé pendant 30 minutes à 37°C en présence de lipoprotéines sériques (HDL ou LDL), avant d'être ajoutée à la suspension cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*.

La concentration du potassium intracellulaire est exprimée en MEg de K⁺ par gramme de protéines cellulaires, ou en pourcentage de potassium retenu ou libéré par les cellules après l'addition de l'amphotericine B, par rapport au même lot de la suspension cellulaire exempt de traitement à l'amphotericine B.

Avant d'entreprendre l'étude proprement dite, il est utile de connaître, dans les conditions expérimentales choisies, l'effet de l'amphotericine B sous sa forme libre sur la perméabilité au potassium de cellules de *saccharomyces cerevisiae*.

1 . Effet de l'amphotericine B libre sur la perméabilité membranaire au potassium des cellules de saccharomyces cerevisiae.

Il est connu, que les polyènes agissent principalement au niveau membranaire Bolard J 1986, les antibiotiques polyènes et particulièrement l'amphotericine B, sont des agents qui interagissent aux stérols membranaires des cellules sensibles. Cette interaction, altère la perméabilité membranaire, en induisant la fuite des constituents cellulaires, qui peut être suivie de la lyse de la cellule sensible. BOLARD J. 1986, KERRIDGE 1986.

Parmi les constituents cellulaires affectés les ions potassiques, premier effet détectable, selon Kerridge 1986, et pourrait être la conséquence de l'accroissement de la perméabilité membranaire aux protons. GALE E.F 1974, BOLARD J. 1986

1.1 - Cinétique de la fuite de potassium intracellulaire de cellules de saccharomyces cerevisiae, induite par l'amphotericine B.

1.1.1 Cinétique de fuite de potassium pendant 1h d'incubation

Figure n° 17. La suspension cellulaire de saccharomyces cerevisiae réparties et resuspendues dans le tampon tris-Hcl 50 mmol/l, pH 7,4 en présence de 10mmol/l de glucose à environ $3,5 \cdot 10^8$ cellules viables par millilitre de solution, correspondant à 0,60 à 0,70 gramme par litre de protéines cellulaires. Les cellules maintenues à 37°C, sont soumises à différentes concentrations d'amphotericine B (1,2,5 et 10µg/ml), pendant 1h d'incubation.

L'ensemble de tracés obtenus représentent la réponse de cellules de saccharomyces cerevisiae à l'action cytotoxique de cet antifongique, en induisant une augmentation de la perméabilité membranaire au potassium intracellulaire.

La cinétique de fuite de potassium dépend de la concentration d'amphotericine B dans le milieu. La vitesse de décroissance de potassium interne augmente lorsque la dose d'amphotericine B varie de 1µg/ml à 10µg/ml. La vitesse maximale est obtenue lorsqu'on atteint une concentration de l'antifongique de l'ordre de 5µg/ml.

La fuite d'ion potassique est significative dès les cinq premières minutes pour des concentrations en antifongiques supérieures à 2µg/ml. Le pourcentage d'ions potassium libéré dépend de la concentration d'amphotericine B utilisée. En effet, seulement 40% de potassium intra cellulaire sont retenus au bout de 5 minutes d'incubation, l'équivalent de 30 MEg K+/mg de protéines cellulaires. Cependant pour obtenir le même effet avec des concentrations d'amphotericine B plus faibles, des temps d'incubation nettement plus importants sont nécessaires (1 heure).

Une fuite massive d'ions potassium (environ 16% seulement d'ions retenu, soit 20MEg K+/mg de protéines cellulaires) est enregistrée à partir de concentration d'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml au bout d'une heure d'incubation à 37°C.

1.1.2 - Effet de l'amphotericine B sur la perméabilité membranaire au potassium pendant 2h d'incubation.

Les cellules sont soumises durant 2h à 37°C à l'action de l'amphotericine B utilisées à des concentrations de 1µg/ml, 5µg/ml et 20µg/ml. Le contenu de potassium intracellulaire est estimé par rapport à des cellules intactes, non traitées à l'antifongique.

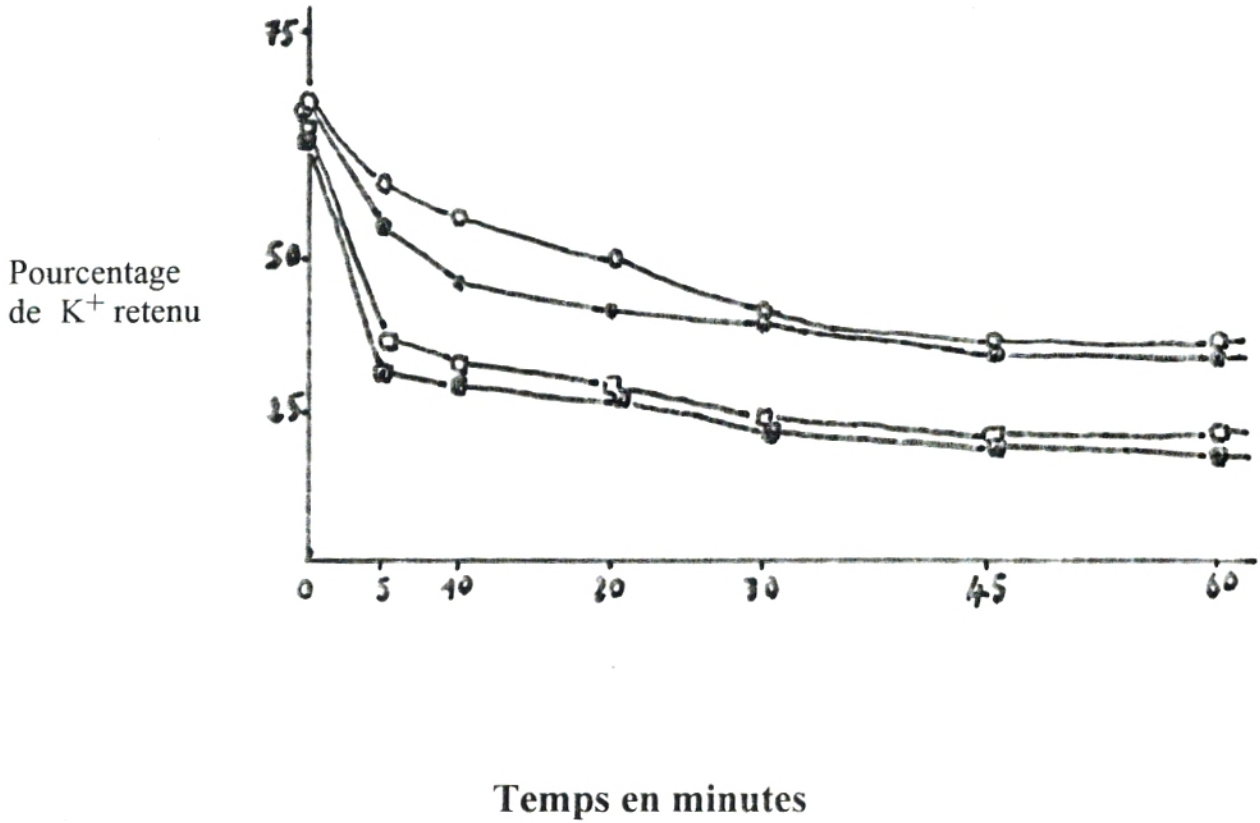


Fig N°17 : Fuite d'ions potassique des cellules de *saccharomyces cerevisiae* en fonction du temps en présence de l'amphotericine B.

Les cellules sont récupérées au moment de la phase exponentielle, lavées et resuspendues à la densité de $3,5 \cdot 10^8$ cellule par ml dans le tampon tris Hcl, 50 m mol /l, ph 7,4 à 37°C.

Cellules traitées à l'Amphotericine B a) 1µg/ml b) 2µg/ml
c) 5µg/ml d) 10µg/ml

Le diagramme représente une série de tracés, des valeurs de fuite des ions potassique en duplicate due à l'amphotericine B , marquant le début de la réaction.

La figure n° 18, montre que seules les cellules en présence d'amphotericine B, montrent une augmentation significative de la perméabilité membranaire au potassium, alors qu'en l'absence de l'antifongique, la fuite potassique est minime après 2 heures d'incubation seulement environ 10% de potassium sont libérés, soit environ $5 \cdot 10^{-2}$ MEg K⁺/gramme de protéines cellulaires. La fuite potassique ralentit pour atteindre l'état stationnaire au bout de 1h d'incubation pour des concentrations d'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml. En revanche, un temps d'incubation d'environ de 90 minutes est nécessaire pour des concentrations plus faibles. On note, une fuite massive d'ions potassiques qui atteint un maximum dès les concentrations d'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml (environ 80% de fuite potassique) au bout de 2h d'incubation.

1.2 - Effet dose-réponse

La figure n° 19, représente l'effet de doses croissantes d'amphotericine B sous forme libre sur la perméabilité au potassium des cellules de *saccharomyces cerevisiae* évaluée après 25 minutes et 60 minutes d'incubation à 37°C.

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* sont incubées en présence ou en l'absence (cellules de contrôle) l'amphotericine B à des concentrations croissantes allant de 0 à 50 µg/ml pendant 25 minutes et 60 minutes à 37°C.

L'addition de l'amphotericine B aux cellules de *saccharomyces cerevisiae* est suivie par une augmentation progressive de la perméabilité au potassium intracellulaire. La fuite potassique est significative à de faible concentration d'amphotericine B (0,5µg/ml) l'équivalent de la concentration minimale inhibitrice (CMI). En effet, 50% de potassium intracellulaire sont retenu au bout de 25 minutes d'incubation et seulement 35% au bout d'une heure, par rapport au contrôle sans amphotericine B. L'intensité de la fuite de potassium augmente avec la concentration de d'antifongique présente dans le milieu et atteint son maximum à

5µg/ml d'amphotericine B, soit 80% de fuite potassique par rapport au contrôle, sans amphotericine B.

1. 2 .1 Conclusion

Les figures n° 17, 18 et 19 illustrent clairement l'efficacité de l'antifongique polyène amphotericine B sous forme libre dans les conditions expérimentales utilisés.

L'amphotericine B, apparaît très toxique contre les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, puis qu'elle induit une fuite massive d'ions potassium intracellulaire (environ 65% de fuite potassium par rapport au contrôle), à de faibles concentrations de l'antifongique (0,5µg/ml).

En revanche, un maximum de fuite potassique (environ 80% par rapport au contrôle), n'est obtenu qu'à partir de concentration d'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml, c'est à dire 10 fois la concentration minimale inhibitrice. 1h d'incubation à 37°C est suffisante pour avoir un effet cytotoxique maximum, sur la perméabilité membranaire aux potassium des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, dès les concentration de l'ordre de 5µg/ml. Nous pouvons conclure que 5µg/ml d'amphotericine B sous forme libre, et suivant nos conditions expérimentales correspond à la concentration minimale est suffisante pour avoir un effet maximum de fuite potassique intracellulaire chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, au bout d'1h d'incubation à 37°C.

2 . Effet de la concentration cellulaire

Les premiers études sur l'interaction des polyènes macrolides vis à vis des systèmes biologiques (exemple liposome), Norman et al 1972, ou en solution, Gruda et al 1980, ont montré l'importance des stérols membranaires. Dans plusieurs systèmes expérimentaux, les stérols sont nécessaires pour une activité maximum de l'amphotericine B. Hartsel S.C et al 1991.

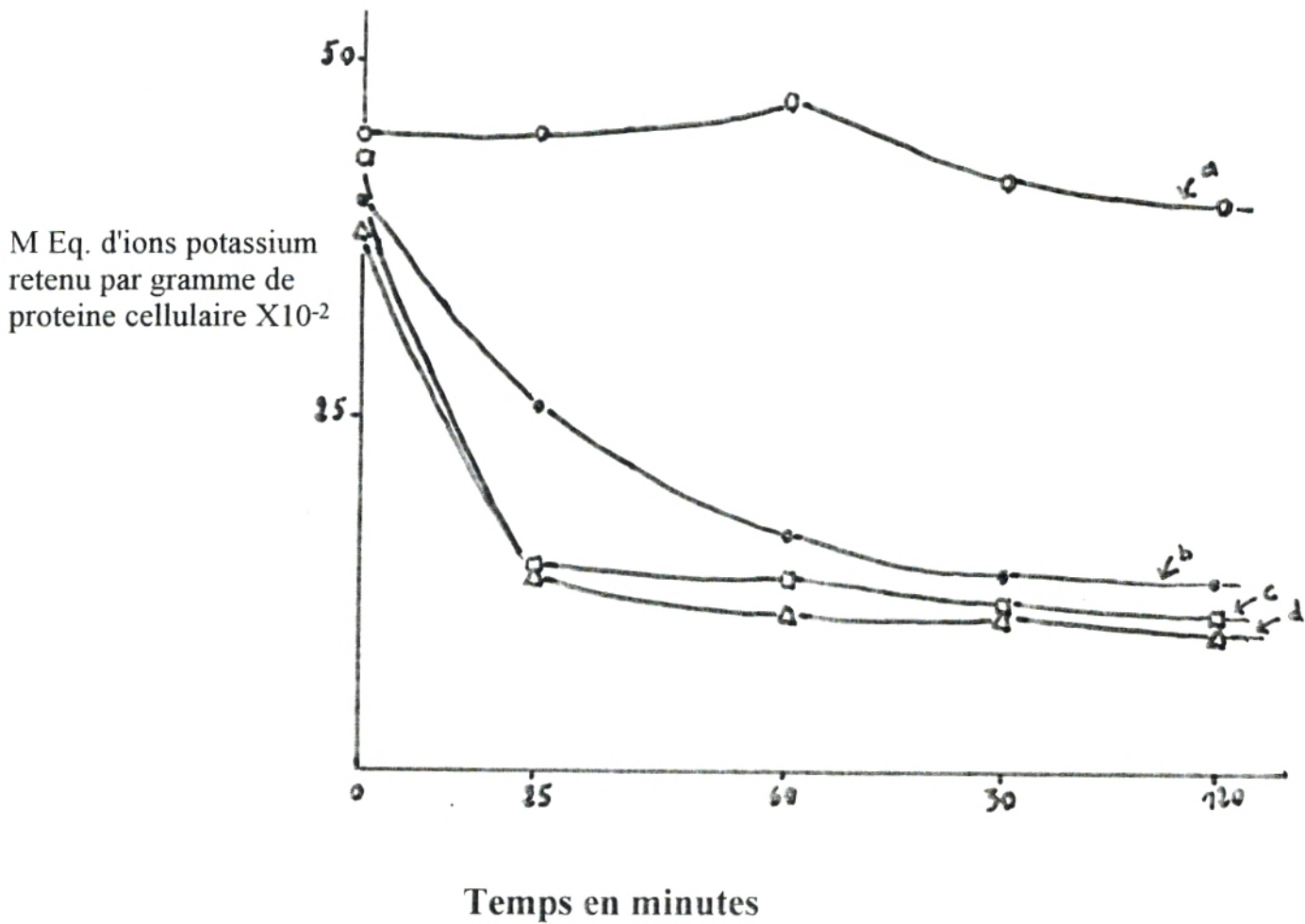


Fig N°18 : Réponse des Cellule *Saccharomyces cerevisiae* à l'action d'amphotericine B.
Fuite d'ions potassique en fonction du temps.

Les Cellules sont recueillies en phase exponentielle, lavées et resuspendues dans le tampon tris Hcl, ph 7,4 à 37°c à la densité de $1,6 \cdot 10^8$ cellule par ml l'équivalent de 0,40 à 0,55g/l de protéines cellulaire.

- (Courbe a) : Cellule de *Saccharomyces cerevisiae* sans traitement préalable.
- (Courbe b) : Cellule de *Saccharomyces cerevisiae* traitées à l'amphotericine B à 1 $\mu\text{g/ml}$
- (Courbe c) : Cellule de *Saccharomyces cerevisiae* traitées à l'amphotericine B à 5 $\mu\text{g/ml}$
- (Courbe d) : Cellule de *Saccharomyces cerevisiae* traitées à l'amphotericine B à 20 $\mu\text{g/ml}$

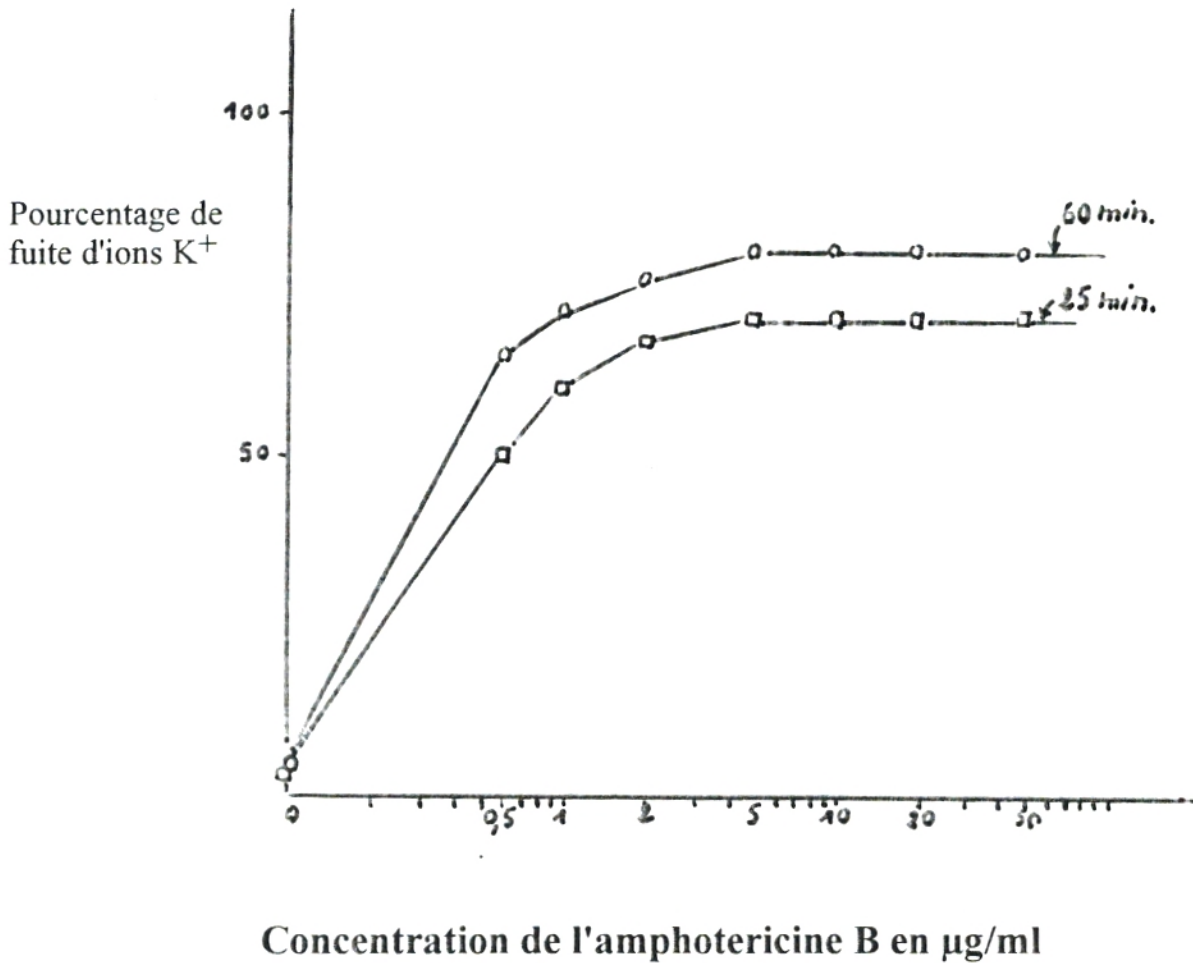


Fig N°19 : Effet dose - réponse. Perméabilité membranaire aux ions potassique des cellules *Saccharomyces cerevisiae* de densité de l'ordre de 0,60 - 0,70 gramme de protéines cellulaires ($3,8 \cdot 10^8$ cellules / ml) traitées à l'amphotericine B de concentrations croissantes aux temps 25 et 60 minutes
Les cellules sont récupérées en phase exponentielle, lavées et resuspendues dans le tampon tris Hcl, 25 m mol / l , ph 7,4 à 37°c

Etant donné que la cytotoxicité de l'amphotéricine B est liée à son interaction aux stérols membranaires des cellules sensibles, en induisant une augmentation de la perméabilité au potassium intracellulaire. La variation de la concentration cellulaire donc du contenu en stérols et celle de l'antifongique, peut être exprimée par le rapport ergosterol/Amphotéricine B. Pour cela, nous avons mesuré la fuite du potassium intracellulaire induite par différentes concentrations d'amphotéricine B (de 0 à 50µg/ml) chez *saccharomyces cerevisiae* utilisé à des densités cellulaires croissantes.

Les cellules sont récupérées, en phase de croissance exponentielle, lavées et resuspendues dans le tampon tris-HCl, 50mmol/l, pH 7,4, contenant 10mmol/l de glucose. L'incubation des cellules de *saccharomyces cerevisiae* en présence de l'amphotéricine B. dure 1h à 37°C.

Il ressort de la figure n° 20 que :

- La fuite potassique intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotéricine B dépend, non seulement de la concentration de l'antifongique, mais aussi de la concentration des cellules cibles dans le milieu réactionnel. Le pourcentage de fuite de potassium dans le milieu extracellulaire induite par 5µg/ml d'amphotéricine B est de l'ordre de 70%, 80% et 85% pour des concentrations cellulaires respectives de $1,6 \cdot 10^8$, $3,8 \cdot 10^8$ et $4,8 \cdot 10^8$ cellules viables par millilitre de solution. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Gale E.F 1974, chez le *candida albicans* après action de l'AME. Le même auteur, rapporte que les pourcentages de fuite potassique sont identiques quand le rapport densité cellulaire/concentration de l'antifongique est similaire.

3 . Effet d'addition d'une source d'énergie

Selon Drouhet et al 1980 in Drouhet et Dupont 1988, les antifongiques polyènes stimulent la transformation de l'ATP en ADP. (voir chapitre III, métabolisme cellulaire). Cet effet entraîne par conséquent une stimulation de l'activité de l'ATPase (Na⁺/K⁺) transmembranaire.

L'addition d'une source d'énergie comme le glucose, nécessaire au fonctionnement de l'ATPase pourrait réduire l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B vis à vis des cellules de *saccharomyces cerevisiae*. La fuite massive du potassium intracellulaire due à l'amphotéricine B peut être compenser par une entrée de ce dernier par le biais de l'ATPase.

Pour cela, nous avons mesuré la fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B sous forme libre en présence et en l'absence de glucose à une concentration finale de 10mmol/l de solution.

A cet effet, 1,510.⁸ cellules viables/ml de solutions de *saccharomyces cerevisiae* recueillies en phase exponentielle, sont incubées à 37°C dans le tampon tris-HCl, 50 mmol/l, pH 7,4 sont soumises à 1µg/ml amphotéricine B en présence ou en l'absence de glucose. L'addition du glucose à la suspension cellulaire marque le début de la réaction.

Il ressort de la figure n° 21 que :

Les cellules en présence (courbe b) et en l'absence (courbe a) de glucose, sans traitement préalable à l'amphotéricine B, montrent un flux ionique apparemment identique (contrôle). En revanche, les cellules soumises à l'action de l'amphotéricine B, en présence (courbe d) et en l'absence (courbe c) de glucose montrent une augmentation de la fuite potassique progressive durant les 30 premières minutes d'incubation. La fuite potassique atteint d'état

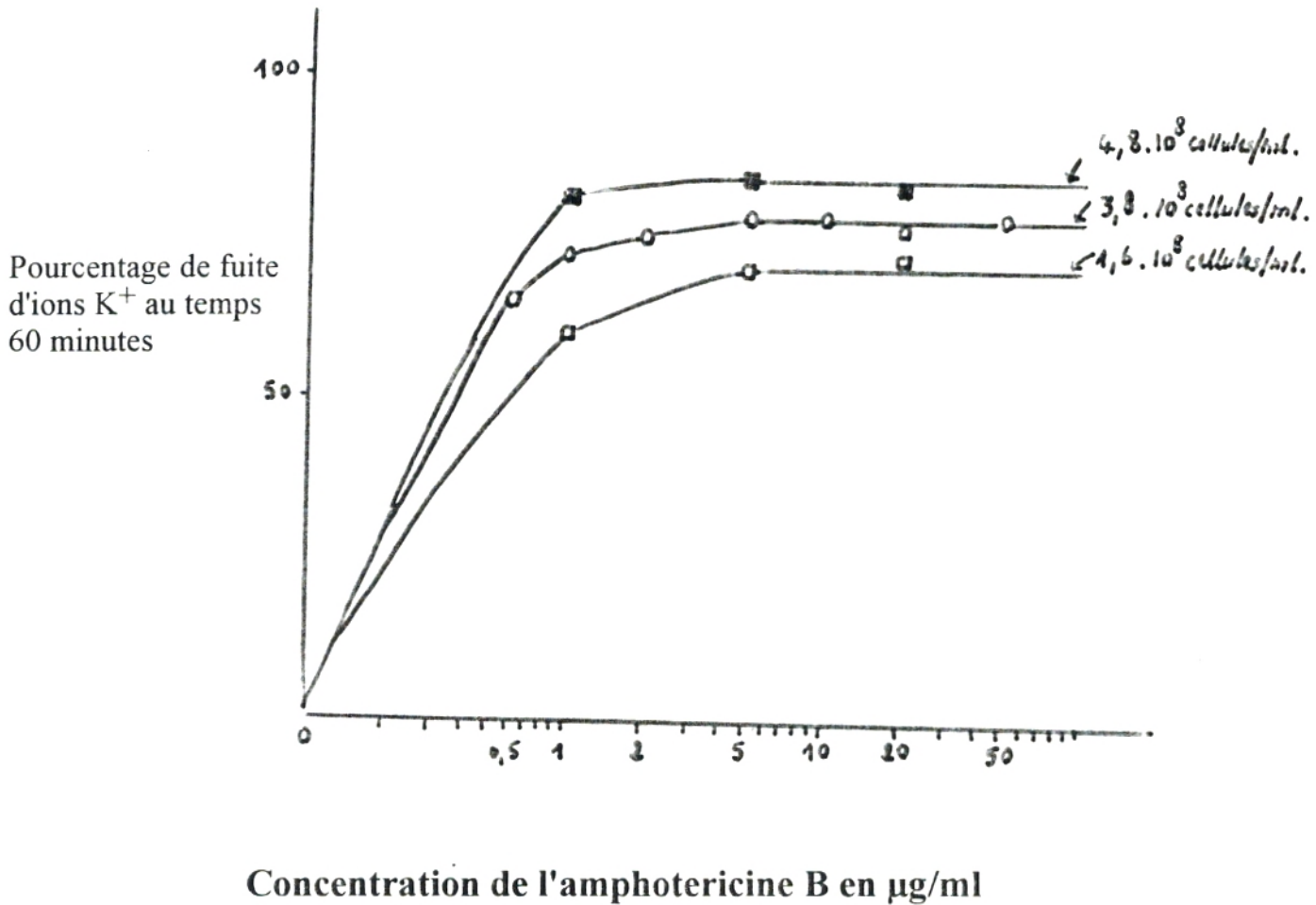


Fig N° 20 : Effet de la concentration cellulaire

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* récupérées en phase exponentielle lavées et resuspendues dans le tampon tris Hcl, 50 m mol / l ph 7,4 (glucose 10 m mol / l) de concentrations cellulaires croissantes. Les cellules sont incubées en présence de l'amphotericine B de concentration croissantes pendant 1h à 37°c

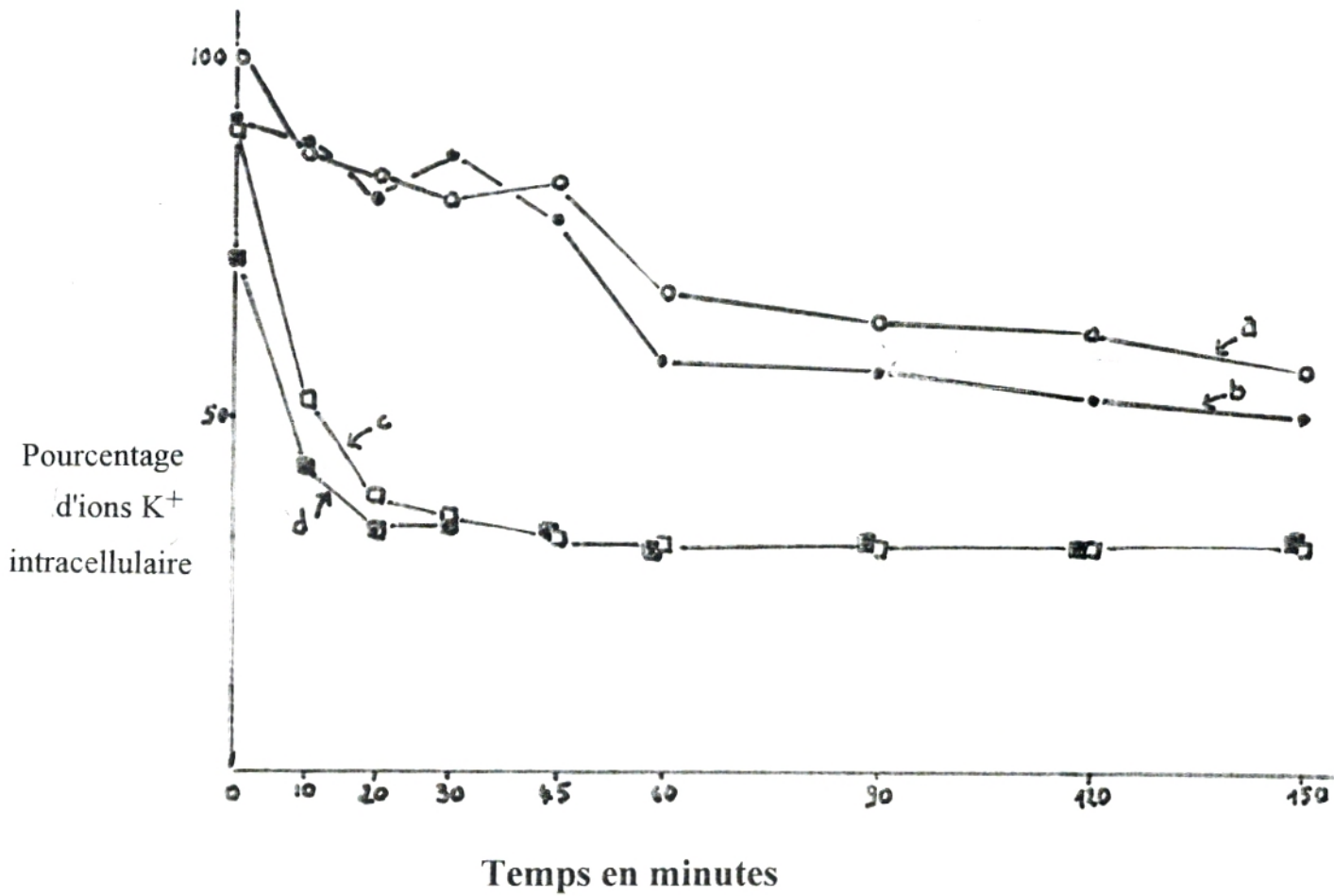


Fig N° 21 : Effet d'addition d'une source d'énergie

- (Courbe a) : *Saccharomyces cerevisiae* sans source d'énergie.
- (Courbe b) : *Saccharomyces cerevisiae* en présence de glucose (10 m mol / l)
- (Courbe c) : *Saccharomyces cerevisiae* sans source d'énergie traitées
à l'Amphotericine B à 1 µg/ml
- (Courbe d) : *Saccharomyces cerevisiae* en présence de glucose (10 m mol / l) traitées
à l'Amphotericine B à 1 µg/ml

stationnaire à partir de 60 minutes d'incubation. Environ 30% d'ions potassium sont retenu aussi bien par les cellules énergisées que par les cellules non énergisées.

A partir de ces résultats, nous pouvons conclure que, l'addition du glucose dans le milieu en présence d'amphotericine B n'a aucun effet notable sur l'action cytotoxique de cet antifongique.

A 1µg/ml d'amphotericine, la fuite potassique est irréversible. Brajtburg et al 1980.

4 . Effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité au potassium induite par l'amphotericine B

A partir des résultats observés de l'effet de l'amphotericine B sous forme libre sur la perméabilité au potassium des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, en induisant une fuite massive du potassium dès que les concentrations de cet antifongique deviennent supérieure à 0,5 µg/ml. Alorsqu'un maximum de fuite est enregistré à partir de concentration de l'ordre de 5µg/ml d'amphotericine B.

Dans les mêmes conditions expérimentales, il nous a paru utile de tester dans un premier temps, l'effet de la présence des lipoprotéines sériques de concentration en cholestérol total identique à celle du plasma sanguin. (0,34 g/l pour les lipoprotéines lourdes, HDL et 1,12g/l pour les lipoprotéines légères, LDL sont calculés), dans le milieu d'incubation sur la perméabilité cellulaire au potassium du *saccharomyces cerevisiae*, induite par 5µg/ml d'amphotericine B.

4.1 - Cinétique de fuite du potassium intracellulaire

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* sont recueillies en phase exponentielle, lavées et resuspendues dans le tampon tris-Hcl, 50 mmoml/l, pH 7,4 en présence de glucose à 10mmol/l à environ $3,1 \cdot 10^8$ cellules viables/ml de solution, soit 0,65 à 0,85g/l de protéines cellulaires. Les lipoprotéines sériques sont préincubées en présence de l'amphotericine B, pendant 30 min à 37°C avant d'être ajoutées à la suspension cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*.

La figure n° 22, représente la cinétique de fuite de potassium intracellulaire en fonction du temps (2h d'incubation à 37°C), induite par 5µg/ml d'amphotericine B en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes, HDL ou de lipoprotéines légères, LDL natives par rapport aux cellules n'ayant subi aucun traitement préalable (contrôle).

Les résultats obtenus montrent que :

- Les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, incubées à 37°C en l'absence d'amphotericine B et de lipoprotéines sériques (contrôle), gardent la totalité de leur potassium intracellulaire pendant 2h d'incubation à 37°C (courbe a).

- En revanche, l'addition de l'amphotericine B libre seule à 5µg/ml induit chez ces cellules une fuite massive de potassium interne (courbe c) : Une cinétique de fuite potassique très rapide dès les 25 premières minutes d'incubation, seulement 15% le potassium retenu par rapport au contrôle, soit environ $12,5 \cdot 10^{-2}$ Meg K⁺/gramme de protéine cellulaire.

Au bout de 2h d'incubation, le contenu en potassium intracellulaire reste inchangé. Dans ces conditions les cellules de *saccharomyces cerevisiae* ont donc perdu la quasi totalité de leur potassium interne.

- L'addition de l'amphotericine B à 5µg/ml complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL, dans le milieu contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* (courbe b), montrent une réduction de la vitesse de fuite potassique significative: En 25 minutes d'incubation, les cellules retiennent encore 60% de leur potassium interne. La cinétique de fuite du potassium est lente, par conséquent le contenu en potassium intracellulaire diminue progressivement

m Eq K⁺ par gramme
de proteines cellulaire
X 10⁻²

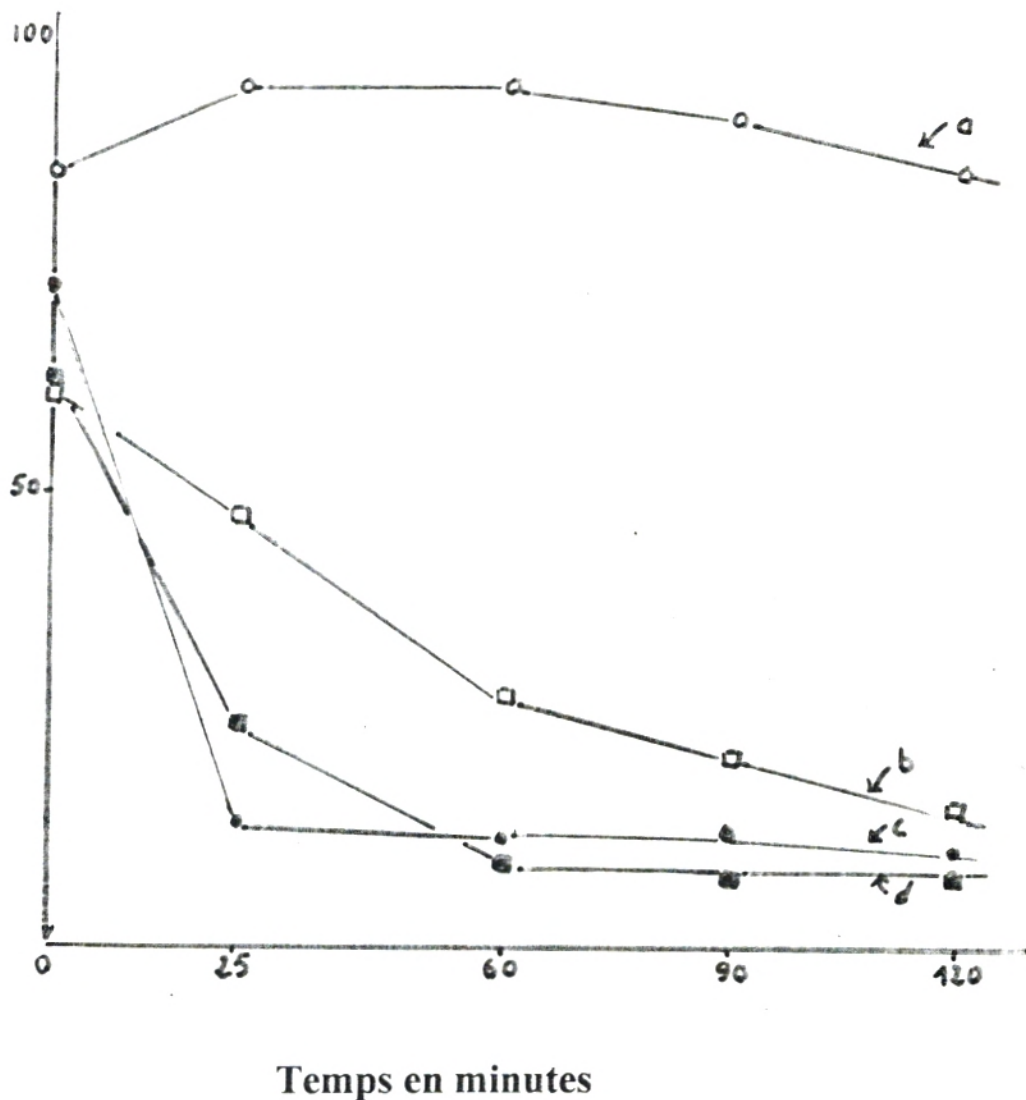


Fig N° 22 : Effet des lipoprotéines sur la cinétique des fuites potassiques en fonction du temps.

Les cellules saccharomyces cerevisiae récupérées en phase exponentielle lavées et resuspendues dans le tampon tris Hcl, 50 mmol / l PH 7,4 à 3,1. 10⁸ cellules viables par millilitre de solution (0,60 - 0,84 g/l de protéines cellulaires). L'Amphotericine B étant préincubée aux fractions lipoprotéiques à 37 °c pendant 30 minutes avant le contact avec les cellules.

- (Courbe a) : Saccharomyces cerevisiae sans traitement préalable.
- (Courbe b) : Saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B à 5 µg/ml préincubée au HDL (chol. 0,34 g/l)
- (Courbe c) : Saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B à 5 µg/ml
- (Courbe d) : Saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B à 5 µg/ml préincubée au LDL (chol. 1,12 g/l)

pour atteindre le niveau du potassium des cellules traitées à l'amphotéricine B sous forme libre, soit environ 16% du potassium retenu par rapport au contrôle, au bout de 2h d'incubation à 37°C.

- En présence de lipoprotéines légères, LDL, l'amphotéricine B à (5µg/ml) induit une fuite massive du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* dès les 25 premières minutes d'incubation avec une cinétique de fuite potassique rapide mais légèrement moins prononcée qu'avec l'amphotéricine seule. Le niveau du potassium intracellulaire est de l'ordre de 30% par rapport au contrôle sans antifongique et sans lipoprotéines soit environ $25 \cdot 10^{-2}$ Meg K^+ /gramme de protéine cellulaire (courbe d). Au bout de 2h d'incubation, un maximum de fuite potassique est enregistrée, le potassium interne des cellules de *saccharomyces cerevisiae* est de l'ordre de 10% par rapport au contrôle, soit environ $8 \cdot 10^{-2}$ Meg K^+ /gramme de protéines cellulaires.

4.1.1 - Conclusion :

Les résultats obtenus montrent clairement que l'amphotéricine à 5µg/ml complexée au lipoprotéines sériques, induit le même effet net sur la perméabilité membranaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, comparé à celui de l'amphotéricine B sous forme libre. L'addition des lipoprotéines sériques modifie la cinétique de fuite du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* et non l'état stationnaire (16% de potassium retenu par rapport au contrôle). Un effet protecteur minime est observé (cinétique de fuite du potassium très lente), due à la présence de lipoprotéines lourdes, HDL seulement. Cet effet est transitoire, il se réduit d'une manière importante avec le temps d'incubation, pour disparaître à 2h d'incubation à 37°C.

4.2 - Effet dose-réponse de concentrations croissantes de lipoprotéines

Dans le but de déterminer les conditions expérimentales optimales de l'effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité au potassium des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotericine B sous forme libre, nous avons entrepris une étude comparative de l'effet de doses croissantes de l'amphotericine B ou de lipoprotéines sériques.

Dans un premier temps, il s'agit de vérifier si l'effet protecteur minime des lipoprotéines lourdes, HDL native complexées à l'amphotericine B de concentration de l'ordre de 5µg/ml est retrouvé à toutes les concentrations utilisées. Dans un deuxième temps, en gardant la concentration de l'antifongique, amphotericine B de concentration de l'ordre de 5µg/ml est retrouvé à toutes les concentrations utilisées. Dans un deuxième temps, en gardant la concentration de l'antifongiques, amphotericine B fixe à 5µg/ml, et on fait varier la concentration de lipoprotéines sériques (donc du contenu en cholestérol non estérifié de ces particules qui est le site de complexation de l'amphotericine B). On vérifie si dans ces conditions l'effet cytotoxique de cet antifongique sous forme libre est affecté ou non en suivant aussi bien les cinétique de fuite potassique que sur l'état stationnaire du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, en le comparant à celui obtenu avec les lipoprotéines sériques utilisées à des concentrations équivalentes à celles du plasma sanguin humain.

Il est rapporté (Brajtburg J et al 1990), que l'affinité de l'amphotericine B aux lipoprotéines sériques varie d'une part du type de fractions lipoprotéiques utilisées et d'autre part de leur concentration initiale dans le milieu d'essai. Comme les deux fractions lipoprotéiques, les lipoprotéines lourdes, HDL et les lipoprotéines légères, LDL renferment aussi bien le cholestérol estérifié que le cholestérol libre ou non estérifié, peuvent offrir par l'intermédiaire de ce dernier des sites de fixation à l'amphotericine B. Selon Brajtburg J. et al 1984, les phospholipides des lipoprotéines sériques peuvent aussi influencer les interactions Amphotericine B-cellules cibles et amphotericine B- lipoprotéines, exprimé par le rapport cholestérol/phospholipides des lipoprotéines. Selon ces auteurs, la vitesse de

l'interaction amphotericine B- lipoprotéines diminue, lorsque le rapport cholestérol/phospholipides des lipoprotéines diminue.

Il est donc probable qu' en utilisant soit les lipoprotéines lourdes, HDL soit les lipoprotéines légères, LDL et en faisant varier leurs concentrations et par conséquent celles du cholestérol libre qu'elles renferment ou de l'antifongique, on peut moduler d'une part l'affinité des molécules véctrices, c'est à dire des lipoprotéines et d'autre part les interactions Amphotericine B, lipoprotéines et cellules cibles. Ces modifications tant sur le plan qualitatif que quantitatif du contenu en lipides et en protéines des lipoprotéines sériques, peuvent permettre de mieux cerner les phénomènes de toxicité de l'amphotericine B chez les cellules cibles, *saccharomyces cerevisiae* liés à ces interactions.

4.2.1 - Effet de doses croissantes de l'amphotericine B

Les expériences que nous avons entreprises montrent l'effet des lipoprotéines sériques natives (de concentrations équivalentes à celles du plasma sanguin), sur la cytotoxicité de l'amphotericine B utilisée à des concentrations allant de 1µg/ml à 20µg/ml, en induisant une fuite potassique massive des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, dans les mêmes conditions expérimentales, montrent que, l'effet protecteur des lipoprotéines obtenu à 25 minutes d'incubation se réduit d'une manière importante pour disparaître à 2h d'incubation à 37°C dès les concentrations de l'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml de solution.

A partir de ces données, nous avons entrepris, l'effet de lipoprotéines sériques de concentrations inférieures à celles des lipoprotéines du plasma sanguin sur l'effet de l'amphotericine B de concentrations croissantes. Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* sont soumises à l'effet de l'amphotericine B libre ou complexée aux lipoprotéines sériques (HDL ou LDL) à des durées d'incubation de 25 minutes et 1 heure.

La figure n° 23, représente les résultats relatifs de la perméabilité au potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotericine B à 1,5 et 20µg/ml, en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes ou de lipoprotéines légères de concentration en cholestérol total de l'ordre de 0,18g/l et 0,65g/l respectivement. Ces concentrations sont de moitié à celles des lipoprotéines du plasma sanguin.

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* de densité cellulaire de l'ordre de $4,8 \cdot 10^8$ cellules viable/ml (1,0 à 2g/l de protéines cellulaires) sont resuspendues dans le tampon tris-HCl, 50mmol/l, pH 7,4 en présence de 10mmol/l de glucose, sont soumises soit à l'effet de l'amphotericine B libre ou complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL ou aux lipoprotéines légères, LDL pendant une durée d'incubation de 25 minutes à 37°C, par rapport aux cellules intactes, sans traitement préalable ni à l'amphotericine B, ni liée aux lipoprotéines sériques. Les lipoprotéines sériques (HDL ou LDL) sont préincubées en présence d'amphotericine B pendant 30 minutes à 37°C, avant d'être ajoutées dans le milieu contenant les cellules.

Il ressort des résultats observés que :

- En l'absence d'amphotericine B et de lipoprotéines sériques, les cellules de *saccharomyces cerevisiae* préservent la totalité de leur potassium intracellulaire (contrôle).

- L'addition de l'amphotericine B libre (courbe à) dans le milieu d'essai induit une fuite massive de potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, des concentrations de l'ordre de 1 µg / ml (soit environ 65 % de fuite potassique par rapport au contrôle). Un maximum de fuite potassique (20 % seulement de K⁺ retenu), est enregistrée dès les concentrations de l'ordre de 5 µg / ml d'amphotericine B.

- Les cellules traitées l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL (courbe c), préservent presque la totalité de leur potassium interne (83 % de potassium retenu par rapport au contrôle), à 1 µg / ml d'amphotericine B. Dès les concentrations supérieures, la fuite potassique devient significative. Les niveaux de potassium intracellulaire sont de l'ordre de 60 % et 54 % à des concentrations d'amphotericine B de 5 1 µg / ml et 20µg/ml respectivement.

- Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* soumises à l'effet de l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines légères, LDL (courbe b), montrent un niveau de potassium intracellulaire de l'ordre de 50% et 45% à des concentrations d'amphotericine B respectives de 1µg/ml et 5 à 20µg/ml.

Des résultats similaires sont obtenus, en utilisant l'amphotericine B de concentrations croissantes (1,5 et 20µg/ml), complexée soit aux lipoprotéines lourdes, HDL, soit aux lipoprotéines légères, LDL de concentrations en cholestérol total de 1/10 de celles des lipoprotéines du plasma sanguin.

Nous pouvons conclure que :

- Les lipoprotéines lourdes, HDL induisent un effet protecteur important (83% de potassium retenu) à des concentrations d'amphotericines B de l'ordre de 1µg/ml, durant les périodes d'incubation courtes (25 minutes). A de concentrations supérieurs, cet effet devient plus réduit.

- Les lipoprotéines légères, LDL montrent aussi un effet protecteur de l'action cytotoxique de l'amphotericine B. Cependant, cet effet est significativement plus réduit que celui induit par les lipoprotéines lourdes, à des concentrations d'amphotericine B de l'ordre de 1µg/ml.

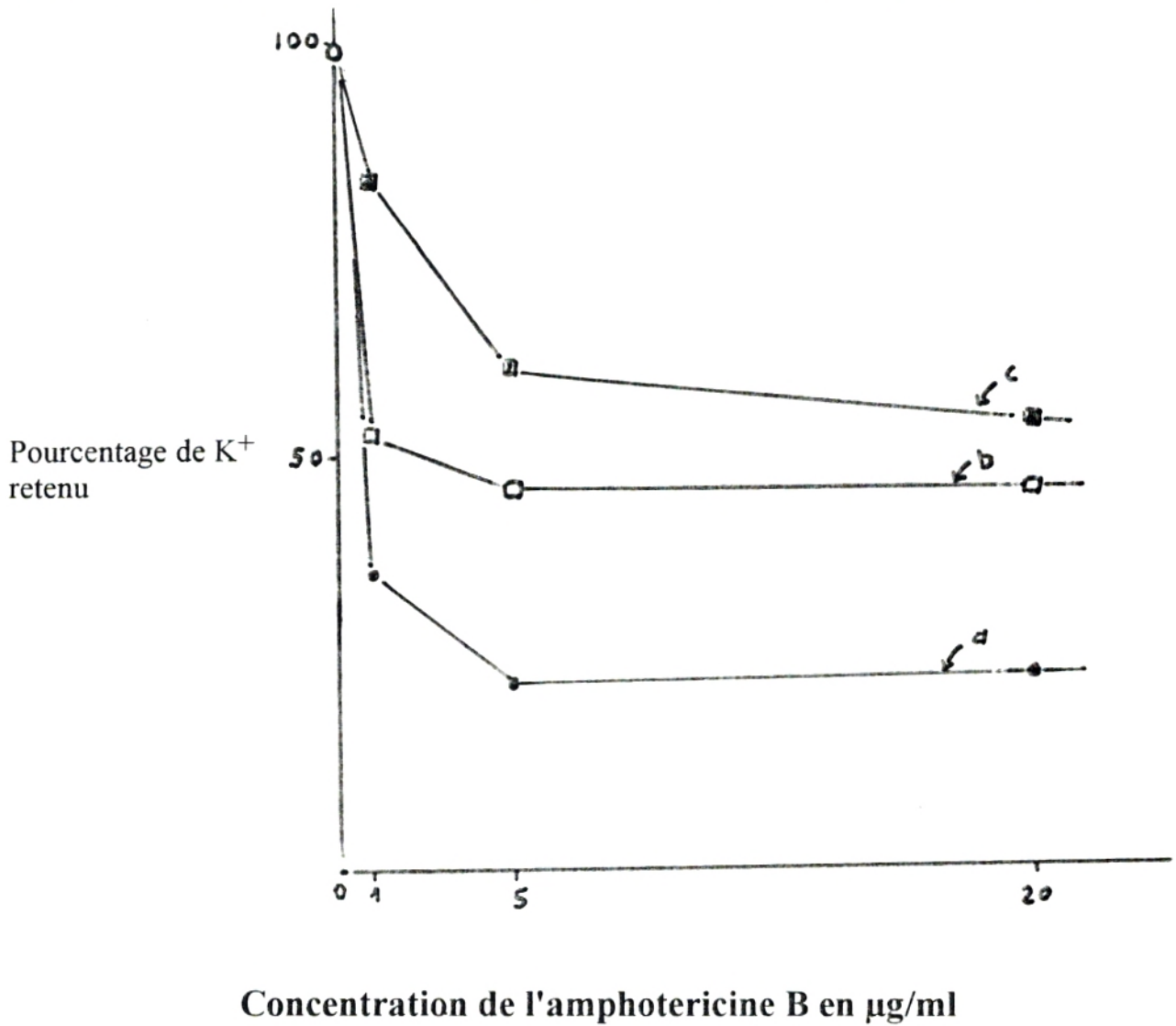


Fig N° 23 : Effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité au potassium intracellulaire des cellules saccharomyces cerevisiae induite par l'Amphotericine B de doses croissantes.

4,8. 10⁸ cellules viables ml⁻¹ (1,0 à 2,0 g de protéines cellulaires par litre de solution) incubées à 37 °c pendant 25 minutes.

- (symbol -o-) : Cellules non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules traitées à l'Amphotericine B libre
- (Courbe b) : Cellules traitées à l'Amphotericine B complexée au HDL
- (Courbe c) : Cellules traitées à l'Amphotericine B complexée au LDL

La figure n° 24, représente les résultats relatifs de la perméabilité au potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induite par l'amphotericine B de concentrations de 1 à 5µg/ml, en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes HDL ou de lipoprotéines légères, LDL de concentration en cholestérol total de l'ordre de 0,20 g/l et 0,56g/l respectivement.

Ces concentrations sont de moitié à celles des lipoprotéines du plasma sanguin. Les lipoprotéines sériques sont préincubées à l'amphotericine B pendant 30 minutes à 37°C avant d'être ajoutées dans le milieu contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae*.

Environ $2,7 \cdot 10^8$ cellules viables/ml de solution (1 à 1,5 g/l de protéines cellulaires), resuspendues dans le tampon tris-HCl, 50mmol/l, pH 7,4 en présence de 10mmol/l de glucose, sont soumises soit à l'effet de l'amphotericine B libre, soit complexée à l'une des fractions lipoprotéiques pendant un temps d'incubation de 2h à 37°C, par rapport aux cellules intactes n'ayant été traitées ni à l'amphotericine B libre, ni complexée aux lipoprotéines (contrôle).

Nous pouvons noter que :

- En l'absence de l'amphotericine B et de lipoprotéines sériques, les cellules de *saccharomyces cerevisiae* préservent la quasi-totalité de leur potassium interne pendant toute la durée de l'incubation.

En revanche, en présence de l'amphotericine libre (courbe a), les cellules présentent une fuite massive du potassium intracellulaire (environ 10% de potassium retenu) quelque soit les concentrations d'amphotericine B utilisées.

- Les cellules traitées à l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL (courbe c) montrent une fuite massive du potassium intracellulaire allant jusqu'à 80% par rapport au contrôle dès que les concentrations de l'amphotericine B deviennent supérieures à 2µg/ml. Alors que pour des concentrations inférieures à 2µg/ml, la fuite potassique est réduite de manière significative et les cellules retiennent encore 50% de leur potassium intracellulaire après 2 heures d'incubation à 37°C. Une fuite potassique maximum (85% de fuite d'ions potassium par rapport au contrôle) lorsque l'amphotericine B atteint les concentrations de l'ordre de 5µg/ml.

- Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* soumises à l'effet de l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines légères, LDL (courbe b), montrent un niveau de potassium intracellulaire de 15% seulement par rapport au contrôle. Les cellules ont donc perdu la quasi totalité de leur potassium interne, soit environ 85% par rapport au contrôle, quelque soit les concentrations de l'amphotericine B utilisées.

4 . 2 . 2 Conclusion :

Chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae* l'amphotericine B sous forme libre ou complexée aux lipoprotéines légères, LDL seulement induit une fuite massive du potassium intracellulaire (15% seulement de potassium retenu par les cellules), dès les concentrations de l'antifongiques de l'ordre de 1µg/ml.

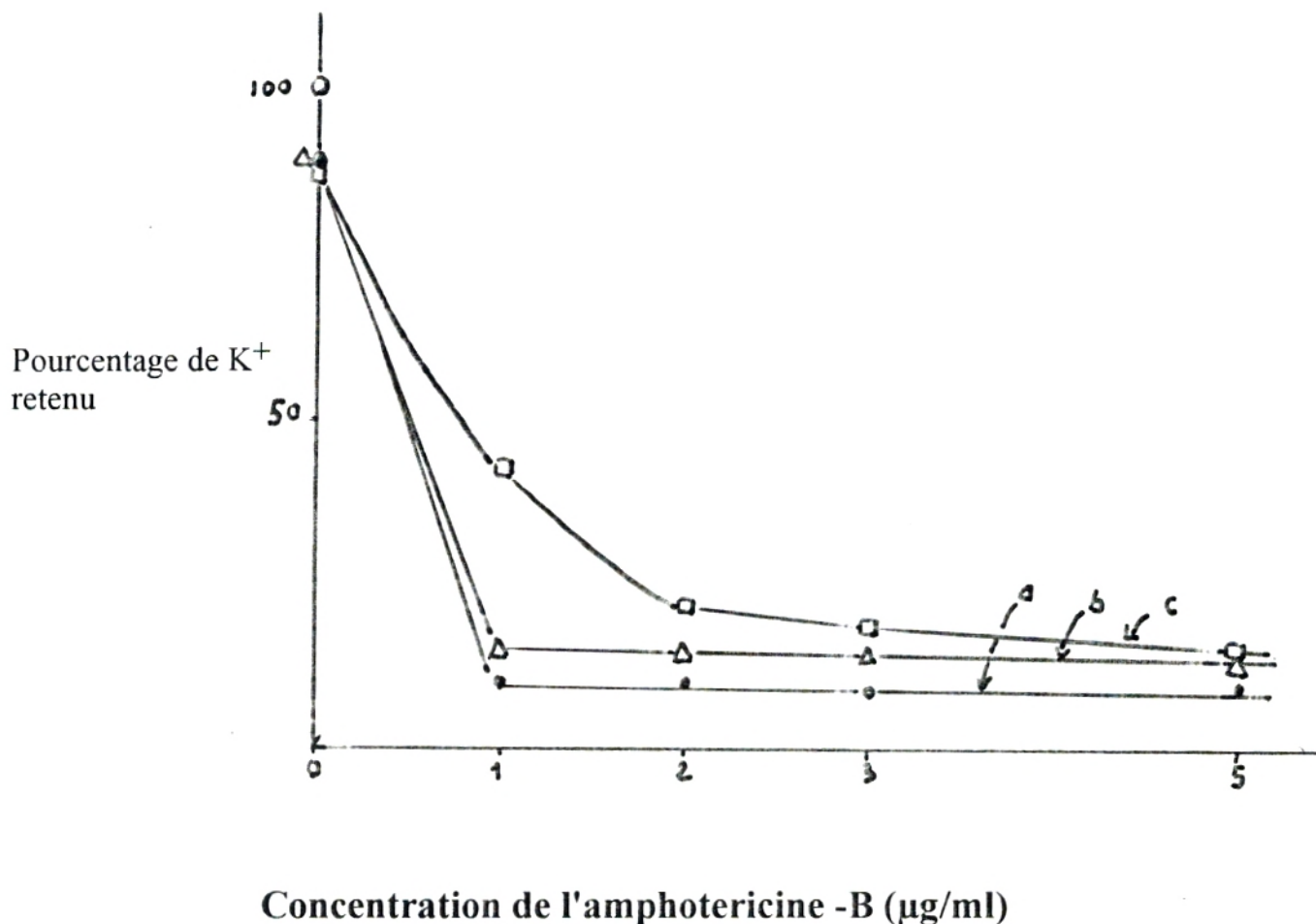


Fig N° 24 : Dose - réponse. Effet des lipoprotéines (HDL, ou LDL) sur l'action membranaire de l'Amphotericine B de doses croissantes chez les cellules saccharomyces cerevisiae de densité de l'ordre de $2,7 \cdot 10^8$ cellules viables par millilitre de solution (1,3 à 1,6 g/l de protéines cellulaires) à des durées d'incubation de 2h.

- (Symbole o) : Cellules intactes (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules traitées à l'Amphotericine B
- (Courbe b) : Cellules traitées à l'Amphotericine B complexée au HDL
(cholestérol total $\approx 0,20$ g/l)
- (Courbe c) : Cellules traitées à l'Amphotericine B complexée au LDL
(cholestérol total $\approx 0,56$ g/l)

En revanche, l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes HDL, ne produit des effets cytotoxiques de même intensité qu'à des concentrations de l'antifongiques de l'ordre de 1µg/ml.

En revanche, l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL, ne produit des effets cytotoxiques de même intensité qu'à des concentrations d'amphotericine B supérieures à 2µg/ml. A des concentrations inférieures à 2µg/ml, les lipoprotéines lourdes, HDL induisent un effet protecteur partiel (environ 50% de fuite potassique par rapport au contrôle).

Des résultats similaires sont obtenus, lorsqu'on utilise des concentrations 2 fois plus faibles de lipoprotéines sériques (correspondant à la moitié des concentrations plasmiqes soit environ 0,18 g/l de cholestérol total pour les lipoprotéines lourdes, HDL et 0,65 g/l pour les lipoprotéines légères, LDL), l'amphotericine B (1,5 et 20µg/ml) induit une fuite potassique massive chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae* utilisées à une concentration cellulaire de l'ordre de $4,8 \cdot 10^8$ cellules viables/ml de solution, soit environ 1,6 à 2,0g/l de protéines cellulaires incubées pendant 2h à 37°C.

Il ressort des figures n° 24 et 25, qu'une concentration de l'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml sous forme libre ou liée aux lipoprotéines sériques utilisées à une concentration de moitié de celle du plasma sanguin, est suffisante pour avoir un effet maximum sur la perméabilité membranaire au potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, environ

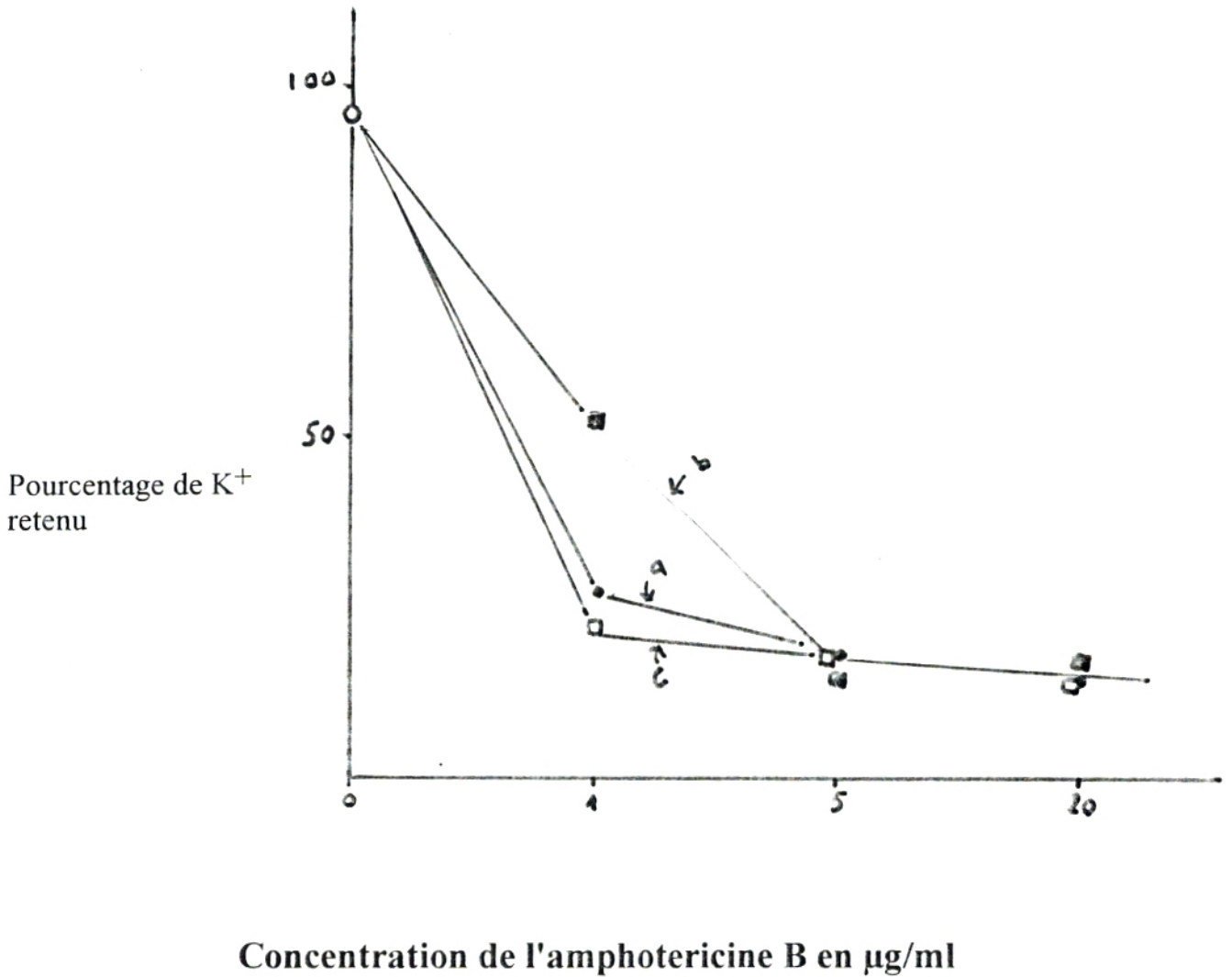


Fig N° 25 : Effet des lipoprotéines sériques sur la perméabilité membranaire des cellules saccharomyces cerevisiae de densité de l'ordre de $4,8 \cdot 10^8$ cellules viables par millilitre de solution induite par l'Amphotericine B de doses croissantes à des durées d'incubation de 2 h.

- (Symbole o) : Cellules non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules traitées à l'Amphotericine B libre
- (Courbe b) : Cellules traitées à l'Amphotericine B complexée au HDL
- (Courbe c) : Cellules traitées à l'Amphotericine B complexée au LDL

16% de potassium retenu par rapport au contrôle sans amphotericine B et sans lipoprotéines.

La figure n° 26, représente l'effet d'addition des lipoprotéines sériques de concentrations en cholestérol total au 1/10 de celles du plasma sanguin, soit environ 0,03g/l des lipoprotéines lourdes, HDL et 0,33g/l des lipoprotéines légères, LDL, sur l'augmentation de la perméabilité au potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotericine B de concentration croissantes (1,5 et 20µg/ml).

A partir des résultats obtenus, il ressort que :

- L'amphotericine B sous forme libre induit une fuite importante du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* (courbe b), soit environ 75% de fuite potassique, au bout de 2h d'incubation à 37°C par rapport au contrôle sans amphotericine B et sans lipoprotéines.

- En présence de lipoprotéines lourdes, HDL (courbe a de la figure 26, la fuite du potassium interne des cellules, est légèrement réduite lorsque la concentration d'amphotericine B est l'ordre de 1µg/ml (45% du potassium intracellulaire retenu). Dès que l'on atteint des concentrations de l'ordre de 5µg/ml, la fuite potassique devient massive (environ 75% de fuite par rapport au contrôle).

- En présence de lipoprotéines légères, LDL (courbe c de la figure 26), la fuite potassique des cellules de *saccharomyces cerevisiae* atteint un maximum (entre 20% à 25% du potassium retenu par rapport au contrôle), dès 1µg/ml d'amphotericine B.

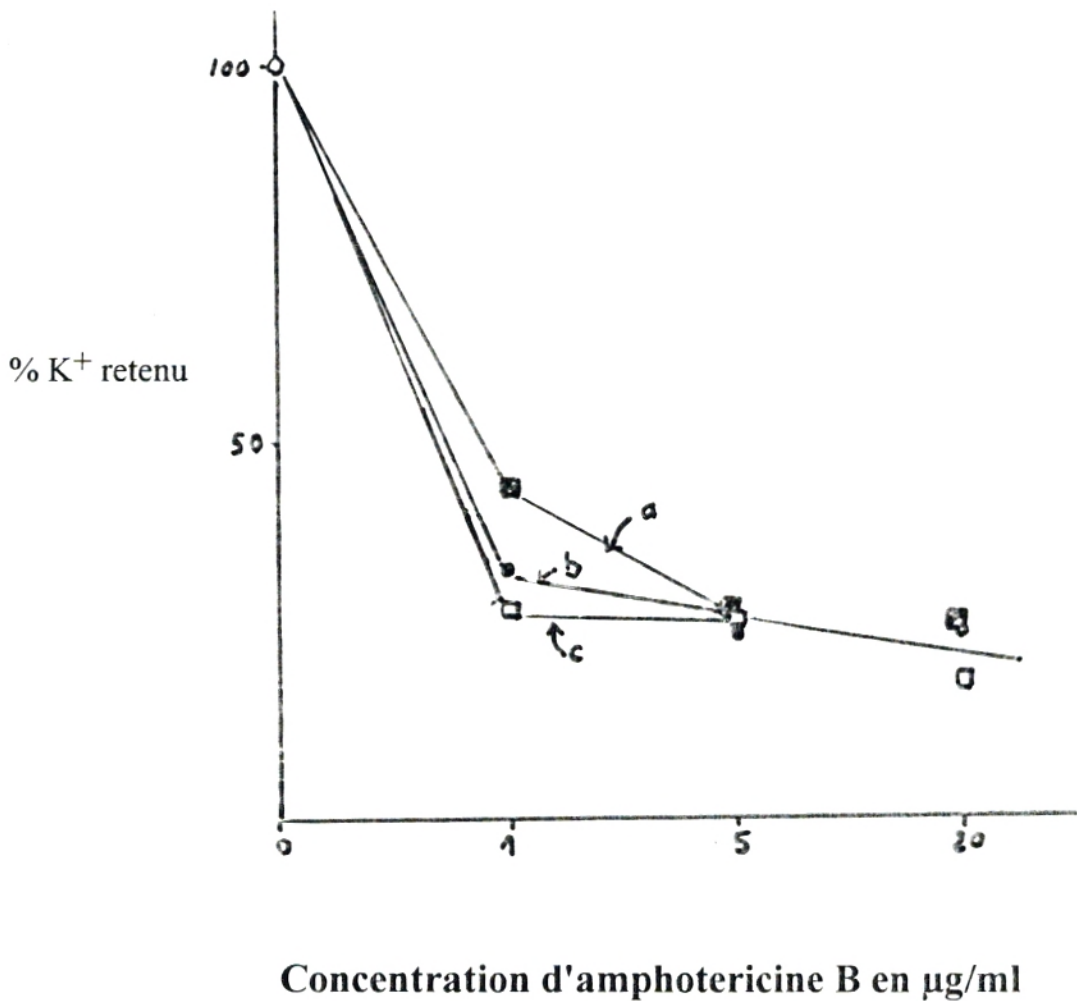


Fig N° 26 : Effet des lipoprotéines sérique de concentrations en cholestérol total de 1/10 de celles des lipoprotéines du plasma sanguin, sur la perméabilité au potassium des cellules *saccharomyces cerevisiae* de densité de l'ordre de $1,64 \cdot 10^8$ cellules viables par millilitre de solution induite par l'Amphotericine B de doses croissantes à des durées d'incubation de 2 h.

- (Symbole \circ) : Cellules non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules traitées à l'Amphotericine B liée au HDL
- (Courbe b) : Cellules traitées à l'Amphotericine B libre
- (Courbe c) : Cellules traitées à l'Amphotericine B liée au LDL

Nous pouvons conclure que seule les lipoprotéines lourdes, HDL sont capable d'induire un effet protecteur relatif (environ 55% de fuite potassique par rapport au contrôle) à de concentrations de l'amphotericine B de l'ordre de 1µg/ml.

Conclusion :

A partir des résultats obtenues des figures n° 24, 25 et 26, nous pouvons conclure que, l'effet des lipoprotéines sériques sur l'action cytotoxique de l'amphotericine B d'induire une augmentation de la perméabilité au potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* incubées durant 2h à 37°C est globalement similaire quelque soit les concentrations en cholestérol total des lipoprotéines lourdes HDL et des lipoprotéines légères, LDL les effets se résument comme suit :

- L'amphotericine B, complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL, produit le même effet cytotoxique au niveau de la perméabilité au potassium des cellules de *saccharomyces cerevisiae* que celui de l'amphotericine B libres seulement à des concentrations supérieures à 2µg/ml de solution. Cependant à des concentrations inférieures à 2µg/ml, les lipoprotéines lourdes, HDL induit un effet protecteur relatif (entre 40% et 50% de fuite potassique), quelque soit les concentrations en cholestérol total des lipoprotéines utilisées.

- L'amphotericine B complexée aux lipoprotéines légères, LDL induit un effet cytotoxique important (soit environ 80% de fuite potassique) quelque soit le contenu en cholestérol total des lipoprotéines sériques. Cet effet est observé dès les concentrations de 1µg/ml d'amphotericine B.

5 . Effet de doses croissantes de lipoprotéines sur la perméabilité au potassium induite par l'amphotericine B.

Les résultats obtenus jusqu'à ce niveau dans les conditions expérimentales choisies illustrent clairement l'efficacité de l'antifongique, amphotericine B sous forme libre ou complexée aux lipoprotéines sériques. L'amphotericine B sous forme libre induit une fuite potassique massive dès que sa concentration devient supérieure à 0,5µg/ml. Un effet maximum de fuite potassique est observée à partir des concentrations d'amphotericine B supérieures ou égales à 5µg/ml.

A 5µG/ml l'amphotericine B, l'addition des lipoprotéines lourdes, HDL à concentrations équivalentes à celles du plasma sanguin induit un effet protecteur transitoire que l'on observe durant la première demi-heure d'incubation. Cet effet se réduit lorsque le temps d'incubation augmente et disparaît après 2h d'incubation à 37°C. Les lipoprotéines légères, LDL ne montrent aucun effet protecteur dès que le temps d'incubation devient supérieure à 25 minutes, sinon cet effet est très minime.

En modifiant les concentrations de lipoprotéines sériques, on modifie le nombre de sites de fixation de l'amphotericine B sur les particules lipoprotéiques. Ces sites sont représentés par les molécules de cholestérol non estifié.

L'objectif de cette partie du travail est de vérifier si ces changements de concentrations ont un effet sur la cytotoxicité de l'amphotericine B vis à vis des cellules de *saccharomyces cerevisiae*.

Nous avons alors utilisé une concentration fixe de l'amphotericine B (5µg/ml) et nous avons fait varier la concentration de lipoprotéines sérique (HDL ou LDL). L'effet de cette variation est suivi par l'index perméabilité au potassium. On apprécie d'une part, les perturbations de "cinétiques" de fuite de potassium, d'autre part, les changements des niveaux stationnaires de potassium intracellulaires.

5.1 - Effet de doses croissantes de lipoprotéines sur les cinétiques de fuite de potassium.

L'étude entreprise a été réalisée avec des lipoprotéines lourdes ou HDL et des lipoprotéines légères ou LDL.

Sur figure n° 27, sont représentés les résultats obtenus en faisant varier la concentration de lipoprotéines lourdes, HDL, suivi par le taux de cholestérol total qu'elles renferment en maintenant la concentration de l'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml de solution.

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae* (à une concentration de 3,1.10⁸ cellules viables/ml de solution, soit 0,70 à 0,85g/l de protéines cellulaire) sont maintenus dans le tampon tris-HCl (50mmol/l, pH 7,4) contenant 10mmol/l de glucose. Les cellules sont traitées à l'amphotericine B (5µg/ml) soit sous forme libre, soit sous forme complexée à des concentrations croissantes de lipoprotéines lourdes, HDL. Ces doses croissantes de lipoprotéines correspondent à des concentrations croissantes de cholestérol (sites de fixation de l'amphotericine B). Les cellules sans traitement préalable à l'amphotericine B libre ou complexée aux lipoprotéines serviront de référence.

Nous rappelons que l'amphotericine B est preincubée aux différentes fractions lipoprotéiques pendant 30 minutes à 37°C avant d'être ajoutée au milieu d'essai.

Nous avons déjà montré que l'addition de l'amphotericine B libre à 5µg/ml au milieu d'incubation induit une fuite massive du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*. Environ, 16% du potassium retenu par rapport au contrôle sans amphotericine B et sans lipoprotéines dès les 25 premières minutes d'incubation à 37°C, soit 15.10⁻² MEq K⁺/gramme de protéines cellulaires.

- L'addition de l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes, HDL native (cholestérol total de l'ordre de 0,34g/l), induit une fuite de potassium intracellulaire plus lente comparée à celle causée par l'amphotericine B libre. La réduction de la vitesse de fuite de potassium dépend de la concentration de lipoprotéines. Le contenu en potassium des cellules diminue progressivement plus le temps d'incubation augmente, pour atteindre le même niveau que celui des cellules en présence d'amphotericine B libre, après 2h d'incubation. Environ 40% à 80% de fuite potassique entre 25 minutes et 120 minutes d'incubation par rapport au contrôle.

En revanche, la cinétique de fuite de potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* augmente lorsque les concentration des lipoprotéines lourdes en cholestérol total diminue. En effet, les cellules traitées à l'amphotericine B complexée aux lipoprotéines lourdes de concentration en cholestérol total inférieure ou égale à 0,1g/l, retiennent seulement 40% de potassium intracellulaires à 25 minutes d'incubation. 1h d'incubation est alors suffisante pour avoir un effet maximum (80% de fuite potassique par rapport au contrôle). Un effet intermédiaire est cependant observé à des concentrations en cholestérol total de lipoprotéines de l'ordre de 0,16 g/l de solution.

Les résultats obtenus de l'effet des lipoprotéines légères de concentrations croissantes de cholestérol total sont regroupés dans la figure n°28.

Nous pouvons constater que :

- La fuite de potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotericine B complexée aux

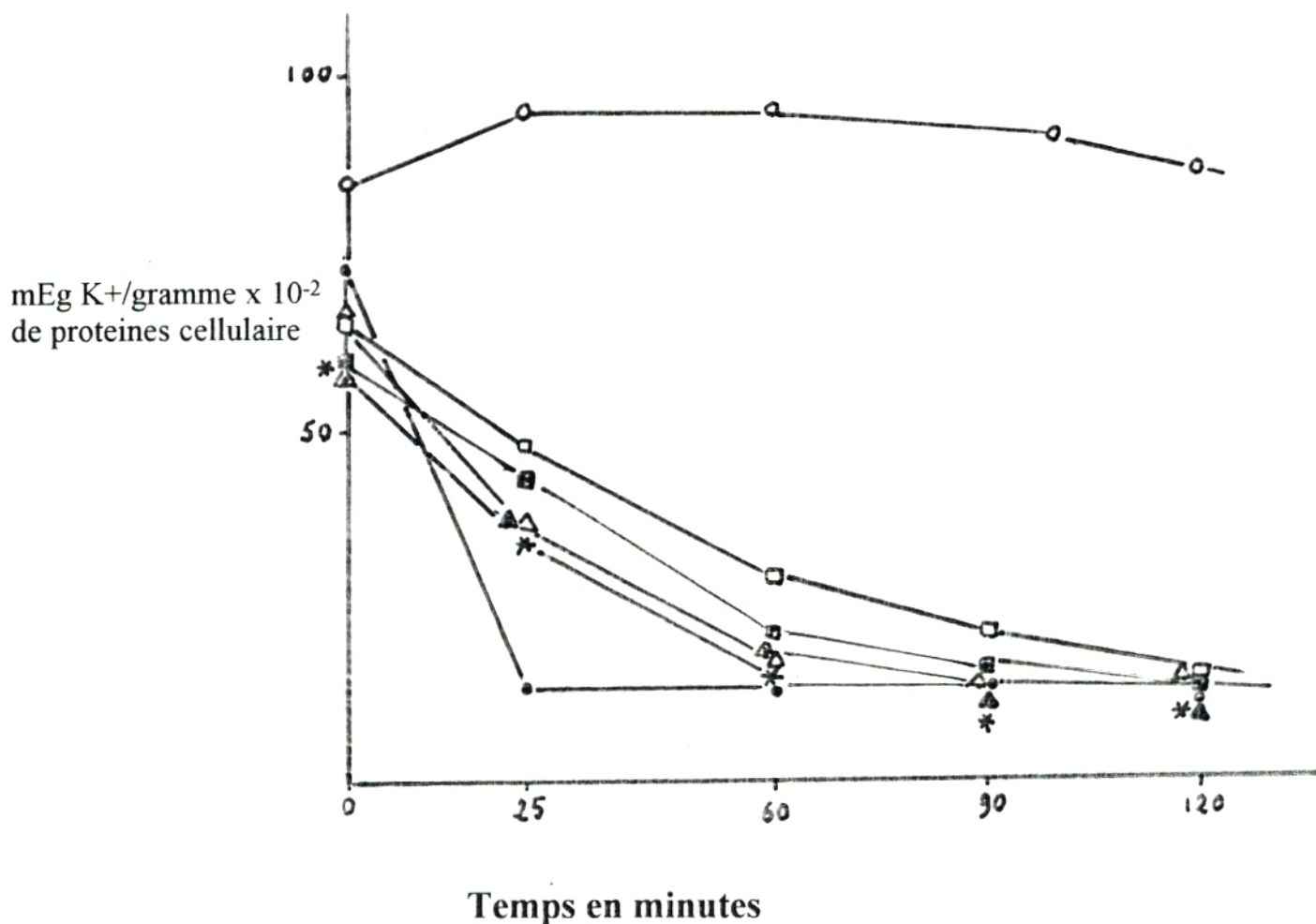


Fig N° 27 : Effet des lipoprotéines lourdes, HDL de concentrations croissantes sur la perméabilité au K⁺ induite par l'amphotericine B

- (Symbole ○) : Cellules de saccharomyces cerevisiae non traitées (contrôle)
- (Symbole ●) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 μg/ml
- : Cellules de saccharomyces cerevisiae en présence d'Amphotericine B 5 μg/ml préincubée au lipoprotéines lourdes, HDL (□ native, cholestérol total ≈ 0,34 g/l; ■ cholestérol total ≈ 0,16 g/l; △ cholestérol total ≈ 0,1 g/l ; ▲ cholestérol total ≈ 0,05 g/l; * cholestérol total ≈ 0,02 g/l.

lipoprotéines légères est massive dès que le temps d'incubation devient supérieure à 25 minutes.

quelque soit les concentrations en cholestérol total des fractions lipoprotéiques, soit environ 15% de potassium retenu par rapport au contrôle. Une cinétique de fuite de potassium intracellulaire beaucoup plus rapide que celle induite par l'amphotericine B liée aux lipoprotéines lourdes. Nous remarquons que la rétention du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* diminue lorsque la concentration en cholestérol total des fractions lipoprotéiques, LDL augmente durant les 25 minutes d'incubation à 37°C. En effet, le contenu de potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* passe de 25% en présence d'amphotericine B complexée aux lipoprotéines légères, LDL de concentrations en cholestérol total équivalentes à celles du plasma sanguin (environ 1,10g/l) à 45% en présence d'amphotericine B liée aux lipoprotéines légères, LDL de concentration en cholestérol total 10 fois moins (de l'ordre de 0,11g/l) par rapport au contrôle sans amphotericine B et sans lipoprotéines.

Sur la base des résultats obtenus des figures n° 27 et 28, nous pouvons en conclure que :

- L'addition de lipoprotéines sériques modifie la cinétique de fuite de potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit par l'amphotericine B à 5µg/ml, et non l'état stationnaire.

- Les lipoprotéines lourdes HDL et les lipoprotéines légères, LDL sont capables d'induire un effet protecteur transitoire observé à 25 minutes d'incubation.

Ce dernier se réduit d'une manière importante, pour disparaître à 2h d'incubation.

L'effet protecteur le plus faible est obtenu dès que la

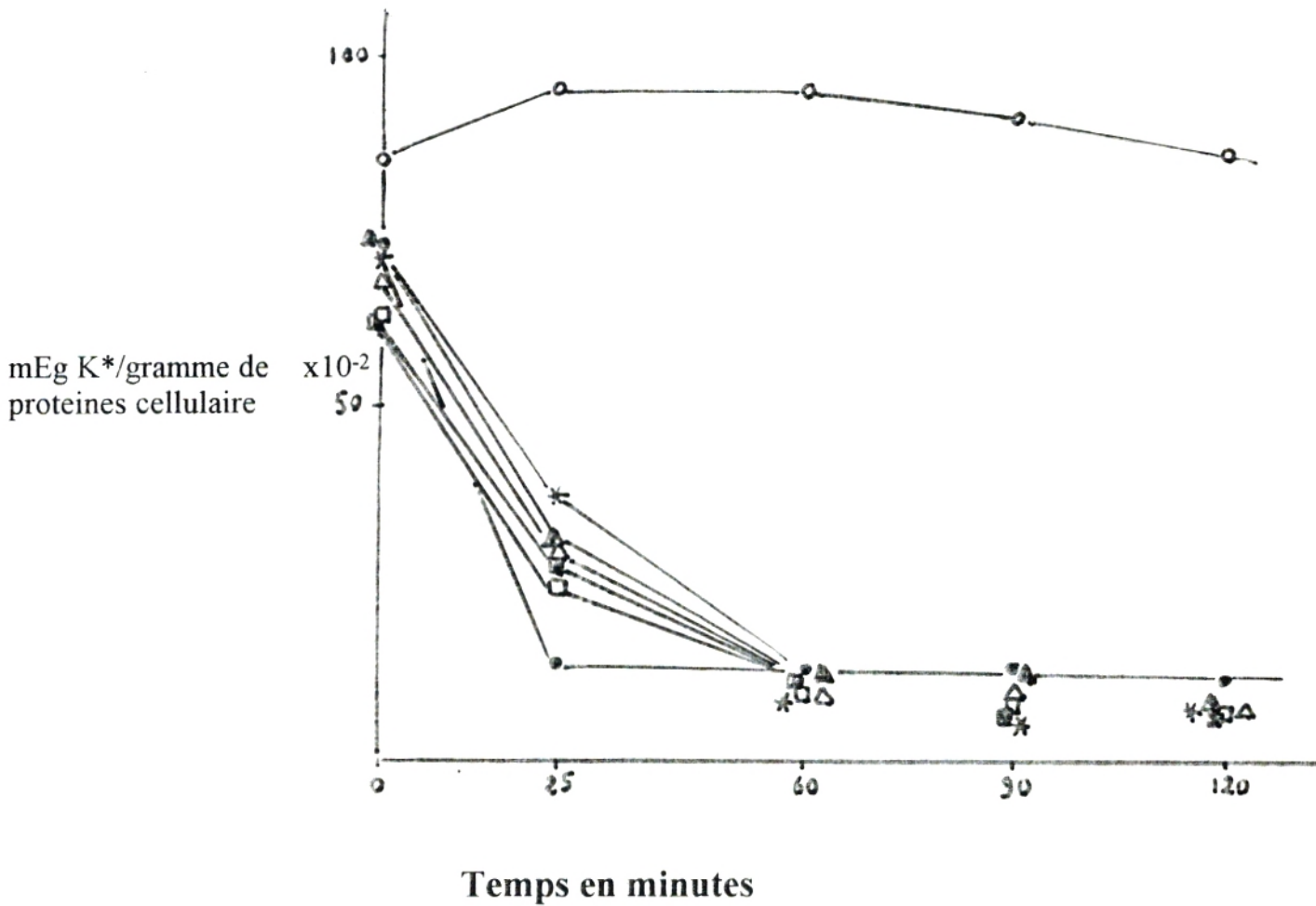


Fig N° 28 : Effet des lipoprotéines légères, LDL de concentrations croissantes sur la perméabilité au K⁺ induite par l'amphotericine B

- (Symbole ○) : Cellules de saccharomyces cerevisiae non traitées (contrôle)
- (Symbole ●) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml
- : Cellules de saccharomyces cerevisiae en présence d'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines lourdes, HDL (□ native, cholestérol total = 1,1 g/l; ■ cholestérol total = 0,5 g/l; △ cholestérol total = 0,3 g/l ; ▲ cholestérol total = 0,15 g/l; * cholestérol total = 0,11 g/l.

concentration en cholestérol total des lipoprotéines lourdes, HDL atteint une valeur de l'ordre de 100mg/l.

- Les lipoprotéines légères, LDL ont un effet protecteur significativement plus réduit que celui des lipoprotéines lourdes, HDL. Cet effet augmente lorsque la concentration en cholestérol total diminue.

5.2 - Effet de doses croissantes de lipoprotéines sériques sur l'état stationnaire de potassium

Dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, nous avons mesuré le contenu en potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* après des durées d'incubation à 37°C de 25 minutes, 60 minutes et 120 minutes.

Les figures n° 29, a, b et c représentent à 25 minutes, à 1h et à 2h d'incubation respectivement, les pourcentages de potassium retenu par les cellules de *saccharomyces cerevisiae* mises en présence de 5µg/ml d'amphotéricine B libre ou complexée à des lipoprotéines utilisées à différentes concentrations. Nous remarquons d'abord qu'en présence de 5µg/ml d'amphotéricine B sous forme libre, la concentration de potassium retenu intracellulaire représente seulement 13% par rapport aux cellules de contrôle, dès les 25 premières minutes d'incubation.

- A 25 minutes d'incubation (figure 29 a) lorsque la concentration de lipoprotéines lourdes, HDL (courbe a) exprimée en mg de cholestérol total par litre de solution augmente de zéro à 100mg/l, les niveaux de potassium intracellulaire varient d'une manière importante de 16 % à 4% du niveau contrôle. Pour des concentrations supérieures, le contenu en potassium intracellulaire atteint rapidement 56% du niveau contrôle, dès que les concentrations de cholestérol total des lipoprotéines lourdes, HDL sont de l'ordre de 300mg/l (celles du plasma sanguin).

- En présence d'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines légères, LDL (courbe b) et contrairement aux lipoprotéine lourdes, le contenu en potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* augmente lorsque les concentrations en cholestérol total diminuent. Les niveaux de potassium intracellulaire passent progressivement de 28% à 43% pour des concentrations en cholestérol total allant de 1000mg/l à 100mg/l respectivement.

Nous pouvons conclure que :

- La présence de lipoprotéines lourdes, HDL natives, présentent un effet protecteur relatif (45% de fuite potassique) contre l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B sous forme libre (environ 85% de fuite potassique), durant 25 minutes d'incubation à 37°C. Cet effet diminue et d'une manière faible pour des concentrations inférieures ou égales à 100 mg/l (60% de fuite potassique)

- Les lipoprotéines légères, LDL sont aussi capables d'induire un effet protecteur minime contre l'action cytotoxique de l'amphotéricine B. Cet effet est plus important à de faibles concentration en cholestérol total (1/10 de celles du plasma sanguin).

L'effet protecteur relatif des lipoprotéines sériques complexées à l'amphotéricine B (5µg/ml), (Figure n° 29 b et c) observé à 25 minutes d'incubation est transitoire. En effet, en présence de lipoprotéines lourdes, HDL (courbe a), l'effet protecteur observé à des concentration en cholestérol équivalentes à celles du plasma, se réduit considérablement à 1h d'installation (environ 65% de fuite potassium) pour disparaître à 2h d'incubation soit environ 82% de fuite potassique par rapport au contrôle sans amphotéricine B et sans lipoprotéines.

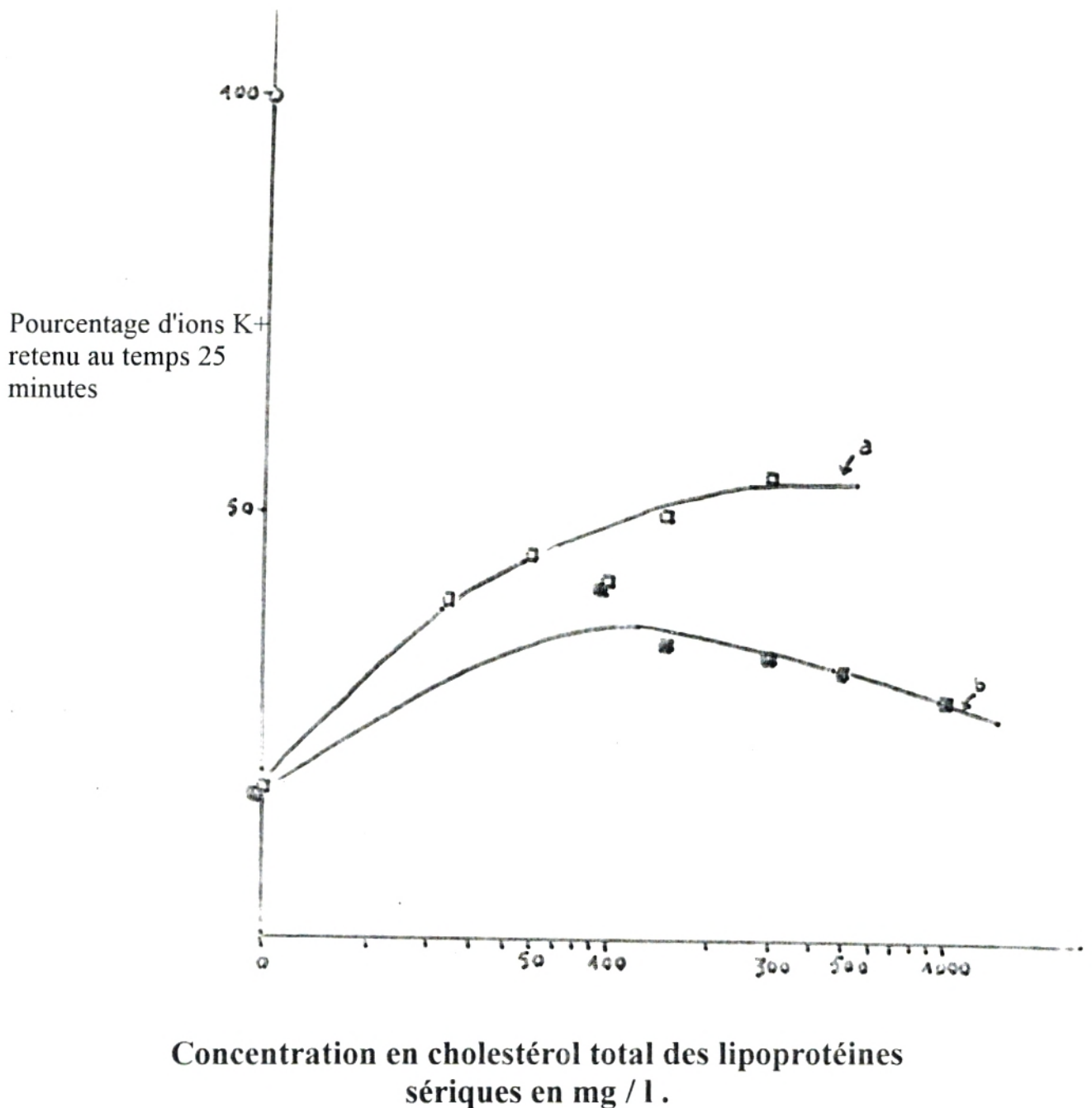


Fig N° 29 a : Effet doses croissantes de lipoprotéines sériques sur l'état stationnaire de K⁺.

Les cellules saccharomyces cerevisiae sont recueillies en phase de croissance exponentielle, lavées et resuspendues dans le tampon tris - Hcl, 50 mmol/l, PH 7,4 contenant le glucose à 10 mmol/l, à une densité de l'ordre de 3,1 10⁸ cellules viables - ml⁻¹ (0,6 à 0,8 g/l de protéines cellulaires.)

- (Symbole ○) : Cellules de saccharomyces cerevisiae non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines lourdes HDL
- (Courbe b) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines légères LDL

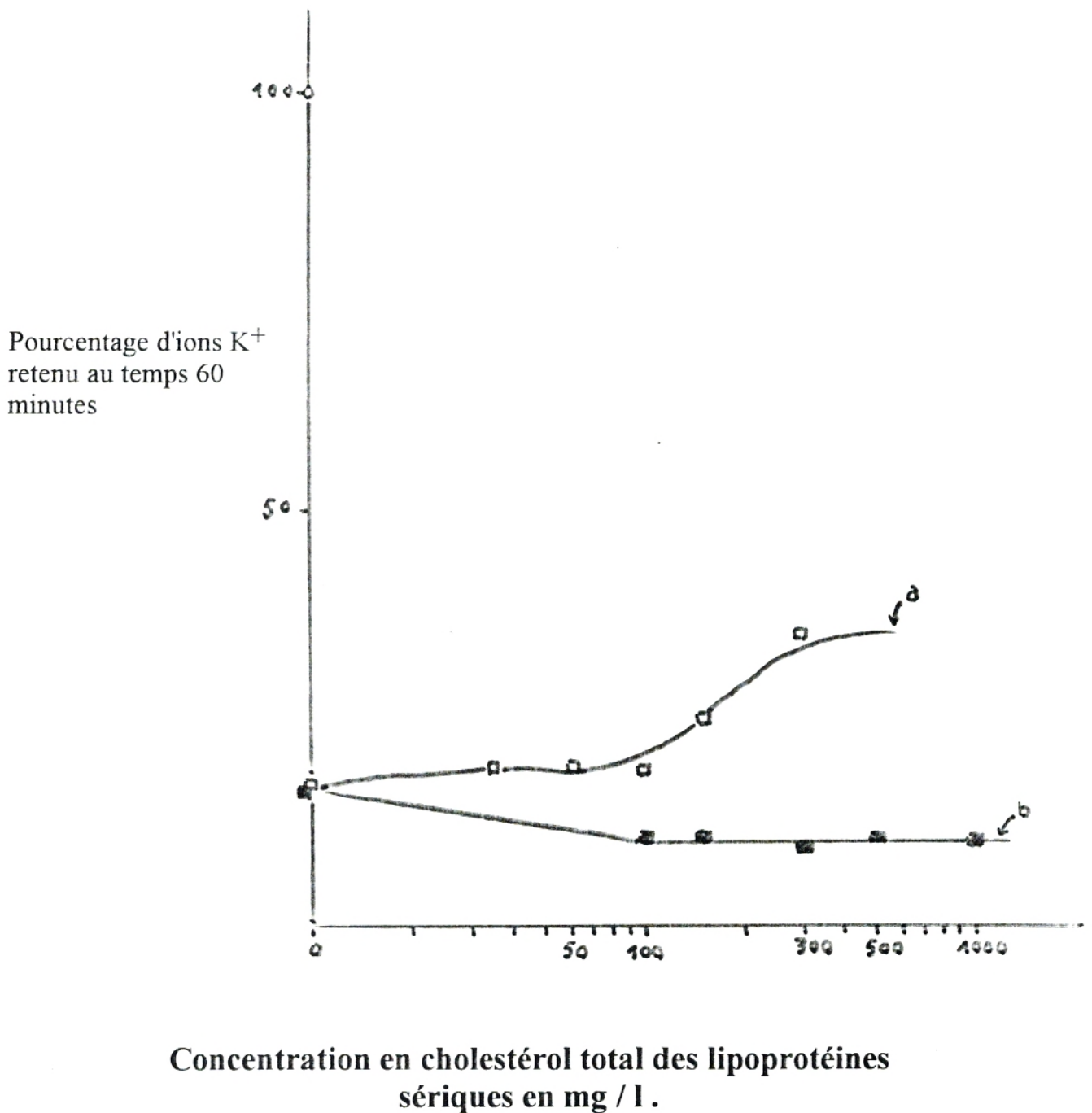


Fig N° 29 b : Effet de doses croissantes de lipoprotéines sériques sur l'état stationnaire de K^+ .

- (Symbole \circ) : Cellules de *saccharomyces cerevisiae* non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules de *saccharomyces cerevisiae* traitées à l'Amphotericine B 5 $\mu\text{g/ml}$ préincubée au lipoprotéines lourdes HDL
- (Courbe b) : Cellules de *saccharomyces cerevisiae* traitées à l'Amphotericine B 5 $\mu\text{g/ml}$ préincubée au lipoprotéines légères LDL

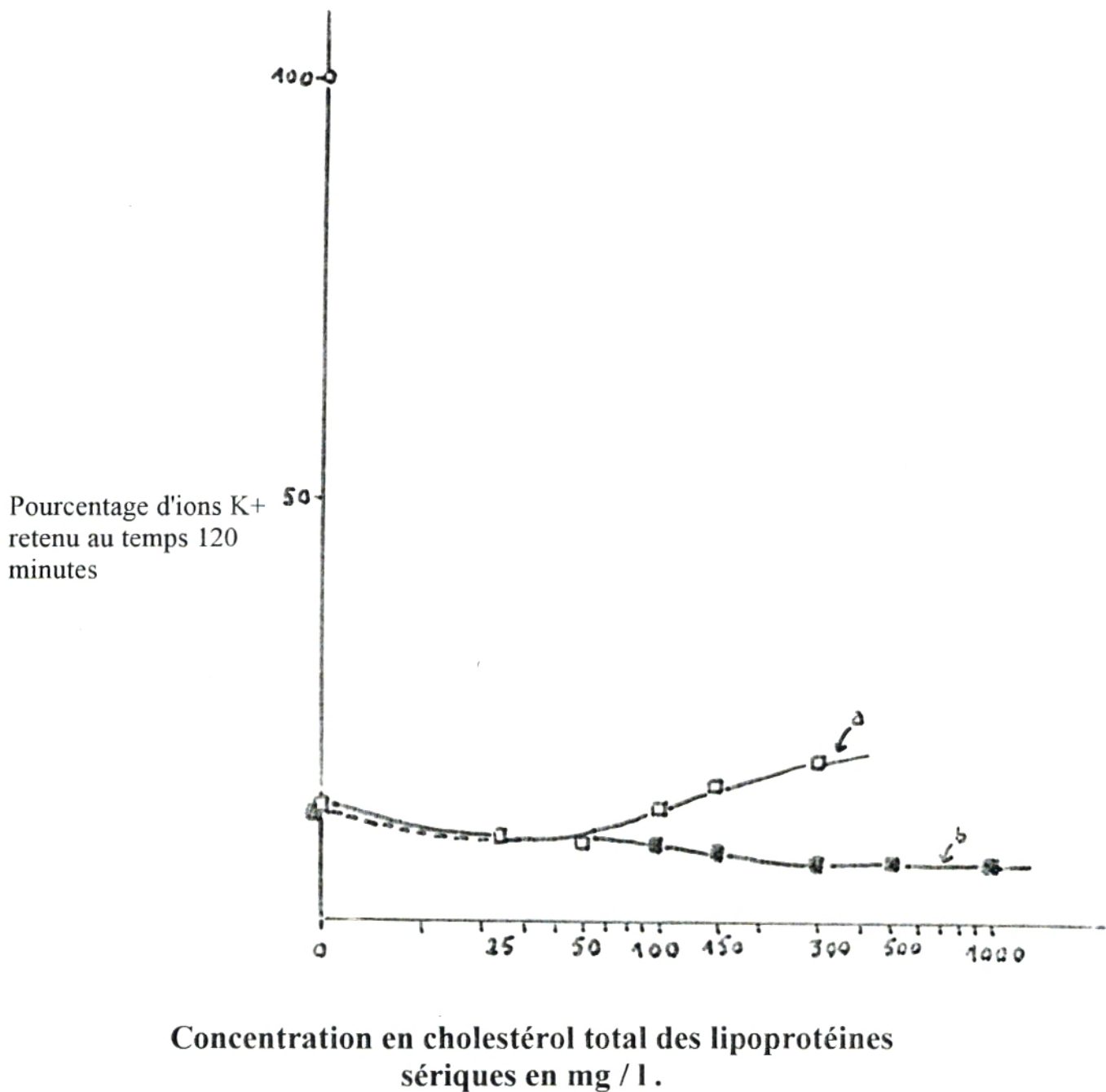


Fig N° 29 c : Effet de doses croissantes de lipoprotéines sériques sur l'état stationnaire de K⁺.

- (Symbole ○) : Cellules de saccharomyces cerevisiae non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines lourdes HDL
- (Courbe b) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines légères LDL

Les niveaux de potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* diminue considérablement lorsque les concentrations en cholestérol total des lipoprotéines lourdes, HDL diminuent. Une fuite maximum est enregistrée dès que celles ci deviennent inférieures à 150mg/l de solution, soit environ 10% de potassium retenu par rapport au contrôle.

- En présence de lipoprotéines légères, LDL (courbe b) l'effet protecteur minime disparaît dès que les durées d'incubation deviennent supérieures à 25 minutes. En effet à 1h d'incubation, le pourcentage de fuite d'ions potassium des cellules de *saccharomyces cerevisiae* est de l'ordre de 90% par rapport aux cellules intactes, quelque soit les concentrations en cholestérol total. Les cellules ont donc perdu la quasi totalité de leur potassium interne. A 2h d'incubation, un maximum de fuite potassiumique environ 93% par rapport au contrôle est enregistré dès que les concentrations en cholestérol total de lipoprotéines deviennent supérieures à 150mg/l de solution.

Etant donné que la présence de cholestérol non estérifié joue un rôle majeur dans l'interaction de l'amphotericine B avec les lipoprotéines sériques, nous avons rapporté les résultats obtenus et résumés dans la figure n° 29c, en fonction du contenu des lipoprotéines en cholestérol non estérifié estimé par calcul ().

Les pourcentages de potassium intracellulaire retenu des cellules de *saccharomyces cerevisiae* traitées à l'amphotericine B libre et complexée aux lipoprotéines sériques, en fonction de concentrations croissante de cholestérol non estérifié calculé, sont représentés sur la figure n° 29 d. Les tracés obtenus sont similaires à ceux de la figure précédente.

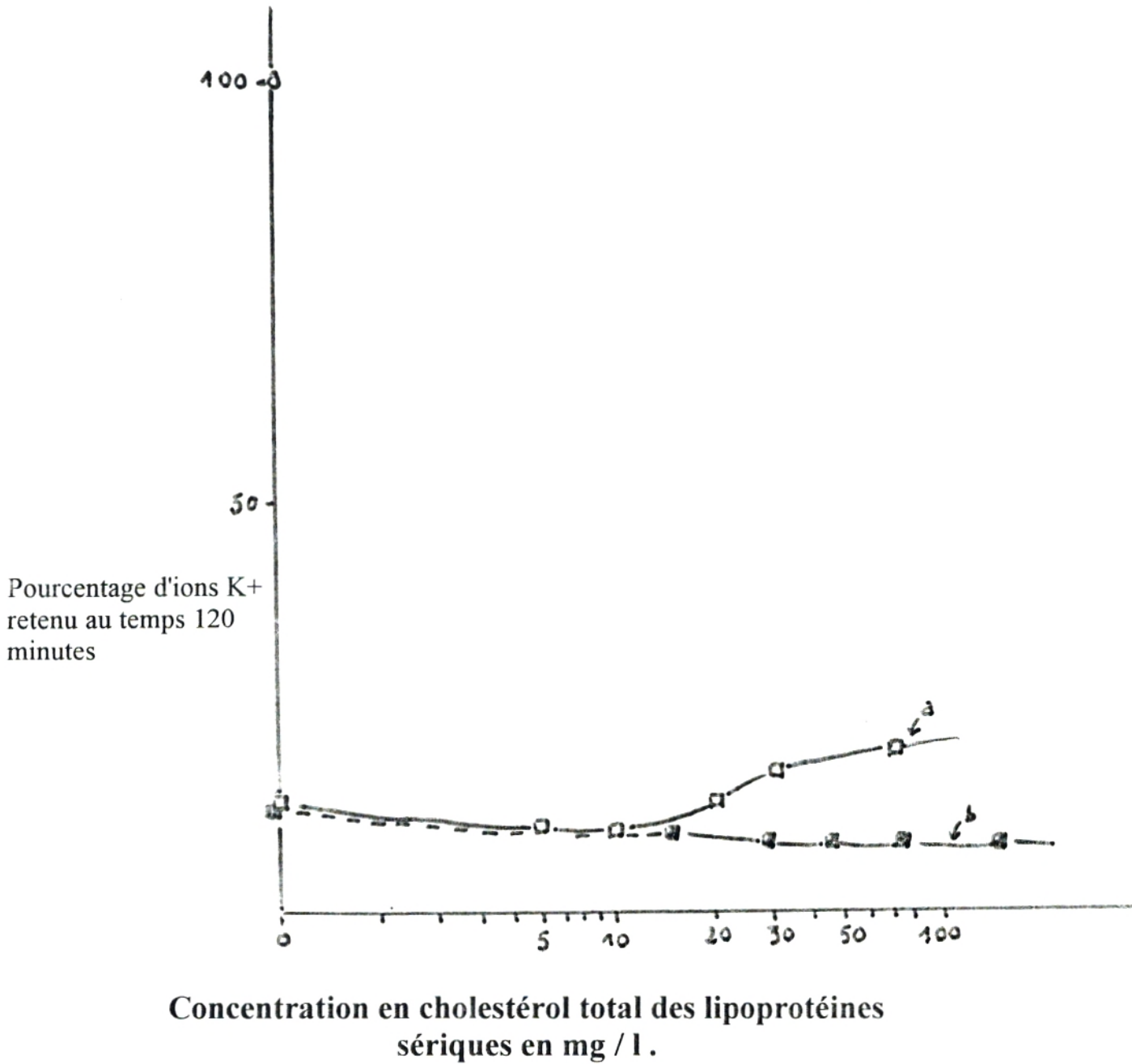


Fig N° 29 d : Effet de doses croissantes de lipoprotéines sériques sur l'état stationnaire de K⁺.

- (Symbole ◦) : Cellules de saccharomyces cerevisiae non traitées (contrôle)
- (Courbe a) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines lourdes HDL
- (Courbe b) : Cellules de saccharomyces cerevisiae traitées à l'Amphotericine B 5 µg/ml préincubée au lipoprotéines légères LDL

6 - Conclusion

Dès que l'on utilise des concentrations supérieures à $0,5\mu\text{g/ml}$, l'amphotericine B ajoutée sous forme libre au milieu d'essai contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* (à des densités cellulaires de $1,6 \cdot 10^8$ cellules viables/ml à environ $5 \cdot 10^8$ cellules viables/ml) induit une fuite massive du potassium intracellulaire. Le pourcentage de potassium retenu par les cellules de *saccharomyces cerevisiae* dépend de la concentration de l'antifongique, et du temps d'incubation à 37°C , celui-ci diminue lorsque la concentration de l'amphotéricine B augmente. 1^h d'incubation est suffisante pour obtenir un maximum de fuite potassique que l'on observe à partir de concentration de l'ordre de $5\mu\text{g/ml}$ d'amphotericine B. La cinétique de fuite du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* varie avec la concentration d'amphotericine B. Elle est plus rapide lorsque la concentration de l'antifongique devient supérieure à $2\mu\text{g/ml}$. Le pourcentage de potassium retenu par ces cellules dépend, d'une part de la concentration de l'antifongique, et d'autre part de la densité de la suspension cellulaire. Ainsi, le potassium intracellulaire diminue, lorsque la concentration cellulaire, et celle de l'antifongique augmente. Selon Kotler Brajtburg et al 1979, l'effet cytotoxique de l'amphotericine B chez les cellules fongiques, peut être séparé en deux états distincts: à faibles concentrations, l'antifongique inhibe la croissance de la levure et change d'une manière réversible la perméabilité des cellules aux ions sodium et potassium. La concentration du potassium intracellulaire peut être augmentée par l'addition des ions potassium dans le milieu contenant les cellules, alors que l'addition des ions magnésium baissent l'efficacité de l'antifongique.

A fortes concentrations, l'amphotericine B provoque la mort de la cellule, dans ce cas les cellules sont incapables de retenir le potassium. L'addition du potassium dans le milieu n'influence pas l'inhibition de la croissance induite par l'amphotericine B, alors que les ions magnésium augmentent son effet inhibiteur.

L'addition du glucose à 10mmol/l, dans le milieu contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, en présence de 1µg/ml d'amphotericine B, n'induit pas de modifications de la perméabilité membranaire au potassium.

L'addition de lipoprotéines sériques (HDL ou LDL), au milieu contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* en présence de l'amphotericine B, modifie la cinétique de fuite du potassium intracellulaire et non l'état stationnaire (environ 16% de potassium retenu), dès les concentrations de l'ordre de 2µg/ml d'amphotericine B.

Pour des concentrations inférieures, les lipoprotéines lourde, HDL et les lipoprotéines légères, LDL sont capables d'induire un effet protecteur relatif (environ 50% de fuite potassique).

A des durées d'incubations courtes (25 minutes), les lipoprotéines lourdes, HDL en présence de faibles concentrations d'amphotericine B (de l'ordre de 1µg/ml), induisent un effet protecteur important (83% de K⁺ retenu), quelque soit leur concentration exprimée en cholestérol total. A de concentrations d'amphotericine B de l'ordre de 5µg/ml, seules les lipoprotéines lourdes de concentration en cholestérol total équivalentes à celles du plasma sanguin sont capables d'induire un effet protecteur minime (55% de K⁺ retenu).

- Les lipoprotéines légères, LDL montrent un effet protecteur significativement plus réduit que celui des lipoprotéines lourdes. Les concentrations les plus faibles de cholestérol total des lipoprotéines, LDL induisent l'effet protecteur le plus important (40% de K⁺ retenu).

Plus le temps d'incubation augmente, plus l'effet protecteur relatif des lipoprotéines sériques diminue, pour disparaître à 2h d'incubation.

Des résultats similaires sont obtenus par Brajtburg et al 1984, 1986, Wasan et al 1994, qui montrent que les lipoprotéines sériques (HDL ou LDL) ont un effet protecteur minime quand l'amphotericine B est utilisée contre les cellules fongiques. L'incapacité des lipoprotéines sériques de protéger le *candida albicans* de l'effet toxique de l'amphotericine B est probablement due, selon Brajtburg J. et al 1984,

1986, à l'interaction avide du polyène aux membranes contenant l'ergostérol (cellules fongiques), qu'avec le cholestérol des lipoprotéines sériques. La diminution de l'affinité d'interaction cholestérol- polyène due à l'effet compétitif des phospholipides des lipoprotéines peut être d'une grande importance lorsque la compétition est entre lipoprotéine-globule rouge, qu'avec les lipoprotéines-*C.albicans*.

CHAPITRE III

Effet de l'amphotéricine B sur le métabolisme
cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*

1 - Introduction

Il est largement admis que l'amphotericine B interagit avec les stérols membranaires HERVE M. et al 1989, en formant des pores transmembranaires à l'origine de l'augmentation de la perméabilité aux ions, et à un nombre important de constituants cellulaires JULIANO R.L et al 1987, CHERON M. et al 1988, HARTSEL S.C et al 1991.

Plusieurs études ont été menées sur le mécanisme d'interaction des polyènes avec les membranes de cellules cibles et sur les perturbations de la perméabilité membranaire, en particulier la fuite potassique et sur la lyse cellulaire induite par ces molécules chez différentes cellules comme les levures et les globules rouges KOTLER BRAJTBURG et al 1979, CHERON M. et al 1988. En revanche, on a peu d'informations sur l'action de ces antifongiques sur le métabolisme cellulaire. Quelques études seulement (WIETZEBIN et al 1992) ont été menées sur l'effet de l'amphotericine B sur le métabolisme du glucose chez le *saccharomyces cerevisiae*. C'est pourquoi, dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action des polyènes (et en particulier de l'amphotericine B) et de pouvoir faire la part de ce qui revient à des effets purement membranaires et de ce qui revient à des effets sur le métabolisme, nous avons entrepris une étude biochimique de l'effet de l'amphotéricine B sur le mécanisme du glucose chez *saccharomyces cerevisiae*.

Actuellement, la spectroscopie RMN à haute résolution associée à dosages de substrats radioactifs sont largement utilisés dans le but d'étudier les voies métaboliques.. DEN. HOLLONDER J.A et al 1979, 1981, 1986, CAMPBELL- BURK S.L

et SHULMAN R.G 1987. A l'heure actuelle, l'influence de ces antifongiques sur le métabolisme cellulaire est encore mal connu.

Pour des raisons pratiques de moyens disponibles, nous avons entrepris une étude préliminaire en réalisant des dosages enzymatiques de quelques produits de la glycolyse et du cycle de Krebs chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae*. Une étude comparative a été entreprise portant sur une estimation de la concentration des substrats de la glycolyse et du cycle de Krebs, en présence et en l'absence d'amphotericine B.

La croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* a été effectuée dans un milieu sabouraud liquide glucosé tamponné (Tampon phosphate de potassium, 0,1 M) de PH 5,6 à 37°C. Les sphéroplastés obtenus à partir des cellules de *saccharomyces cerevisiae* isolées en phase de croissance exponentielle sont resuspendues dans le tampon phosphate de potassium 0,1M, PH 7,4 contenant du NaCl à 50mmol/l, à une densité de l'ordre de $1,1 \cdot 10^9$ cellules viables \cdot ml⁻¹, correspondant à 2,5 à 3,5 gramme de protéines cellulaires par litre de milieu. Les mesures des différents substrats ont été effectuées en l'absence et en présence de 5µg/ml d'amphotericine B.

La réaction est initiée par l'addition de 100mmol/l de glucose comme source de carbone, les concentrations des différents substrats ont également été déterminées avant l'addition du glucose.

Il est connu que la dégradation du glucose s'effectue par voie enzymatique (voie d'EMBDEN MAYERHOF PANAS), aboutissant à une plaque tournante, l'acide

pyruvique, dont les destinées diffèrent en fonction du milieu d'incubation (LEHNINGER A.L 1985).

- En l'absence d'oxygène et dans le cas d'une fermentation lactique, l'acide pyruvique est réduit en acide lactique. Cette réaction réversible est catalysée par une lactico-déshydrogénase, au même temps que le NADH est oxydé en NAD⁺, WELL J.H et al 1979. Dans le cas d'une fermentation alcoolique, l'acide pyruvique fournit de l'éthanol et du CO₂. Le pyruvate est d'abord decarboxylé en acétaldehyde. Cette étape est catalysée par la pyruvate décarboxylase magnésium dépendante. L'acétaldehyde est ensuite réduit en éthanol et CO₂.

- En présence d'oxygène, le pyruvate fournit de l'acétyl-COA qui sera métabolisé par l'intermédiaire du cycle de Krebs. C'est la destinée principale de l'acide pyruvique dans le milieu intramitochondrial. Le système enzymatique qui catalyse ces réactions est un complexe multienzymatique dont, la pyruvate décarboxylase, la pyruvate déshydrogénase, l'acétyl transférase, et la citrate synthèse. LOUIS P. 1983. L'acétyl COA constitue un précurseur du cycle de Krebs. A ce niveau, la condensation de l'acétyl COA avec l'oxaloacétate fournit de nouveau le même substrat (oxalacétate), par une chaîne de réactions enzymatiques de décarboxylation, de phosphorylation et de déshydrogénation de produits intermédiaires. (LEHNINGER A.L 1985).

2 - Effet de l'amphotericine B sur la production de pyruvate.

Dans un premier temps, nous avons exploré l'effet de l'amphotericine B sur la production de pyruvate, substrat qui se trouve au carrefour des voies cataboliques aérobie et anaérobie du glucose.

La figure n° 30, représente l'effet de l'amphotericine B à la concentration de 5µg/ml sur la production de l'acide pyruvique de sphéroplastes de *saccharomyces cerevisiae*.

- Avant l'addition de glucose, les concentrations intracellulaires de pyruvate sont de l'ordre de 2,6 µmol/l en l'absence d'amphotericine B et de 0,16 µmol/l en présence de 5µg/ml amphotericine B.

- Après addition de 100 mmol/l de glucose dans l'une des suspensions cellulaires (courbe a, contrôle), le niveau de pyruvate augmente progressivement de 2,6µmol/l, à 5µmol/l, et représente le maximum de la production de l'acide pyruvique, à 30 minutes d'incubation à 37°C. Ensuite, ce niveau se réduit considérablement pour atteindre la concentration initiale, en l'absence de glucose après 90 minutes d'incubation.

- L'addition de l'amphotericine B à 5µg/ml en même temps que 100 mmol/l de glucose (courbe b), au temps zéro, induit une augmentation progressive de la production de pyruvate d'un facteur 40 après 60 minutes d'incubation à 37°C, soit environ 6,34 µmol/l de solution.

A partir des résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'addition de l'amphotericine B à 5µg/ml dans le milieu contenant les sphéroplastes de *saccharomyces cerevisiae* induit une augmentation importante et régulière de la production de l'acide pyruvique.

3-Effet de l'amphotericine B au niveau de la glycolyse anaérobie

Les perturbations possibles de l'amphotericine B sur la glycolyse anaérobie des cellules de *saccharomyces cerevisiae* ont été suivies par les mesures de la production de l'acide lactique et de l'acide acétique.

La figure n° 31, représente l'effet de l'amphotericine B sur la production de l'acide lactique suivie dans le surnageant, du fait de la libération de ce produit dans le milieu extérieur.

Nous pouvons remarquer que :

- En l'absence de glucose, les concentrations en acide lactique du surnageant sont de l'ordre de 21 mmol/l en l'absence d'amphotericine B et de 23,5 mmol/l en présence de 5µg/ml d'amphotericine B.

L'addition de 100mmol/l de glucose dans le milieu contenant les sphéropastes de *saccharomyces cerevisiae*, au temps zéro (courbe a), induit une libération importante de l'acide lactique dans le milieu extérieur qui passe de 21 mmol/l de solution après 25 minutes d'incubation à 37°C, soit environ 3 fois plus la concentration initiale c'est à dire avant l'addition du glucose. Ensuite ce niveau se réduit considérablement pour atteindre la concentration initiale après 50 minutes d'incubation, soit environ 23,5 mmol/l de solution.

L'addition de 5µg/ml d'amphotericine B au même temps que le glucose (100mmol/l), (courbe b), réduit considérablement la production du substrat lactate dans le milieu extracellulaire. En effet, en présence de l'amphotericine B, la concentration de l'acide lactique au temps 25 minutes, à la suite de l'addition de

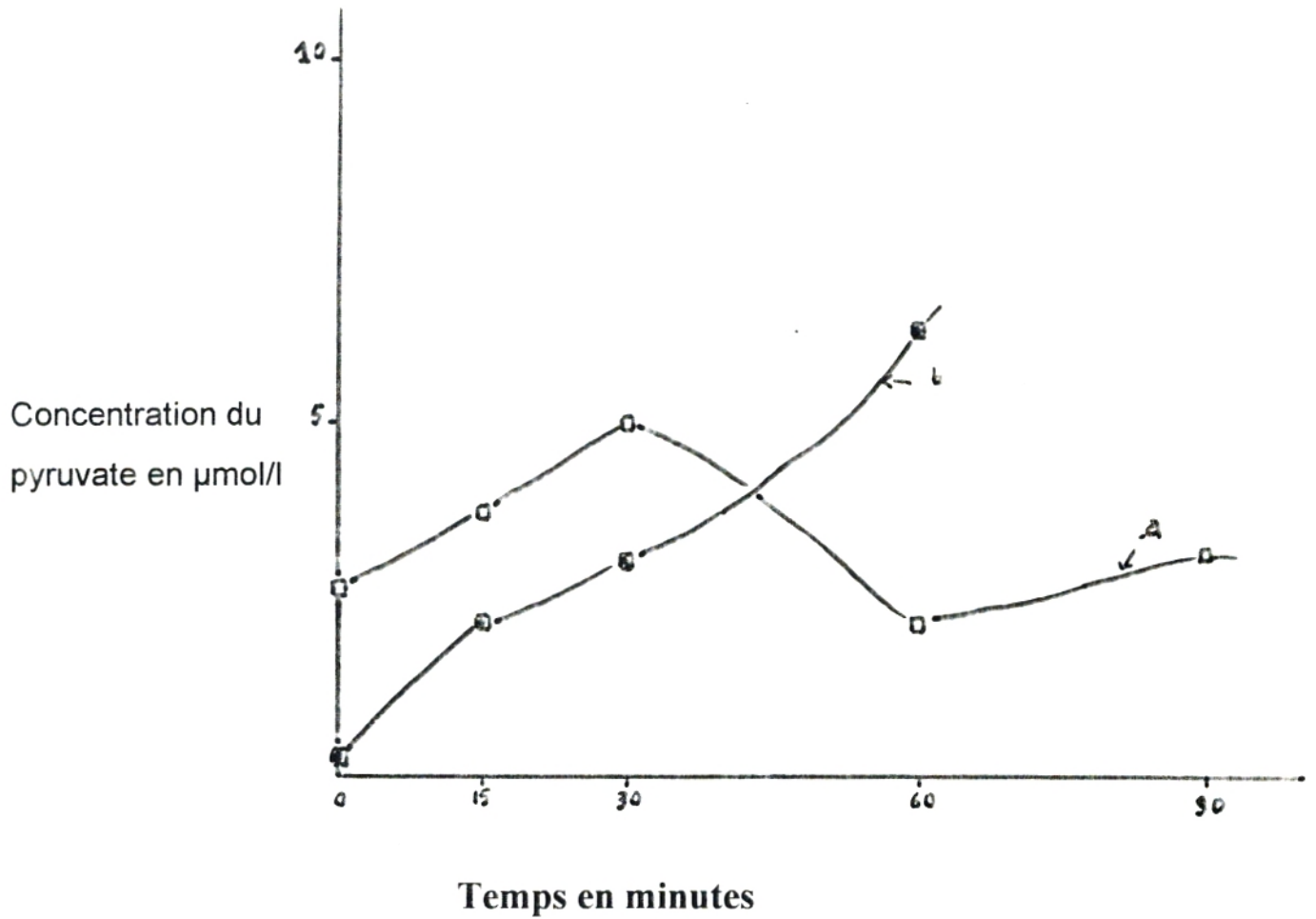


Figure n° 30 : Effet de l'amphotericine B sur la production du pyruvate

□ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) sans amphotericine B (contrôle)

■ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) en présence de 5 $\mu\text{g/ml}$ d'amphotericine

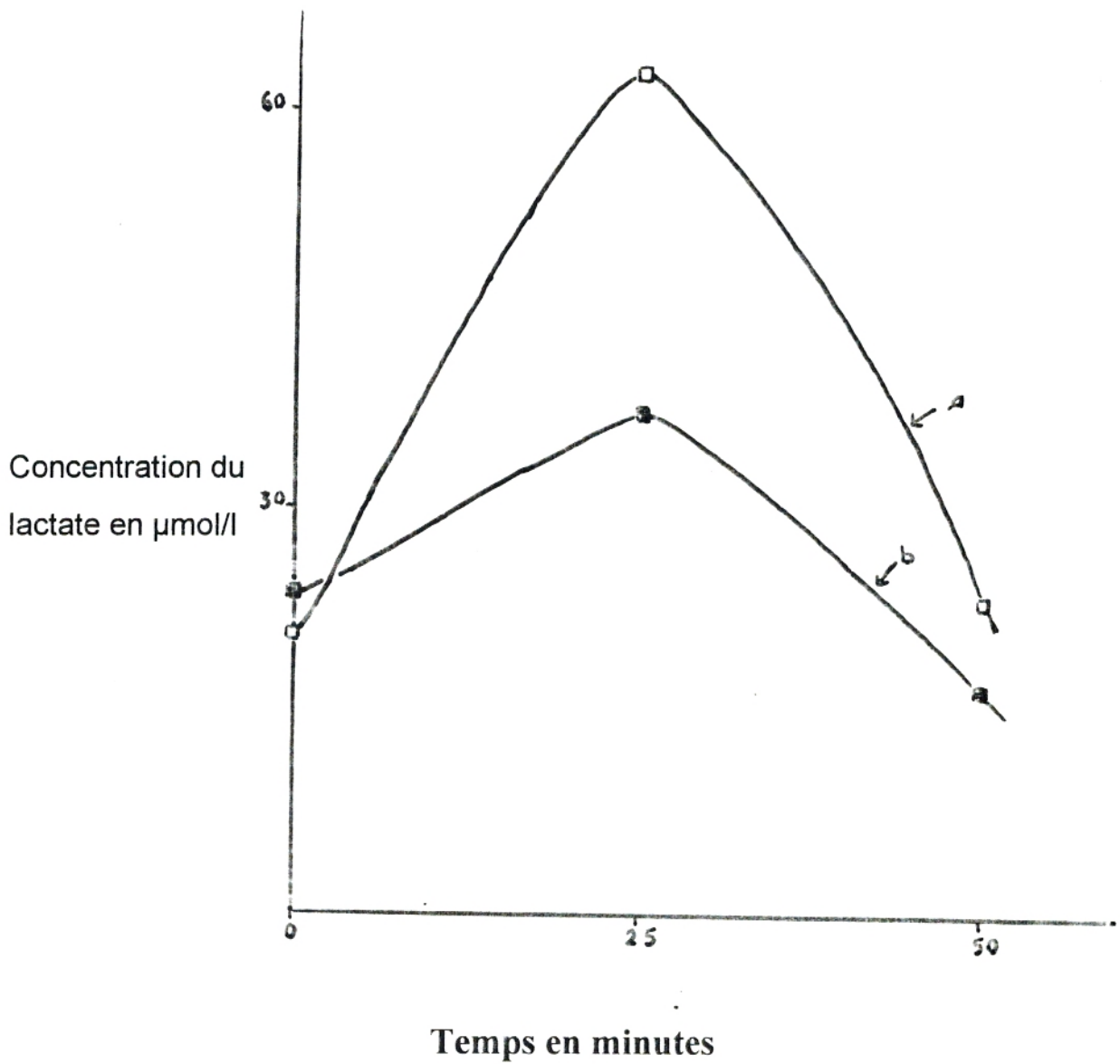


Figure n° 31 : Effet de l'amphotericine B sur la production du lactate

- - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) en l'absence d'amphotericine B (contrôle)
- - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) en présence d'amphotericine B à 5 $\mu\text{g/ml}$

glucose est de l'ordre de 37,3 mmol/l de solution, ce qui représente, environ 1/2 de la production de lactate sans amphotericine B. Cette concentration diminue rapidement pour atteindre le niveau initiale (sans glucose), dès que le temps d'incubation atteint 50 minutes.

Il ressort des résultats obtenus que :

- En l'absence d'amphotericine B, la concentration de l'acide lactique dans le milieu extracellulaire est importante, produite par les cellules de *saccharomyces cerevisiae* à la suite d'addition de 100mmol/l du glucose. En revanche, la présence de l'amphotericine B à 5µg/ml dans le milieu d'incubation induit une réduction significative de la production de lactate durant 50 minutes d'incubation, malgré l'addition du glucose.

La figure n° 32, représente l'effet de l'amphotericine B sur la production de l'acide acétique intracellulaire.

Les résultats observés montrent que :

- La concentration de l'acide acétique avant l'addition du glucose (courbe a), est de l'ordre de 0,50 mmol/l.

L'addition de 100mmol/l de glucose dans le milieu d'épreuve contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* induit une faible production d'acétate durant les 15 premières minutes d'incubation, soit environ 0,60 mmol/l de solution. Ensuite la concentration de l'acide lactique diminue pour atteindre la concentration initiale en l'absence de glucose, au bout de 30 minutes d'incubation.

- La concentration en acide acétique du deuxième lot de la suspension de sphéroplastes de *saccharomyces cerevisiae* (courbe b), avant l'addition de glucose correspond à environ 0,60 mmol/l de solution. Le niveau de l'acide acétique augmente d'une manière non significative qui correspond à environ 0,30 mmol/l à partir des périodes d'incubation de 1h à 37°C.

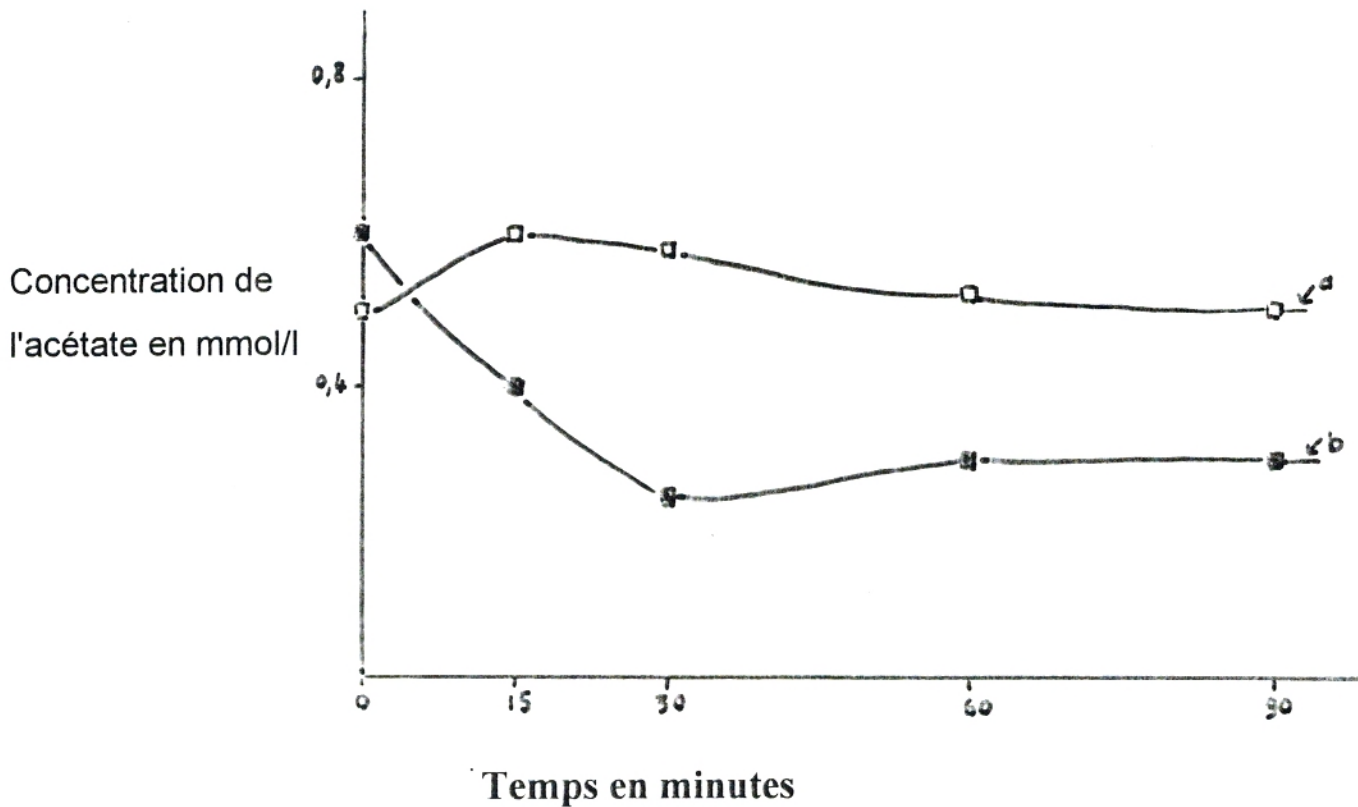


Figure n° 32 : Effet de l'amphotericine B sur la production de l'acétate

□ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) incubés en l'absence d'amphotericine B (contrôle)

■ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) en présence d'amphotericine B à $-5\mu\text{g/ml}$.

Nous pouvons conclure que :

- Les cellules sans amphotericine B, produisent peu d'acide acétique après addition de 100mmol/l de glucose durant 60 minutes d'incubation à 37°C. En revanche, l'addition de l'amphotericine à 5µg/ml, est à l'origine d'une réduction importante de l'acide acétique avec un minimum de production d'acétate observé à 30 minutes d'incubation ; ce qui représente environ le 1/3 de la production en l'absence d'amphotericine B, (contrôle).

A partir des résultats obtenus jusqu'à ce niveau, sur des cellules de *saccharomyces cerevisiae* qui glycolysent, nous pouvons conclure que :

- En l'absence de l'amphotericine B, les cellules de *saccharomyces cerevisiae* produisent essentiellement de l'acide acétique. En effet, sa concentration est 100 fois plus élevée que celle de l'acide pyruvique et de 7 fois de celle de l'acide lactique à 25 minutes d'incubation où les concentrations de ces substrats montrent un maximum. La concentration de l'acide acétique reste pratiquement constante durant les 90 minutes d'incubation alors que celle de pyruvate et de lactate diminue rapidement dès que le temps d'incubation devient supérieur à 30 minutes. Ces résultats sont à l'origine de l'état réprimé des cellules de *saccharomyces cerevisiae* incubées en milieu glucosé. Les mesures de l'ensemble de substrats de la glycolyse de *saccharomyces cerevisiae* en état réprimé, en utilisant des composés radioactifs, les auteurs DEN HOLLANDER et al 1979, montrent que ces cellules produisent essentiellement le glycérol et de l'éthanol.

- L'addition de l'amphotericine B à 5µg/ml en même temps que le glucose dans le milieu d'épreuve contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* provoque d'une part, une diminution de la production, aussi bien de l'acide lactique que de l'acide acétique, d'autre part, une augmentation de la production de l'acide pyruvique.

Ces résultats laissent à croire que l'activité de la glycolyse des cellules de *saccharomyces cerevisiae* est réduite d'une manière importante sous l'effet de l'amphotericine B à 5µg/ml. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par TRAN DINH s et al 1991, qui montrent que la présence de 10⁻⁶M d'amphotericine B dans le milieu riche en Na⁺, contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit une réduction de la consommation de glucose et la production de l'éthanol et favorise celles du glycérol et du tréhalose. Cet effet est nettement réduit, selon ces auteurs, en présence de concentrations élevées de potassium. Ces résultats peuvent être exprimés selon WIETZERBIN J et al 1992, par la fuite des ions potassium dans le milieu extracellulaire induit par l'antifongique, amphotericine B, qui peuvent induire une réduction de l'activité des enzymes potassium dépendants, comme l'aldolase, la phosphofructokinase et la pyruvate Kinase.

Les perturbations du métabolisme de glucose des cellules de *saccharomyces cerevisiae* au niveau du cycle de Krebs, sous l'effet d'addition de l'amphotericine B au milieu d'essai contenant les sphéroplastes de *saccharomyces cerevisiae* incubées pendant 90 minutes à 37°C dans du tampon phosphate de potassium à 0,1 M contenant 50mmol/l de NaCl de pH 7,4, peuvent être suivies par le dosage du citrate de l'iso-citrate et du malate, intracellulaires en présence et en l'absence d'amphotericine B à 5µg/ml.

4 - Effet de l'amphotericine B, au niveau du cycle de Krebs

La figure n° 33, représente, l'effet de l'amphotericine B sur la production du citrate, issue de la condensation de l'acétyl COA avec l'oxaloacétate.

Les résultats obtenue rapportés par la figure n° 33 montrent que :

- La concentration intracellulaire de l'acide citrique des cellules intactes (courbe a) n'ayant subit aucun traitement à l'amphotericine B (contrôle), avant l'addition de glucose est de l'ordre de 2 $\mu\text{mol/l}$ de solution.

- L'addition de 100 mmol/l de glucose dans le milieu d'épreuve contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, montre une augmentation de la production du substrat, citrate, dès que le temps d'incubation augmente. La concentration du citrate atteint un maximum au bout de 1h d'incubation à 37°C, soit environ 8 $\mu\text{mol/l}$ de solution. Ensuite le niveau de citrate diminue pour atteindre la valeur de l'ordre de 3,8 $\mu\text{mol/l}$ de solution à 90 minutes d'incubation.

- L'addition de l'amphotericine B (courbe b), à 5 $\mu\text{g/ml}$ en même temps que le glucose à 0,1M/l, induit une production importante de l'acide citrique dès les 15 premières minutes d'incubation à 37°C soit environ 11,5 $\mu\text{mol/l}$ de solution. Le niveau du citrate augmente considérablement, plus le temps d'incubation augmente, pour atteindre un maximum au bout de 90 minutes d'incubation, de l'ordre de 25 $\mu\text{mol/l}$ de solution, soit environ 12 fois la concentration initiale de cellules avant l'addition de glucose.

Nous pouvons conclure que:

L'addition de l'amphotéricine B à 5 $\mu\text{g/ml}$, dans le milieu, induit une augmentation importante de l'acide citrique. Cet effet apparait clairement à 90 minutes d'incubation où les cellules intactes montrent un minimum de production de citrate, alors que les cellules traitées à l'amphotéricine B, produisent un maximum d'acide citrique d'un facteur 6, par rapport au contrôle.

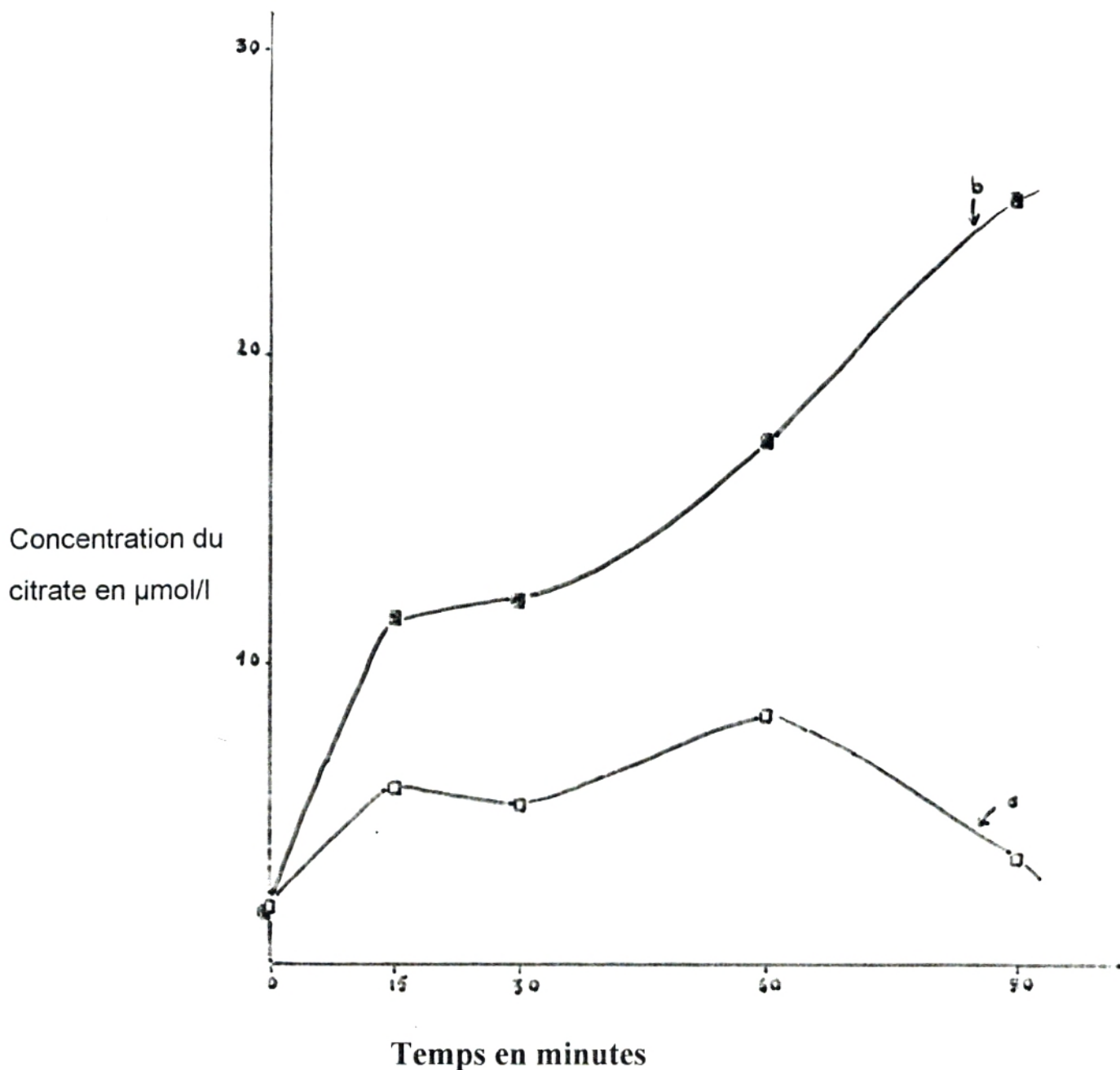


Figure n° 33 : Effet de l'amphotericine B sur la production du citrate

□ - Sphéroplastes sans amphotericine B (contrôle)

■ - Sphéroplastes en présence d'amphotericine B à 5 $\mu\text{g/ml}$

La figure n° 34, reflète l'effet de l'amphotéricine B sur la production de l'iso-citrate.

Il ressort des résultats obtenus que :

- La concentration de l'acide iso-citrique, avant l'addition de glucose (courbe a, contrôle) est de l'ordre de 0,69 $\mu\text{mol}/\text{gramme}$ de protéines cellulaires.

- L'addition de 100 mmol/l de glucose au temps zéro, induit une augmentation de la production de l'acide isocitrique les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, qui atteint un maximum au bout progression de 1h d'incubation à 37°C soit environ 3,75 $\mu\text{mol}/\text{gramme}$ de protéines cellulaire. Les cellules ont donc produit 5 fois plus d'acide isocitrique suite à l'addition de glucose.

- L'addition de l'amphotericine B à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (courbe b) au temps zéro, c'est à dire au même moment que le glucose à 100 mmol/l, induit une production intense de l'acide iso-citrique par les cellules de *saccharomyces cerevisiae* dès les 15 premières minutes d'incubation. Les cinétiques de production d'acide isocitrique est très rapide. En effet, les cellules produisent un maximum d'isocitrate, dès les 30 minutes d'incubation, soit environ 8 $\mu\text{mol}/\text{gramme}$ de protéines cellulaires, qui correspond d'un facteur 13 par rapport à la concentration en acide iso-citrique initiale, avant l'addition du glucose. Ensuite la concentration diminue légèrement pour atteindre la valeur de l'ordre de 6,5 $\mu\text{mol}/\text{gramme}$ de protéines cellulaires au bout de 90 minutes d'incubation à 37°C.

Nous pouvons conclure que, l'addition de 100mmol/l de glucose, en l'absence d'amphotericine B dans le milieu d'incubation contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae* induit une augmentation significative de la production de l'acide iso-citrique. L'addition simultanée de l'amphotericine B à 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et de glucose à 100mmol/l induit une augmentation, aussi bien des cinétiques de productions que de la concentration de l'acide iso-citrique. En effet, les cellules de *saccharomyces* traitées à l'amphotericine B produisent 3 fois plus d'acide isocitrique par rapport aux cellules intactes (contrôle), au bout de 30 minutes d'incubation à 37°C.

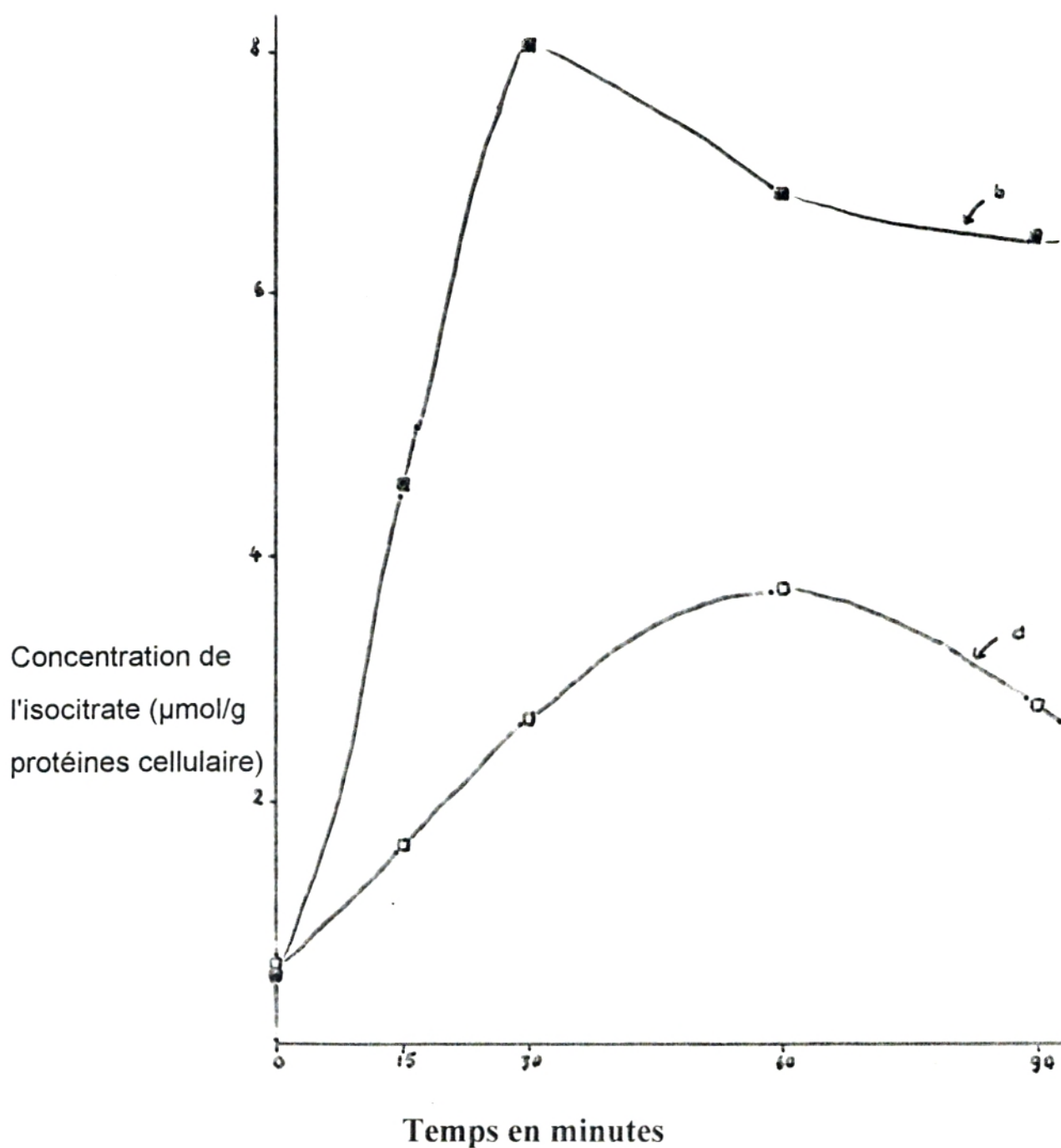


Figure n° 34 : Effet de l'amphotericine B sur la production du l'iso-citrate

□ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) sans amphotericine B (contrôle)

■ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) + amphotericine B à $5\mu\text{g/ml}$

La figure n° 35, représente l'effet de l'amphotericine B sur la production de l'acide malique.

- La concentration intracellulaire d'acide malique des cellules de *saccharomyces cerevisiae* (courbe a)

Avant l'addition de glucose est de l'ordre de 14,1 $\mu\text{mol/l}$ de solution. Ce niveau augmente après addition de 100 mmol/l de glucose au temps zéro, en l'absence d'amphotericine B pour atteindre un maximum au bout de 15 minutes d'incubation à 37°C, soit environ 75,54 $\mu\text{mol/l}$ de solution. Les cellules ont donc produit environ 5 fois plus d'acide malique suite à l'addition de glucose. La production de l'acide malique diminue au temps d'incubation 30 minutes, puis reprend pour atteindre la même valeur, maximale au bout de 90 minutes d'incubation.

- L'addition de l'amphotericine B à 5 $\mu\text{g/ml}$ (courbe b) en plus de glucose à 100mmol/l dans le milieu d'épreuve contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit une augmentation progressive et d'une manière significative de la production de l'acide malique. En effet, le niveau d'acide malique atteint la valeur de l'ordre de 133 $\mu\text{mol/l}$ de solution, au bout de 30 minutes d'incubation soit environ d'un facteur 5 par rapport à la concentration de l'acide malique avant l'addition de glucose. La production du substrat augmente légèrement plus le temps d'incubation augmente, est atteint un maximum après 90 minutes d'incubation, soit environ 150 $\mu\text{mol/l}$ de solution.

Nous pouvons conclure que, l'addition de 100mmol/l de glucose dans le milieu contenant les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit une augmentation significative de la production de l'acide malique. (5 fois plus la concentration avant l'addition du glucose).

En revanche, l'addition de l'amphotericine B à 5 $\mu\text{g/ml}$, au même moment que le glucose induit une stimulation de la production du métabolite. Cet effet apparaît nettement, dès les temps d'incubation de 30 minutes.

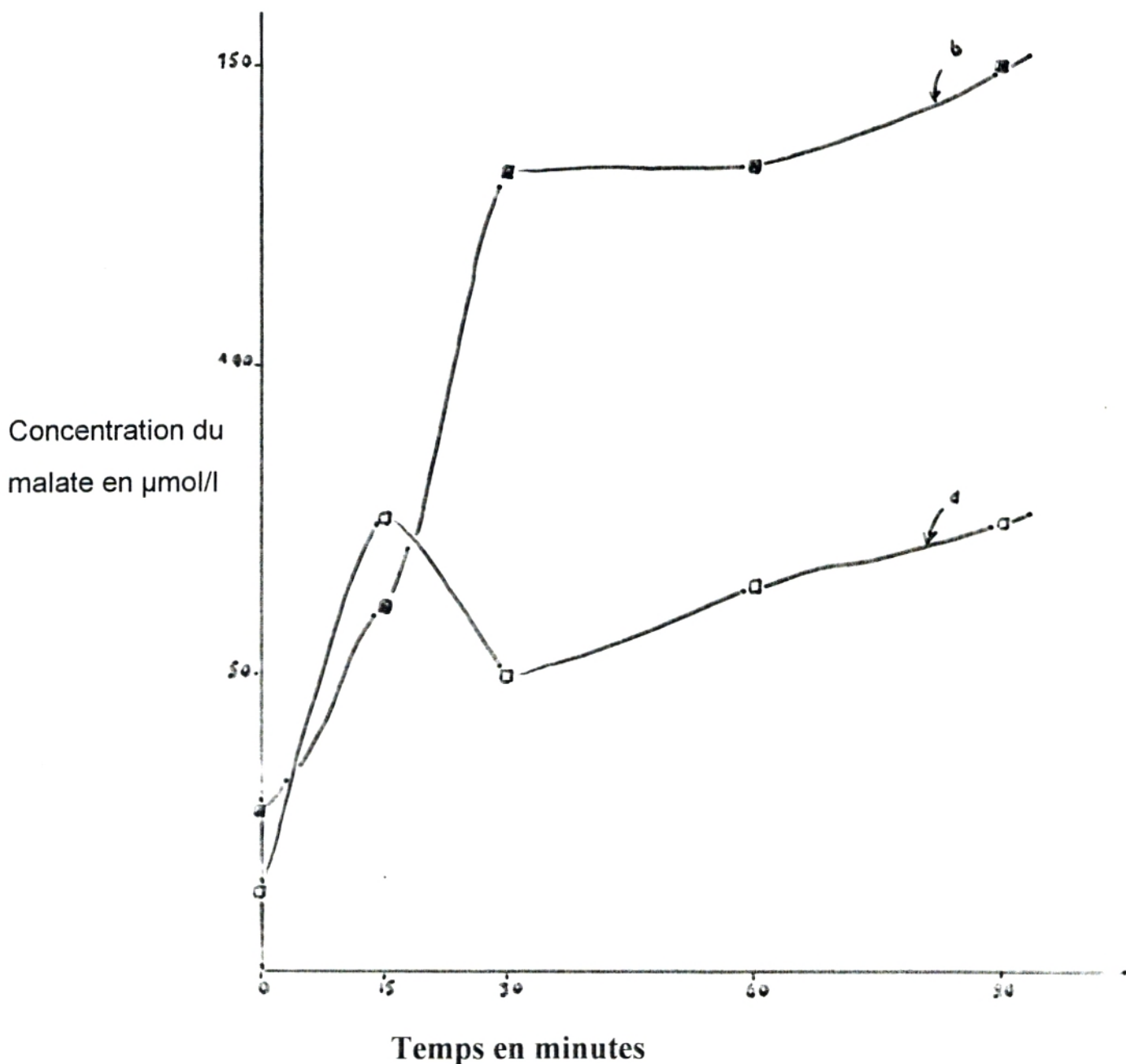


Figure n° 35 : Effet de l'amphotericine B sur la production de malate

□ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) sans amphotericine B (contrôle)

■ - Sphéroplastes (*s.cerevisiae*) en présence d'amphotericine B à 5 $\mu\text{g/ml}$

En effet, les cellules traitées à l'amphotericine B produisent 2 fois plus d'acide malique que les cellules intactes.

Il ressort des figures n° 33,34 et 35 que :

- La production des différents substrats, citrate, iso-citrate et malate, en l'absence de l'amphotericine B, par des cellules de *saccharomyces cerevisiae* qui métabolisent du glucose varie en fonction du temps d'incubation. Un maximum de production n'est atteint qu'à des durées d'incubation longues (60 minutes). En revanche, l'addition de l'amphotericine B à 5µg/ml induit une augmentation de la production des substrats, dès les temps d'incubation courts (15 minutes).

Nous pouvons conclure à partir des résultats obtenus des figures 33, 34 et 35 que l'amphotericine B induit une forte stimulation du cycle de Krebs, suivie par l'évolution importante des substrats, citrate, iso-citrate et malate.

5 - Conclusion

L'amphotericine B à 5µg/ml provoque des perturbations importantes du métabolisme cellulaire de glucose des cellules de *saccharomyces cerevisiae*. Ces perturbations ont été clairement observées aussi bien durant le catabolisme du glucose par la voie de la glycolyse anaérobie que par la voie du cycle de Krebs, par une modification sur la production des métabolites le long de cette voie métabolique.

Dans nos conditions expérimentales, l'amphotericine B, induit une réduction importante de la glycolyse anaérobie. Cet effet apparaît par une réduction significative de la production de l'acide lactique et de l'acide acétique. Au niveau de la glycolyse aérobie, l'amphotericine B, induit cependant une stimulation de la production de l'acide pyruvique. De la même manière, l'amphotericine B exprime

ses effets sur le métabolisme du glucose au niveau du cycle de Krebs, observés par une évolution importante du citrate, de l'iso-citrate et du malate.

Ces résultats concordent avec ceux des auteurs DROUHET E et al 1960 in DROUHET et DUPONT 1988, qui affirment que l'amphotericine B, induit une stimulation de la consommation d'oxygène et la transformation de l'ATP en ADP.

Les auteurs WIETZEBIN J et al 1992, rapportent que l'amphotericine B provoque un effet important sur la production des composés du métabolisme du glucose chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae* dans le milieu cytosolique mais n'induit pas d'influence significative sur le mécanisme de leur formation.

DISCUSSION GENERALE

L'effet cytotoxique des antifongiques polyènes et particulièrement l'amphotéricine B est un phénomène complexe. Il est pour une large part lié à l'interaction de cette drogue amphiphile aux lipides des membranes cellulaires et notamment les stérols membranaires. Cette interaction est conditionnée d'une part par l'état physico-chimique dans lequel se trouve la drogue notamment sa solubilité, d'autre part, la composition lipidique et notamment le type de stérol contenu dans la cellule cible. Or, il se trouve que les membranes plasmiques de levures et fongis renferment de l'ergostérol et que les membranes de cellules animales contiennent du cholestérol, ce qui serait à l'origine de l'effet toxique chez les cellules de l'organisme hôte. L'amphotéricine B est sélectivement plus toxique vis-à-vis des membranes renfermant de l'ergostérol, comme les membranes de levures et de fongis, que vis-à-vis des membranes contenant le cholestérol, comme les membranes de cellules animales. *Bolard.J.1986*. En effet, cette sélectivité comporte deux éléments: une sélectivité à l'échelle moléculaire et une sélectivité à l'échelle cellulaire.

- La sélectivité moléculaire apparaît sous deux aspects. Un premier aspect concerne l'interaction directe de l'amphotéricine B avec les stérols. Cette interaction est étroitement liée au type de stérol. En effet, de nombreux travaux, comme, ceux de *Norman et al 1972*, *Gruda.I. et al 1980*, montrent clairement qu'en solution aqueuse ou hydroalcoolique, l'amphotéricine B interagit préférentiellement avec l'ergostérol qu'avec le cholestérol. Cet effet est traduit par une variation importante du spectre U.V. que lorsque l'ergostérol est ajouté dans le milieu contenant l'amphotéricine B. Un deuxième aspect lié à l'état physico-chimique de cet antifongique.

L'ensemble des résultats obtenus aussi bien chez les levures et fongis que chez les cellules animales, montrent clairement que l'activité antifongique dépend de sa concentration dans le milieu aqueux. Comme l'amphotéricine B est un produit

insoluble dans le milieu aqueux, on le disperse grâce à l'addition d'un véhicule ou transporteur et la forme commerciale habituelle qui est la "*Fungizone*", n'est autre chose qu'un mélange d'amphotéricine B a du désoxycholate.

Etant donné la faible affinité du solvant désoxycholate, l'amphotéricine B en milieu aqueux se trouve sous forme de micelles qui sont à l'origine de l'effet toxique des cellules animales hôtes. Par contre ce sont les formes monomériques ou oligomères solubles qui sont toxiques chez les levures et fongis. *Kotler Brajtburg. et al 1979.*

L'effet toxique de l'amphotéricine B apparaît à de faibles concentrations de l'antifongique (l'amphotéricine B existe sous forme monomérique ou petits oligomères solubles), lorsque l'ergostérol est présent dans la membrane de la cellule cible. Cet aspect est observé, aussi bien au niveau de membranes artificielles, *Marty.A. et FINKELSTEIN.A.1975, Hartsel.S.C. et al 1988, HERVE.M et al 1989, Ramos.H et al 1989*, qu'au niveau de membranes biologiques *Brajtburg.J. et al 1984, Toulmé.H,N et al 1989.*

Tout paramètre modifiant l'équilibre entre les différentes formes d'amphotéricine B (formes monomériques, et formes agrégées), entraînent une modification de l'interaction de la drogue avec les membranes de cellules cibles. C'est ce qui a été réalisé dans nos protocoles expérimentaux en introduisant les lipoprotéines sériques. Celles-ci offrent par leur lipides, d'une part un environnement hydrophobe, d'autre part par leur cholestérol un site de fixation pour l'antifongique. Le système en présence est un système à trois compartiments, où l'amphotéricine B sous forme libre dans le milieu extérieur se répartit entre d'une part les cellules cibles, d'autre part les fractions lipoprotéiques, HDL ou LDL. De ce fait, la concentration d'amphotéricine B disponible pour une fixation sur les sites membranaires des cellules cibles sera modulée par les concentrations relatives d'amphotéricine B, de lipoprotéines et de cellules.

Ces lipoprotéines sériques induisent en effet des modifications de l'effet toxique de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules de *saccharomyces cerevisiae*. Ces modifications sont nettement observées à de faibles concentrations de l'antifongique (inférieures à 2 µg/ml), au niveau de la croissance cellulaire et au niveau de la perméabilité membranaire au potassium intercellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae*. L'effet protecteur observé est en rapport avec la concentration d'amphotéricine B libre dans le milieu aqueux. En effet, Ces lipoprotéines sériques sont capables d'induire, soit un effet protecteur, soit un effet cytotoxique important équivalent à celui de l'amphotéricine B sous forme libre. Au niveau de la cellule entière, la présence de lipoprotéines sériques, induit un effet protecteur important contre l'action inhibitrice de la croissance de *saccharomyces cerevisiae*, induite par l'amphotéricine B à des concentrations de l'ordre de 1 µg/ml. En revanche, 2 µg/ml sont nécessaires pour obtenir le même effet inhibiteur. Au niveau de la perméabilité membranaire au potassium les lipoprotéines sériques induisent un effet protecteur relatif (50% de fuite potassique par rapport au contrôle), à de faibles concentrations d'amphotéricine B (environ 1µg/ml), et durant des périodes d'incubation courtes (25 minutes). Dès les concentrations de l'ordre de 2µg/ml, les lipoprotéines modifient les cinétiques de fuite du Potassium interne, sans affecter l'état stationnaire. Les lipoprotéines légères, LDL montrent un effet protecteur significativement moins important que celui des lipoprotéines lourdes, HDL. Ces résultats concordent avec ceux trouvés par l'équipe de *Brajtburg et al 1984* et ceux de *Wasan et al 1984*, qui ont fait remarqué que les lipoprotéines sériques, ne montrent pas d'effet protecteur chez le *candida albicans* de l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B.

- La sélectivité à l'échelle cellulaire, une interaction mécanique entre les molécules de l'antifongique et celles de la membrane des cellules cibles (Stérois, Phospholipides...) L'expression de la toxicité de l'amphotéricine B libre ou liée aux lipoprotéines sériques diffère selon que l'amphotéricine B se trouve en présence de

cellules fongiques, ou en présence de cellules animales, comme les globules rouges ou les cellules rénales. Selon, *Wasan et al 1994*, les formes monomériques solubles d'amphotéricine B libre ou complexée aux lipoprotéines sériques peuvent exprimer l'effet cytotoxique chez les cellules fongiques, sans affecter les cellules animales. La présence de la paroi cellulaire rigide constitue un tamis moléculaire ne laissant passer que les formes monomériques et les petits oligomères solubles de l'amphotéricine B, Ces formes peuvent accéder à la membrane plasmique des cellules fongiques et exprimer ainsi l'effet cytotoxique. L'amphotéricine B sous les formes d'agrégats ne peut pas traverser la paroi cellulaire de levures et fongis. Cependant ces formes montrent un effet toxique important chez les cellules animales comme les globules rouges *Kotler Brajburg et al 1979*, ou les cellules rénales *Wasan et al 1994*. Dans nos conditions expérimentales, nous avons d'abord testé l'efficacité de l'amphotéricine B sous sa forme libre chez les cellules de *saccharomyces cerevisiae*. L'effet toxique de cet antifongique est nettement observé aussi bien, au niveau de la cellule entière en phase de croissance, et au niveau de la perméabilité membranaire au potassium de ces cellules à l'état stationnaire, qu'au niveau de leur métabolisme cellulaire de glucose. En ce qui concerne les cellules en phase de croissance, 1µg/ml d'amphotéricine B suffit pour avoir une inhibition totale de la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae*.

Dans le cas de la perméabilité membranaire au potassium de ces cellules à l'état stationnaire, une fuite potassique significative est enregistrée (50% de fuite potassique par rapport au contrôle), dès les concentrations de 0.5 µg/ml d'amphotéricine B, alors qu'un maximum de fuite potassique (16% de K⁺ retenu par rapport au contrôle), n'est atteint qu'à partir de concentration de l'ordre de 5µg/ml. Dans le cas du métabolisme cellulaire de glucose de *saccharomyces cerevisiae*, l'amphotéricine B provoque des perturbations importantes de la voie de la glycolyse anaérobic et de la voie de la glycolyse aérobie. Ces perturbations sont exprimées par une réduction de la glycolyse et une stimulation du cycle de *Krebs*.

D'autre part, nos résultats montrent qu'à de faibles ou moyennes doses, l'amphotéricine B induit un effet cytotoxique important vis-à-vis des levures de *saccharomyces cerevisiae*, alors que l'effet cytotoxique de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules animales apparaît à des doses élevées. *Kotler Brajtburg et al 1979*. Ces résultats suggèrent que, la toxicité de l'amphotéricine B comporte deux zones distinctes: Une zone de faibles ou moyennes doses, (inférieures à $3.10^{-7}M$), l'amphotéricine B sous formes de monomères et petits oligomères solubles peut facilement exprimé l'effet toxique chez les levures fongis. Et une zone de concentration plus élevée (supérieures à $3.10^{-7}M$), l'amphotéricine B sous formes d'agrégats, exprime l'effet toxique chez les cellules animales et notamment les globules rouges ou les cellules rénales. A partir de ces données, la stratégie consiste à élaborer les formes non agrégées. Par ailleurs, un paramètre supplémentaire vient se surajouter lorsqu'on a affaire à l'amphotéricine B liée aux lipoprotéines légères, LDL chez les cellules animales. *Wasan et al 1994*, montrent clairement que l'effet toxique de l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines légères, LDL chez les cellules rénales est due à l'internalisation de l'amphotéricine B véhiculée par les LDL, qui ont un récepteur spécifique. Sur la base de ces résultats et dans l'état actuel des choses, il ressort que l'amphotéricine B agit par deux types de mécanismes:

- Un mécanisme classique, qui consiste en une interaction directe de l'amphotéricine B avec les stérols membranaires qui entraîne une perturbation de la structure et des fonctions membranaires.

- Et un mécanisme d'internalisation de l'amphotéricine B lorsqu'elle est complexée aux lipoprotéines légères, LDL. Du fait de ce deuxième type de mécanisme, l'effet protecteur des lipoprotéines légères, LDL observé chez le globule rouge humain, *Brajtburg et al 1984*, où le récepteur aux LDL est absent, est réduit d'une manière importante lorsqu'il s'agit de cellules rénales (*Wasan et al*

1994), et probablement de cellules hépatiques, qui renferment des récepteurs spécifiques aux LDL.

Jusqu'à présent, ce type de mécanisme n'a jamais été mis en évidence chez les levures et fongis. Nos résultats suggèrent que ce type de mécanisme n'intervient pas chez la levure *saccharomyces cerevisiae*, puisqu'avec l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines sériques et notamment aux LDL, on obtient un effet protecteur qui de plus est concentrations dépendant. Cet effet ne devrait pas exister, si l'amphotéricine B était internalisée par l'intermédiaire de récepteurs aux lipoprotéines sériques.

Sur la base de ces données et en vu d'une thérapeutique antifongique, la stratégie serait donc, soit une utilisation de lipoprotéines lourdes, HDL, qui elles ont peu de récepteurs membranaires connus, soit les lipoprotéines légères, LDL en diminuant l'expression de leurs récepteurs spécifiques.

CONCLUSION GENERALE

Le travail que nous avons entrepris avait pour but d'évaluer l'effet des lipoprotéines du sérum sanguin sur la cytotoxicité des antifongiques polyènes entre autres l'amphotéricine B. Les travaux antérieurs sur le globule rouge humain (*Brajtburg.J. et al 1984*) et sur les cellules rénales (*Wasan et al 1994*), montraient que lorsqu'on associe l'amphotéricine B à des lipoprotéines sériques, on observait une réduction de la toxicité. La question posée est de savoir, si dans les mêmes conditions l'amphotéricine B garderait toute son efficacité vis-à-vis des levures en vue d'une utilisation thérapeutique.

Les résultats que nous avons obtenus chez les levures, *saccharomyces cerevisiae* montrent que:

1- L'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines sériques inhibe la croissance cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* dès les concentrations d'amphotéricine B de l'ordre de 2µg/ml, et augmente la perméabilité de ces cellules isolées de leur milieu de culture et maintenues dans un état stationnaire par resuspension dans un milieu salin tamponné.

2- Les effets obtenus dépendent des concentrations relatives de l'amphotéricine B, des lipoprotéines sériques et des cellules de *saccharomyces cerevisiae*.

Sur la base des propriétés physico-chimiques d'amphotéricine B liée au caractère amphiphile, de celles des lipoprotéines sériques (présence d'un environnement hydrophobe), et des molécules de cholestérol non estérifiés des lipoprotéines sériques, il a été possible de moduler de façon différentes la concentration d'amphotéricine B mise à disposition pour une interaction avec les cellules cibles de *saccharomyces cerevisiae*:

a- Soit en faisant varier la concentration de lipoprotéines sériques dans le milieu, celle d'amphotéricine B restant fixe.

b- Soit inversement, en faisant varier la concentration d'amphotéricine B, celle des lipoprotéines sériques restant constante.

En utilisant ces deux protocoles, il a été possible d'observer les principaux faits suivants:

1- En ce qui concerne l'effet de concentrations croissantes des lipoprotéines sériques sur l'amplitude des phénomènes toxiques d'amphotéricine B, nos résultats montrent que lorsque les concentrations d'amphotéricine B sont de l'ordre de 1 $\mu\text{g/ml}$, l'addition de lipoprotéines sériques dans le milieu d'essai contenant.

Les cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit un effet protecteur relatif (50% de fuite potassique par rapport au contrôle). Dès les concentrations d'amphotéricine B de l'ordre de 2 $\mu\text{g/ml}$, les lipoprotéines sériques montrent un effet protecteur transitoire. Cet effet apparaît à des périodes d'incubations courtes (25 minutes). Les lipoprotéines légères, LDL montrent par ailleurs, un effet protecteur significativement moins important que celui des lipoprotéines lourdes, HDL. Lorsque les périodes d'incubation deviennent supérieures à 30 minutes, les lipoprotéines sériques modifient seulement les cinétiques de fuite de potassium intracellulaire, sans affecter l'état stationnaire.

Ces résultats sont en accord avec ceux de *HAMMOND et al 1974*, qui ont montré que l'augmentation et la perméabilité ionique se produit au cours des premières minutes de l'addition de l'antifongique, alors que, la présence de lipoprotéines dans le milieu inhibent significativement les cinétiques de fuite du potassium interne des cellules de *candida albicans*.

2- En ce qui concerne l'effet dose-réponse c'est-à-dire l'effet de concentrations croissantes d'amphotéricine B à concentration fixe de lipoprotéines, l'addition de l'amphotéricine B libre dans le milieu de cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit une fuite potassique significative, dès les concentrations de l'ordre de 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Un maximum de fuite potassique (16% de K^+ retenu par rapport au contrôle), n'est atteint qu'à partir de concentrations d'amphotéricine B de l'ordre de 5 $\mu\text{g/ml}$, dès les cinq premières minutes d'incubation à 37°C.

L'addition des lipoprotéines sériques natives, (de concentrations équivalentes à celles du plasma sanguin) induit un effet protecteur entre 0 et 25 minutes d'incubation. Cet effet se réduit d'une manière importante pour disparaître à deux heures d'incubation à 37°C dès les concentrations de l'amphotéricine B de l'ordre de 5 µg/ml de solution.

L'addition de lipoprotéines sériques de concentration en cholestérol de moitié et au 1/10 à celle du plasma sanguin, montrent des effets différents sur la toxicité de l'amphotéricine B suivant le type de lipoprotéines sériques:

A des concentrations d'amphotéricine B de l'ordre de 1 µg/ml, et durant des périodes d'incubation courtes (25 minutes):

- Les lipoprotéines lourdes, HDL induisent un effet protecteur important (83% de K⁺ retenu par rapport au contrôle.)

- Les lipoprotéines légères LDL montrent aussi un effet protecteur de l'action toxique de l'amphotéricine B. Cependant cet effet est significativement plus réduit que celui induit par les HDL.

A des périodes d'incubation, longues (2 h), seules les lipoprotéines sériques HDL montrent un effet protecteur minime. (50% de K⁺ retenu.)

Dès les concentrations supérieures à 2 µg/ml l'amphotéricine B complexée aussi bien aux lipoprotéines lourdes, HDL qu'aux lipoprotéines légères, LDL montrent un effet toxique important équivalent à celui de l'amphotéricine B sous sa forme libre. (16% seulement de K⁺ retenu.)

3 -En ce qui concerne l'effet de la densité cellulaire sur les phénomènes toxiques d'amphotéricine B, nos résultats montrent que la fuite du potassium intracellulaire des cellules de *saccharomyces cerevisiae* induite par l'amphotéricine B libre dépend non seulement de la concentration de l'antifongique, mais aussi de la densité cellulaire dans le milieu d'épreuve. Plus la concentration de l'amphotéricine B et celle de la suspension cellulaire de *saccharomyces cerevisiae* augmente, plus important est le contenu en potassium dans le milieu extérieur.

4 - Par ailleurs, l'addition d'une source d'énergie tel que le glucose à 10mmol/l, ne modifie pas l'amplitude de cytotoxicité de l'amphotéricine B. Autrement dit, l'énergisation cellulaire ne semble pas protéger les cellules contre l'effet cytotoxique.

Enfin, l'analyse détaillée des effets dose-réponse montrent qu'aux faibles concentrations d'amphotéricine B (inférieures à 2µg/ml), les lipoprotéines sériques montrent un effet protecteur relatif lorsqu'elles sont utilisées à des concentrations élevées (supérieures à 100µg/ml de cholestérol total). Des concentrations supérieures ou égales à 2µg/ml sont nécessaires pour obtenir une activité inhibitrice pleine.

Cet effet protecteur relatif suggère qu'un mécanisme d'internalisation des lipoprotéines sériques, notamment les lipoprotéines légères, LDL n'a pas lieu chez les levures de *saccharomyces cerevisiae*. Le seul mécanisme d'action, est le mécanisme classique, c'est-à-dire celui de l'interaction directe de l'amphotéricine B avec les constituants de la membrane plasmique en l'occurrence l'érgostérol. Cependant, la preuve expérimentale directe de l'absence des récepteurs aux LDL, chez les levures, nécessite une utilisation des lipoprotéines marquées sur leur partie apoprotéiques, et le suivi de leur devenir à l'intérieur de la cellule.

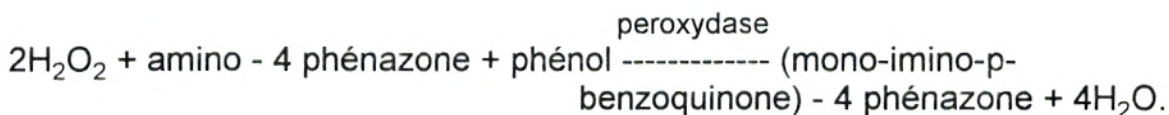
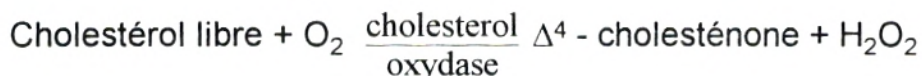
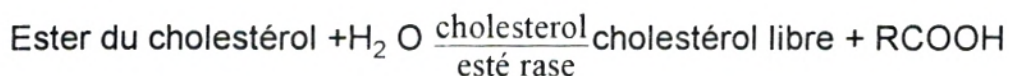
Le prolongement naturel de notre travail est l'étude in vivo de l'effet des lipoprotéines sériques sur la toxicité de l'amphotéricine B. D'autre part, en faisant varier la composition des lipides aussi bien des cellules cibles que des lipoprotéines sériques on peut obtenir des informations complémentaires intéressantes sur les mécanismes de base des phénomènes de toxicité de l'amphotéricine B.

Enfin une étude approfondie de l'effet de ces antifongiques sur les deux formes (libre et complexée aux lipoprotéines sériques sur le métabolisme cellulaire des cellules cibles permet de compléter l'étude de cet antifongique et de faire la part de ce qui revient aux effets purement membranaires et de ce qui revient aux effets sur le métabolisme cellulaire.

ANNEXE

1. Dosage du cholestérol total

1.1 - Principe



1.2 - Mode opératoire

Dans des tubes à essais, introduire :

	Témoin-réactif	Essai
Echantillon	-	0,02 ml
Solution réactionnelle	2,00 ml	2,00 ml

Mélanger, incuber le témoin-réactif et l'essai 10 minutes à 20-25°C ou 5 minutes à 37°C.

Lire l'extinction de l'essai contre le témoin-réactif à une longueur d'onde de 546nm dans un délai de 1 heure = E_{essai}

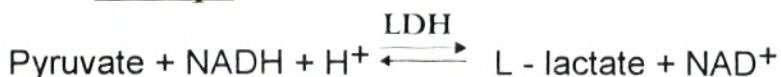
1.3 - Calcul

La concentration en cholestérol (C) dans l'échantillon est obtenue à partir de la formule suivante :

$$C(\text{g/l}) = 8,53 \times E_{\text{essai}}$$

2 . Dosage de l'acide pyruvique

2.1 - Principe



LDH : Lactate déshydrogénase

2.2 - Préparation de l'échantillon

Introduction dans un tube à centrifuger :	
Acide perchlorique (glacial) environ 1,0mol/l	4,0 ml
suspension cellulaire	4,0 ml
Bien mélanger et centrifuger 10min. à environ 3000t/min. introduire dans un tube à essais :	
surnageant	4,0 ml
tampon phosphate tripotassique (0,7mol/l)	2,0 ml
Mélanger et placer environ 15 min dans un de glace bain	
Filtrer sur un petit filtre à plis.	

2.3 - Mode Opératoire

Dans des tubes à essais, introduire :

Filtrat (25°C)	2,00 ml
solution, NADH (2,5 mmol/l)	0,20 ml
Mélanger avec une spatule en plastique et lire l'extinction E_1	
suspension LDH (≥ 900 U/ml)	0,02 ml
Mélanger et attendre la fin de la réaction. (environ 5min) pour lire l'extinction E_2 . $\Delta E = E_1 - E_2$	

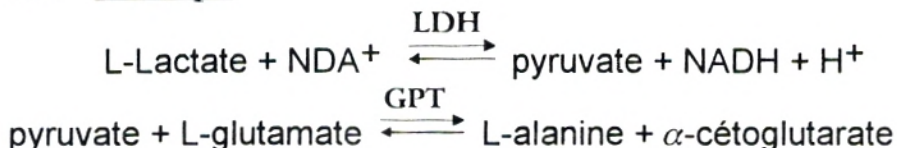
2.4 - Calcul

La concentration (C) du pyruvate dans l'échantillon est obtenue à partir du tableau suivant :

Longueur d'onde	Hg 365 nm	340 nm	334 nm
C($\mu\text{mol/l}$)	905 x ΔE	488 x ΔE	498 x ΔE

3. Dosage de l'acide lactique

3.1 - Principe



3.2 - Mode opératoire

Dans des tubes à essais introduire :

solution de NAD	4,00 ml
surnageant	0,10 ml
Bien mélanger, et répartir le mélange dans cuves :	
2	
(NH ₄) ₂ SO ₄ (sulfate d'amonium)	0,05 ml
Enzyme (LDH, GPT)	0,05 ml

Mélanger immédiatement, et lire l'extinction E_{enzyme} et E_{sulfate} après 10 à 15 minutes, à une longueur d'onde de 340 nm.

3.3 - Calcul

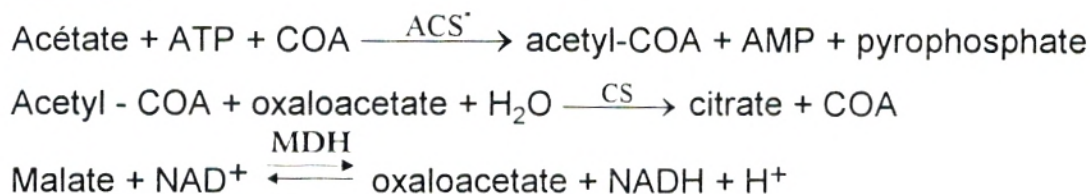
$$\Delta E = E_{\text{enzyme}} - E_{\text{sulfate}}$$

La concentration (C) de l'acide lactique dans l'échantillon est obtenue à partir de la formule suivante :

$$C(\text{mmol/l}) = \Delta E \times 16,3$$

4. Dosage de l'acide acétique

4.1 - Principe



4.2 - Mode opératoire

Introduire dans des tubes à essais :

	Blanc	Echantillon
Solution (triéthanolamine, malate, et chlorure de magnésium)	1 ml	1 ml
Solution (ATP, COA, NAD)	0,2 ml	0,2 ml
Eau distillée	1 ml	0,5 ml
Echantillon	/	0,5 ml

Mélanger et lire des solutions (A_0) après environ 3 minutes

l'absorbance

Ajouter

suspension (MDH, CS)	0,01 ml	0,01 ml
----------------------	---------	---------

Mélanger et lire (A_1) après environ 3 minutes La réaction est

l'absorbance

initiée par addition de :

suspension (ACS)	0,02 ml	0,02 ml
------------------	---------	---------

Mélanger, et lire l'absorbance (A_2), après 10 à 15 minutes

4.3 - Calcul

$$\Delta A_{\text{acé tate}} = \left[(A_2 - A_0)_{\text{ech.}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{ech.}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{é ch}}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{\text{blanc}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blanc}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blanc}}} \right]$$

ACS. Acétate thiokinase, CS : citrate synthase, MDH : Malate deshydrogénase.

La concentration de l'acétate (C) de l'échantillon est obtenue par la formule suivante :

$$C = \frac{1,940}{\varepsilon} \times \Delta A (\text{g/l})$$

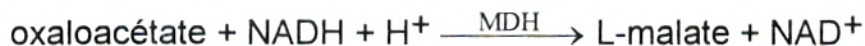
ε : coefficient d'absorption du NADH à 340nm, égale à 6,3

5 . Dosage de l'acide citrique

5.1 - Principe



En présence des enzymes (MDH) et (LDN), l'oxaloacétate et le produit de sa décarboxylation, le pyruvate sont réduits en L-malate et L-lactate respectivement par la réduction du NADH.



Le taux du citrate est équivalent au taux de NADH oxydé

5.2 - Mode opératoire

Introduire dans des tubes :

	Blanc	Echantillon
Solution (MDH, LDH, NADH)	1 ml	1 ml
Eau distillée	2 ml	1,8 ml
Echantillon	/	0,2 ml

Mélanger et lire la DO (A1) après environ 5 minutes

Introduire

Solution (CL)	0,02 ml	0,02 ml
---------------	---------	---------

Mélanger, et lire la DO (A2) après 5 minutes

5.3 - Calcul

La concentration (C) du citrate est obtenus par la formule suivante :

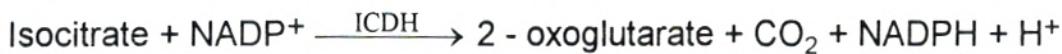
$$C = \frac{3,173}{\varepsilon} \Delta A (\text{g/l})$$

$$\varepsilon = 6,3$$

$$\Delta A = \Delta A_{\text{éch.}} - \Delta A_{\text{blanc}}$$

6 . Dosage de l'acide iso-citrique

6.1 - Principe



le taux du NADPH formé est proportionnel à celle de l'acide iso-citrique produit.

6.2 - Mode opératoire. introduire dans des tubes :

	Blanc	Echantillon
Solution (NADP)	1 ml	1 ml
Eau distillée	2 ml	1,9 ml
Echantillon	/	0,1 ml
Mélanger, et lire la D.O (A1) après 3 minutes		
La réaction est initiée, en ajoutant :		
solution (ICDH)	0,05 ml	0,05 ml

Mélanger et lire la D.O (A2), après 10 minutes.

6.3 - Calcul

$$C = \frac{5,859}{\varepsilon} \times \Delta A (\text{g/l})$$

$$\varepsilon = 6,3 \text{ (coefficient d'absorption)}$$

du NADPH à 340 nm)

$$\Delta A = \Delta A_{\text{éch.}} - \Delta A_{\text{blanc}}$$

7 . Dosage de l'acide malique

7.1 - Principe



ICDH : iso-citrate déshydrogénase

Le taux du L-malate est équivalent à celui du NADH formé. L'évolution du NADH est mesurée par son absorbance à 340 nm.



7.2 - Mode Opératoire

	Blanc	Echantillon
Solution (acide glutamique)	1 ml	1 ml
Solution (NAD)	0,2 ml	0,2 ml
Eau distillée	1 ml	0,9 ml
Echantillon (GOT)	/	0,1 ml
Mélanger, et lire la D.O (A1) après 3 minutes		
La réaction est initiée, en ajoutant :		
suspension (MDH)	0,01 ml	0,01 ml

Mélanger et lire la D.O (A2), après 5-10 minutes

7.3 - Calcul

$$\Delta DO = A_2 - A_1$$

$$\Delta A = \Delta A_{\text{éch.}} - \Delta A_{\text{blanc}}$$

$$C = \frac{2,977}{\varepsilon} \times \Delta A \text{ (g/l)}$$

$\varepsilon = 6,3$ (coefficient d'absorption du NADH à 340 nm)

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

-
- 1 - ANDREOLI. T. E (1973)
On the anatomy of amphotericin - B- cholesterol pores in lipid bilayer membranes, Vol. 4. p.337 - 345
 - 2 - BOLARD. J. (1989)
Future prospects with polyene antibiotics. Vol. 27 ; p. 151 - 159
 - 3 - BOALRD. J. (1986)
How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties ?
Biochim. Biophys. Acta (864) : 257 - 304
 - 4 - BOUCHERIT. Z (1995)
Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotericine B associée aux lipoprotéines du sérum sanguin chez des cellules de globules rouges humaines
Thèse de magister - biochimie
 - 5 - BRAJTBURG. J ELBERG. S, MEDDOF. J., KOBAYASHI. G.S, SCHLESSINGER. D, and MEDOFF. G. (1984).
Stimulatory, Permeabilising, and toxic effects of amphotericin B on L sells Antimicrobial. Agents and chemotherapy: p: 892 - 897
 - 6 - BRAJTBURG. J, MEDOFF. G., KOBAYASHI. G.S, and ELBERG. S (1980)
Influence of extracellular K⁺ or Mg²⁺ on the stages of the antifungal effects of amphotericin B and filipin Antimicrobial. Agents and Chemother (18). N° 4 : 593 - 597
 - 7 - BRAJTBURG. J, ELBERG. S, BOLARD. J, KOBAYASHI. G.S, LEVY. R.A, OSTLUND. R.E, SCHLESSINGER. D, and MEDOFF. G (1984)
Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B J. Inf. Dis. (149). N° 6 : 986 - 997.
 - 8 - BRAJTBURG. J., ELBERG. S, KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1986)
Effets of serum lipoproteins on damage to erythrocytes and Candida albican cells by polyene antibiotics.
J. Inf. Dis. (153). N° 3 : 623 - 626
 - 9 - BRAJTBURG. J, POWDERLY. W.G, KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1990).
Current understanding of mechanisms of action.
Antimicrobial. Agents and Chemother. (34). N° 2 : 183 - 188
 - 10 - BURSTEIN. M, SCHOLNICK. H.R and MORFIN. R (1970)
Rapid method for the isolation of lipoproteins form human serum by precipitation with polyanions
J. Lipid. Research (11) : 383 - 393

-
- 11 - BURSTEIN. M, et SAMAILLE. J. (1957)
Sur la précipitation selective des lipoproteines du sérum par l'héparine et les hépatinoïdes de synthèse en présence du Ca^{2+} . J. de phisyol., 49, 83.
- 12 - BURSTEIN. M. (1963)
Isolement des lipoproteines sériques de faible densité après floculation par le phosphotungstate de soude à pH neutre en présence de chlorure de magnésium. Tome3, n° 2. p. 139 - 148
- 13 - BURSTEIN.M, et SAMAILLE.J (1960)
Sur un dosage rapide du cholesterol lié aux α et aux β lipoproteines du sérum. Clin. Chim. Acta, 5, 609.
- 14 - BURSTEIN.M (1962)
Précipitation selective des lipoproteines sériques de faible densité par l'héparine en présence du chlorure de magnésium et de saccharose.
Séance du 16 Juillet 1962, présentée par M. Léon Binet. p. 605 - 607
- 15 - CAMPBELL Burk S.L, and Shulman. R.G (1987)
High - resolution NMR studies of *saccharomyces cerevisiae*.
Ann. Rev. microciol. 41 ; 595 - 616.
- 16 - CANIAUX. I, VILLARD. J, PORTE. M and ODDOUX. L (1984)
Les antifongiques utilisés en thérapeutique humaine
Lyon pharmaceutique (35) N° 3 : 131 - 141
- 17 - CHERON. M, CYBULSKA. B, MAZERSKI. J, GRZYBOWSKA. J, CZERWINSKI and BOROWSKI. E. (1988)
Quantitative structure activity relationships in Amphotericin B derivatives
Biochemical pharmacology. Vol. 37, N° : 5, p. 827 - 836
- 18 - Cybulska . B , BOROWSKI. E , Prigent . Y and GARY- BOBO .C.M (1981)
Cation permeability induced by two aromatic heptaenes, Vacidin .A and candididin . D on phospholipid unilamellar vesicles.
The journal of antibiotics. Vol XXXIV , n°7 , P 884 - 891
- 19 - DROUHET E. et DUPONT. B. (1988)
Antifongiques
pharmacologie clinique : bases de la thérapeutique. 2e édition. p. 1738 - 1759.
- 20 - DEN. HOLLONDER. J.A, UGURBIL. K, BROWN T.R, BEDNAR. M, REDFIELD. C, and Schulman R.G. (1986)
Studies of anaerobic and aerobic glycolysis in *sacchaomyces cerevisiae*.
Biochemistry, 25, p. 203 - 211
- 21 - DEN HOLLONDER J.A, BROWN. T.R, UGURBIL K. ; and SHULMAN. R.G (1979)

- ¹³C nuclear magnetic resonance studies of anaerobic glycolysis in suspension of yeast cells. *Biochemistry*, 23, 6096 - 6100.
- 22 - DEN HOLLONDER J.A, BEHAR K.L and SCHULMAN. R.G (1981)
¹³C NMR study of transamination during acetate utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. Vol. 78, N° 5. p. 2693 - 2697.
- 23 - FRUCHART . J . C (1984)
Extrait de l'ouvrage, pédiatrie, édité par M. DAVID et D. FLORET.
ed . Simep
- 24 - GEORGOPAPADAKOU. N.H and WALSH T.J. (1994)
Human mycoses : Drugs and targets for emerging pathogens. Vol. 246. p.
371 - 373.
- 25 - GOTTLIEB. D, CARTER. H.E, and AMMANN. A (1958)
Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols
Science (129) : 361
- 26 - GALE. E.F (1974).
The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *Journal of general microbiology*. 80, 451 - 465.
- 27 - GRUDA. I, NADEAU. P, BRAJTBURG. J, and MEDOFF. G (1980)
Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B - sterol complexes *Biochim. Biophys. Acta* (602) : 260 - 268
- 28 - HAMMOND. S.M, LAMBERT.P.A, and KLIGER. B.N (1974)
The mode of action of polyene antibiotics ; induced potassium leakage in *Candida albicans*
J. Gen. Microbial. (81) : 325 - 330
- 29 - HERVE. M, DEBOUZY. J.C, BOROWSKI. E, CYBULSKA. B, and GARY BOBO. C.M (1978)
The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A ³¹P - N.M.R study
Biochim. Biophys. Acta (980) : 261 - 272
- 30 - HARTSEL. S.C, BENZ. S.K, PETERSON. R.P, and whyte B.S (1991)
Potassium selective Amphotericin B Channels are predominant in vesicles regardless of sidedness. 30, p. 77 - 82

-
- 31 - HARTESEL. S.C, PERKINS. W.R, MACGARVEY. G.Y, and Cafiso. D.S. (1988)
A selective cholesterol dependent induction of H⁺/OH⁻ currents in phospholipid vesicles by amphotericin -B, 27, 2656 - 2660.
- 32 - JULIANO R.L, DAOUD. S, KRAUSE H.S, and GRANT C.W.M. (1987)
Membrane to membrane transfer of lipophilic drugs used against cancer or infectious disease. Annals New York academy of sciences. p. 89 - 103
- 33 - JANOFF. A.S, BONI. I.t, POPESCU. M.C, MINCHEY. S.R, CULLIS. P.R, MADDEN. T.D, TARASCHI.T, GRUNER. S.M, SHYAMSUNDER. E, TATE. M.W, MEMDELSON. R, and BONNER. D (1988).
Unusual lipid structures selectively reduce the toxicity of amphotericin B. Vol. 85, p. 6122 - 6126.
- 34 - KERRIDGE. D (1986)
Mode of action of clinically important antifungal drugs
Advances in microbial physiol (27) : : 1 - 64
- 35 - KITO. M, AKUSTSU. H, SUGETA. H, KYOGOKU. Y, SOHN. D.H, and YU.B.S (1987)
Association of polyene antibiotics with sterols
Chem. Biol. Interactions (64) : 61 - 70
- 36 - KLIMOV. A.N, and NIKIFOROVA. A.A (1972)
Interaction of polyene antibiotics and serum lipoproteins
Antibiotics (29) : 661 - 663
- 37 - KOBAYASHI. G.S, and MEDOFF. G (1977)
Antifungal agents : Recent developments
Ann. Rev. microbiol (31) : 291 - 308
- 38 - KOTLER - BRAJTBURG. J, MEDOFF. G, KOBAYASHI. G.S, BOGGS. S, SCHLESSINGER. D, PANDEY. R. C, and RINEHART. K.L. JR (1979)
Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects Antimicrob. Agents and Chemother (15). N° 5 : 716 - 722
- 39 - LAMPEN. J.O, ARNOW. P.M and SAFFERMAN. R.S (1960)
Protection by sterols against polyene antibiotics
J. Bacteriol (80) : 1152 - 1160
- 40 - LOWRY. O.H, ROSEBROUGH. N.J, FARR. A.L, and RANDALL. R.J, (1951).
Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. p. 265 - 275.

-
- 41- LEHNINGER. A.L, (1985).
Principes de biochimie. p. 397 - 434
ed. Flammarion medecine - Sciences.
- 42 - METAIS. P, Agneray. J, Féraud. G, FRUCHARD. J.C, JARDILLIER. J.C,
REVOL. A, STEST. G, STAHL. A. (1980)
ed. Simep . Biochimie clinique. Tome 2 . Biochimie métabolique.
- 43 - LOUISOT. P (1983)
Biochimie générale et medicale
Structure, métabolique, sémiologique. P.P : 426 - 295 ed. SIMEP
- 44 - MADDUX. M.S, and BARRIERE. S.L (1980)
A review of complications of amphotericin B - therapy : recommendations for
prevention and management
Drug intelligence and clinical pharmacy (14) : 177 - 181
- 45 - MARTY. A and FINKELSTEIN. A (1975)
Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin
Differences in its one-sided and two-sided action
J. Gen. physiol (65) : 515 - 526
- 46 - NEWMAN. M (1990)
Vade-Mecum des antibiotiques et agent chimiothérapeutiques anti-infectieux
5e édition. Maloine
- 47 - NORMAN. A.W, DEMEL. R.A, DE KRUIFF. B, GEURTS. W.S.M, VAN
KESSEL, and VAN DEENEN. L.L.M (1972)
Studies on the biological properties of polyene antibiotics :
Comparaison of other polyenes with filipin in their ability to interact
specifically with sterol
Biochim. Biophys. Acta (290) : 1 - 14
- 48 - NDZINGE. I, PETERS. S.D, and Thomas. A.H (1977)
Assay of nystatin based on the measurement of potassium released from
saccharomyces cerevisiae. Vol. 102, p. 328 - 332
- 49 - Papadopoulos. N.M and Kintzios. J.A. (1969)
Determination of Human serum lipoprotein patterns by agarose gel
electrophoresis. Analytical biochemistry 30, 421 - 426
- 50 - PUCHOIS. P, ALAUPOVIC. P, and FRUCHART. J.C, (1985)
Mise au point sur les classifications des lipoprotéines plasmatiques
Ann. Biol. clin (43) : 831 - 840

-
- 51 - RAO. T.V.G, TRIVEDI. A, and PRASAD. R. (1985)
Phospholipid enrichment of *saccharomyces cerevisiae* and its effects on polyene sensitivity. *Can. J. microbiol.* 31 : 322 - 326
- 52 - RAMOS. H, Attias de Murciano. A, Cohen. B.E, and Bolard. J, (1988)
The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca^{2+} ionophore in sterol - containing liposomes. *Biochimica et biophysica Acta*, 982. p. 303 -306.
- 53 - RINNERT. H, THIRION. C, DUPONT. G, and LE MAITRE. J (1977)
Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of a polyene antibiotic :
Amphotericin B
Biopolymers (16) : 2419 - 2427
- 54 - STEWART. G.G and RUSSEL.
The biology of *saccharomyces*. chap. 17 , 511
- 55 - SOKOL-ANDERSON. M.L, BRAJTBURG. J, and MEDOFF. G, (1986)
Amphotericin B induced oxidative damage and killing of *candida albicans*
Vol. 154, N° 1 ; p. 76 - 83
- 56 - TOULME. N.H, SARTHOU. P, SEMAN. M, and BOLARD. J (1989)
Membrane effects of the polyene antibiotic amphotericin B and of some of its derivatives on Lymphocytes. *Molecular and cellular biochemistry* 91 : 39 - 44
- 57 - TRAN-DINH. S, HERVE. M, LEBOURGUAIS. O, JEROME. M, and WIETZERBIN. J (1991)
Effects of amphotericin B on the glucose metabolism in *saccharomyces cerevisiae* cells.
Studies by ^{13}C , 1H - NMR and biochemical methods. *Eur. J. Biochem.* 197. p. 271 - 279
- 58 - VANDEN BOSSCHE. H, WILLEMSSENS. G, and MARICHAL. P (1987)
Anti - *Candida* drugs. The biochemical basis for their activity
C.R.C Critical. Rev in Microbiol. (15) : 57 - 72
- 59 - VERTUT-CROQUIN. A, BOLARD. J, CHABBERT. M and GARY-BOBO. C.M (1983)
Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B With cholesterol - or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study
Biochimistry (22) : 2939 - 2944
- 60 - WHYTE. B.S, Peterson. R.P, and Hartsel. S.C, (1989)
Amphotericin B and Nystatin show different activities on sterol - free vesicles
Vol. 164, N° 2 : p. 609 - 614

-
- 61 - WASAN. K.M, ROSENBLUM. M.G, CHEUNG. L, and BERESTEIN. G.L,
(1994)
Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin - B. Antimicrobial agents and chemotherapy. p. 223 - 227
- 62 - WIETZERBIN. J, HERVE. M, Lebourguais. O, and Tran-Dinh. S, (1992)
Comparative study of the effects of amphotericin B on the glucose metabolism in *saccharomyces cerevisiae* in K⁺ and Na⁺ rich media.
Biochimica et Biophysica Acta, 1136, p. 105 - 112.
- 63 - WELL . J . H , Boulanger . Y Chambon . P GAUTHERON . D , Lazdunski. M,
Montreuil . J , Patte . J . C , Rebel . G , and Wright . M (1979)
Biochimie générale . p 144 - 215
3^{ème} ed . Masson.