

MAG/574.88-12/01

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

UNIVERSITE DE TLEMCCEN

FACULTE DES SCIENCES

Département de Biologie

THESE

Inscrip. Sous le N° M85
Date: 2007. 03. 17
Lieu:

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

M 14

Présentée par

Mme BOUANANE Samira née TALEB BENDIAB

Thème

Etude in vivo de l'effet de l'amphotéricine B liée
aux solvants organiques Dimethyl formamide (DMF)
et Dimethyl sulfoxyde (DMSO)
sur quelques paramètres sériques et urinaires
chez les rats Wistar

Soutenue le 18.01.2001, devant le jury

Président	: M ^{me} H. MERZOUK	Maître de Conférences
Promoteur	: M ^r D. CHABANE SARI	Professeur
Examinateur	: M ^r S.M. BENYOUCEF	Docteur ès-Sciences
Examinateur	: M ^r B. BENABADJI	Docteur ès-Sciences
Examinateur	: M ^r K. BOUCHERIT	Chargé de Cours

Année Universitaire 1999 - 2000

UNIVERSITE DE TLEMCCEN
FACULTE DES SCIENCES
Département de Biologie

THESE

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

Présentée par

Mme BOUANANE Samira née TALIB BENDIAB

Thème

Etude in vivo de l'effet de l'amphotéricine B liée
aux solvants organiques Dimethyl formamide (DMF)
et Dimethyl sulfoxyde (DMSO)
sur quelques paramètres sériques et urinaires
chez les rats Wistar

Soutenue le 2000, devant le jury:

Président : M^{me} H. MERZOUK Maître de Conférences
Promoteur : M^r D. CHABANE SARI Maître de Conférences
Examinateur : M^r S.M. BENYOUCEF Docteur ès-Sciences
Examinateur : M^r B. BENABADJI Docteur ès-Sciences
Examinateur : M^r K. BOUCHERIT Chargé de Cours

Année Universitaire 1999 - 2000

Tout au long du chemin de ces longues années,

tu étais présente,

tu m'as encouragé avec ta patience et tes sacrifices,

Aujourd'hui mes efforts sont récompensés,

mais tu n'es plus là,

Mes ma très chère mère, c'est à toi avant tout

que je dédie ce travail, à ta mémoire qui vit dans

ma mémoire et dans mon cœur à tout jamais.

Je n'oublie pas mon père, mon frère et mes sœurs,

A mon mari qui m'a bien épaulé,

A ma fille « Jina »

A toute ma famille et mes amis(es).

REMERCIEMENTS

Ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à mon promoteur Monsieur D. CHABANE-SARI, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen. Je lui exprime ma profonde gratitude pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse, je le remercie pour les conseils précieux qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à :

Madame H. MERZOUK, Maître de conférences à la Faculté des Sciences, Département de Biologie Université de Tlemcen, pour ses encouragements et assistance ainsi que l'honneur qu'elle ma réservé pour presider ce jury.

Monsieur S.M. BENYOUCEF, Docteur ès-Sciences, je le remercie très sincèrement de m'avoir accueilli dans son laboratoire de biochimie du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen et d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Monsieur B. BENABADJI Docteur es-Sciences Pharmaceutiques, Chef de Service du laboratoire de microbiologie et d'immunologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen, pour sa disponibilité à juger ce travail.

Monsieur K. BOUCHERIT Chargé de Cours à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime toute ma gratitude à tout le personnel du laboratoire de Physiologie animale et du laboratoire de Biochimie de la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen.

Mes remerciements les plus distingués vont à tout le personnel du laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen pour leur aide permanente.

Je tiens à remercier vivement Monsieur M. A. KHELIL, Professeur à la Faculté des Sciences, Département de Biologie Université de Tlemcen pour son aide précieuse et son appui.

J'exprime mes remerciements distingués à Monsieur D. SMADI Maître assistant à la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, pour l'élaboration et la contribution graphique de ce travail.

Enfin, mes reconnaissances vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail!

ABREVIATIONS

Amphotericine B-D	Amphotericine B desoxycholate (fungizone)
AmB	Amphotericine B
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
HDL	Lipoprotéines lourdes
LDL	Lipoprotéines légères
ERS	Flux renal sanguin
FG	Filtration glomérulaire
EF%	Excrétion fractionnaire
\dot{V}	Debit urinaire
$(U/P)_{\text{creat}}$	Rapport de la créatinine urinaire et plasmatique
Na^+	Sodium
K^+	Potassium
Ca^{++}	Calcium
mn	Minute
GR	Globule rouge
Hb	Hémoglobine
UNS	Urée nitrogene sanguine
DMPC	Dimyristoyl phosphatidyl choline
DMPG	Dimyristoyl phosphatidyl glycerol

الملخص :

إن الإرتفاع الهام المسجل في الأمراض الجلدية الناجمة عن الخمائر دفعت الى اكتشاف وتمثيل مواد جديدة مضادة للفطريات مع زيادة الفعالية من جهة والتقليل من الآثار الجانبية الضارة لخلايا العائل من جهة أخرى .

تعتبر مادة Amphotericine B-desoxycholate مضاد فطري الأكثر استعمالا ودراسة رغم آثاره الجانبية السامة والتي تعود أساسا الى عدم ثباته وعدم قابليته للذوبان .

أقيمت هذه الدراسة على مادة Amphotericine B-desoxycholate بهدف الرفع من مستوى الفعالية والتقليل من آثارها الجانبية والمرتبطة بالمذيبات العضوية (Dimethyl formamide (DFM و dimethyl sulfoxide (DMSO على بعض المعايير الكلوية عند فتران Wistar .

حيث قمنا بدراسة أثر التراكيز التصاعديّة لمادة Amphotericine B-desoxycholate من جهة واختبار طبيعّة المذيبات العضوية وأثرها على ذوبانية هذه المادة المضادة للفطريات من جهة أخرى حيث تم تتبع مظاهر السمية على مستوى الجهاز الدموي بتحليل كمي للهيموجلوبين وعد الكريات الدموية الحمراء والتحليل البيوكيميائية لبعض المعايير الأساسية (بروتينات ، يوريا الكرياتين ، الصوديوم ، البوتاسيوم ، الكالسيوم) وبعض المعايير الكلوية كقياس الشفافية والكهربائية الكلوية .

أمكن استخلاص من هذه أن :

♦ الآثار الجانبية لمادة Amphitericine B-desoxycholate مرتبطة

بالجرعة في أطراد تتزايد على مستوى الجهاز الدموي والكلية .

♦ أن مادة Amphitericine B-desoxycholate المنحلة بالمذيبات

أبدت آثارا سامة أكثر أهمية في حالة DMF من DMSO .

هذا التغير راجع أساسا الى طبيعة المذيب من جهة والى قطبية المذيب المستخدم من جهة أخرى .

الكلمات المفتاحية :

Fungizone ، Amphitericine B-
desoxycholate ، درجة الإنحلال .
المذيبات العضوية ، الكريات الحسراء ،

RÉSUMÉ

La progression très importante des mycoses, affections dues à des champignons levuriformes, a incité la recherche à découvrir et à synthétiser de nouveaux antifongiques dont l'efficacité est accrue mais avec moins d'effets toxiques pour les cellules hôtes.

L'amphotéricine B, antifongique polyénique, reste le plus étudié et le plus utilisé en milieu médical malgré ces effets secondaires toxiques dus essentiellement à son instabilité et son insolubilité.

De nombreuses études ont été faites dans le but d'augmenter l'index thérapeutique de cette molécule tout en réduisant sa toxicité ; pour cela nous avons entrepris l'étude *in vivo* de l'effet de l'amphotéricine B-desoxycholate liée aux solvants organiques diméthyl formamide (DMF) et diméthyl sulfoxyde (DMSO) sur quelques paramètres sériques et urinaires chez le rat Wistar.

Dans notre travail, nous avons abordé d'une part l'effet de concentrations croissantes de l'amphotéricine B-desoxycholate (fungizone), d'autre part nous avons testé l'effet de la nature du solvant sur la solubilité de cet antifongique.

Les phénomènes de toxicité au niveau sanguin sont suivis par dosage du taux de l'hémoglobine, numération des globules rouges et le dosage biochimique de quelques paramètres sanguins (protéines, urée, créatinine, sodium, potassium, calcium) et urinaires par analyses de la clairance et des électrolytes urinaires.

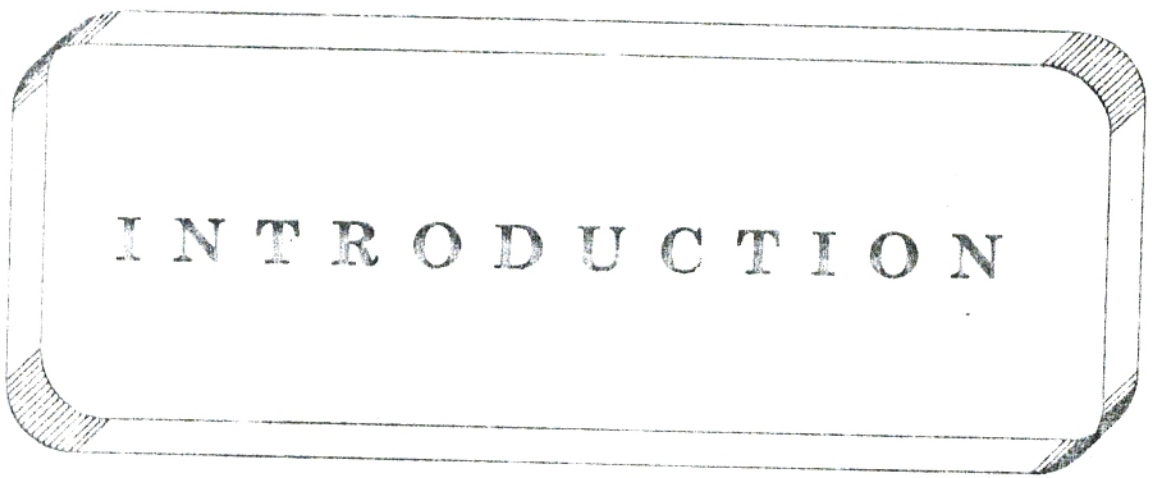
Il ressort de cette étude que

- Les effets secondaires liés à l'Amphotéricine B-desoxycholate sont en fonction de la dose (phénomènes de dose/reponse) Car plus la dose augmente, plus l'effet toxique est marqué aussi bien au niveau sanguin qu'urinaire.
- L'Amphotéricine B-desoxycholate dissoute dans les 2 solvants présente aussi un effet toxique, qui reste plus marqué pour le DMF que le DMSO. Enfin cette variation dépend d'une part de la solution mère d'antifongique et de la nature ainsi que la polarité du solvant utilise d'autre part.

Mots clés : Amphotéricine B - fongicide - solvant - solubilité - globule rouge - desoxycholate

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
MATÉRIEL ET MÉTHODES	5
I - MODELE EXPERIMENTAL	5
I.1 - Choix de l'animal	5
I.2 - Préparation des animaux	5
I.3 - Protocole expérimental	6
II - DEROULEMENT DE L'EXPERIENCE	7
II.1 - Expérience de Clearance	7
II.2 - Dosage des échantillons	7
II-2-1. Dosage des protéines totales.....	7
II-2-2. Dosage des électrolytes.....	7
II-2-3. Dosage de la créatinine et de l'urée.....	8
II-2-4. Dosage du cholestérol total, triglycédes, Phospholipides.....	8
II-2-5. Dosage de l'hémoglobine.....	8
II-2-6. Numérotation des globules rouges.....	8
II.3 - Mesure du débit urinaire	8
II.4 - Filtration glomérulaire	8
II.5 - Excrétion fractionnaire EF%	9
II.6 - Analyse statistique	9
III - PREPARATION DES SOLUTIONS ANTIFONGIQUES	9
INTERPRÉTATION DES RESULTATS	11
DISCUSSION	58
CONCLUSION GÉNÉRALE	67
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	69



INTRODUCTION

INTRODUCTION GENERALE

La population mondiale considérée comme relativement jeune est caractérisée par un taux d'accroissement très fort, ceci s'explique certainement par les conditions de vie améliorées et particulièrement la réduction du taux de mortalité.

Pourtant, ce dernier en diminuant n'exclue pas la fréquence des maladies liées d'une part à l'antibiothérapie prolongée et abusive et d'autre part marquée par un milieu pollué, malnutrition, manque d'hygiène et sous développement. Par ailleurs, le monde dans lequel nous vivons est en perpétuelle dégradation souvent à l'origine de la quasitotalité des affections de plus en plus complexes, qui nous incitent chaque fois à mettre en œuvre une politique de recherches visant à l'élaboration de thérapeutiques nouvelles et efficaces.

Parmi ces affections, on trouve les mycoses qui sont des infections causées par des champignons microscopiques touchant aussi bien la peau que les organes internes (29, 46, 74).

Le problème de la diversification de la pathologie fongique et ses localisations dans pratiquement tous les niveaux de l'organisme pose des difficultés de traitement.

En effet, le polymorphisme des champignons a suscité la curiosité des chercheurs voulant élaborer une stratégie thérapeutique antifongique efficace tout en diminuant la toxicité pour la cellule hôte.

Ces antifongiques sont des polyènes d'origine naturelle, obtenus par extraction de divers streptomyces, ces polyènes comprennent les héptaènes (amphotéricine B, mepartricine) et les tétraènes (Nystatine, natamycine).

Certains fongis présentent une résistance aux traitements anti-mycosiques habituels, ceci nous a conduit à l'étude de l'antifongique particulièrement efficace à l'heure actuelle, en l'occurrence l'amphotéricine B utilisée en milieu médical, malgré qu'elle soit à l'origine

de phénomènes toxiques parfois sévères, cette toxicité est due essentiellement à son instabilité et son insolubilité dues à son état aggrégé (37, 53, 54, 59, 78)

Selon des études physiologiques, son spectre d'activité *in vitro* s'étend à de nombreux champignons pathogènes des mycoses profondes (*Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Sporothrix*, *Aspergillus*, *Cryptococcus* et les levures du genre *Candida*) (35, 58), le pH d'activité est compris entre 5,5 et 7.

Chez l'homme, ces champignons sont entièrement inhibés avec des concentrations allant de 0,25 à 2 µg/ml (77).

Pour cela de nouveaux travaux ont été faits dans le but d'établir une stratégie nouvelle permettant d'augmenter l'efficacité de l'amphotéricine B avec moins d'effets toxiques, parmi lesquels on peut citer les essais de solubilisation de cet antifongique avec des sels, des détergents, des solvants, des triglycérides, des lipoprotéines et des liposomes (7, 21, 34, 61, 78)

Aux doses thérapeutiques l'amphotéricine B a une grande affinité sur les stéroïdes lipophiles de la membrane plasmique des champignons (*Ergosterol*) que pour le cholestérol membranaire des cellules animales (1, 7, 12, 35), augmentant ainsi la perméabilité de la membrane cellulaire avec fuite de cations intracellulaires (K^+ , Mg^{++}), cela entraîne la formation de véritables pores cylindriques.

Cependant, l'amphotéricine B présente des effets indésirables liés à sa toxicité tels que: l'effet hématologique, l'effet hépatotoxique, les troubles électrolytiques et les effets néphrotoxiques où le rein reste l'organe cible d'une exposition chronique et modérée à l'amphotéricine B par voie intraveineuse (12, 24, 31, 33, 39, 70, 84)

En effet, le traitement par l'amphotéricine B est caractérisé par une modification de l'aspect hémodynamique du rein, entraînant une chute importante de la filtration glomérulaire, une augmentation de la créatinine

sanguine et un désordre électrolytique. Cette atteinte dépend de la dose totale reçue et peut devenir irréversible (22, 32, 70).

Son excrétion se fait par deux voies principales : la voie biliaire qui élimine au maximum 19% et la voie urinaire qui élimine 21% de la dose injectée (70).

Les caractéristiques de l'amphotéricine B, telle que son insolubilité dans l'eau et son instabilité, ont conduit les chercheurs à modifier la structure chimique de cette molécule, ce qui a abouti à des dérivés solubilisés et dérivés semi-synthétiques (12, 38, 70, 73, 76, 84). Sur la base de ces résultats, nous nous sommes attelés à expérimenter l'amphotéricine B-D solubilisée dans deux solvants organiques à savoir le Diméthyl sulfoxyde DMSO et le Diméthyl formamide DMF, dans le but d'étudier sa toxicité, son spectre d'activité ainsi que la cinétique du médicament. La complexation de cette molécule avec ces solvants organiques réduit probablement l'effet cytotoxique. Cette solubilisation pourrait protéger la membrane plasmique, stabiliser les protéines de transport, et rétablir les troubles électrolytiques.

En effet, le complexe amphotéricine B-D - solvant, modifie l'affinité de cet antifongique en diminuant son transfert sélectif vers les cellules cibles (49) ; et cela est favorisé par la formation des agrégats et des oligomères insolubles qui semblent être inactifs (37, 53, 54, 59, 64, 78).

L'objectif de notre travail était d'établir une forme d'amphotéricine B-D efficace tout en diminuant de sa cytotoxicité sur le milieu de diffusion des différentes parties de l'organisme et ainsi une modification de l'interaction de cet antifongique avec les cellules cibles.

Pour cela nous avons envisagé d'entreprendre une étude *in vivo* de l'effet de l'amphotéricine B-D à différentes concentrations (2,5 - 5 - 7,5 - 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) liée aux solvants organiques diméthyl formamide « DMF » et diméthyl sulfoxyde « DMSO » sur quelques paramètres sériques et urinaires chez les rats Wistar.

Dans un premier temps, il nous a fallu établir un protocole expérimental permettant de déterminer *in vivo* les phénomènes de toxicité de l'amphotéricine B-D. Pour cette étude quatorze groupes de rats de type Wistar ont été choisis. Le chapitre matériels et méthodes est consacré à la description du modèle animal étudié.



M A T E R I E L

E T

M E T H O D E S

MATÉRIEL ET METHODES

I - MODELE EXPERIMENTAL

1.1 - Choix de l'animal

Notre travail a porté sur une souche de rats mâles albinos de type Wistar.

Les animaux sont élevés à l'animalerie de la Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Tlemcen, ayant un poids corporel moyen de 150 à 300 g et sont âgés de 8 à 15 semaines.

1.2 - Préparation des animaux

14 groupes de rats ont été étudiés de 5 rats chacun (n = 5)

- 1 - Un lot de rats témoins recevant une perfusion de solution saline à 9 g/l
- 2 - Un lot expérimental de rats recevant une perfusion de desoxycholate de sodium.
- 3 - Quatre lots expérimentaux recevant chacun une perfusion d'amphotéricine B-D à différentes concentrations : $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ - $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ - $7,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ - $10 \mu\text{g ml}^{-1}$
- 4 - Un lot expérimental de rats recevant une perfusion du solvant DMF à 10^{-2} M l^{-1} .
- 5 - Un lot expérimental de rats recevant une perfusion du solvant DMF à 10^{-5} M l^{-1} .
- 6 - Un lot expérimental de rats recevant l'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ solubilisée dans du DMF à 10^{-2} M l^{-1} .
- 7 - Un lot expérimental de rats recevant l'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ solubilisée dans du DMF à 10^{-5} M l^{-1} .
- 8 - Un lot expérimental de rats recevant du DMSO à 10^{-2} M l^{-1} .
- 9 - Un lot expérimental de rats recevant du DMSO à 10^{-5} M l^{-1} .

- 10 - Un lot expérimental de rats recevant l'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ solubilisée dans du DMSO à 10^{-2} M l^{-1}
- 11 - Un lot expérimental de rats recevant l'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ solubilisée dans du DMSO à 10^{-5} M l^{-1}

1.3 - Protocole expérimental

La veille de l'expérience (18 heures), les rats sont mis à jeun dans des cages à métabolisme.

Au début de la manipulation, l'animal est pesé puis anesthésié au moyen d'une injection intra-péritonéale de penta-barbitol à 6% (NEMBUTAL). Après l'anesthésie, l'animal est placé sur une table chauffante thermostatée à 37°C , une trachéotomie est effectuée.

La perfusion de la solution physiologique à 9 g/l est réalisée par un cathéter (PE 50) introduit dans la veine jugulaire droite à un débit de $30 \mu\text{l. mn}^{-1}$ pendant 1 heure afin d'établir un équilibre hydrique. Un cathéter (PE 50) est introduit dans la veine jugulaire gauche afin de pouvoir perfuser la solution d'antifongique.

L'artère fémorale est repérée au niveau de la patte postérieure et un cathéter (PE 50) hépariné est placé pour collecter le sang toutes les demi-heures, et par suite réaliser le dosage de l'hémoglobine et la numération globulaire. Après chaque prélèvement sanguin, l'échantillon est centrifugé à 3000 trs mn^{-1} , les globules rouges sont remis en suspension dans du NaCl à 9 g/l et réinjecté par la veine fémorale. Ce procédé permet de maintenir la pression artérielle à sa valeur initiale.

Une fois l'abdomen ouvert par une incision longitudinale médiane, 2 cathéters (PE 50) sont introduits dans les uretères droit et gauche pour le recueil de l'urine définitive.

Afin de compenser les pertes liquidiennes liées à l'intervention chirurgicale, 2 ml de NaCl à 9 g/l sont administrés en deux fois durant la préparation à tous les groupes de rats étudiés.

En dernier, une compresse imbibée de NaCl à 9 g/l est placée sur l'ouverture abdominale pour éviter la déshydratation du rat.

II - DEROULEMENT DE L'EXPERIENCE

II.1 - Expérience de Clearance

A partir du temps zéro de l'expérience, les animaux témoins et traités reçoivent par la veine jugulaire droite une solution de chlorure de sodium à 9 g/l à un débit constant de $30 \mu\text{l min}^{-1}$ pendant une heure.

Les expériences de Clearance comportent 4 périodes. La première de celles-ci commençant une fois l'heure d'équilibration terminée, chaque période dure 30 minutes.

Au début de la 1^{ère} période, le traitement spécifique pour chaque lot de rat est administré par la veine jugulaire gauche à un débit de $10 \mu\text{l min}^{-1}$. Le débit de la solution saline est rajusté à $20 \mu\text{l min}^{-1}$.

A la fin de l'expérience, un prélèvement sanguin est effectué au niveau de l'artère abdominale; pour les tests biochimiques et ionogramme (Sodium Na^+ , Potassium K^+ , Calcium Ca^{++}) le sang est récupéré dans des tubes non héparinés; et dans des tubes sous anticoagulants pour les tests hématologiques.

Après centrifugation à 3000 trs/min pendant 10 mn, le plasma (et le sérum) est récupéré pour les différents dosages, ensuite conserve à une température de 5 °C.

II.2 - Dosage des échantillons

II-2-1. Dosage des protéines totales

Ce dosage est effectué par la méthode colorimétrique de Buret. Les résultats sont exprimés en g/l.

II-2-2. Dosage des électrolytes

La concentration du sodium (Na^+), potassium (K^+) et calcium (Ca^{++}) des échantillons de plasma et d'urine est déterminée par un ionogramme de type (Beckman Cx-3) au Service de Biochimie du CHU de Tlemcen. Les résultats sont exprimés en mmol l^{-1} (ou Meq).

II 2-3. Dosage de la créatinine et de l'urée

La concentration plasmatique et urinaire de la créatinine et de l'urée est déterminée par la méthode colorimétrique (Kit BOEHRINGER, Kit PROCHIMA et par automat) au Service de Biochimie du CHU de Tlemcen. Les valeurs sont exprimés en mmol l^{-1}

II 2-4. Dosage du cholestérol total, triglycérides, phospholipides

Le dosage du cholestérol, triglycéride et phospholipide se fait par des méthodes enzymatiques (Kit BOEHRINGER et par automat) au Service de Biochimie du CHU de Tlemcen. Les valeurs sont exprimés en mg dl^{-1}

II 2-5. Dosage de l'hémoglobine

Le dosage de l'hémoglobine est réalisé selon la méthode de TallKist⁵. Les résultats sont exprimés en mg dl^{-1}

II 2-6. Numérotation des globules rouges

Le dénombrement des hématies se fait par la cellule de Thomas. le comptage est réalisé au moyen d'un microscope optique avec un grossissement de 40×10 . Les résultats sont exprimés en nombre de globules rouges par $\text{mm}^3 \times 10^6$ de sang.

II.3 – Mesure du débit urinaire

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

II.4 – Filtration glomérulaire

Elle est déterminée par la Clearance de la créatinine

$$FG = \left(\frac{U}{P} \right)_{\text{crea}} \cdot V \text{ en } \mu\text{l. min}^{-1}$$

(V) = débit urinaire

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

II.5 - Excrétion fractionnaire EF%

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

$$EF_{\text{urinaire}} = \frac{1}{\left(\frac{U}{P}\right)_{\text{urinaire}}}$$

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

$$EF_{\text{e}} = \frac{\left(\frac{U}{P}\right)_{\text{e}}}{\left(\frac{U}{P}\right)_{\text{urinaire}}}$$

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

II.6 - Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats est réalisée en effectuant une analyse de variance. Lorsque la valeur de F le permet, un test dit de "t" modifié est appliqué. Une différence est considérée comme significative pour une valeur de $P < 0,05$.

Les moyennes sont données avec leur erreur standard.

III - PREPARATION DES SOLUTIONS ANTIFONGIQUES

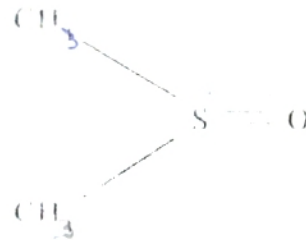
L'antifongique polyénique utilisé dans ce travail est Fungizone (forme commercialisée de l'Amphotéricine B du laboratoire SQUIBB).

ayant l'aspect d'une poudre jaune dont la composition est la suivante

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

L'Amphotéricine B est dissoute dans 2 solvants organiques à 2 concentrations différentes 10^{-2} M.l⁻¹ et 10^{-5} M.l⁻¹

Le Dimethyl sulfoxyde (acétone) DMSO



Le Dimethyl formamide (amide) DMF



Les solutions ainsi préparées (de concentrations allant de 2,5 - 5 - 7,5 - 10 µg ml⁻¹) sont gardées à 4 °C pendant au moins 12 heures avant leur utilisation pour assurer une bonne solubilisation et une meilleure stabilité

INTERPRETATION

DES

RESULTATS

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les valeurs moyennes de l'hémoglobine (Hb) et le nombre de globules rouges (GR) chez les rats témoins et ceux recevant les différents traitements à savoir l'amphotéricine B-D à concentrations croissantes ($2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ - $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ - $7,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $10 \mu\text{g ml}^{-1}$), les solvants (DMF 10^{-2} M l^{-1} , DMF 10^{-5} M l^{-1} , DMSO 10^{-2} M l^{-1} et DMSO 10^{-5} M l^{-1}) et les solvants additionnés d'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ sont représentées sur les Tableaux I (a-b-c)

Il a été constaté clairement que le taux d'hémoglobine augmente significativement avec des concentrations croissantes de la solution d'antifongique (allant de $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$) comparés aux rats témoins (Tableau I-a - Figure 1-2-4).

Il en est de même pour les rats traités aux solvants seuls (DMF, DMSO) (Tableau I-b et I-c) et (Figure 3-8-9-10-11-12)

Cette augmentation du taux d'hémoglobine est liée à l'hémolyse des globules rouges dont le nombre diminue significativement en présence des différentes concentrations d'amphotéricine B-D par rapport aux témoins (Tableau I-a - Figure 13).

Pour les rats traités aux solvants DMF et DMSO en présence ou en absence d'amphotéricine B-D, le nombre de globules rouges diminue significativement par rapport aux témoins (Tableau I b - Figure 14-15-16)

Les Tableaux II (a-b-c) indiquent la composition plasmatique des protéines, urée, créatinine, sodium, potassium et calcium chez les différents lots de rats Wistar : les rats témoins, les rats traités avec l'amphotéricine B-D à différentes concentrations ($2,5$ - 5 - $7,5$ et $10 \mu\text{g ml}^{-1}$), les rats traités avec l'amphotéricine B à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (solvants (DMF 10^{-2} M l^{-1} , DMF 10^{-5} M l^{-1} , DMSO 10^{-2} M l^{-1} et DMSO 10^{-5} M l^{-1}), et les rats recevant seulement le solvant (DMF 10^{-2} M l^{-1} , DMF 10^{-5} M l^{-1} , DMSO 10^{-2} M l^{-1} et DMSO 10^{-5} M l^{-1}).

Groupes	Paramètres	Hb (mg.dl ⁻¹)	GR (10 ⁶ .mm ³)
Temoins (n=5)		11.12 ± 0.57	6.09 ± 0.77
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ (n=5)		13.45 ± 0.49 *	4.44 ± 0.19 *
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		12.98 ± 0.20 *	4.12 ± 0.49 *
DMF 10 ⁻⁴ M.l ⁻¹ (n=5)		12.72 ± 0.10 *	4.05 ± 0.21 *
DMF 10 ⁻⁴ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		12.88 ± 0.78 *	3.97 ± 0.45 *
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ (n=5)		13.19 ± 0.014 *	4.49 ± 0.21 *
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		12.50 ± 0.61 *	4.11 ± 0.45 *
DMSO 10 ⁻⁴ M.l ⁻¹ (n=5)		12.99 ± 0.15 *	4.66 ± 0.22 *
DMSO 10 ⁻⁴ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		13.05 ± 0.59 *	4.01 ± 0.29 *

Dissertation des étudiants

Tableau I-b : Valeurs moyennes de l'hémoglobine (Hb) et globules rouges (GR) chez les rats témoins et ceux traités aux solvants seuls DMF (10⁻² M.l⁻¹ – 10⁻⁴ M.l⁻¹) et DMSO (10⁻² M.l⁻¹ – 10⁻⁴ M.l⁻¹) en présence ou en absence d'Amphotéricine B-D à 10 µg ml⁻¹. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience (P < 0.05)

* différence significative par rapport aux témoins

Groupes	Paramètres	Hb (mg.dl ⁻¹)	GR (10 ⁶ .mm ³)
AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		15,08 ± 0,23	4,31 ± 0,19
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		12,98 ± 0,20 *	4,12 ± 0,49
DMF 10 ⁻⁴ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		12,88 ± 0,78 *	3,97 ± 0,45
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		12,50 ± 0,61 *	4,11 ± 0,45
DMSO 10 ⁻⁴ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		13,05 ± 0,59 *	4,01 ± 0,29

Tableau I-c : Valeurs moyennes de l'hémoglobine (Hb) et globules rouges (GR) chez les rats traités à l'Amphotéricine B-D à 10 µg ml⁻¹ et les rats recevant le solvant DMF (10⁻² M.l⁻¹ - 10⁻⁴ M.l⁻¹) et DMSO (10⁻² M.l⁻¹ - 10⁻⁴ M.l⁻¹) additionné à l'AmB-D à 10 µg ml⁻¹. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience (P < 0,05)

* différence significative par rapport aux témoins

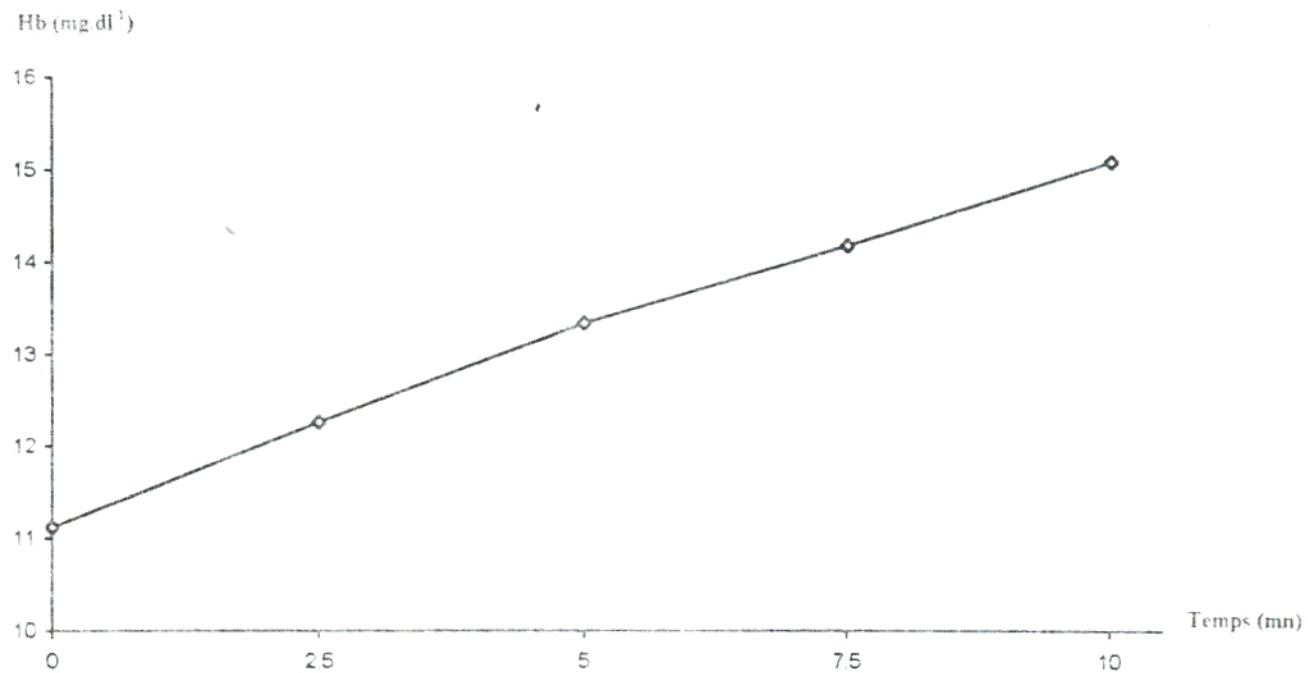


Figure 1 : Effet de l'amphotéricine B-D à différentes concentrations (2,5 - 5 - 7,5 et 10 $\mu\text{g}, \text{ml}^{-1}$) sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez les rats Wistar.

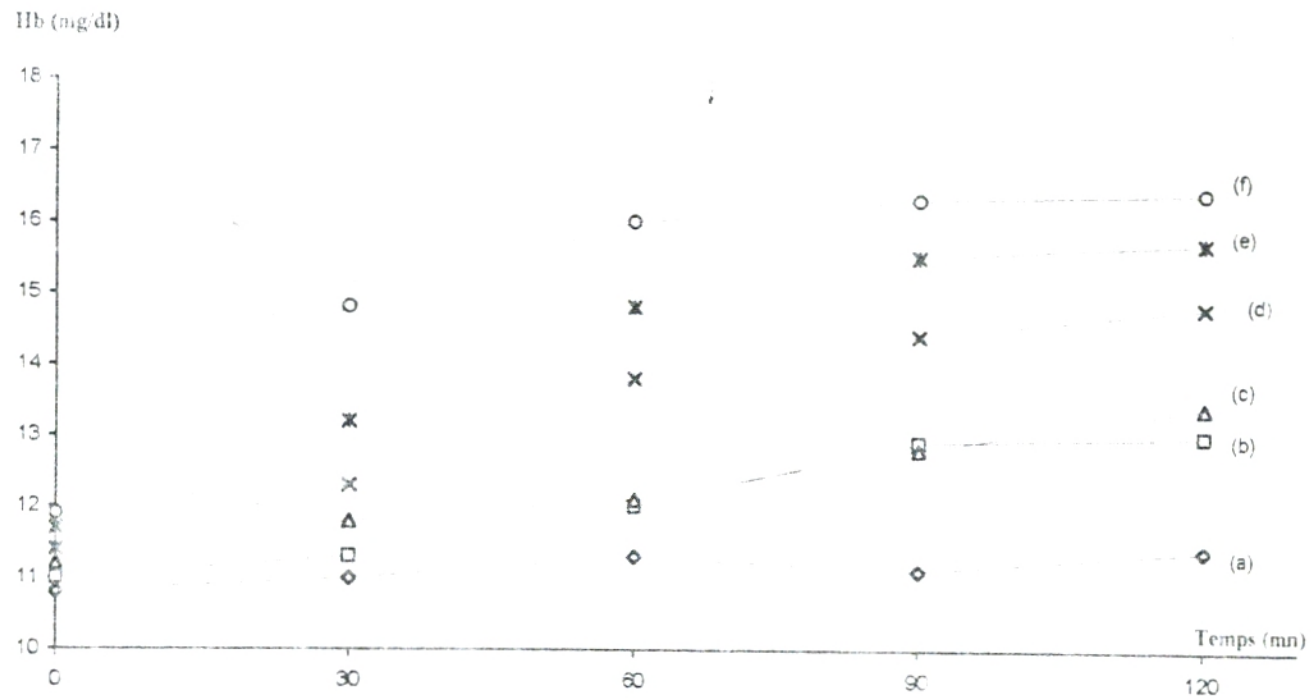


Figure 2 : Effet de l'Amphotericine B-D à différentes concentrations (2,5 - 5 - 7,5 - 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire chez les rats Wistar.

- (a): Témoins (b): Rat + Desoxycholate de sodium (c): Rat + AmB-D à 2,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (d): Rat + AmB-D à 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
(e): Rat + AmB-D à 7,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (f): Rat + AmB-D à 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

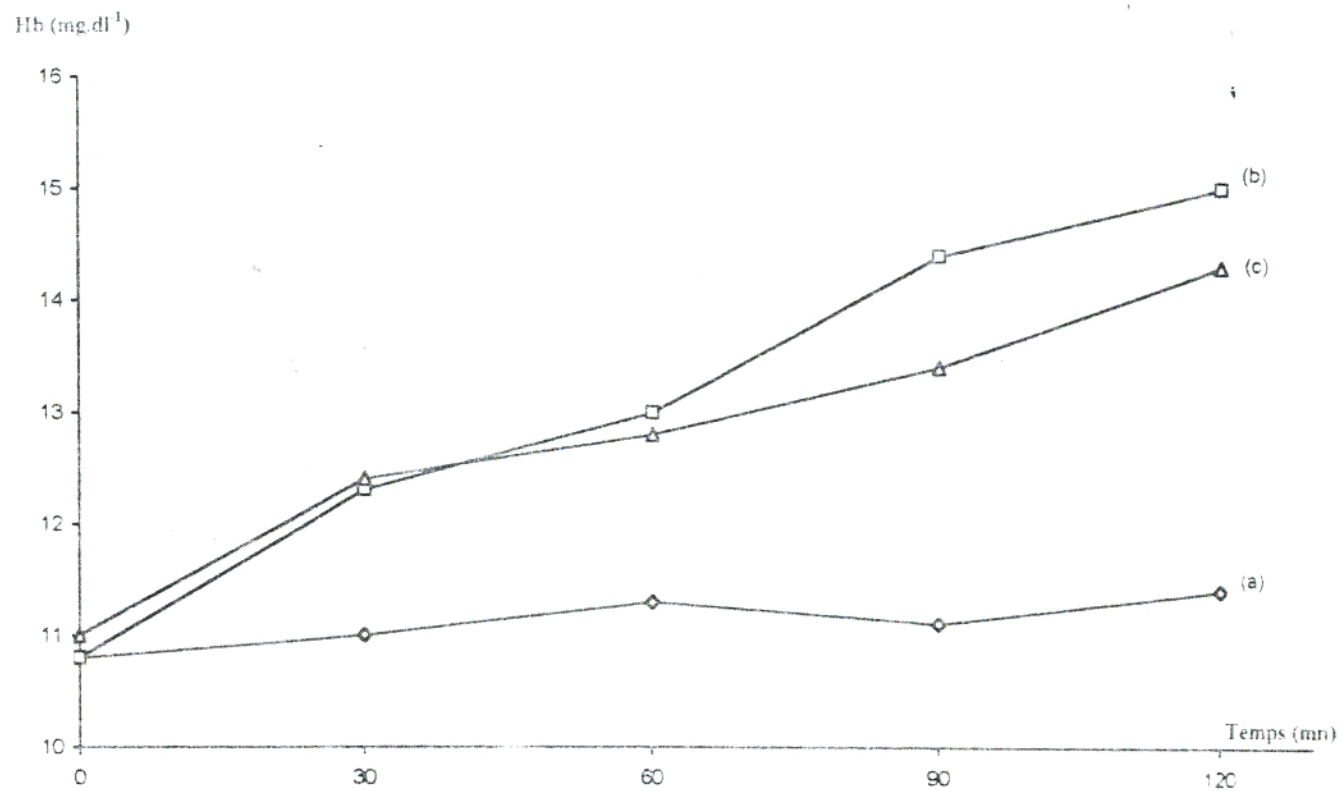


Figure 3 : Effet de l'amphotéricine B-D sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire en présence et en absence de DMF à 10^{-2} M.l⁻¹ chez les rats Wistar.

(a): Témoins (b): Rat + DMF 10^{-2} M.l⁻¹ (c): Rat + AmB-D à $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ + DMF 10^{-2} M.l⁻¹

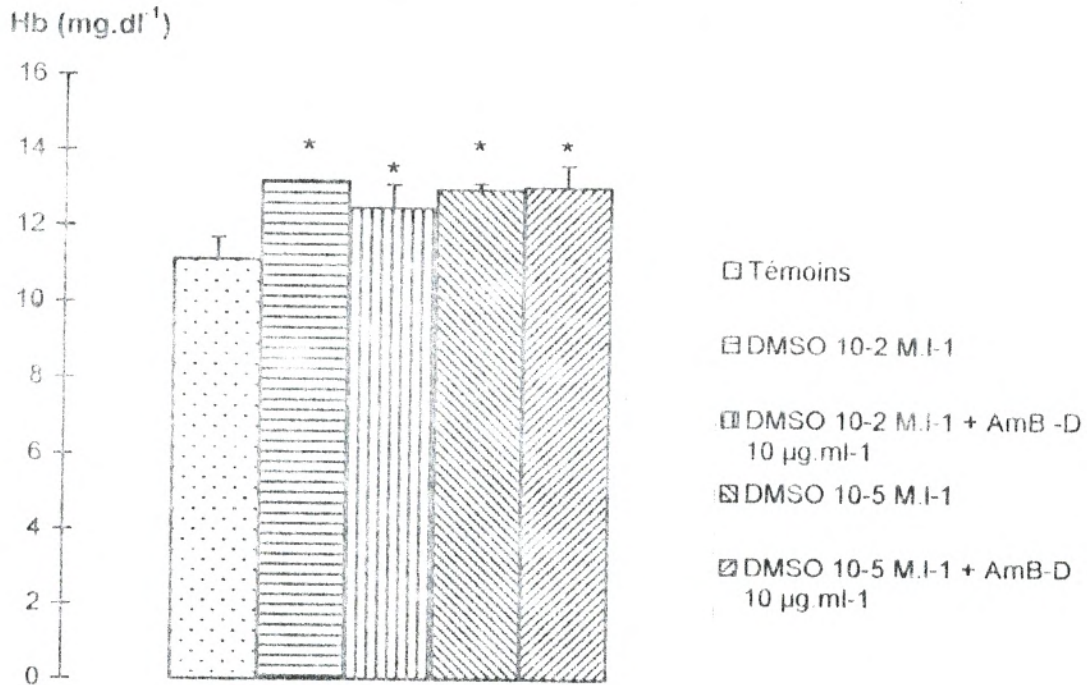


Figure 6 : Valeurs moyennes de l'Hb exprimées en mg.dl⁻¹ chez les rats Wistar (Témoins et rats recevant du DMSO à 10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹)

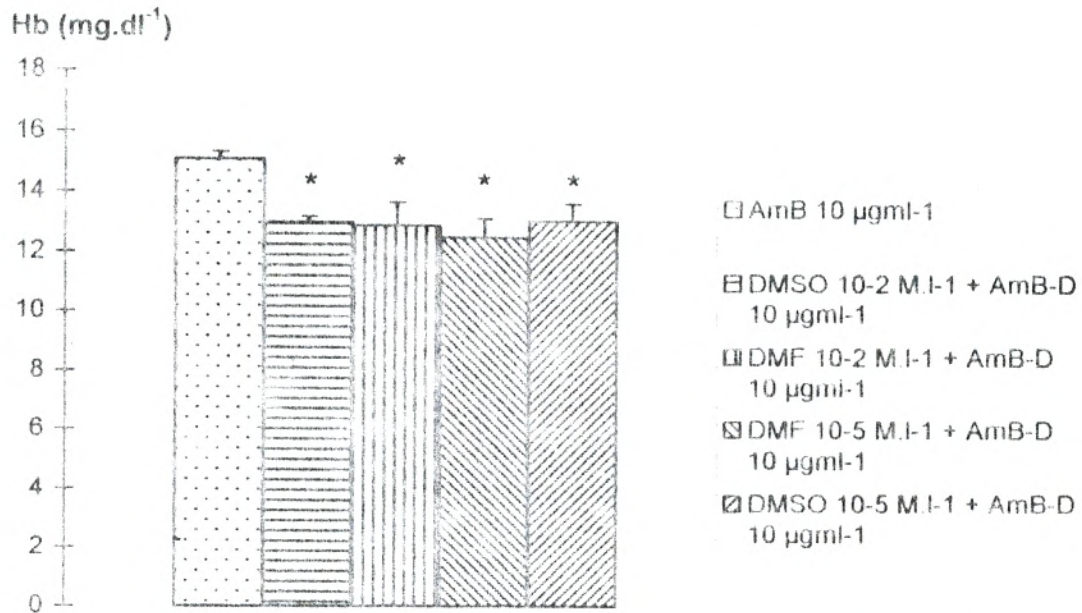


Figure 7 : Valeurs moyennes de l'Hb exprimées en mg.dl⁻¹ chez les rats Wistar recevant l'AmB-D à 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹). (p < 0,05)

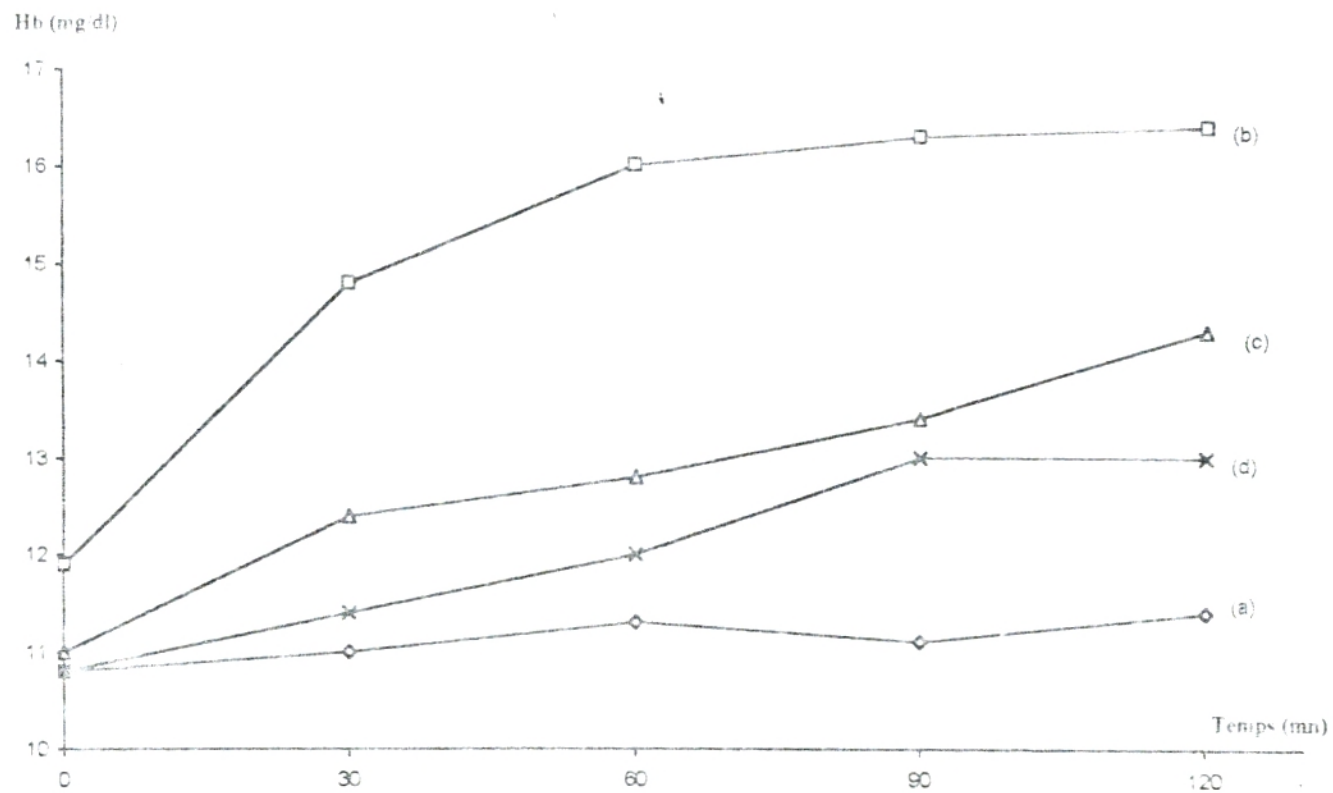


Figure 8 : Effet de l'amB-D à 10 µg.ml⁻¹ sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire en présence d'un solvant organique DMF à 10⁻² M.l⁻¹ et 10⁻⁵ M.l⁻¹ chez les rats Wistar.

(a): Témoin (b): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ (c): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ + DMF 10⁻² M.l⁻¹ (d): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ + DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹

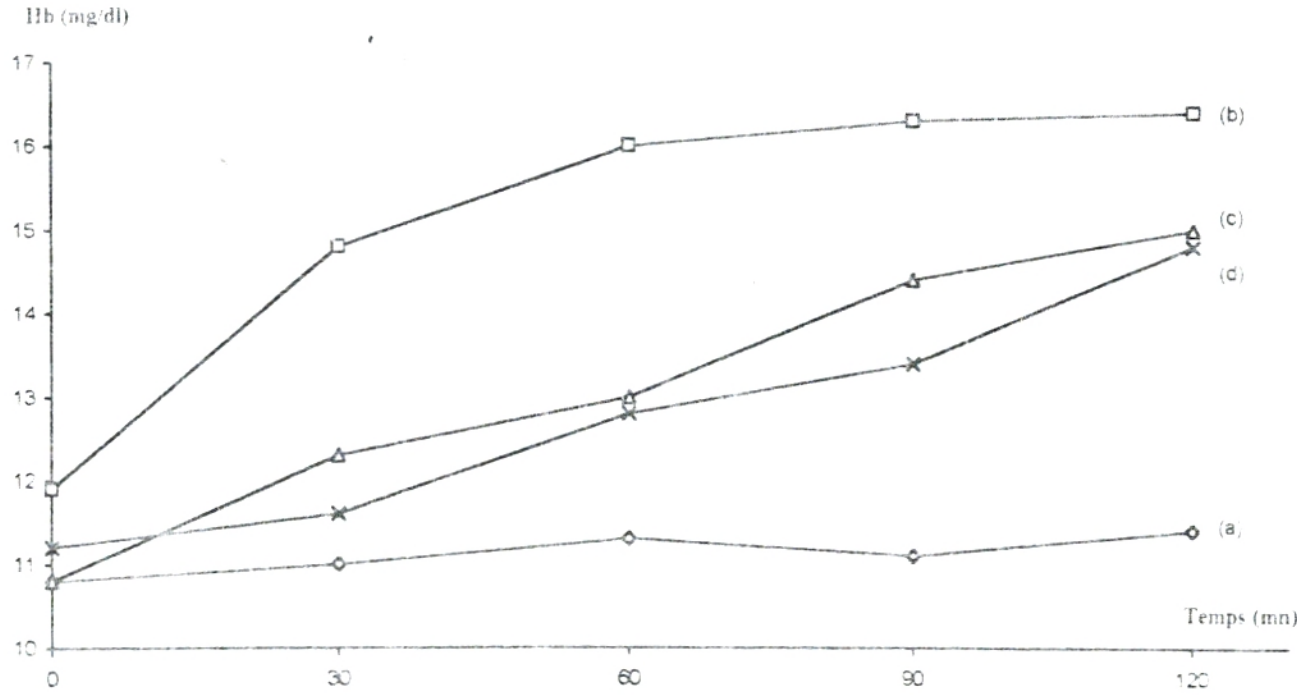


Figure 9 : Effet de l'AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire en présence d'un solvant organique DMF à 10⁻⁵ M.l⁻¹ chez les différents lots de rats Wistars.
(a): Témoin (b): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ (c): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ + DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹ (d): Rat + DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹

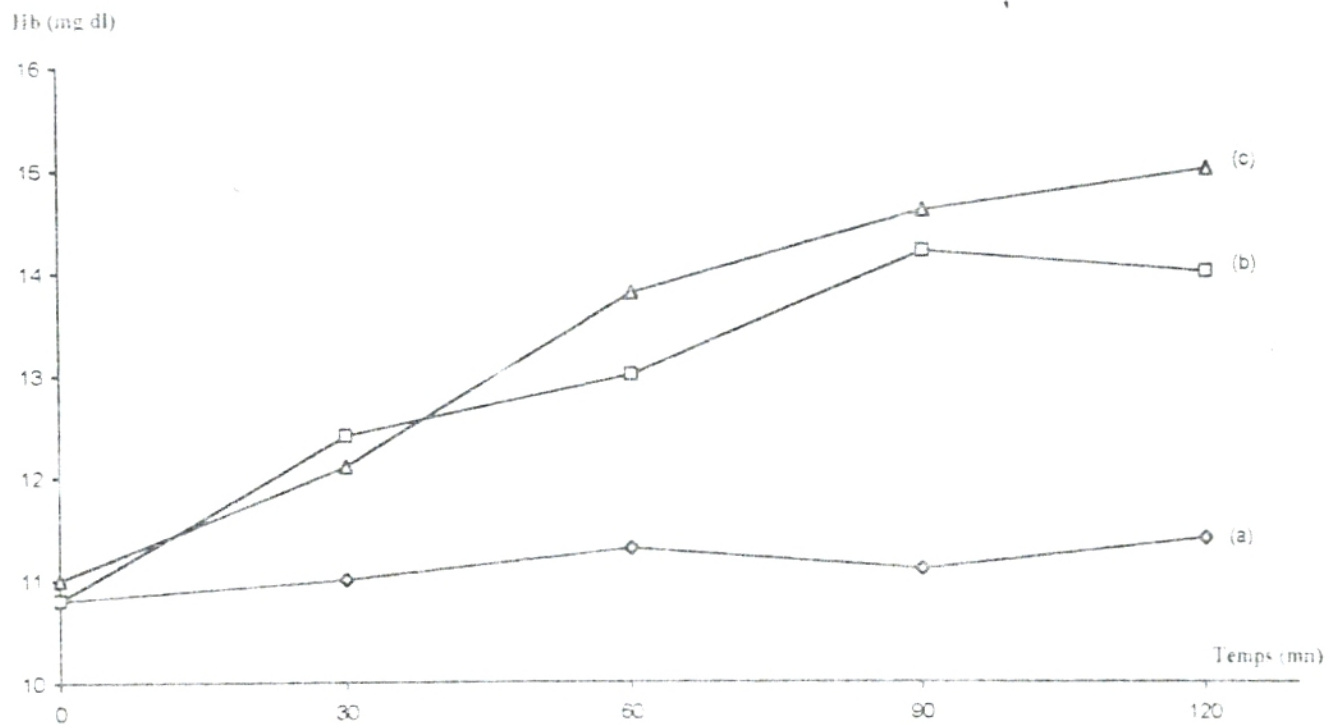


Figure 10 : Effet de l'amB-D à 10 µg.ml⁻¹ sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire en présence de DMSO à 10⁻⁵ M.l⁻¹ chez les différents lots de rats Wistar étudiés.

(a): Temoins (b): Rat + DMSO à 10⁻⁵ M.l⁻¹ (c): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ + DMSO 10⁻⁵ M.l⁻¹

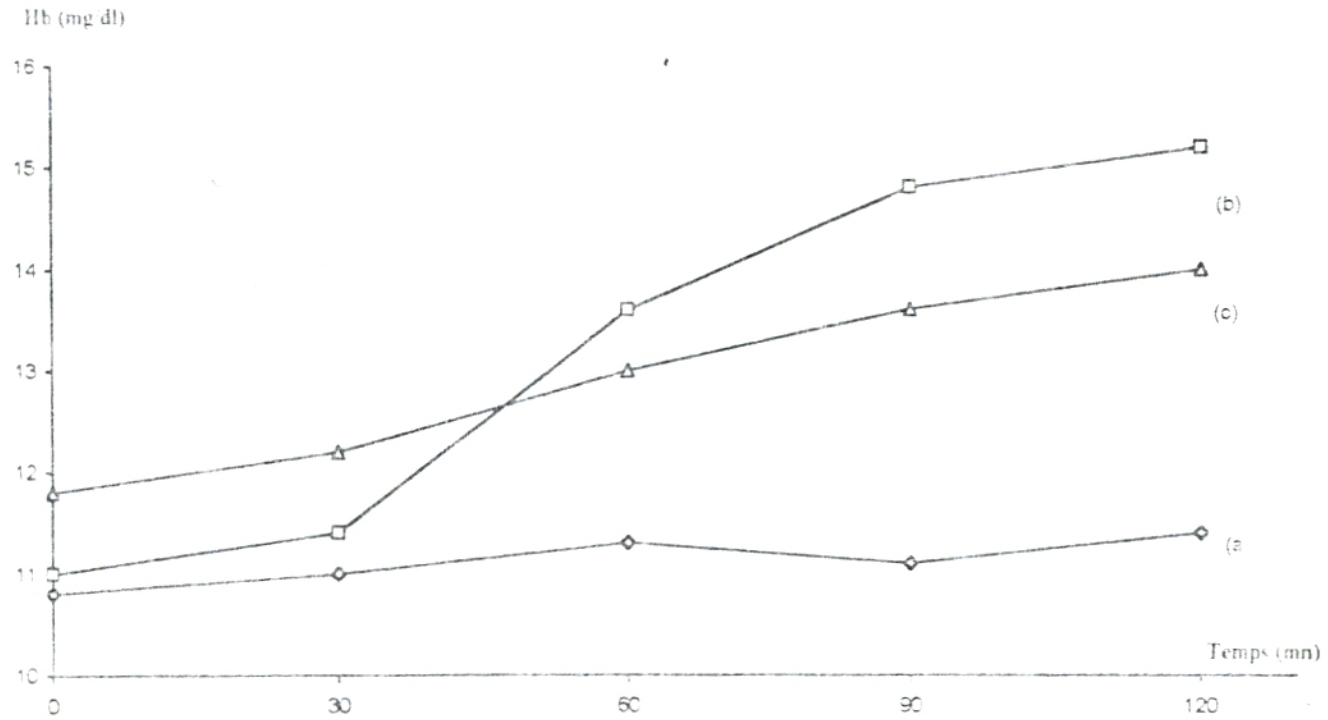


Figure 11 : Effet de l'amB-D à 10 µg.ml⁻¹ sur la fuite de l'hémoglobine cellulaire en présence de DMSO à 10⁻² M.l.⁻¹ chez les différents lots de rats Wistar étudiés.

(a): Témoins (b): Rat + DMSO à 10⁻² M.l.⁻¹ (c): Rat + Amp B-D à 10 µg.ml⁻¹ + DMSO 10⁻² M.l.⁻¹

Interprétation des résultats

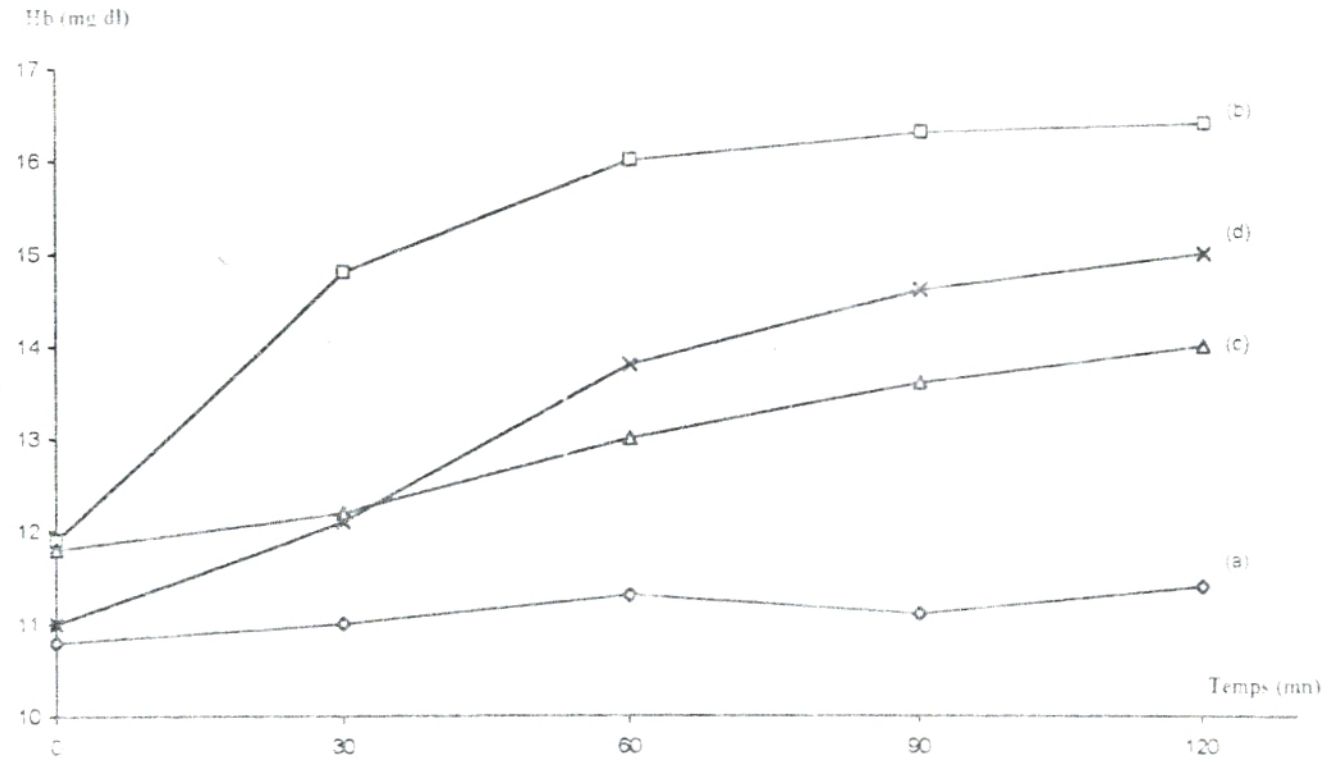


Figure 12 : Effet de l'amB-D à 10 µg.ml⁻¹ sur la fuite de l'hémoglobine en présence d'un solvant organique DMSO à 10⁻² M.l⁻¹ ; 10⁻⁵ M.l⁻¹ chez les différents lots de rats Wistar.

(a): Témoins (b): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ (c): Rat + AmB-D à 10 µg.ml⁻¹ - DMSO 10⁻² M.l⁻¹ (d) Rat + AmB D à 10 .l⁻¹µg.ml-1 - DMSO 10⁻⁴M.l⁻¹

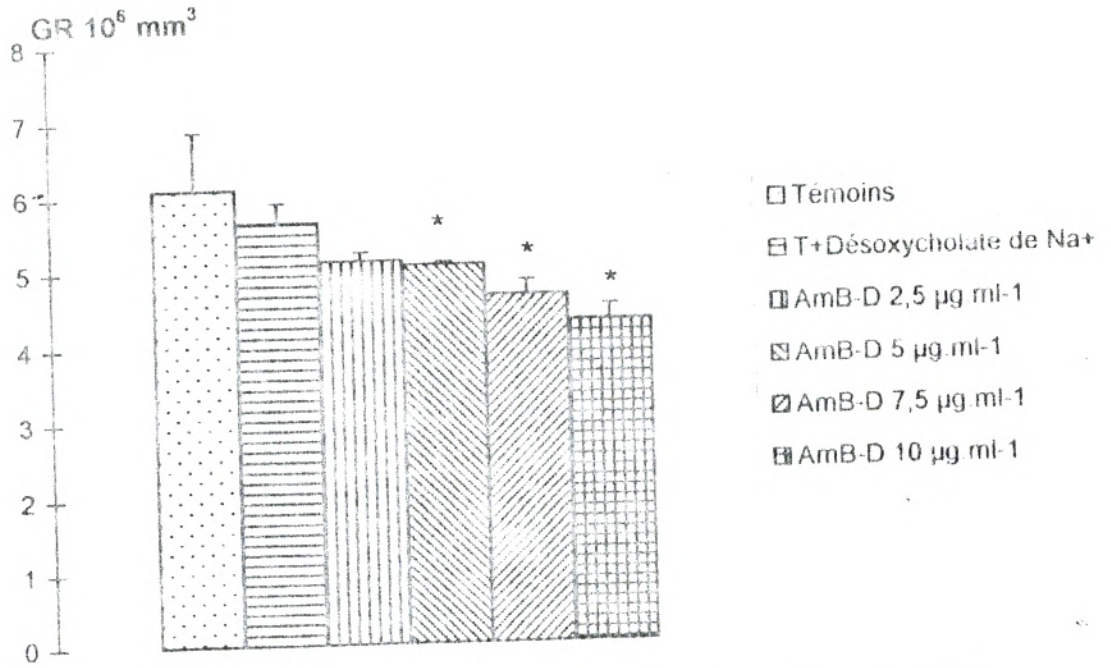


Figure 13 : Valeurs moyennes des GR exprimées en $10^6 \cdot \text{mm}^3$ chez les rats Wistar (Témoins et rats recevant du DNa^+ , et des concentrations d'AmB-D de 2,5 - 5 - 7,5 et $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). ($p < 0,05$)

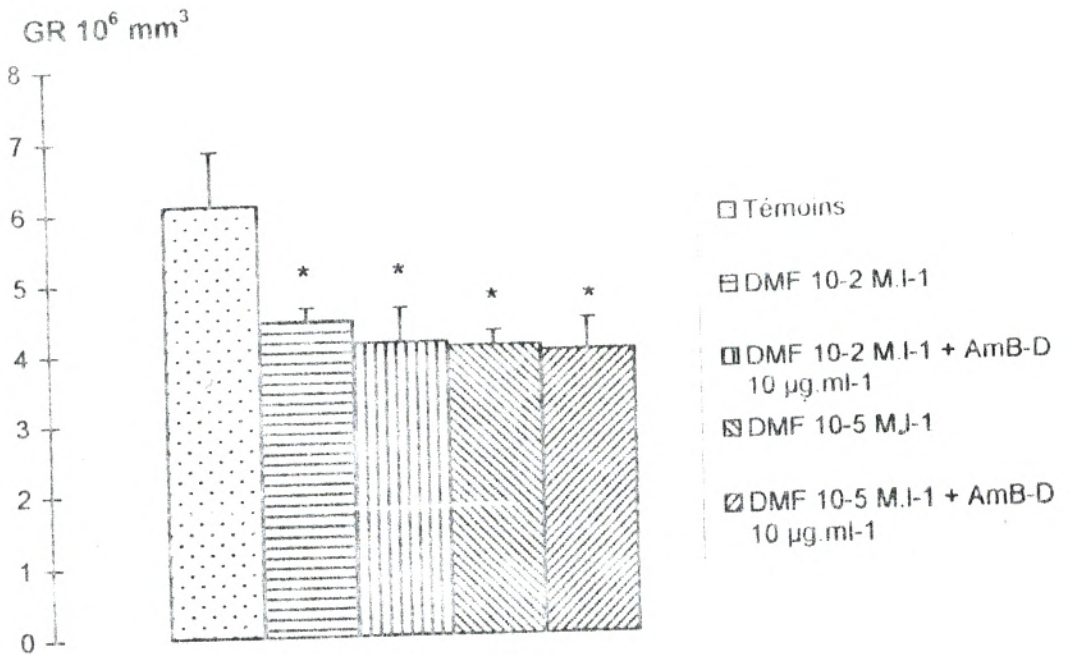


Figure 14 : Valeurs moyennes des GR exprimées en $10^6/\text{mm}^3$ chez les rats Wistar (Témoins et rats recevant du DMF à 10^2 M.l^{-1} , $10^2 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 10^5 M.l^{-1} , $\text{DMF } 10^5 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). ($p < 0,05$)

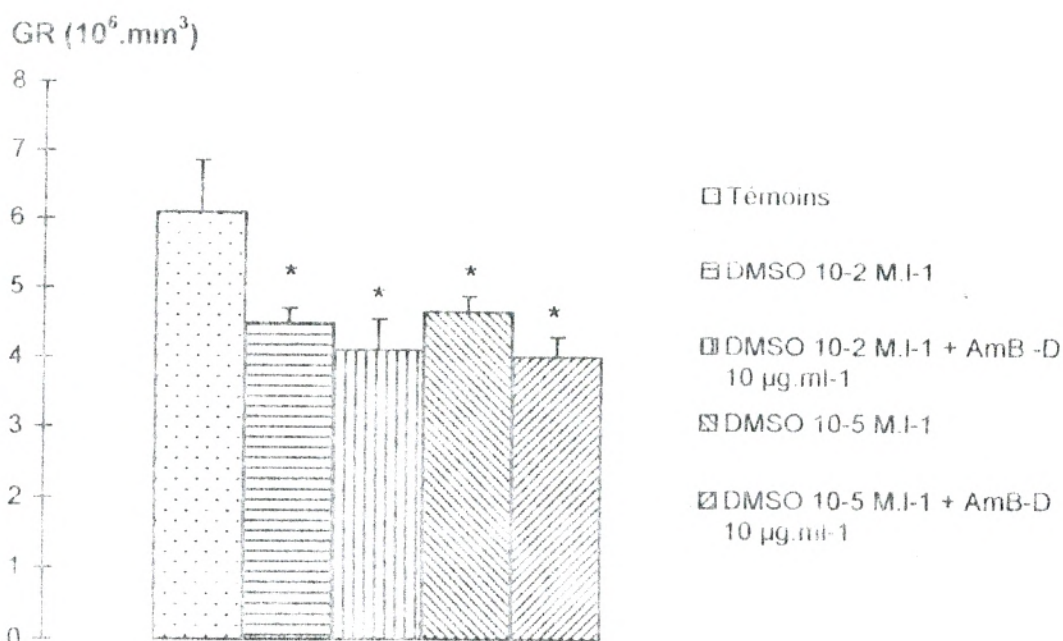


Figure 15 : Valeurs moyennes des GR exprimées en $10^6 \cdot \text{mm}^3$ chez les rats Wistar (Témoins et rats recevant du DMSO à 10^2 M.l^{-1} , $10^2 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 10^5 M.l^{-1} , $10^5 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$). ($p < 0,05$)

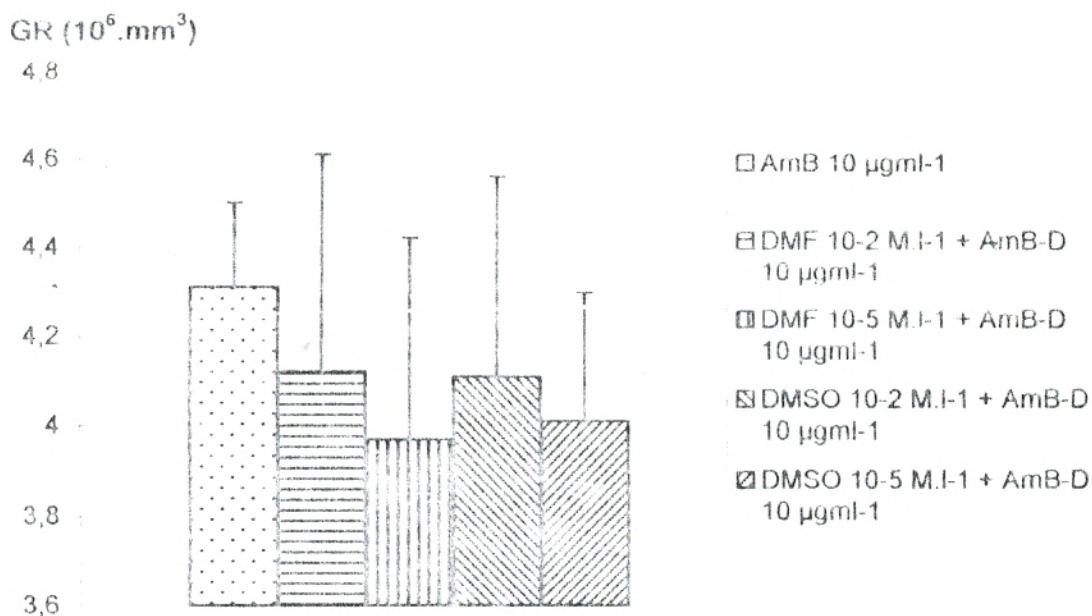


Figure 16 : Valeurs moyennes des GR exprimées en $10^6 \cdot \text{mm}^3$ chez les rats Wistar recevant l'AmB-D à $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, DMF $10^2 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, DMF $10^5 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, DMSO $10^2 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, DMSO $10^5 \text{ M.l}^{-1} + \text{AmB-D } 10 \mu\text{g.ml}^{-1}$). ($p < 0,05$)

Aucune différence significative n'a été observé entre les différents groupes de rats étudiés (Tableau II-a) pour les protéines plasmatiques, de même pour l'urémie, la créatinémie, la natrémie (Figure 17) et la calcémie. Par contre a une dose d'amphotéricine B-D de $7.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ et $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ le taux de kaliémie augmente significativement (Figure 18), le même profil du K^+ a été observé chez les rats traités aux désoxycholate de sodium comparés aux témoins.

Par ailleurs le Tableau II-b montre que l'urémie des rats traités aux DMF 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ est significativement élevée par rapport aux témoins, la natrémie reste aussi élevée chez les rats recevant du DMF 10^{-2} M l^{-1} , DMF 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ et DMF 10^{-5} M l^{-1} (Figure 19).

Pour les rats traités DMF 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ et DMF 10^{-5} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, la kaliémie est significativement élevée comparés aux témoins (Figure 20).

Les valeurs moyennes de l'urémie des rats ayant reçus de DMSO 10^{-2} M l^{-1} et DMSO 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ont significativement augmenté (Tableau II-b).

Une augmentation significative a été observée pour la natrémie chez les rats traités aux DMSO 10^{-2} M l^{-1} , DMSO 10^{-5} M l^{-1} et DMSO 10^{-5} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ et ceci comparés aux témoins (Figure 21-23).

En revanche, la kaliémie est élevée pour les rats traités au DMSO 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Figure 22-24).

Etant le marqueur important du métabolisme protéique, le taux d'urée plasmatique reste significativement élevé chez les rats ayant du DMSO 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ et DMSO 10^{-5} M l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Par ailleurs le bilan biochimique plasmatique ne révèle aucune différence significative pour le cholestérol les triglycérides et les phospholipides par rapport aux témoins (Tableau III a-b-c).

Paramètres / Groupes	Protéines (g/l)	Urée (mmol.l ⁻¹)	Créatinine (mmol.l ⁻¹)	Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	Ca ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)
Témoins (n=5)	59.66 ± 3.51	7.72 ± 1.34	7.66 ± 2.51	133.33 ± 2.51	3.76 ± 1.06	2.90 ± 1.37
T - Desoxycholate de Na ⁺ (n=5)	60.18 ± 7.72	6.09 ± 0.49	6.66 ± 2.88	138.01 ± 5.45	5.82 ± 1.28 *	2.52 ± 0.54
AmB-D 2.5 µg/ml (n=5)	52.88 ± 4.5	11.43 ± 0.48	6.23 ± 1.12	136.43 ± 1.69	4.86 ± 0.52	1.60 ± 0.41
AmB-D 5 µg/ml (n=5)	56.33 ± 5.86	6.60 ± 0.79	8.66 ± 2.88	142.43 ± 3.88	4.76 ± 0.49	1.91 ± 0.18
AmB-D 7.5 µg/ml (n=5)	55.83 ± 1.97	6.81 ± 1.40	9.33 ± 2.3	129.32 ± 5.04	5.19 ± 0.27 *	2 ± 0.112
AmB-D 10 µg/ml (n=5)	58.83 ± 3.81	7.15 ± 0.53	10.66 ± 1.54	140.86 ± 2.22	5.87 ± 0.35 *	2.14 ± 0.07

Tableau II-a : Composition plasmatique moyenne des protéines, d'urée, de créatinine, du sodium, du potassium et calcium chez les différents lots de rats Wistar. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

* : Différence significative par rapport aux rats témoins

Paramètres / Groupes	Protéines (g/l)	Urée (mmol.l ⁻¹)	Creatinine (mmol.l ⁻¹)	Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	Ca ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)
Témoins (n=5)	59,06 ± 3,51	7,72 ± 1,54	7,66 ± 2,51	133,33 ± 2,51	3,76 ± 1,06	2,91 ± 1,37
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ (n=5)	55 ± 4,24	7,65 ± 1,76	10 ± 2,82	145,35 ± 5,16	4,37 ± 0,17	3,59 ± 0,86
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	62,33 ± 5,68	12,15 ± 2,32	8,06 ± 2,53	144,16 ± 3,06	5,00 ± 0,75 *	3,59 ± 0,65
DMF 10 ⁻³ M.l ⁻¹ (n=5)	56,52 ± 0,70	10,24 ± 5,31	8,5 ± 2,12	143,3 ± 6,08	4,63 ± 0,74	3,5 ± 1,41
DMF 10 ⁻³ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	58,33 ± 9,29	9,99 ± 3,44	7,66 ± 2,51	143 ± 7,54	4,64 ± 1,41 *	3,52 ± 0,42
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ (n=5)	59,5 ± 2,12	11,9 ± 2,70	10,5 ± 6,70	141,5 ± 4,94	4,05 ± 1,05	3,3 ± 0,76
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	61,33 ± 3,5	11,4 ± 1,85	8,33 ± 1,52	143,46 ± 8,68	6,17 ± 0,96 *	4,56 ± 0,29
DMSO 10 ⁻³ M.l ⁻¹ (n=5)	56 ± 1,82	11,32 ± 7,88	9 ± 1,41	144 ± 1,41	5,05 ± 1,70	2,83 ± 0,03
DMSO 10 ⁻³ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	57,33 ± 5,67	9,33 ± 1,65	8,99 ± 1,52	148,26 ± 2,01	4,99 ± 0,98	3,9 ± 0,78

Tableau II-b Composition plasmatique moyenne des protéines, d'urée, de créatinine, du sodium, du potassium et du calcium chez les rats témoins et les rats traités aux solvants seuls DMF (10⁻² M.l⁻¹ - 10⁻³ M.l⁻¹) et DMSO (10⁻² M.l⁻¹ - 10⁻³ M.l⁻¹) en présence ou en absence d'AmB-D à 10 µg ml⁻¹. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* Différence significative par rapport aux rats témoins.

Paramètres / Groupes	Protéines (g/l)	Urée (mmol.l ⁻¹)	Créatinine (mmol.l ⁻¹)	Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	Ca ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)
AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	56,83 ± 3,81	7,15 ± 0,59	10,66 ± 1,54	140,86 ± 2,22	5,87 ± 0,35	2,14 ± 0,07
DMF 10 ⁻² M l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	62,33 ± 5,08	12,15 ± 2,32	8,06 ± 2,53	144,16 ± 3,06	5,00 ± 0,57	3,59 ± 0,65
DMF 10 ⁻⁵ M l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	58,33 ± 9,29	9,99 ± 3,14	7,66 ± 2,51	143 ± 7,54	4,64 ± 1,41	3,52 ± 0,42
DMSO 10 ⁻² M l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	61,33 ± 3,51	11,4 ± 1,83	8,33 ± 1,52	140,46 ± 2,68	6,17 ± 0,96	4,56 ± 0,20
DMSO 10 ⁻⁵ M l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	57,33 ± 5,03	9,33 ± 1,63	8,66 ± 1,52	148,26 ± 2,61	4,96 ± 0,98	2,02 ± 0,18

Tableau II-c Composition plasmatique moyenne des protéines, d'urée, de créatinine, du sodium, du potassium et du calcium chez les rats traités à l'AmB-D à 10 µg ml⁻¹ et les rats recevant les solvants additionnés avec l'AmB-D à 10 µg ml⁻¹ [DMF (10⁻² M l⁻¹ – 10⁻⁵ M l⁻¹) et DMSO (10⁻² M l⁻¹ – 10⁻⁵ M l⁻¹)]. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

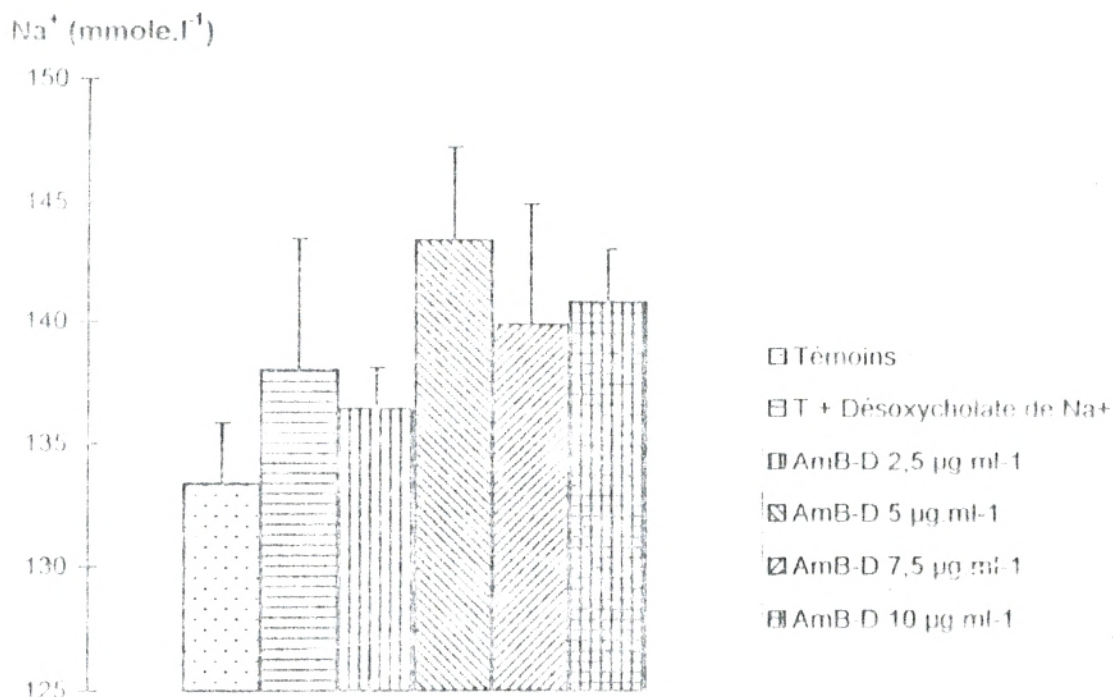


Figure 17 : Valeurs moyennes plasmatiques du sodium (Na^+) (mmole.l^{-1}) chez les rats Wistar (témoins et ceux recevant du desoxycholate de Na^+ , et des concentrations d'AmB-D de 2,5 - 5 - 7,5 - 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). ($p < 0,05$)

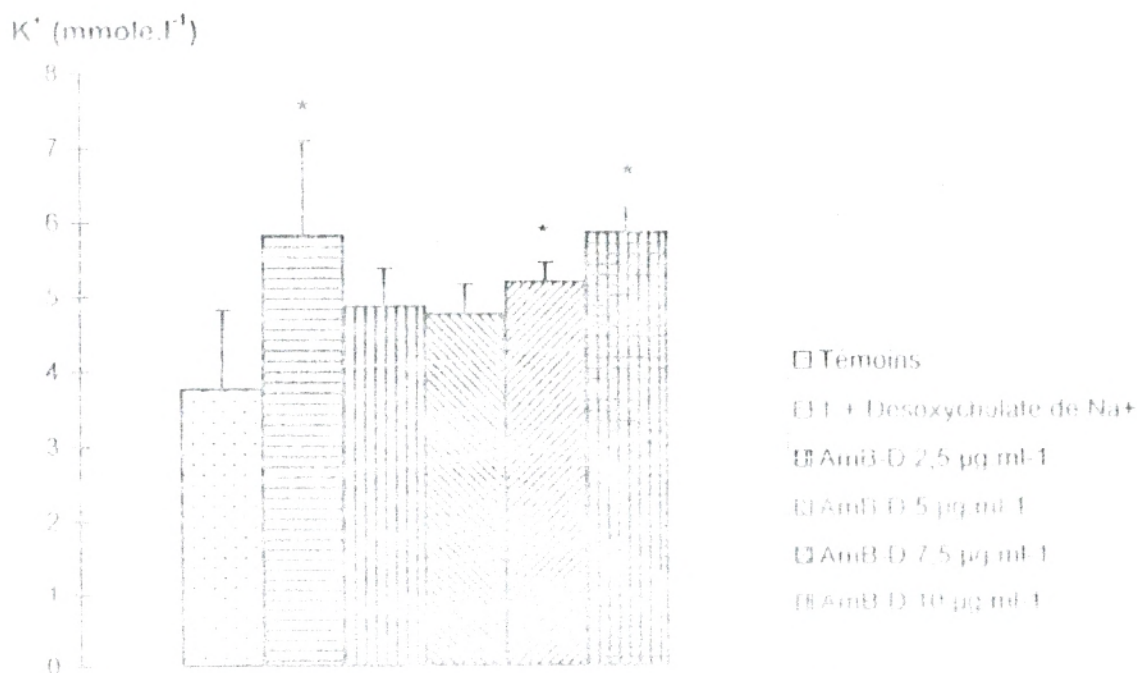


Figure 18 : Valeurs moyennes plasmatiques de potassium (K^+) (mmole.l^{-1}) chez les rats Wistar (témoins et ceux recevant du desoxycholate de Na^+ , et des concentrations d'AmB-D de 2,5 - 5 - 7,5 - 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). ($p < 0,05$)

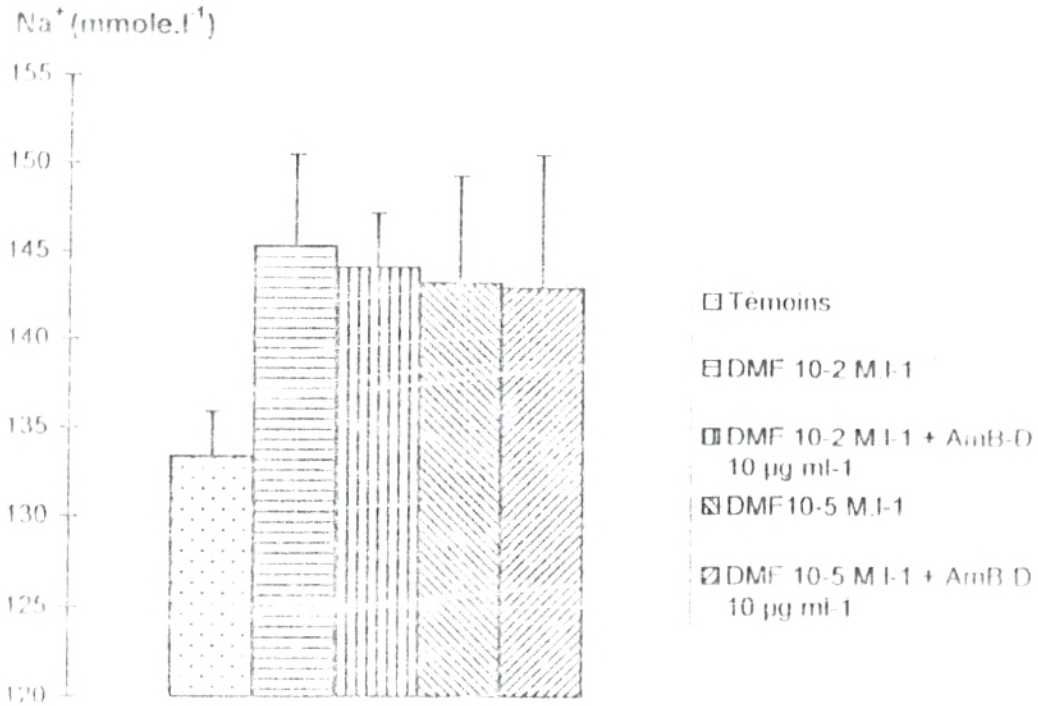


Figure 19 : Valeurs moyennes plasmatiques du sodium (Na⁺) (mmole.l⁻¹) chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMF à (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹). (p < 0,05)

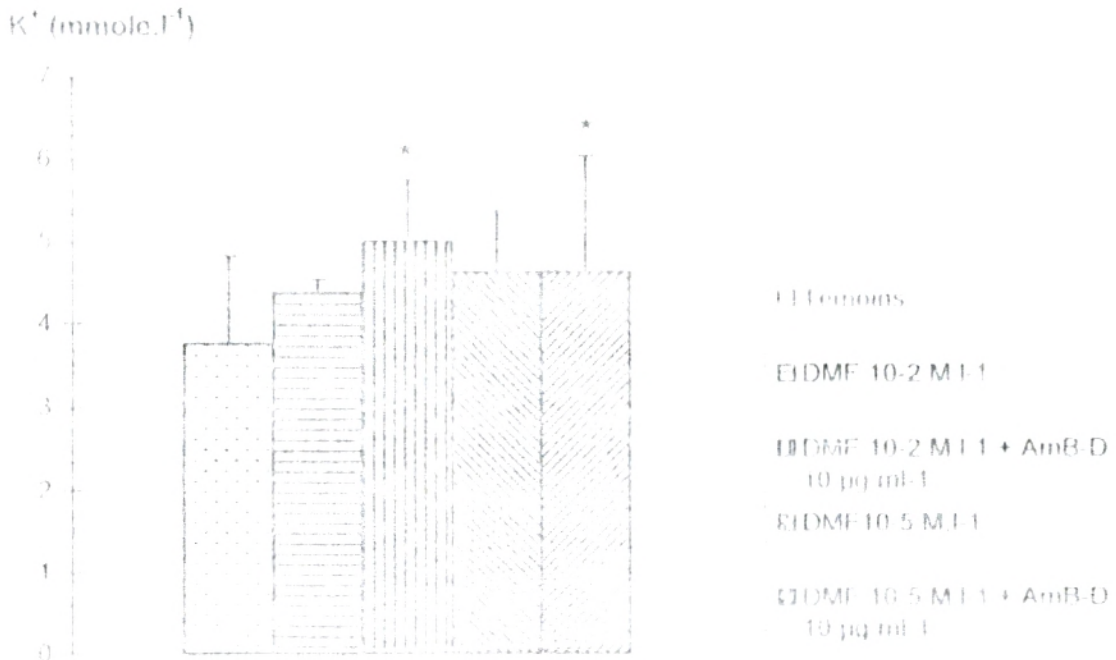


Figure 20 : Valeurs moyennes plasmatiques du potassium (K⁺) (mmole.l⁻¹) chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMF à (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹). (p < 0,05)

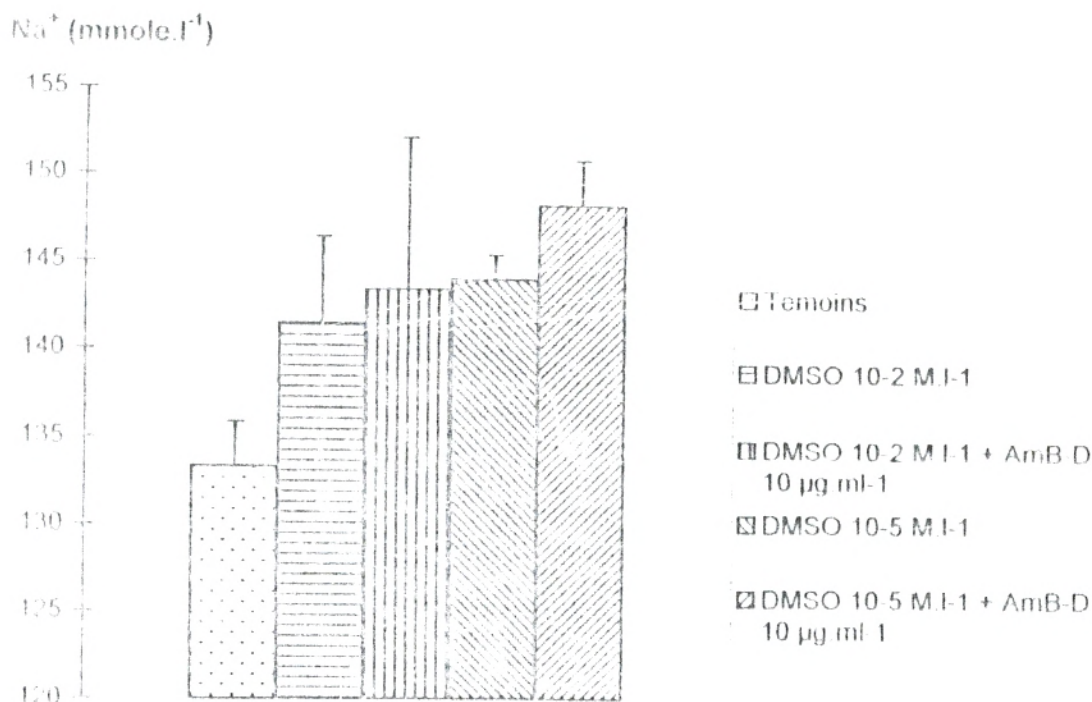


Figure 21 : Valeurs moyennes plasmatiques du sodium (Na⁺) (mmole.l⁻¹) chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMSO à (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹). (p < 0,05)

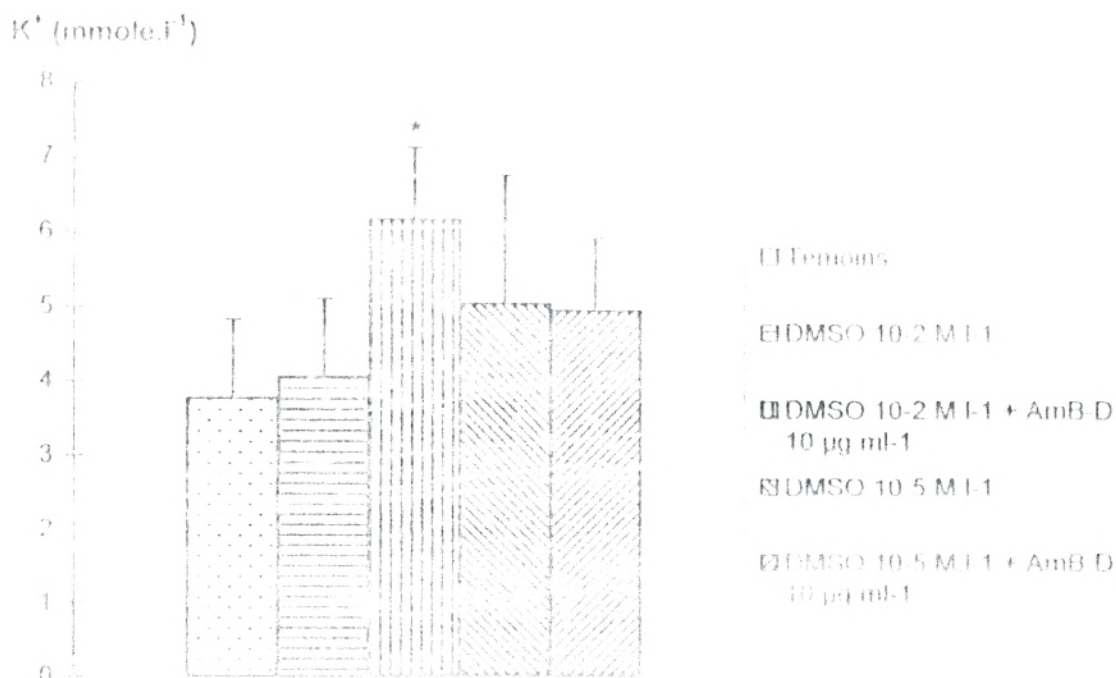


Figure 22 : Valeurs moyennes plasmatiques du potassium (K⁺) (mmole.l⁻¹) chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMSO à (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹). (p < 0,05)

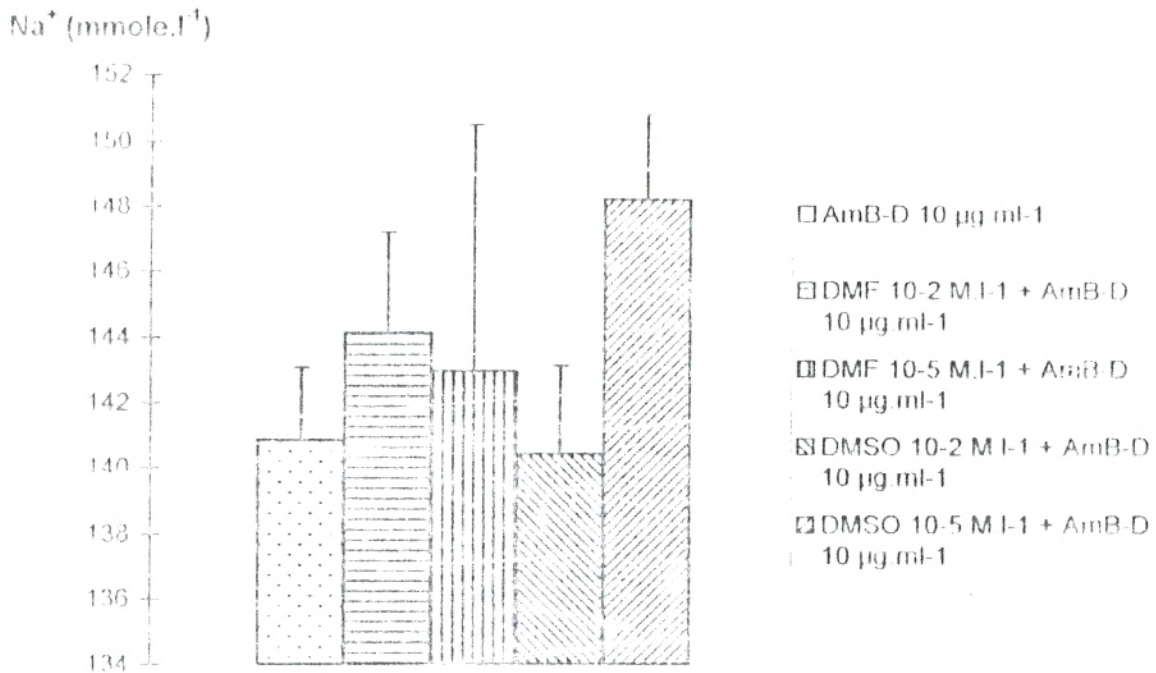


Figure 23 : Valeurs moyennes plasmatiques du potassium Na⁺ (mmole.l⁻¹) chez les rats recevant l'AmB-D à 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

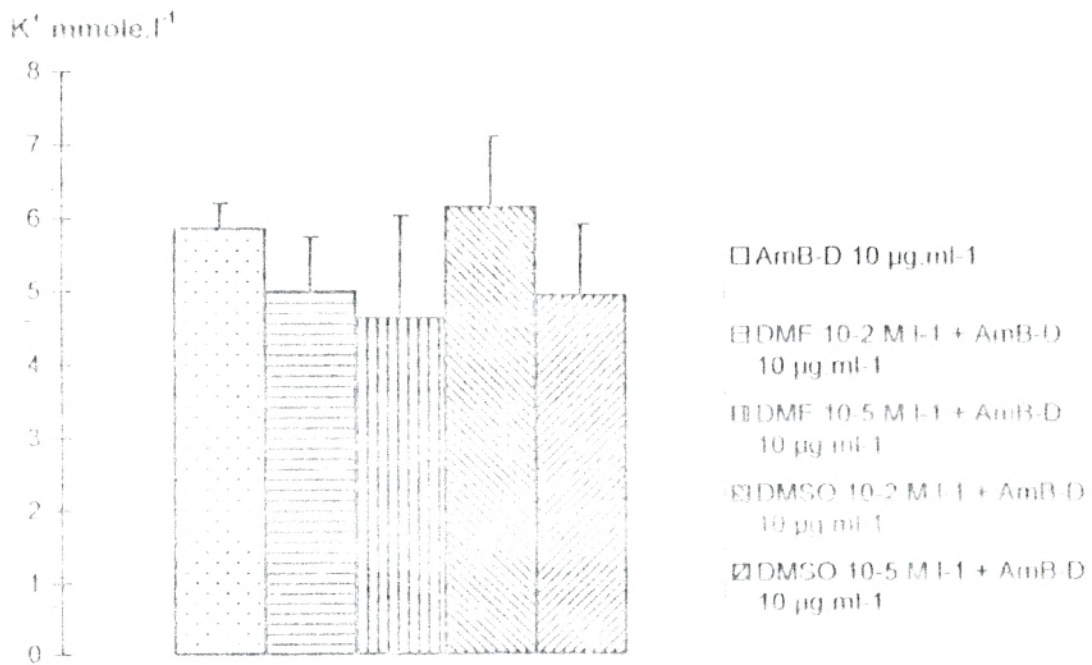


Figure 24 : Valeurs moyennes plasmatiques du potassium K⁺ (mmole.l⁻¹) chez les rats recevant l'AmB-D à 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

Groupes	Paramètres	Cholestérol total (mg/dl)	Phos. holipodes (mg/dl)	Triglycérides (mg/dl)
Temoins (n=5)		82 ± 3	144.13 ± 9.12	80.83 ± 1.08
T + Desoxycholate de Na ⁺ (n=5)		75.66 ± 8.73	137.23 ± 8.33	72.95 ± 5.23
AmB-D 2.5 µg/ml (n=5)		77 ± 7	137.6 ± 20.82	71.86 ± 9.73
AmB-D 5 µg/ml (n=5)		79.6 ± 7.23	138.5 ± 12.65	78.66 ± 10.88
AmB-D 7.5 µg/ml (n=5)		80.5 ± 1.5	137.2 ± 12.73	79.9 ± 12.97
AmB-D 10 µg/ml (n=5)		80.53 ± 6.83	136.35 ± 2	69.85 ± 16.86

Tableau III-a : Valeurs plasmatiques moyennes du cholestérol total, phospholipides et triglycérides chez les différents lots de rats Wistar temoins, temoins + desoxycholate de sodium et amphotéricine B-D a différentes concentrations (2.5 - 5 - 7.5 et 10 µg ml⁻¹). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience (P < 0.05)

Groupes	Paramètres	Cholestérol total (mg dl)	Phospholipides (mg-dl)	Triglycerides (mg-dl)
Témoins (n=5)		82 ± 3	83.5 ± 3.53	80.87 ± 16.08
DMF 10 ⁻² M.I ⁻¹ (n=5)		83.5 ± 3.53	83.5 ± 3.53	73.5 ± 8.48
DMF 10 ⁻² M.I ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		73.73 ± 14.14	83.5 ± 3.53	95 ± 22.06
DMF 10 ⁻⁵ M.I ⁻¹ (n=5)		81.5 ± 2.12	83.5 ± 3.53	78.5 ± 4.94
DMF 10 ⁻⁵ M.I ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		76.66 ± 6.80	107.36 ± 52.38	82.60 ± 20.74
DMSO 10 ⁻² M.I ⁻¹ (n=5)		83.33 ± 7.57	111.25 ± 61.71	87.66 ± 10.26
DMSO 10 ⁻² M.I ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		76.33 ± 6.02	110.79 ± 59.50	74.33 ± 6.50
DMSO 10 ⁻⁵ M.I ⁻¹ (n=5)		85.5 ± 0.70	121.25 ± 80.25	66 ± 10.97
DMSO 10 ⁻⁵ M.I ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)		70.66 ± 13.31	109.23 ± 51.39	68.60 ± 11.15

Tableau III-b : Valeurs plasmatiques moyennes du cholestérol total, phospholipides et triglycerides chez les rats témoins et les rats traités aux solvants seuls DMF (10⁻² M.I⁻¹, 10⁻⁵ M.I⁻¹) et DMSO (10⁻² M.I⁻¹, 10⁻⁵ M.I⁻¹) en présence ou en absence d'Amphotericine B-D à 10 µg ml⁻¹. Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience (P < 0,05)

Groupes	Paramètres	Cholestérol total (mg/dl)	Phospholipides (mg dl)	Triglycérides (mg dl)
	AmB-D 10 μgml^{-1} (n=5)	80.53 \pm 6.83	150.55 \pm 20.91	69.85 \pm 16.80
	DMF 10 ⁻² M l ⁻¹ + AmB-D 10 μgml^{-1} (n=5)	73.73 \pm 14.14	129.8 \pm 44.13	95 \pm 22.06
	DMF 10 ⁻⁴ M l ⁻¹ + AmB-D 10 μgml^{-1} (n=5)	76.66 \pm 6.80	107.36 \pm 52.38	82.66 \pm 20.74
	DMSO 10 ⁻² M l ⁻¹ + AmB-D 10 μgml^{-1} (n=5)	76.33 \pm 6.02	110.79 \pm 55.56	74.33 \pm 6.5
	DMSO 10 ⁻⁴ M l ⁻¹ + AmB-D 10 μgml^{-1} (n=5)	70.66 \pm 13.31	109.23 \pm 51.39	68.66 \pm 11.15

Tableau III-c : Valeurs plasmatiques moyennes du cholestérol total, phospholipides et triglycérides chez les rats traités à l'Amphotéricine B-D à 10 μgml^{-1} et ceux recevant les solvants additionnés à l'AmB-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (DMF 10⁻² M l⁻¹, DMF 10⁻⁴ M l⁻¹, DMSO 10⁻² M l⁻¹ et DMSO 10⁻⁴ M l⁻¹). Les valeurs ont été calculées en prenant la moyenne obtenue pour chaque expérience (P < 0,05)

Les Tableaux IV (a-b-c) rapportent les valeurs moyennes de la composition urinaire de l'urée, créatinine, sodium, potassium et calcium des rats témoins, des rats recevant les différentes concentrations d'amphotéricine B-D ($2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $7,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), des rats traités aux solvants seuls (DMF 10^{-2} M.l^{-1} , DMF 10^{-5} M.l^{-1} , DMSO 10^{-2} M.l^{-1} et DMSO 10^{-5} M.l^{-1}) et enfin des rats traités à l'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ solubilisée dans les solvants.

Aucune différence significative n'a été observée pour la créatinine l'urée et le sodium urinaires comparés aux témoins (Tableau IV-a - Figure 25).

Par contre, le potassium urinaire a tendance à augmenter significativement chez les rats traités au desoxycholate de sodium et en présence de concentrations croissantes d'amphotéricine B-D ($2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$, $7,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$) (Figure 26); de même pour le calcium urinaire qui diminue significativement à une dose de $2,5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et $5 \mu\text{g.ml}^{-1}$ d'amphotéricine B-D (Tableau IV-a)

Par ailleurs à une dose de DMF 10^{-5} M.l^{-1} , la créatinine urinaire est significativement élevée (Tableau IV-b).

Chez les rats traités à l'amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ solubilisée dans les solvants DMF 10^{-2} M.l^{-1} et DMF 10^{-5} M.l^{-1} , et aux solvants seulement (DMF 10^{-2} M.l^{-1} et DMF 10^{-5} M.l^{-1}), le potassium urinaire augmente significativement par rapport aux témoins (Tableau IV-b - Figure 28). Par contre aucune différence significative n'a été observée pour le sodium urinaire (Figure 27-31).

Le Tableau IV-b indique aussi que le taux du potassium urinaire des rats traités avec une dose de DMSO 10^{-2} M.l^{-1} , DMSO 10^{-5} M.l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ et DMSO 10^{-5} M.l^{-1} + amphotéricine B-D à $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ est significativement élevé comparés aux témoins (Figure 30). Bien qu'il existe une légère baisse de potassium urinaire des rats perfusés à l'amphotéricine B-D solubilisée dans les deux solvants (Tableau IV-c), aucune différence significative n'a été observée entre les différents rats étudiés (Figure 32)

Paramètres Groupes	Créatinine (mmol.l ⁻¹)	Urée (mmol.l ⁻¹)	Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	Ca ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)
Temoins (n=5)	1408,33 ± 579,51	418,08 ± 61,66	138,78 ± 9,03	70,33 ± 2,80	5,87 ± 0,19
T - Desoxycholate de Na ⁺ (n=5)	991,66 ± 576,80	428,58 ± 55,45	128 ± 4,09	78,70 ± 8,42	5,05 ± 0,98
AmB-D 2,5 µg ml (n=5)	1290 ± 411,66	362,5 ± 63,23	144,62 ± 5,19	89,88 ± 5,08 *	4,92 ± 0,50
AmB-D 5 µg ml (n=5)	835 ± 123,18	398,9 ± 137,57	135,66 ± 10,42	90,17 ± 7,76 *	5,05 ± 0,28
AmB-D 7,5 µg ml (n=5)	869,16 ± 217,57	407,52 ± 38,26	132,84 ± 5,97	97,83 ± 4,78 *	6,55 ± 2,11
AmB-D 10 µg ml (n=5)	1204,16 ± 609,83	635,08 ± 248,43	131,08 ± 5,13	104,6 ± 9,55 *	5,87 ± 1,03

Tableau IV-a Valeurs moyennes de la créatinine, d'urée, du sodium, du potassium et du calcium urinaires chez les différents lots de rats Wistar : les temoins, temoins - desoxycholate de sodium et les concentrations croissantes d'amphotericine B-D (2,5 - 5 - 7,5 et 10 µg ml⁻¹). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

* Différence significative par rapport aux rats temoins

Amphotericin B-D

Paramètres Groupes	Créatinine (mmol.l ⁻¹)	Urée (mmol.l ⁻¹)	Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	Ca ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)
Témoins (n=5)	1478,33 ± 579,51	418,08 ± 61,69	138,78 ± 7,03	7,33 ± 2,8	5,87 ± 1,19
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ (n=5)	970 ± 240,41	370,33 ± 39,71	122,41 ± 7,29	10,37 ± 0,98 *	5,83 ± 0,38
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	614,16 ± 298,12 *	388,75 ± 40,17	129,62 ± 11,2	97,55 ± 11,76 *	7,05 ± 1,39
DMF 10 ⁻⁵ M.l ⁻¹ (n=5)	677,5 ± 39,24	249,83 ± 66,34	122,78 ± 4,9	94,34 ± 8,49 *	8,41 ± 4,72
DMF 10 ⁻⁵ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	780 ± 82,61	290,85 ± 149,31	130,54 ± 14,15	90,93 ± 2,33 *	6,34 ± 1,26
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ (n=5)	1012,5 ± 53,03	350,37 ± 23,51	129,83 ± 8,64	104,55 ± 5,13 *	6,01 ± 0,13
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	965,83 ± 99,69	386,29 ± 55,48	135,57 ± 4,11	101,66 ± 19,28 *	6,47 ± 1,80
DMSO 10 ⁻⁵ M.l ⁻¹ (n=5)	1042,5 ± 166,17	382,81 ± 78,04	121,52 ± 2,79	83,1 ± 2,79 *	9,05 ± 0,96 *
DMSO 10 ⁻⁵ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1123,33 ± 176,10	356,54 ± 59,17	138,02 ± 8,98	102,02 ± 8,98 *	5,65 ± 2,61

Tableau IV-b : Valeurs moyennes de la créatinine, d'urée, du sodium, du potassium et du calcium urinaires chez les rats témoins et chez les rats traités aux solvants seuls DMF (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹) et DMSO (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹) en présence ou en absence d'Amphotericine B-D à 10 µg ml⁻¹. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

* Différence significative par rapport aux rats témoins

Paramètres Groupes	Créatinine (mmol.l ⁻¹)	Urée (mmol.l ⁻¹)	Na ⁺ (mmol.l ⁻¹)	K ⁺ (mmol.l ⁻¹)	Ca ⁺⁺ (mmol.l ⁻¹)
AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1204,16 ± 609,85	635,08 ± 248,43	131,08 ± 5,13	104,6 ± 9,55	5,87 ± 1,03
DMF 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	614,16 ± 298,12	388,75 ± 40,17	129,61 ± 11,2	97,55 ± 11,76	7,05 ± 1,39
DMF 10 ⁻⁵ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	780 ± 82,61	290,85 ± 149,31	130,54 ± 14,15	90,93 ± 2,33	6,34 ± 1,26
DMSO 10 ⁻² M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	965,83 ± 99,69	386,29 ± 55,48	135,57 ± 4,11	101,66 ± 19,28	6,47 ± 1,80
DMSO 10 ⁻⁵ M.l ⁻¹ + AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1128,33 ± 176,16	356,54 ± 59,17	138,02 ± 8,98	102,45 ± 9,52	5,66 ± 2,61

Tableau IV-c : Valeurs moyennes de la créatinine, d'urée, du sodium, du potassium et du calcium urinaires chez les rats traités à l'amB-D à 10 µg.ml⁻¹ et ceux recevant les solvants additionnés avec l'amB-D à 10 µg.ml⁻¹ [DMF (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹) et DMSO (10⁻² M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹)]. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

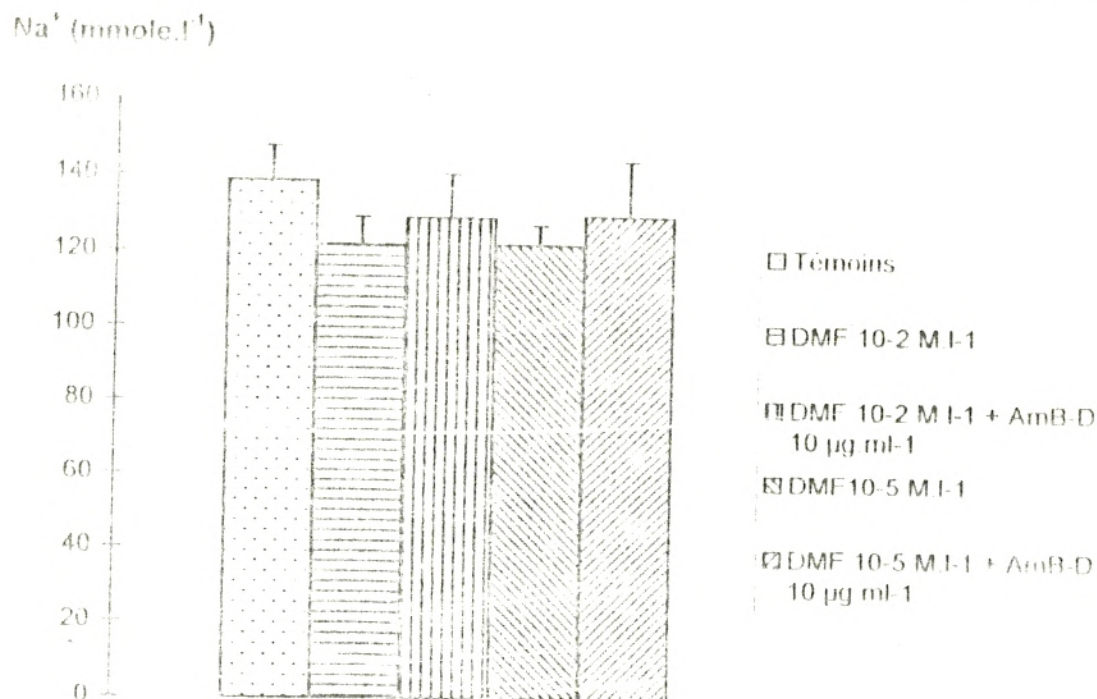


Figure 27 : Valeurs moyennes du Na⁺ (mmole.l⁻¹) urinaire chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMF à 10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

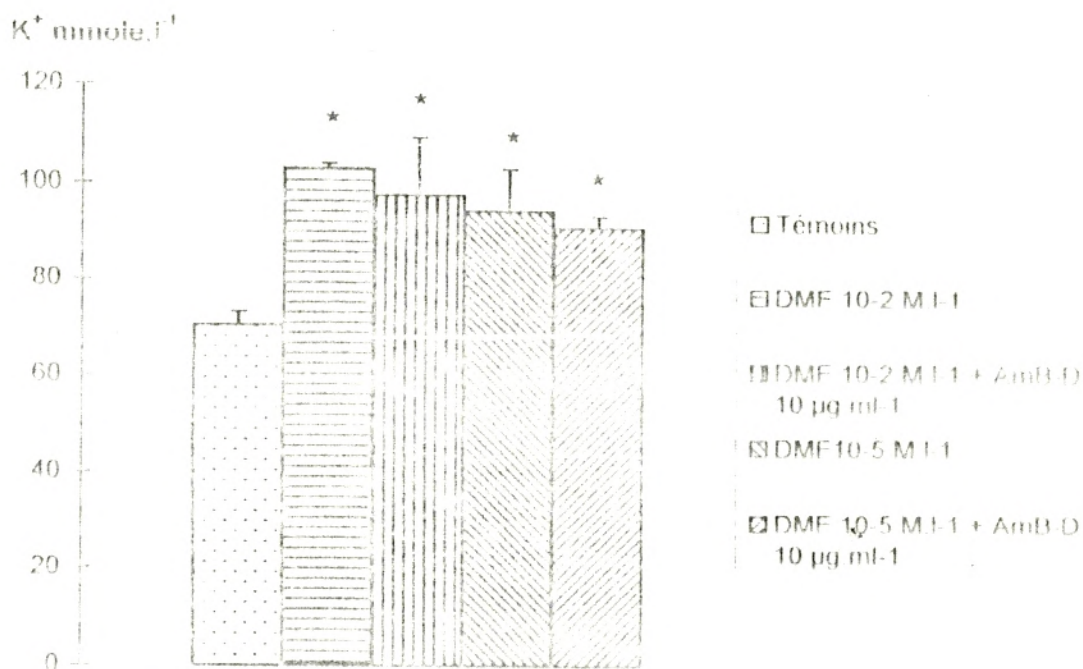


Figure 28 : Valeurs moyennes du K⁺ (mmole.l⁻¹) urinaire chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMF à 10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

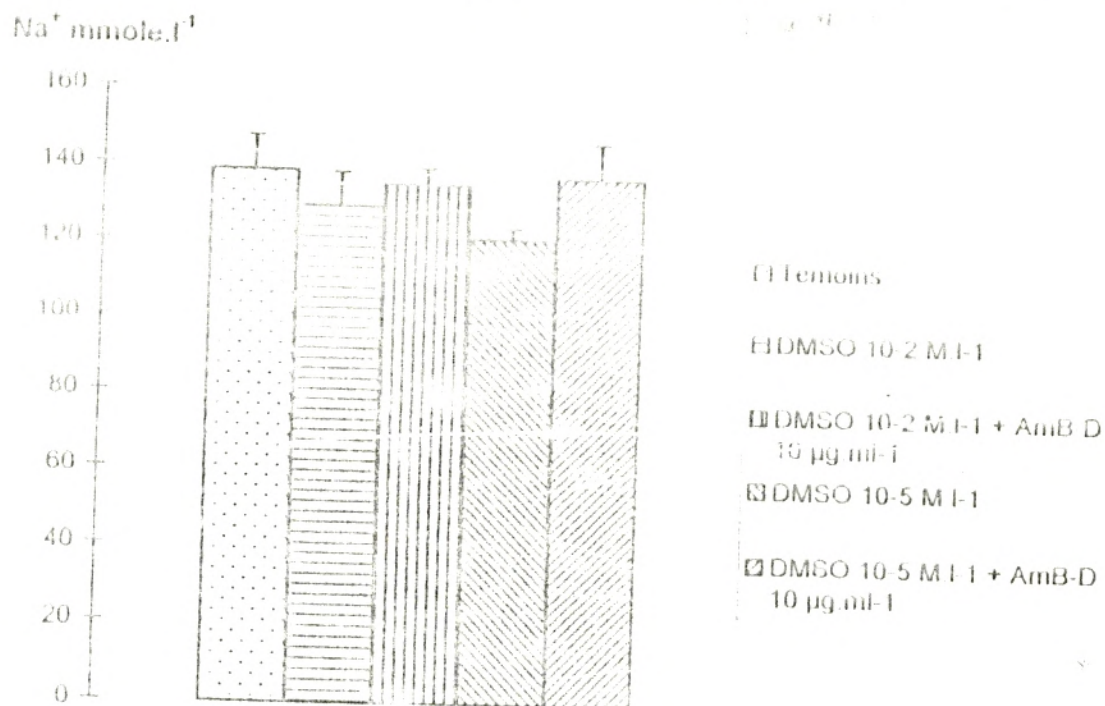


Figure 29 : Valeurs moyennes du Na⁺ (mmole.l⁻¹) urinaire chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMSO à 10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

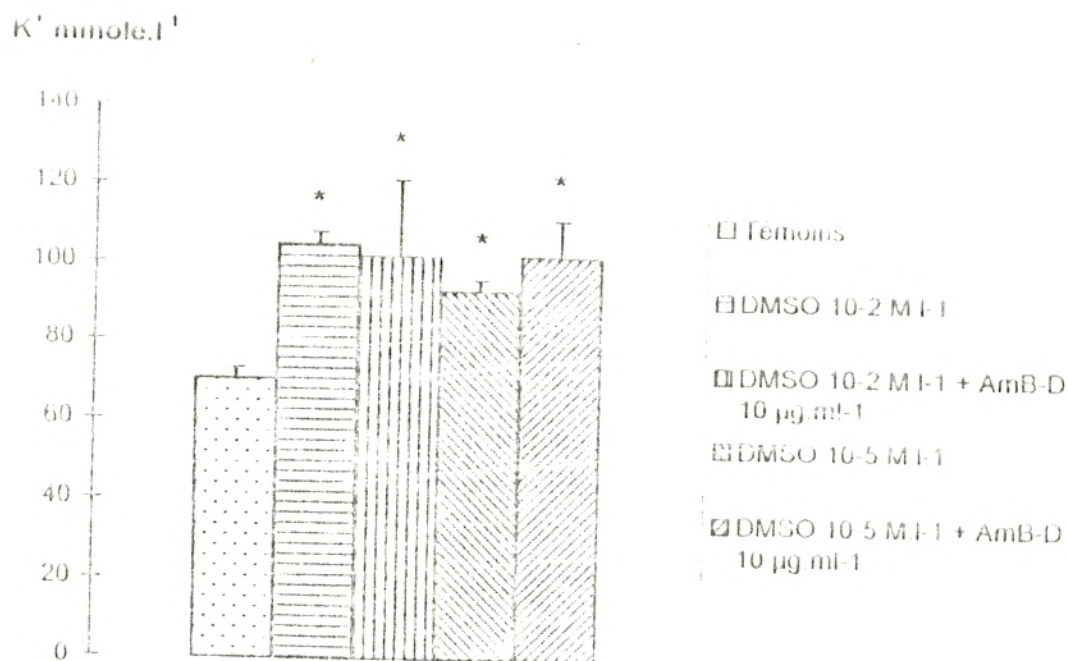


Figure 30 : Valeurs moyennes du K⁺ (mmole.l⁻¹) urinaire chez les rats Wistar témoins et ceux recevant du DMSO à 10⁻² M.l⁻¹, 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹, 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

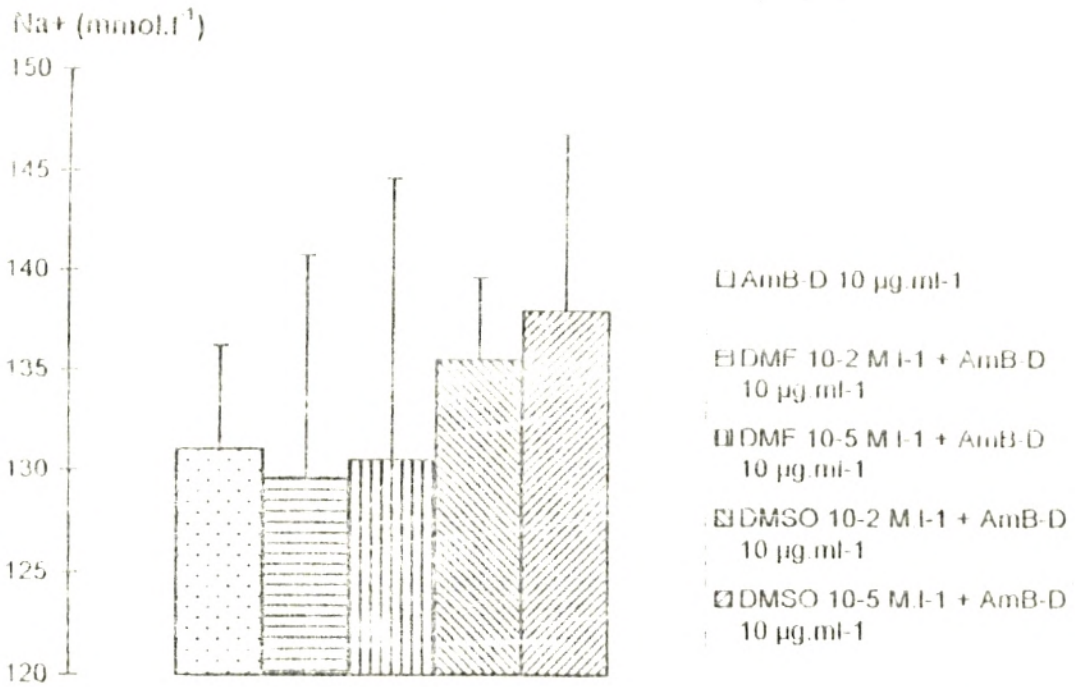


Figure 31 : Valeurs moyennes du Na⁺ (mmol.l⁻¹) urinaire chez les rats recevant l'AmB-D à 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

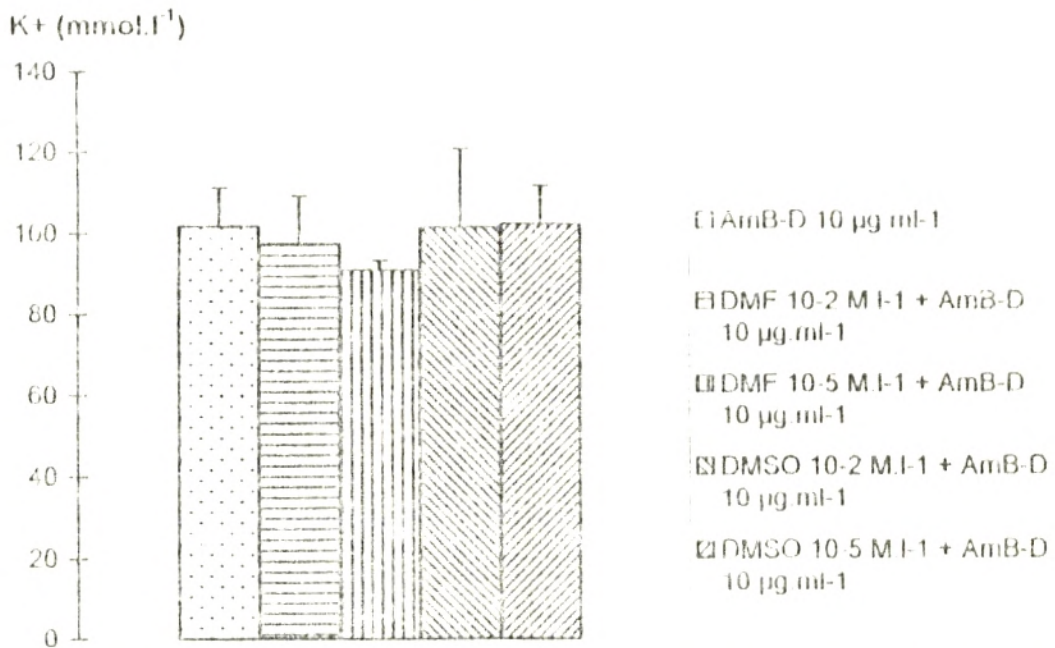


Figure 32 : Valeurs moyennes du K⁺ (mmol.l⁻¹) urinaire chez les rats recevant l'AmB-D à 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMF 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻² M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹, DMSO 10⁻⁵ M.l⁻¹ + AmB-D 10 µg.ml⁻¹. (p < 0,05)

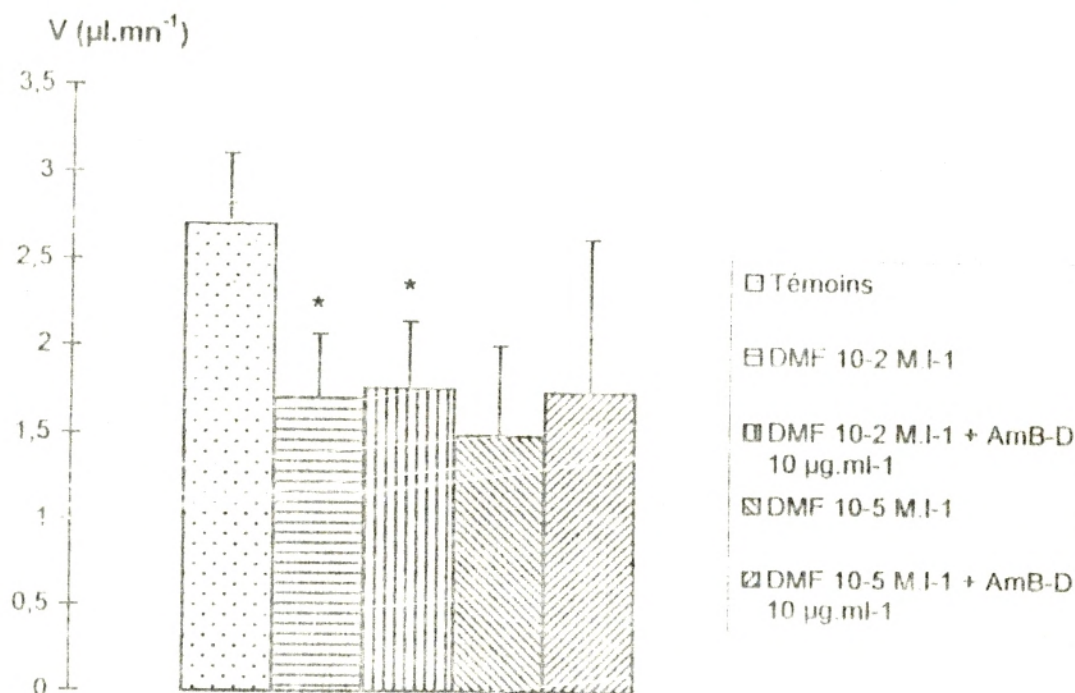


Figure 35 : Valeurs moyennes du V ($\mu\text{l.mn}^{-1}$) chez les rats Wistar Témoins et ceux recevant du DMF à 10^{-2} M.l⁻¹, 10^{-2} M.l⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 10^{-5} M.l⁻¹, DMF 10^{-5} M.l⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$. ($p < 0,05$)

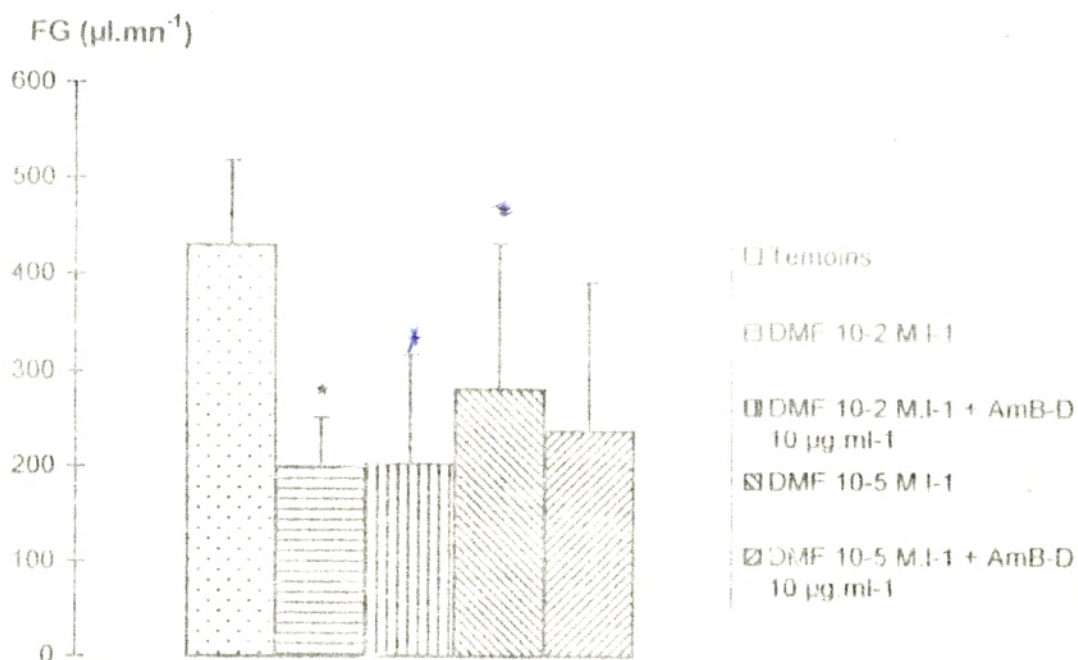


Figure 36 : Valeurs moyennes de FG ($\mu\text{l.mn}^{-1}$) chez les rats Wistar Témoins et ceux recevant du DMF à 10^{-2} M.l⁻¹, 10^{-2} M.l⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 10^{-5} M.l⁻¹, DMF 10^{-5} M.l⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$. ($p < 0,05$)

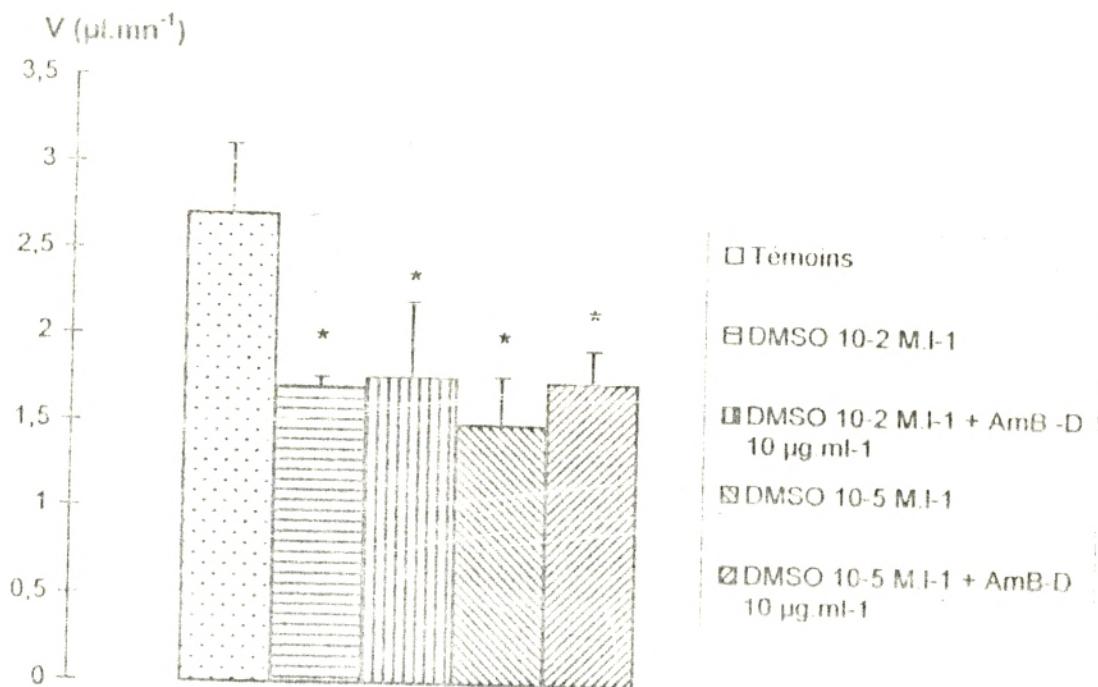


Figure 37 : Valeurs moyennes du V ($\mu\text{l.mn}^{-1}$) chez les rats Wistar témoins et rats recevant du DMSO à 10^{-2} M.I⁻¹, 10^{-2} M.I⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 10^{-5} M.I⁻¹, 10^{-5} M.I⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$. ($p < 0,05$)

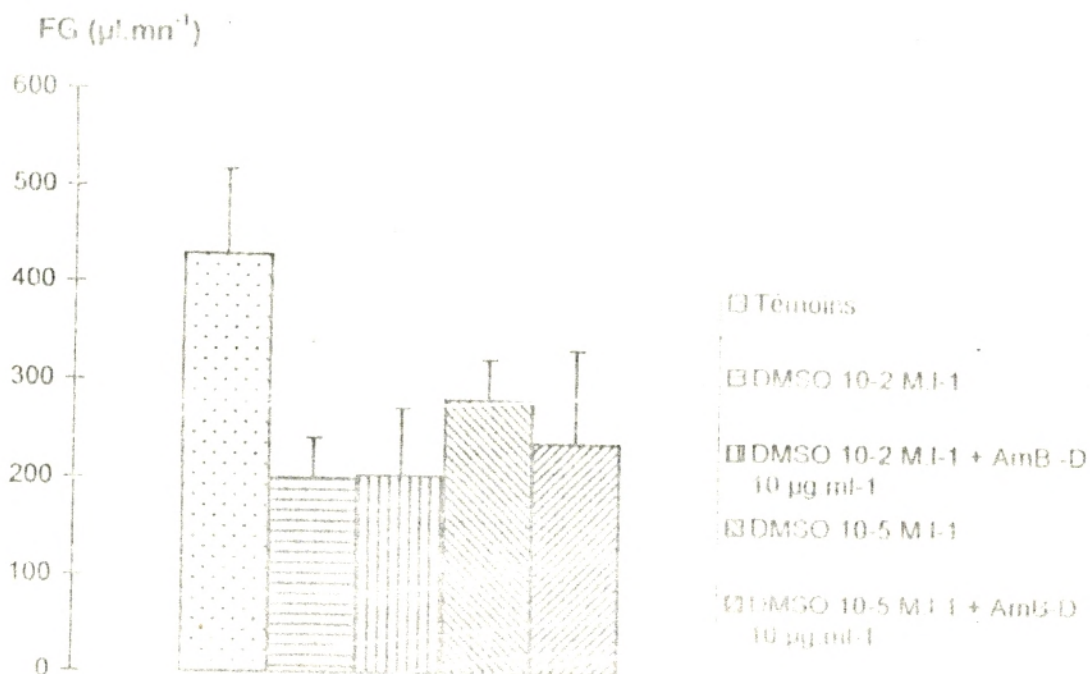


Figure 38 : Valeurs moyennes de FG ($\mu\text{l.mn}^{-1}$) chez les rats Wistar témoins et rats recevant du DMSO à 10^{-2} M.I⁻¹, 10^{-2} M.I⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$, 10^{-5} M.I⁻¹, 10^{-5} M.I⁻¹ + AmB-D $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$. ($p < 0,05$)

Bien que l'excrétion fractionnaire de l'urée des rats traités à l'amphotéricine B-D à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ est significativement faible, celle des rats recevant l'amphotéricine B-D à 7,5 $\mu\text{g/ml}$ et surtout à une concentration de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ est significativement élevée comparés aux rats témoins (Tableau VI-a). Dans ce tableau aussi, l'excrétion fractionnaire du sodium (Na^+) est nettement significative à une dose de 7,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$, et l'excrétion fractionnaire du calcium (Ca^{++}) à la dose d'amphotéricine B-D de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ est significative aussi.

Comparés aux témoins (Tableau V-b), l'excrétion fractionnaire de l'urée et du sodium des rats traités au solvant DMF 10^{-2} M l^{-1} augmentent significativement.

Par ailleurs, pour une concentration de DMF 10^{-2} M l^{-1} additionné à l'amphotéricine B-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$, l'excrétion fractionnaire du sodium et du calcium sont élevées de même pour l'excrétion fractionnaire du potassium des rats traités au DMF 10^{-5} M l^{-1} + amphotéricine B-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ qui est très élevée par rapport aux rats témoins.

Le taux de l'excrétion fractionnaire de l'urée diminue significativement chez les rats étudiés avec du DMF 10^{-5} M l^{-1} + amphotéricine B-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tableau VI-c)

Par contre aucune différence significative n'est observée entre les différents paramètres concernant les lots de rats du Tableau VII-b comparés à ceux des témoins.

En dernier, le taux de l'excrétion fractionnaire de l'urée et du calcium diminue d'une façon significative chez les rats traités aux DMSO 10^{-2} M l^{-1} + amphotéricine B-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ et DMSO 10^{-5} M l^{-1} + amphotéricine B-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ par rapport aux rats traités à l'amphotéricine B-D à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Tableau VI-c)

Groupes	Paramètres	EF% H ₂ O	EF% Urée	EF% Na ⁺	EF% K ⁺	EF% Ca ²⁺
	Témoins (n=5)		0,79 ± 0,39	34,82 ± 9,29	0,64 ± 0,16	11,81 ± 2,73
Rat - Desoxycholate de sodium (n=5)		0,74 ± 0,15	54,90 ± 17,18	0,71 ± 0,18	10,22 ± 1,53	1,31 ± 0,52
Rat + AmB-D 2,5 µg ml ⁻¹ (n=5)		0,98 ± 0,75	17,15 ± 4,703 *	0,58 ± 0,005	9,87 ± 2,23	1,35 ± 0,66
Rat + AmB-D 5 µg ml ⁻¹ (n=5)		1,39 ± 0,70	48,94 ± 17,00	0,78 ± 0,27	25,56 ± 12,87	2,15 ± 0,84
Rat + AmB-D 7,5 µg ml ⁻¹ (n=5)		1,20 ± 0,56	71,78 ± 8,50	1,14 ± 0,34	20,51 ± 7,68	5,32 ± 4,27 *
Rat + AmB-D 10 µg ml ⁻¹ (n=5)		1,25 ± 0,57	92,9 ± 21,71 *	1,17 ± 0,57	21,43 ± 8,78	5,71 ± 1,13 *

Tableau VI-a Valeurs moyennes de l'excretion fractionnaire de l'H₂O (EF% H₂O), de urée (EF% Urée), du sodium (EF% Na⁺), du potassium (EF% K⁺), et du calcium (EF% Ca²⁺) chez les rats témoins et chez les rats recevant une concentration croissante d'amphotéricine B-D (2,5 - 5 - 7,5 et 10 µg ml⁻¹). Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05

* Différence significative par rapport aux rats témoins

Groupes	Paramètres				
	EF% H ₂ O	EF% Urée	EF% Na ⁺	EF% K ⁺	EF% Ca ²⁺
Témoins (n=5)	0,79 ± 0,39	54,82 ± 9,29	0,64 ± 0,16	11,81 ± 2,73	1,44 ± 0,60
DMF 10 ⁻² Ml ⁻¹ (n=5)	1,16 ± 0,0989	54,925 ± 6,874 *	0,995 ± 0,176 *	18,36 ± 5,14	1,58 ± 0,774
DMF 10 ⁻² Ml ⁻¹ - AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1,515 ± 0,505	48,966 ± 20,572	1,38 ± 0,330 *	44,26 ± 33,29	2,563 ± 0,291 *
DMF 10 ⁻⁵ Ml ⁻¹ (n=5)	2,43 ± 0,763	42,155 ± 37,073	1,07 ± 0,579	17,22 ± 7,283	3,055 ± 1,519
DMF 10 ⁻⁵ Ml ⁻¹ - AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1,226 ± 0,528	31,646 ± 16,837	1,05 ± 0,491	21,93 ± 7,196 *	2,283 ± 1,239
DMSO 10 ⁻² Ml ⁻¹ (n=5)	1,265 ± 0,091	35,17 ± 17,03	1,07 ± 0,753	16,81 ± 5,218	1,95 ± 0,715
DMSO 10 ⁻² Ml ⁻¹ - AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1,026 ± 0,362	34,80 ± 10,339	0,98 ± 0,365	4,16 ± 2,22	1,376 ± 0,361
DMSO 10 ⁻⁵ Ml ⁻¹ (n=5)	0,665 ± 0,049	24,765 ± 1,237 *	0,335 ± 0,035	1,52 ± 0,806	1,805 ± 0,332 *
DMSO 10 ⁻⁵ Ml ⁻¹ - AmB-D 10 µgml ⁻¹ (n=5)	1,713 ± 1,682	33,623 ± 16,120	0,74 ± 0,183	1,093 ± 0,266	1,076 ± 0,177 *

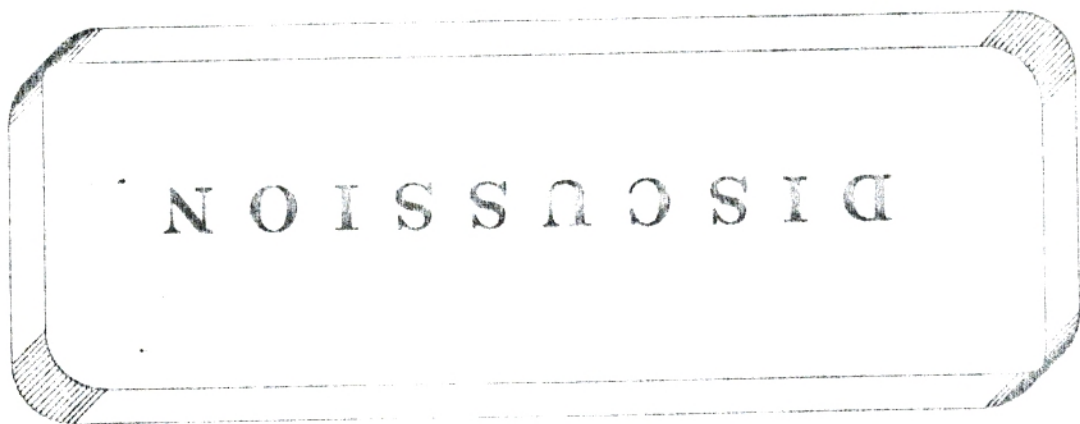
Tableau VI-b : Valeurs moyennes de l'excretion fractionnaire de l'H₂O (EF% H₂O), d'urée (EF% Urée), du sodium (EF% Na⁺), du potassium (EF% K⁺) et du calcium (EF% Ca²⁺) chez les rats Wistar (témoins et les rats traités aux solvants seuls DMF (10⁻² Ml⁻¹, 10⁻⁵ Ml⁻¹), DMSO (10⁻² Ml⁻¹, 10⁻⁵ Ml⁻¹) en présence et en absence d'AmB-D à 10 µg ml⁻¹. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* Différence significative par rapport aux rats témoins

Groupes	Paramètres	EF% H ₂ O	EF% Urée	EF% Na ⁺	EF% K ⁺	EF% Ca ²⁺
	AmB-D (10 µg/ml) (n=5)		1,25 ± 0,570	82,9 ± 21,714	1,176 ± 0,570	21,43 ± 9,784
AmB-D (10 µg/ml) (n=5)	DMSO (10 ⁻² M) +	1,513 ± 0,505	48,966 ± 20,572	1,38 ± 0,330	44,26 ± 33,29	2,563 ± 0,291
AmB-D (10 µg/ml) (n=5)	DMF (10 ⁻² M) +	1,226 ± 0,528	31,646 ± 16,837 *	1,05 ± 0,461	20,93 ± 3,196	2,283 ± 1,210
AmB-D (10 µg/ml) (n=5)	DMSO (10 ⁻² M) +	1,026 ± 0,562	43,80 ± 10,139 *	0,98 ± 0,365	14,16 ± 2,22	1,376 ± 0,162 *
AmB-D (10 µg/ml) (n=5)	DMSO (10 ⁻⁴ M) +	1,713 ± 1,682	33,623 ± 16,120 *	0,74 ± 0,183	17,063 ± 6,26	1,0766 ± 0,177 *

Tableau VI-c : Valeurs moyennes de l'excretion fractionnaire de l'H₂O (EF% H₂O), d'urée (EF% Urée), du sodium (EF% Na⁺), du potassium (EF% K⁺) et du calcium (EF% Ca²⁺) chez les rats Wistar recevant de l'AmB-D (10 µg/ml) et ceux recevant les solvants additionnés avec l'AmB-D à (10 µg/ml) [DMF (10⁻² M) ; 10⁻⁴ M], DMSO (10⁻² M) ; 10⁻⁴ M]. Les valeurs ont été calculées en prenant la valeur moyenne obtenue pour chaque expérience. P < 0,05.

* Différence significative par rapport aux rats témoins



DISCUSSION

L'amphotéricine B, isolée en 1956 par GOLD et col, reste le médicament le plus utilisé et le plus efficace pour le traitement des mycoses systémiques les plus sévères (29, 74)

Cet antibiotique, l'amphotéricine B, agit sur les membranes plasmiques des cellules procaryotiques (Fongis, levures) et eucaryotiques en augmentant la perméabilité de certains ions principalement les ions K^+ , Na^+ et Mg^{++} (44)

L'action de l'amphotéricine B sur la perméabilité cellulaire est liée à des interactions entre le polyène et les stérols membranaires à savoir l'ergostérol chez les levures et le cholestérol chez les cellules animales supérieures (25, 39, 71)

En effet selon (KRUIJFF B. et col, 1974) l'amphotéricine B produit des changements de perméabilité en créant des pores de 0,8 nm de diamètre environ dans la membrane plasmique, conduisant à une perte d'éléments intracellulaires essentiels pour les fonctions de la cellule (27, 80) Sur la base de ces indications, les travaux se sont orientés vers la recherche de diverses formes de molécules d'amphotéricine B dans le but d'obtenir un mode d'action spécifique et plus sélectif dont l'efficacité est importante avec moins d'effets secondaires au sein de l'organisme

Ces études se sont axées vers l'émulsion de l'amphotéricine B avec les systèmes vecteurs tels que les triglycérides, les lipoprotéines et les liposomes ; ces nouvelles formulations ont donné des résultats encourageant dans la prophylaxie des infections contre les agents mycosiques (5, 7, 8, 21, 78, 81, 82, 83)

Une deuxième stratégie de solubilisation de l'amphotéricine B est l'hémisynthèse qui tend à augmenter son index thérapeutique et diminuer sa toxicité ; en effet, son insolubilité dans l'eau et son instabilité ont permis aux chercheurs de modifier la structure chimique de la molécule

aboutissant à des dérivés solubilisés et des dérivés semi-synthétiques (dérivés N-acyl, N-méthyl, N-glycosyle, N-ammoacethyle et N-guanidine de l'amphotéricine B) (60, 73, 76, 84, 85).

Sur la base de ces recherches faites aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, ce présent travail a été établi dans le but d'étudier l'effet de l'amphotéricine B-D solubilisé dans deux solvants organiques : le diméthyl formamide « DMF » et le diméthyl sulfoxyde « DMSO », sur la cytotoxicité induite par la forme commercialisée ou fungizone chez les rats Wistar adultes.

En effet, les travaux *in vitro* de (BRAJTBURG J. et col, 1990) ont montré que l'utilisation des solvants organiques permet d'étudier les effets moléculaires et cellulaires de l'amphotéricine B.

Dans le cadre de ce travail nous avons cherché, chez des rats Wistar, à démontrer l'effet de variabilité de la réponse à des concentrations de 2,5, 5, 7,5 et 10 $\mu\text{g mi}^{-1}$ d'amphotéricine B-D ainsi que celui du desoxycholate de sodium.

Il a été démontré sur quelques études faites *in vitro* sur les hématies, que seuls les dérivés solubles de l'amphotéricine B peuvent se fixer sur le globule rouge (84) et que l'effet toxique de cet antifongique est lié aux formes solubles (49) d'où l'apparition des effets indésirables liés à sa toxicité.

C'est pourquoi l'introduction de l'amphotéricine B au sein de l'organisme par perfusion intraveineuse, a tendance à modifier l'ensemble des fonctions particulièrement la fonction rénale (20, 63, 65, 67, 68, 75), car le rein reste l'organe essentiel dans le maintien de l'équilibre hydrominéral par la régulation de la pression osmotique, la concentration ionique ainsi que le pH du milieu intérieur (57).

De part ces effets secondaires, le plus marquant étant la néphrotoxicité, l'amphotéricine B entraîne des changements hémodynamiques rénaux, une altération directe dans la fonction globale du rein principalement celle du filtre glomérulaire et le tubule proximal. Cela se traduit par

- Des effets peritubulaires avec diminution de la filtration glomérulaire « FG » et du flux renal sanguin « FRS »
- Des effets tubulaires avec perte élevée d'électrolytes urinaires (K^+ , Mg^{++}), une acidose tubulaire et une perte de la capacité de concentration de l'urine (2, 3, 4, 36, 41, 52, 53, 63, 66)

Au niveau du tubule rénal, l'interaction de l'amphotéricine B avec les stérols membranaires entraîne une perméabilité aux ions monovalents par la formation de pores (1, 19, 27, 43, 65, 67, 81, 86). Cette perméabilité qui change aussi bien dans les cellules du tubule rénal des mammifères (69, 72) que chez *Candida albicans* (39) est due à l'inhibition de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (79). Ces auteurs ont montré que l'amphotéricine B à $5 \mu M$ peut complètement inhiber la pompe sodium / potassium des érythrocytes humains (79).

Par ailleurs, des études faites *in vitro* sur l'action d'amphotéricine B indiquent que cet antibiotique a tendance à augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire aux ions potassium (K^+) dans les préparations de vessie de tortue et les globules rouges. En effet, son affinité pour les stérols membranaires des cellules tubulaires distales, entraîne à ce niveau une augmentation du flux passif de K^+ dans son gradient électrochimique et une acidité par transfert de protons H^+ (15, 36, 52, 55). Cette acidification du milieu cytoplasmique est à la base de l'action fongicide de ce polyène (38).

Cliniquement, la perte de K^+ chez les patients traités avec l'amphotéricine B soutient l'idée que l'effet secondaire de cet antifongique est dirigé au tubule distal, par contre l'absence de glycosurie, phosphaturie et d'aminoacidurie reflètent du bon fonctionnement du tubule proximal (56, 68).

En revanche, d'autres études ont montré que la néphrotoxicité diminue en utilisant soit les préparations liposomales soit un supplément en sel (sodium) ou des lipoprotéines (29, 67, 69).

Une autre étude, *in vivo* chez le rat, montre que l'augmentation dans le sérum du taux de cholestérol total et HDL - cholestérol à la suite d'une perfusion d'intralipides diminue la clearance de l'amphotéricine B et diminue la concentration de l'amphotéricine B liposomale dans les reins et les poumons (81).

Le fait que l'interaction des lipoprotéines avec l'amphotéricine B conditionne le phénomène de toxicité, les résultats de l'équipe de (BRATTBURG, 1984-1986) montrent qu'il y a une protection du globe rouge mais pas de *Candida albicans* (dont la membrane renferme de l'ergostérol) cela est dû aux valeurs relatives de la variabilité de la lipoprotéine et du rapport cholestérol libre / phospholipides chez les cellules cibles.

Par ailleurs, les systèmes vecteurs ou liposomes sont diversifiés par la nature des lipides les constituants et leur charge négative et positive. En effet, l'amphotéricine B liposomale composée de DMPC et DMPG sont moins néphrotoxiques mais avec une efficacité telle que la fungizone.

Dans le même ordre d'idée, les travaux de (JOIY V. et col, 1992) indiquent que le rapport phospholipide / amphotéricine B et le type de phospholipides (DMPC - DMPG) influe sur la toxicité des cellules rénales et l'activité fongicide de l'amphotéricine B. En effet, *in vitro* ces préparations d'amphotéricine B (Amp B + DMPC, Amp B + DMPG) sont très efficaces sur *Candida albicans*, en revanche sur des préparations de cellules de type proximal de lapin, la toxicité rénale diminue au rapport de lipide / amphotéricine B voisin de 40 en plus DMPC + Amp B est le plus protecteur pour les cellules rénales.

In vitro, (WASAN K.M. et col, 1993 - 1994) montrent qu'à 37°C, l'amphotéricine B à 20 µg ml⁻¹ associée aux HDL testée sur des cellules rénales LLCPK1 (dérives de culture primaire de cellules tubulaires proximales de porc) est significativement moins toxique que l'amphotéricine B sous forme desoxycholate (53% ± 2,5% de toxicité contre 81% ± 3,6%) à l'inverse des LDL.

En effet, des expériences menées *in vivo*, ont révélées que l'amphotéricine additionnée aux LDL est plus toxique que l'amphotéricine administrée seule, car cela est due à l'existence de récepteurs spécifiques aux LDL à l'inverse des HDL (47).

Par ailleurs, (BREZIS M. et col, 1993) a expliqué qu'aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, la toxicité de l'amphotéricine B diminue considérablement quand elle est administrée dans de l'albumine.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'amphotéricine B liposomale et la formation d'une émulsion de l'amphotéricine B en lipide peut donner un effet protecteur, pour les membranes des cellules animales supérieures, basé sur la modification de l'affinité de l'amphotéricine B, tout en préservant la haute efficacité contre des cellules fongiques, cependant des études ultérieures sont nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité de ces nouvelles formulations de l'amphotéricine B.

Pour les raisons citées ci-dessus, nous avons choisi d'effectuer une étude *in vivo* sur des rats Wistar adultes, afin de tester si une bonne solubilisation de l'amphotéricine B-D (fungizone) pourrait diminuer de ses effets secondaires notamment toxiques.

Les résultats obtenus en utilisant des concentrations croissantes d'amphotéricine B-D (2,5 – 5 – 7,5 – 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$), nous ont amené à constater une augmentation du taux d'hémoglobine suivie d'une diminution du nombre d'hématies par hémolyse.

D'autre part, nos résultats montrent que la fungizone à 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ solubilisée dans les solvants organiques DMF et DMSO, entraîne aussi une hémolyse, en effet le taux d'hémoglobine augmente considérablement en fonction du temps comparativement aux témoins, mais il reste plus important pour une concentration de solvant de 10^{-2} M l^{-1} comparés à 10^{-5} M l^{-1} .

Ces résultats sont confirmés par les travaux de (WITZERBIN J. et col, 1990), qui ont montré que seuls les dérivés solubles d'amphotéricine B peuvent se fixer sur le globule rouge.

L'amphotéricine B est éliminée principalement par le rein, organe essentiel dans la régulation hydro-électrolytique dont le dysfonctionnement peut engendrer des troubles ioniques importants. Au cours de nos expériences, l'hyperkaliémie observée après une perfusion de 2 heures des différentes préparations d'amphotéricine B-D chez des rats Wistar, témoigne de la toxicité de cet antifongique.

En effet, au niveau rénal, cela se traduit par une sécrétion accrue du potassium plus précisément au niveau du tubule distal (siège de la régulation de l'excrétion du potassium).

Par ailleurs, plusieurs auteurs indiquent une hypokaliémie très commune comme complication pendant une longue thérapie par l'amphotéricine B (16, 18, 23, 41, 66) et des taux aussi bas que 0,8 meq/l ont été enregistrés.

En revanche, nous remarquons qu'il y a une augmentation de l'excrétion du potassium proportionnelle à la concentration de l'antifongique, car l'amphotéricine B selon (SAWAYA P. et col, 1995) engendrerait une perte de potassium rénale qui peut produire des déficits de K^+ substantiel (15, 52, 55). Selon BUTLER (1966) cela est probablement dû à des effets au niveau du tubule distal qui diminue leur perméabilité au potassium.

Il semblerait donc qu'il existe une relation entre l'hyperkaliémie et l'excrétion augmentée du potassium chez les rats perfusés avec l'amphotéricine B-D à concentrations croissantes. Par ailleurs, nos résultats montrent que les effets de la fungizone solubilisée dans ces deux solvants sur l'excrétion du potassium sont maintenus constants chez les rats Wistar.

D'autres études ont montré que le taux d'excrétion du potassium est modulé par l'amplitude de la sécrétion distale de cet ion, qui est elle-même réglé par de multiples facteurs au nombre desquels il faut compter la kaliémie, le débit d'eau intratubulaire, le taux de réabsorption du sodium et le recyclage médullaire du potassium (57).

Par ailleurs, le rein permet aussi l'excrétion des médicaments par le biais d'un transport tubulaire et d'une filtration glomérulaire mise en évidence par des expériences de clearance. De ce fait, nos travaux sur des rats perfusés à la frangizone seule ou solubilisée dans le DMF et DMSO montrent une diminution de la filtration glomérulaire.

En effet le trouble dans la fonction glomérulaire engendre une azotémie caractérisée par une augmentation du taux de la créatinine avoisinant 1,5 mg/ml et une augmentation de l'urée azotémique sanguin (UNSA) (4, 6, 15, 16, 41, 63).

Chez les chiens l'administration chronique d'amphotéricine B à une dose de 5 mg/kg par l'artère rénale entraîne une brusque diminution de la clearance de l'inuline (17). Par contre une perfusion intraveineuse d'une dose d'amphotéricine B de 0,5 mg/kg au plus provoque la mort de l'animal (18, 40).

Seulement chez des rats anesthésiés l'administration d'amphotéricine B à 1 mg/kg/heure entraîne une diminution de 70 - 40 et 25% de la clearance de l'inuline ainsi que la pression glomérulaire capillaire (22).

La diminution de « FRS » entraîne une diminution du taux de la filtration glomérulaire « GFR » (6, 28, 63, 66).

La néphrotoxicité engendre aussi une incapacité de concentrer l'urine par défaut de réponse de la vasopressine de tubule collecteur médullaire (28, 56).

En revanche, la concentration de l'urine dépend du recyclage de l'urée et du gradient de concentration de l'urée dans l'interstitium médullaire (68), de plus l'excrétion de l'eau est couplée avec l'excrétion de l'urée. In vitro la perméabilité de l'urée et l'eau n'est pas altérée par l'amphotéricine B (19).

Un autre trouble électrolytique de la fonction rénale par l'amphotéricine B est l'hypomagnésémie (3, 17, 23), dont l'effet est controversé dans deux études. L'une montre une perte de

magnésium urinaire (28, 51) et l'autre indique une diminution de l'excrétion urinaire du magnésium (3, 16).

En conclusion, ce présent travail montre qu'il est possible in vivo de suivre les phénomènes de cytotoxicité en général de l'amphotéricine B et la néphrotoxicité en particulier.

Au cours de notre étude in vivo, des concentrations croissantes fungizone (61) furent administrées en perfusion intraveineuse à des rats Wistar afin de suivre l'effet dose-réponse de cet antifongique au niveau renal et sanguin.

Nos essais ont porté aussi sur l'étude de l'effet de deux solvants organiques (DMF et DMSO) sur la toxicité induite par la fungizone. La différence structurale de ces deux solvants, DMF (amide) et DMSO (cétone), nous a conduit à penser que cela pourrait influencer sur la solubilité et la toxicité de la fungizone chez le rat.

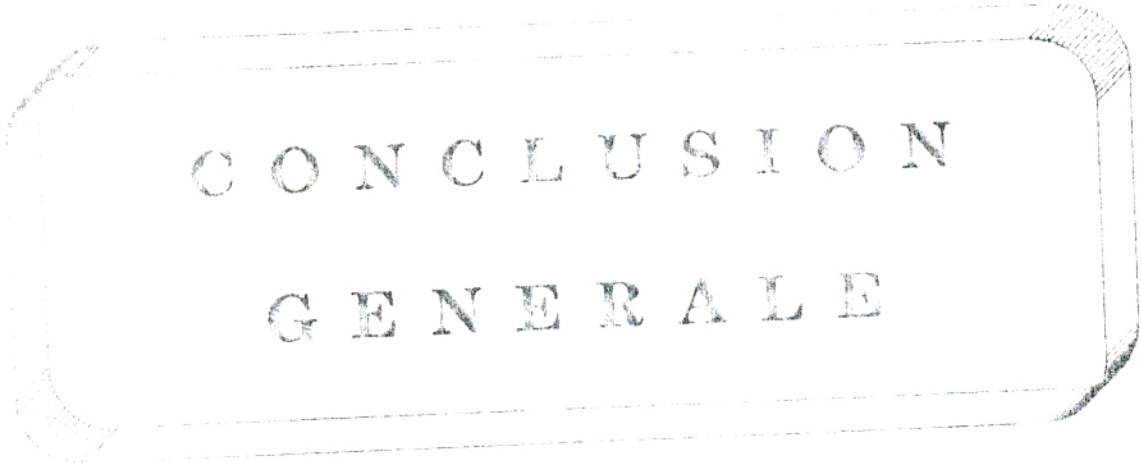
Il ressort clairement de nos résultats, que la toxicité de la fungizone augmente avec la concentration de la solution mère, quelque soit le solvant utilisé et cela est dû probablement à la présence des oligomères et agrégats insolubles et de sa solubilité dans les deux solvants étudiés.

L'effet, la balance polaire/apolaire de l'amphotéricine B (clairement en faveur de sa partie hydrophobe) limite sa solubilité en phase aqueuse. Ainsi à des concentrations inférieures à $5 \cdot 10^{-5}$ M l'amphotéricine B est sous forme d'oligomère soluble, alors que les agrégats insolubles sont à partir de 10^{-6} M (5, 37, 56, 54, 59, 61, 23).

Il faut signaler aussi que la solubilité de l'amphotéricine B dépend de la polarité du solvant dans lequel elle est préparée, car plus la polarité du solvant est importante plus la solubilité de l'antifongique augmente et son effet toxique diminue.

Cela s'explique par une diminution du taux des agrégats et oligomères insolubles qui sont les formes actives de l'amphotéricine B.

Ces résultats sont confirmés par ceux de l'équipe de (LEGRAND P., 1992) qui ont constaté qu'à la même concentration d'antifongique le DMF est plus toxique que le DMSO, et cela est dû aux taux des différentes formes actives de l'amphotéricine B-D qui sont plus importantes dans le solvant DMF. Cela suggère que la toxicité de l'amphotéricine B-D semble être en étroite relation avec la présence des formes solubles d'antifongiques (monomères et oligomères solubles) par contre les agrégats et oligomères insolubles semblent être inactifs.



CONCLUSION
GENERALE

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de notre présent travail était d'évaluer *in vivo*, chez les rats Wistar, l'effet de la solubilisation de l'amphotéricine B-desoxycholate (fungizone) avec les solvants organiques diméthyl formamide (DMF) et diméthyl sulfoxyde (DMSO) et la variation de quelques paramètres sériques et urinaires.

Il a été constaté que l'amphotéricine B perturbe la perméabilité membranaire de la cellule (fongique et animale) en formant un complexe insoluble avec les stérols membranaires (il s'agit de l'ergostérol pour les levures et les fongis et du cholestérol pour les cellules animales). De ce fait l'amphotéricine B manifeste sa toxicité pour les deux types membranaires ; conduisant ainsi à une perte d'éléments intracellulaires essentiels. Ces effets sont complètement réversibles et peuvent être exploités pour augmenter l'efficacité thérapeutique de cet antifongique (1, 7, 92, 35, 46)

Il convient de souligner, que toutes ces observations ont été faites aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Pour cela, dans un premier temps nous sommes donc attachés à définir les conditions expérimentales permettant de mieux contrôler la cytotoxicité de l'amphotéricine B-desoxycholate pendant l'expérience, mais également l'effet des deux solvants organiques (DMF et DMSO) utilisés pour une meilleure solubilisation de l'amphotéricine B. Il nous a semblé aussi particulièrement approprié de travailler sur un modèle animal à savoir le rat Wistar adulte.

Les résultats que nous avons obtenus indiquent que

- L'amphotéricine B-desoxycholate ou fungizone à des concentrations croissantes (2,5 - 5 - 7,5 et 10 $\mu\text{g/ml}^1$) entraîne une augmentation du taux de l'hémoglobine par hémolyse suivie d'une diminution du nombre d'hématies, une fuite potassique au niveau sanguin et urinaire.

- La toxicité de la fungizone à $10 \mu\text{gml}^{-1}$ solubilisée dans du DMF ou DMSO diminue avec la concentration 10^{-2} M l^{-1} du solvant. En effet, lorsque la concentration de la solution mère passe de 10^{-2} M l^{-1} à 10^{-3} M l^{-1} , les effets varient respectivement aussi bien pour le taux d'hémoglobine, la numération globulaire, la kaliémie et la kaliurie et sont plus ou moins similaires pour les deux solvants utilisés. Cela est probablement dû à la complexation de l'amphotéricine B au desoxycholate favorisant ainsi la formation des agrégats et des oligomères insolubles.

Ces résultats sont en accord avec ceux de (LeGrand P., 1992) effectués sur le globule rouge et qui montrent que la toxicité de l'amphotéricine B semble être liée à la présence des formes solubles d'antifongiques (monomère, et oligomères solubles).

Il ne nous est donc pas possible de dire pour l'instant si la toxicité de l'amphotéricine B-desoxycholate peut être modulée par la nature du solvant et/ou par sa polarité.

En effet, plus la polarité du solvant est importante, plus la toxicité de l'antifongique diminue.

Enfin, pour compléter ce travail, il serait important et indispensable d'étudier l'impact de quelques facteurs physico-chimiques, de tester d'autres solvants organiques d'une part, et étudier des levures d'intérêt médical tel que *Candida* d'autre part.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANDREOLI T.E. and MONAHAN M. (1968)
The interaction of polyene antibiotics with thin lipid membranes
J. Gen. Physiol. (52) : 300 - 325.
2. BARBOUR F.L., STRAUB K.D., O'NEAL B.L. and FEATHERMAN J.W. (1979)
Vasopressin-resistant nephrogenic diabetes insipidus - a result of amphotericin B therapy
Arch. Intern. Med. (139) : 86 - 88.
3. BARTON C.H., PAHL M., VAZIRI N.D. and CESARIO T. (1984)
Renal magnesium wasting associated with amphotericin B therapy
Am. J. Med. (77) : 471 - 474.
4. BEARD H.W., RICHERT J.H. and TAYLOR R.R. (1960)
Treatment of deep mycotic infections with amphotericin B with particular emphasis on drug toxicity.
Am. Rev. Resp. Dis. (81) : 43 - 51.
5. BEDRANE M.A. (1997)
Effet des lipoprotéines sériques sur la toxicité induite par les polyènes macrolides
Exemple d'Amphotéricine B chez les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*
Thèse de Magister en Biologie moléculaire et cellulaire Université Aboubekr BELKADLO - Tlemcen.
6. BELL N.H., ANDRIOLE V.T., SABESIN S.M. and VITZ J.P. (1962)
On the nephrotoxicity of amphotericin B in man
Am. J. Med. (33) : 64 - 69.
7. BOLARD J., SEIGNEURET M. and BOUDET G. (1980)
Interaction between phospholipid bilayer membrane and polyene antibiotic amphotericin B.
Biochim. Biophys. Acta (599) : 289 - 293.

8. **BOUCHERIT Z. (1995)**

Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée aux lipoprotéines du serum sanguin chez les cellules de globules rouges humaines.

Thèse de Magister en Biologie moléculaire et cellulaire Université Aboubekr BELKAID - Tlemcen

9. **BRAJTBURG J., MEDDOFF G., KOBAYASHI G.S. and ELBERG S. (1980)**

Influence of extracellular K^+ or Mg^{2+} on the stages of the antifungal effect of amphotericin B and filipin

Antimicrobial Agents and chemother (18) N°4 : 593 - 597

10. **BRAJTBURG J., ELBERG S., BOLARD J., KOBAYASHI G.S., LEVY R.A., OSTLUND R.E., SCHLESSINGER D. and MEDDOFF G. (1984)**

Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B

J. Inf. Dis. (149) N°6 : 986 - 997

11. **BRAJTBURG J., POWDERLY W.G., KOBAYASHI G.S. and MEDDOFF G. (1986)**

Effect of serum lipoproteins on damage to erythrocytes and *Candida albicans* cells by polyene antibiotics.

J. Inf. Dis. (149) N°3 : 623 - 626

12. **BRAJTBURG J., POWDERLY W.G., KOBAYASHI G.S. and MEDDOFF G. (1990)**

Amphotericin B : Current understanding of mechanisms of action

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

13. **BRAJTBURG J., POWDERLY W.G., KOBAYASHI G.S. and MEDDOFF G. (1990)**

Amphotericin B : Delivery systems.

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

14. **BREZIS M., HEYMAN S.N. and SUGAR A.M. (1993)**

Reduced amphotericin B toxicity in an albumin vehicle.

J. Drug. Target. (1) N°3 : 185 - 189

15. **BURGESS J.L. and BIRCHALL R. (1972)**
Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function
Am. J. Med. (53) : 77 - 84.
16. **BUTLER W.T., BENNET J.E., ALLING D.W., WERTHAKE P.T., UTZ J.P. and HILLAND G.J. (1964)**
Nephrotoxicity of amphotericin B. Early and late effects in 81 patients
Ann Intern. Med. (61) : 175 - 187.
17. **BUTLER W.T., HILL G.J. II, SZWED C.F. and KNIGHT V. (1964)**
Amphotericin B renal toxicity in the dog
J. Pharmacol. Exp. Ther. (143) : 47 - 56.
18. **BUTLER W.T. and HILL G.J. II (1964)**
Intravenous administration of amphotericin B in the dog
J. Am. Vet. Med. Assoc. (144) : 399 - 402.
19. **CAPASSO G., SCHLIETZ H., VICKERMANN B. and KINNE R. (1986)**
Amphotericin B and amphotericin B methyl ester - effect on brush border membrane permeability
Kidney Int. (30) : 311 - 317.
20. **CARLSON M.A. and CONDON R.E. (1994)**
Nephrotoxicity of amphotericin B
J. Am. Coll. Surg. 179 (3) : 361 - 381.
21. **CASS A., FINKELSTEIN A. and KRESPI S. (1976)**
The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatine and amphotericin B.
J. General Physiology. (56) : 109 - 124.
22. **CHENG J.T., WITTY R.T., ROBINSON R.R., YARGER W.E., SCHRADER N.W. and KENNEDY B.M. (1982)**
Amphotericin B nephrotoxicity. Increased renal resistance and tubule permeability
Kidney Int. (22) : 626 - 633.

23. CLEMENT J.S. and PEACOCK J.F. (1990)
Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity
Am. J. Med. (88) : 22 - 27
24. CYBULSKA B., MAZERSKI J., BOROVSKEF., and RARY BOBO C.M. (1984)
Haemolytic activity of aromatic heptane: A group of polyene macrolide antifungal antibiotics
Biochem. And pharmae. (33) No. 1 : 41 - 46
25. DEACON J.W. (1980)
Introduction of modern mycology
Ed. Wilkinson J.F.
26. DEKRUJFF B. and DEMEL R.A. (1974)
Polyene antibiotic-sterol interaction in membranes of *Ycholeplasma laudlawii* cells and lecithin liposomes III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complex
Biochim. Biophys. Acta. (339) : 57 - 70
27. DEUTICKE B., KIM M. and ZOLLNER C. (1973)
The influence of amphotericin B on the permeability of mammalian erythrocytes to nonelectrolytes, anions and cations
Biochim. Biophys. Acta. (318) : 345 - 359
28. DOUGLAS J.B. and HEALY J.K. (1969)
Nephrotoxic effects of amphotericin B in hydrocortisone tabloid acidosis
Am. J. Med. (46) : 154 - 162
29. DRETZ D.J. (1982)
Newer antifungal agents and their use, including an update on amphotericin B and flucytosine
In: REMINGTON J.S., SWARTZ M.N. (Eds.) *Current clinical Topics in infectious Disease* 3 : 97 - 135
30. GATE F.F. (1974)
The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics
J. Gen. Microbiol. (80) : 451 - 465

31. GEORGOPAPADAKOV N.H. and WALSH T.J. (1994)
Human mycoses : Drugs and targets for emerging pathogens.
Sciences (264) : 371 - 373.
32. GIBAUD J.L. and MATHIE S. (1988)
Pharmacologie clinique - Base de la thérapeutique
Éditions scientifiques française, 2^e édition.
33. GRACIANSKY P. and LARREGNE M. (1980)
Pathologie médicale
Et. Inflammation médecine - sciences.
34. GRUDA J., GAUTHIER E., ELBERG S., BRAJEBURG J. and MEDOFF G. (1987)
Effects of detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells.
Biochim. Biophys. Res. Commun (151) : 954 - 956.
35. HAKKOU A. (1988)
Mode d'action des antifongiques polyéniques sur l'enveloppe cellulaire de la levure *Kluyveromyces fragilis*. Etude du phénomène de résistance.
Thèse de Biochimie - pharmacologie, Nancy I.
36. HALPERN S.E. and LINDERMAN R.D. (1970)
Effect of amphotericin B on the renal clearance of urea in man.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (134) : 1073 - 1074.
37. HUMENGER R.P., KAPLAN T. and GRAY L. L. (1983)
Structure of amphotericin B aggregates based on calculations of optical spectra.
Biopolymers (22) : 911 - 918.
38. HERVE M., DÉBOUZY J.C., BOROWSKI E., CYBULSKA B. and GARYBOBO C.M. (1989)
The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A ¹³C-NMR study.
Biochim. Biophys. Acta (980) : 261 - 277.

47. KOEDIN M.H., KOBAYASHI G.S., BRAJTBURG J. and MEDOFF G. (1985)
Effects of elevation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipoproteins on amphotericin B-induced toxicity in rabbits.
Antimicrob. Agents and Chemother. (28): 144 - 145.
48. LAMPEN J.O. (1966)
Interference by polyene antifungal antibiotics, especially nystatin and filipin with specific membrane function.
Comp. Soc. Gen. Microbio. (16): 101 - 150.
49. LE GRAND P., ROMERO E.A., COHEN B.E. and BOLARD J. (1992)
Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes.
Antimicrob. Agents and Chemother. (36): 2502 - 2507.
50. LEHNINGER A.L. (1988)
Principe de biochimie.
Ed. Flammarion-Medecine-Sciences.
51. LIANOS A., CIEZA J., BERNARDO J. et al (1991)
Effects of salt supplementation on amphotericin B nephrotoxicity.
Kidney Int. (40): 302 - 308.
52. LITTMAN M.L., HOROWITZ P.L. and SWADAY E.G. (1958)
Coccidioidomycosis and its treatment with amphotericin B.
Am. J. Med. (24): 568 - 592.
53. MAZERSKI J., BOLARD J. and BOROWSKI E. (1982)
Self-association of some polyene macrolide antibiotics aqueous media.
Biochim. Biophys. Acta. (719): 11 - 17.
54. MAZERSKI J., GRZYBOWSKA J. and BOROWSKI E. (1990)
Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media.
Euro. Biophys. J. (18): 1 - 6.
55. Mc CHESNEY J.A. and MARAQUARDI J.F. (1964)
Hypokalemic paralysis induced by amphotericin B.
LANA. (189): 1029 - 1031.

56. **VIC, CORDY D.K., FREDERIC, M. and FUSNION, J.C. (1968)**
Renal tubular acidosis due to Amphotericin B.
N. Engl. J. Med. (278) : 124 - 131.
57. **MOREL, F. (1981)**
Sites of hormone action in the mammalian nephron.
Am. J. Physiol. (240) : F 159 - F 164.
58. **NEWMAN, M. (1990)**
Vade Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux
8^e édition - Maloine
59. **NORMAN, A.W., DEMELE, R.A., DEKRUJFF, B., GEERTS, W.S.M., VAN
KESSEL, And VAN-DEENEN, L.J.M. (1977)**
Studies on the biological properties of polyene antibiotics - Comparison of other
polyenes with filipin in their ability to interact specifically with sterol.
Biochim. Biophys. Acta (290) : 1 - 11.
60. **P. CMEGLIANI, R.M., LOIBENBERG, D., ANTONACCI, B., VARGHESIO MAINE,
E., SCOPPI, R., WRIGHT, J.J., CHIU, P.J.S. and MILLER, G.H. (1987)**
Comparative in vitro and in vivo of evaluation of N-D ornithyl amphotericin B
methyl ester, amphotericin B.
Antimicrob. Agents chemother. (31) : 1756 - 1760.
61. **FATTERSON, F.F., MINTY, P., BEEKSTRA, J., SZOKA, E.L., RYAN, J.L. and
ANDRIOLE, V.T. (1989)**
Treatment of experimental invasive aspergillosis with novel amphotericin B
cholesterol sulfate complexes.
Infect. Dis. (189) : 717 - 724.
62. **RAMOS, H., De MARCIANO, A.A., COHEN, B.F. and BOEVA, D.J. (1989)**
The polyene antibiotic amphotericin B acts as Ca²⁺ ionophore in sterol containing
liposomes.
Biochim. Biophys. Acta (1982) : 303 - 306.

39. JERVE M., WIETZERBIN J., COURTOIS A. and TRAN-DINH S. (1994)
Effets et mode d'action de l'amphotéricine B sur le métabolisme cellulaire. Etude par la spectroscopie R.M.N. multinucléaire.
Société Française de Microbiologie (colloque - Mars) - 91.
40. BILL G.E. II, BUTLER W.T., SZWED C.F. and MOORE S.A. (1963)
The lethal toxicity and dose related azotemia due to amphotericin B in dogs.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (144) - 76 - 79.
41. BOELMAN C.W. Jr. and EINSTEIN H. (1963)
The toxic effects of amphotericin B in man.
Cath. Med. (99) - 90 - 93.
42. JOLY V., BOLARD J., SAINT-JULIEN E., CARBON C. and YENI P. (1992)
Influence of phospholipid amphotericin B ratio and phospholipid type on in vitro renal cell toxicities and fungicidal activities of lipid-associated.
Antimicrob. Agents Chemother. 36 (2) - 262 - 266.
43. JOLY V., CARBON C. and YENI P. (1990)
Interaction of free and liposomal amphotericin B with renal proximal tubular cell in primary culture.
J. Pharmacol. (255) - 17 - 22.
44. KITO M., AKUTSU H., SUGETA H., KYOGOKU Y., SOHN D.H. and YU B.S. (1987) *
Association of polyene antibiotics with steroids.
Chem. Biol. Interactions (64) - 61 - 70.
45. KNIEPPER M. and ROCH-RAMEL E. (1987)
Pathways of urea transport in the mammalian kidney.
Kidney Int. (31) - 629 - 633.
46. KOBAYASHI G.S. and MEDOFF G. (1977)
Antifungal agents - Recent developments.
Ann. Rev. Microbiol. (31) - 291 - 308.

63. RHODES E.R., GINN H.E., MICHIGORE H.G., SMITH W.O. and HAMMERSTENAND J.F. (1961)
Effects of amphotericin B upon renal function in man
In GRAY P., TABENKIN B. and BRADLEY S.G. Eds. *Antimicrobiology Agents*
Amal. NY : Plenum Press : 539 - 542
64. RINNERT H., LEMATRE J. and DUPONT G. (1977)
Etude physicochimique de l'amphotericine B en milieu alcalin par diffusion
Rayleigh dichroïsme circulaire et absorption
C.R. Acad. Sci. Paris (281) : 853 - 855
65. SABRA R. and BRANCH R.A. (1990)
Amphotericin B nephrotoxicity
Drug Safety (5) : 94 - 108
66. SANFORD W.G., RASCH J.R. and STONE HEU R.B. (1962)
Therapeutic dilemma : Treatment of disseminated coccidioidomycosis with
amphotericin B
Ann Intern Med (56) : 553 - 563
67. SAWAYA B.P., WEHPRECHT H., CAMPBELL W.R. et al. (1994)
Direct vasoconstriction as a possible cause for amphotericin B induced
nephrotoxicity in rats
J. Clin. Invest. (87) : 2097 - 2107
68. SAWAYA B.P., BRIGGS J.P. and SCHNERMANN J. (1995)
Amphotericin B nephrotoxicity : The adverse consequences of altered membrane
properties
J. Am. Soc. Nephrol. (6) : 154 - 164
69. SCHELL R.E., TRAN N.V. and BRAMHALL J.S. (1989)
Amphotericin B induces changes in renal membrane permeation : a model of
nephrotoxicity
Biochim. Biophys. Res. Commun. (159) : 1165 - 1170
70. SNOEK R. and MEUNIER F. (1989)
Antifongiques In pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications thérapeutiques
O.P.C. (Alger) : 767 - 774

71. SOUZA L.C., MARANHÃO R.C., SCHREIBER S. and CAMPA A. (1993)
In vitro and in vivo studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with triglyceride rich emulsion
J. Antimicrob. Chemother. (32) : 123 - 132
72. STROUP R.F., WEINMAN E., HAYSLETT J.P. and KASHGARIAN M. (1974)
Effect of luminal permeability on net transport across the amphibian proximal tubule*
Am. J. Physiol. (226) : 1110 - 1116
73. SZPONARSKI W., WIETZERBIN J., BOROWSKI E. and GARY-BOBO C.M. (1988)
Interaction of ¹⁴C labelled amphotericin B derivatives with human erythrocytes: relationship between binding and induced re-leak
Biochim. Biophys. Acta (938) : 97 - 106
74. TERRY C.C.L. and HUGHES C.E. (1992)
Antifungal agents used for deep seated mycotic infections
Mayo Clin. Proc. (67) : 69 - 93
75. TROTTENS J.P. and RAJ L. (1994)
Chronic amphotericin B nephrotoxicity in the rat - protective effect of calcium channel blockade.
J. Am. Soc. Nephrol. (2) : 98 - 102
76. URBINA J.A., FLEAZAR COHEN B., PEROZO E. and CORNIVELLI L. (1987)
Spin labelled amphotericin B - Synthesis, characterization, biological and spectroscopic properties.
Biochim. Biophys. Acta. (897) : 467 - 473
77. VAN DEN BOSSCHE H., WILLEMSSENS G. and MARICHAL P. (1987)
Anti-candida drugs. The biochemical basis for their activity
C.R.C. Critical. Rev. In Microbiol. (5) : 57 - 72
78. VERRIET-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.
Biochim. Biophys. Res. Commun. (123) N°1 : 360 - 366

79. VERTUE-DOUA, HANNAERT P. and BOLARD J. (1988)
The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the Na/K⁺ pump of human erythrocytes.
Biochim Biophys Res Commun (157) : 692 - 697
80. WARNOCK D.W. (1991)
Amphotericin B - An introduction
J. Antimicrob Chemother (28) : 27 - 38
81. WASAN K.M., GROSSIE V.B. Jr. and LOPEZ-BERESTEIN G. (1994)
Concentration in serum and distribution in assay of free and liposomal amphotericin b in rats during continuous intralipid infusion
Antimicrob Agents Chemother (38) N°9 : 2224 - 2226
82. WASAN K.M., MORTON R.E., ROSENBLUM M.G. and LOPEZ-BERESTEIN G. (1994)
Decreased toxicity of liposomal amphotericin B due to association of amphotericin B with high density lipoproteins - role of lipid transfer protein
J. Pharm. Sci (83) N°7 : 1006 - 10
83. WASAN K.M. and LOPEZ-BERESTEIN G. (1994)
Modification of amphotericin B's therapeutic index by increasing its association with serum high-density lipoproteins
Ann. N-Y Acad. Sci. (730) : 95 - 106
84. WEITZERBIN J., SZPONARSKI W., BOROŃSKI E. and GARY-BOBO C.M. (1990)
Kinetic study of interaction between ¹²⁵I amphotericin B derivatives and human erythrocytes : relationship between binding and induced K⁺ leak
Biochim Biophys Acta (1026) : 93 - 98
85. WRIGHT J., ALBARELLA J.A., KREPSKI L.P. and LOEBENRG D. (1982)
N-aminoacyl derivatives of polyene macrolide antibiotics and their esters
J. Antibiot. (35) : 911 - 914
86. YANO Y., MONTEIRO J.L. and SEGURO A.C. (1994)
Effect of amphotericin B on water and urea transport in the inner medullary collecting duct.
J. Am. Soc. Nephrol. (5) N°1 : 68 - 74