

MAG/574.88 - 24/01

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

# THESE

Présentée devant

L'UNIVERSITE DE TLEMCCEN

INSTITUT DE BIOLOGIE

pour l'obtention du

DIPLOME DE MAGISTER

en Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biochimie

par

M<sup>me</sup> BOUCHERIT - ATMANI Zahia

S 4

M/S

**ETUDE DE L'EFFET DE QUELQUES FACTEURS  
SUR LA CYTOTOXICITE INDUITE PAR  
L'AMPHOTERICINE B ASSOCIEE AUX  
LIPOPROTEINES DU SERUM SANGUIN CHEZ DES  
CELLULES DE GLOBULES ROUGES HUMAINES**

Soutenue le

1995

JURY :

Président	M <sup>me</sup> EL KEBIR F.Z.	Professeur
Promoteur	M' BENYOUCEF S.M.	Docteur ès-Sciences
Examineur	M' CHABANE SARI D.	Maître de Conférences
Examineur	M' BENABADJI B.	Docteur ès Sciences

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué aux laboratoires de Biochimie de l'institut de Biologie et du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen sous la direction de Monsieur **S.M. BENYOUCEF** Docteur ès-sciences naturelles.

Je lui exprime toute ma gratitude de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de la confiance qu'il m'a accordée et de m'avoir aidé sur le plan pratique et conceptuel. Je tiens à le remercier également pour son optimisme inaltérable, son enthousiasme jamais démenti et sa passion pour les recherches qu'il entreprend.

Qu'il trouve ici le témoignage sincère de ma reconnaissance.

Ma gratitude va également à Madame **F.Z. EL KEBIR**, professeur en biologie à l'institut des sciences de la nature de l'université d'Oran qui a acceptée de présider le jury de ce travail. Mes remerciements les plus distingués pour m'avoir fait cet honneur.

Je remercie très sincèrement Monsieur **B. BENABADJI**, Docteur ès-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 **D. CHABANE-SARI**, Maître de Conférence à l'Institut de Biologie de Tlemcen, trouve ici ma reconnaissance pour l'aide qu'il m'a apporté et pour ces conseils utiles le long de ce travail. Je le remercie également d'avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.

Je tiens à rendre hommage à tous les responsables de l'institut de biologie de l'université de Tlemcen pour avoir su entretenir autour de notre laboratoire, pendant la préparation de cette thèse, des conditions matérielles et psychologiques particulièrement pénibles. Ils savent sans nul doute à quel point les épreuves forgent l'âme.

J'exprime toute ma gratitude à monsieur **B. BOUDILMI** Directeur du laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen qui m'a accueilli chaleureusement dans son laboratoire et pour son assistance technique.

Mes remerciements les plus distingués vont particulièrement à Monsieur **A. BELHARRANE**, magasinier à l'institut de Biologie de Tlemcen pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté.

J'adresse l'expression de mon amitié à tout le personnel du laboratoire de Biochimie du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen pour leur aide permanente.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Mademoiselle **L. BOUBEKEUR** pour son importante contribution à la présentation graphique de ce travail, pour son efficacité et sa bonne volonté.

## RESUME

L'amphotéricine B, antifongique polyène de large utilisation clinique induit d'importants effets toxiques.

Dans le cadre de l'élaboration d'une stratégie de développement de cette molécule visant à augmenter l'index thérapeutique tout en réduisant la toxicité, nous avons étudié l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée à des lipoprotéines du sérum sanguin chez le globule rouge humain (modèle universel de cellules animales supérieures).

Dans notre travail nous avons abordé d'une part, les effets des caractéristiques des lipoprotéines utilisées notamment la nature des lipoprotéines (lipoprotéines lourdes ou H.D.L et les lipoprotéines légères ou L.D.L), et la composition en stérols de ces lipoprotéines. D'autre part, l'effet de la concentration en antifongique et du rapport antifongique / stérols, puis, de l'état d'énergisation des cellules cibles, et en fin, du pH du milieu extérieur.

Les phénomènes de toxicité aiguë chez le globule rouge sont suivis par les changements de perméabilité aux ions potassium et par l'hémolyse.

Il ressort de cette étude que :

L'addition de lipoprotéines dans le milieu inhibe significativement la cinétique de fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B. Cette inhibition est plus importante avec les lipoprotéines lourdes ou H.D.L, qu'avec les lipoprotéines légères ou L.D.L. L'effet protecteur des H.D.L est plus efficace sur l'hémolyse que sur la fuite potassique.

Lorsque la concentration de lipoprotéines exprimée en mg de cholestérol/l de milieu augmente de 0 à 100 mg/l, l'effet protecteur est de même amplitude avec les H.D.L et les L.D.L. Au delà de 100mg/l de milieu, nous avons observé que se sont les H.D.L qui protègent mieux le globule rouge contre la fuite potassique.

En effet, les cellules mises en présence d'amphotéricine B complexée aux H.D.L, gardent l'intégralité de leur contenu potassique, par contre, la protection maximale atteinte par l'amphotéricine B complexée aux L.D.L est de 85% seulement.

La protection du globule rouge par les H.D.L est assurée même pour des concentrations très élevées d'amphotéricine B (10µg/ml).

En ce qui concerne le rôle des stérols, les résultats obtenus montrent que l'addition des stérols libres seuls (cholestérol ou ergostérol) dans le milieu extérieur n'induit pas d'effet protecteur significatif mais que c'est la présence d'un transporteur protéique (lipoprotéines ou sérum albumine bovine) qui permet l'expression de l'effet protecteur des stérols.

L'addition d'une source d'énergie dans le milieu externe a peu d'influence sur la protection du globule rouge contre l'action toxique de l'amphotéricine B libre ou complexée aux lipoprotéines.

En fin, l'effet protecteur des lipoprotéines augmente significativement avec la baisse du pH du milieu.

---

**Mots clés** : amphotéricine B, amphotéricine B-H.D.L, amphotéricine B-L.D.L, globules rouges humains, cholestérol non estérifié.

# **SOMMAIRE**

## **PREMIERE PARTIE**

<b>INTRODUCTION : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	1
<b>1. Caractéristiques de l'amphotéricine B</b> .....	3
1.1. Caractéristiques physico-chimiques .....	3
1.2. Caractéristiques biologiques .....	6
1.3. Caractéristiques cliniques .....	6
<b>2. Les lipoprotéines du sérum sanguin humain</b> .....	13
2.1. Définition et propriétés .....	13
2.2. Classification .....	13
2.2.1. Les lipoprotéines lourdes (High Density Lipoproteins : H.D.L) .....	13
2.2.2. Les lipoprotéines légères (Low Density Lipoproteins : L.D.L) .....	13
2.2.3. Les lipoprotéines très légères (Very Low Density Lipoproteins : V.L.D.L) .....	14
2.3.4. Les chylomicrons et les lipomicros .....	14

## **DEUXIEME PARTIE**

<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	17
<b>1. Matériel biologique</b> .....	18
<b>2. Méthodes</b> .....	18
2.1. Préparation des globules rouges .....	18
2.2. Préparation des lipoprotéines .....	18
2.3. Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur acétate de cellulose ..	20
2.3.1. Principe .....	20
2.3.2. Réactifs .....	20
2.3.3. Mode Opératoire .....	20
2.3.4. Résultats .....	21
2.4. Préparations des solutions antifongiques .....	21
2.5. Dosage des protéines totales .....	21
2.6. Dosage du cholestérol total .....	24
2.6.1. Principe .....	24
2.6.2. Mode opératoire .....	24
2.6.3. Calcul .....	25
2.7. Etude de la cytotoxicité .....	25
2.7.1. Etude de la lyse cellulaire .....	25
2.7.2. Dosage du potassium .....	25

## TROISIEME PARTIE

<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	26
1. Effet de la nature des lipoprotéines .....	29
1.1. Perméabilité au potassium .....	30
1.2. Hémolyse .....	34
1.3. Conclusion .....	37
2. Effet dose-réponse .....	37
2.1. Effet de concentrations croissantes de lipoprotéines sur l'amplitude des phénomènes toxiques induits par l'amphotéricine B .....	38
2.2. Effet de concentrations croissantes d'amphotéricine B sur l'amplitude des phénomènes toxiques .....	44
2.2.1. Perméabilité au potassium .....	44
2.2.2. Hémolyse .....	46
2.2.3. Conclusion .....	48
3. Effet de l'addition de stérols libres externes .....	49
3.1. Effet de l'addition de stérols non estérifiés en l'absence de vecteur .....	50
3.2. Effet de l'addition du cholestérol non estérifié en présence d'un vecteur ..	52
3.2.1. En présence de lipoprotéines sériques .....	52
3.2.2. En présence de la sérum albumine bovine .....	56
3.3. Conclusion .....	58
4. Mode d'addition de l'amphotéricine B .....	58
5. Etat d'énergisation de la cellule cible .....	60
6. pH du milieu .....	62

## QUATRIEME PARTIE

<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	65
<b>ANNEXE</b> .....	69
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	70

**PREMIERE PARTIE**  
**INTRODUCTION : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les mycoses, affections dues à des champignons levuriformes constituent actuellement un axe de recherche en pathologie médicale en pleine évolution. Cette pathologie change d'aspect et d'importance : Autrefois les localisations étaient essentiellement cutanéomuqueuses, actuellement les localisations profondes, viscérales ou généralisées nettement plus graves sont de plus en plus fréquentes. Parmi les causes de cette évolution, on peut citer l'emploi de moyens thérapeutiques prolongés à base d'antibiotiques, de corticoïdes, d'immunodépresseurs et de radiations, et aussi par l'utilisation des techniques chirurgicales modernes. Certains facteurs locaux jouent aussi un rôle très important dans l'apparition des mycoses : Macération, utilisation de vêtements ou chaussures synthétiques, transfert de population et contact avec les animaux. Enfin, l'état pathologique ou physiologique du patient peut favoriser l'augmentation et le développement des infections fongiques : La déshydratation, la tuberculose pulmonaire, les infections malignes, le SIDA etc...

Par ailleurs, la liste des agents responsables ne cesse pas d'augmenter. Autrefois seule l'espèce *Candida albicans*, incriminée dans l'apparition des candidoses était mise en cause. A l'heure actuelle, d'autres espèces saprophytes de l'organisme humain exercent un pouvoir pathogène. La présence de plus en plus fréquente de ces infections ne peut que confirmer la gravité du phénomène, elles atteignent 10 à 15% de la population et elles progressent d'une façon alarmante : 15% par an environ (CANIAUX, I et col. 1984). L'autre problème qui s'ajoute, est la diversification de la pathologie fongique et ses localisations dans pratiquement tous les niveaux de l'organisme, se qui pose des difficultés de traitement, surtout dans les régions profondes de l'organisme, peu accessibles et moins vascularisées.

Un phénomène aussi important et qui pose beaucoup de difficultés dans le traitement de ces infections est l'apparition de résistance aux antifongiques chez certains microorganismes et l'inefficacité d'un traitement pour protéger l'organisme contre l'envahissement de certaines espèces pathogènes. Depuis 1950, l'année de la découverte du premier antifongique polyénique, la nystatine par HAZEN et BROWN, plus de 60 antibiotiques furent isolés, mais un nombre très restreint est utilisé à des fins thérapeutiques (nystatine, amphotéricine B, pimaricine, etc...), cela du fait de leur toxicité et /ou de leur inactivité in vitro.

Si pour les mycoses superficielles, la chimiothérapie antifongique dispose de médicaments puissants (nystatine pour les candidoses, griséofulvine pour les dermatophytoses, dérivés polyvalents comme les imidazoles), le traitement des mycoses systémiques et souvent plus difficile, malgré les progrès énormes réalisés récemment.

Les antifongiques polyéniques sont les plus utilisés pour lutter contre les mycoses profondes et l'amphotéricine B qui en est l'exemple type a fait l'objet de notre travail.

## **1. CARACTERISTIQUES DE L'AMPHOTERICINE B**

### **1.1. Caractéristiques physico-chimiques**

Il s'agit de l'antifongique le plus étudié et le plus utilisé en milieu médical.

Elle fut isolée en 1956 par GOLD et col. à partir de culture de *Streptomyces nodosus*, actinomycète du sol Vénézuélien. Sa structure chimique (**Figure N°1**) est caractérisée dans sa partie hydrophobe polyénique par sept doubles liaisons conjuguées. Elle contient un fragment hydrocarboné contenant plusieurs groupements hydroxyles et un désoxyhexose aminé, la mycosamine.

La présence d'un nombre important de groupements hydroxyles polaires donnant à la molécule un pôle hydrophile et d'une région hydrophobe constituée de doubles liaisons conjuguées confère à cet antibiotique une propriété physico-chimique caractéristique : Celle d'être amphiphile.

La présence de deux groupements chargés sur la molécule d'amphotéricine B, un groupement carboxyle ( $-COO^-$ ) et un groupement amine ( $-NH_3^+$ ) donne à ce composé un caractère amphotère.

Son poids moléculaire est de 960. Elle est soluble dans certains solvants organiques tel que le diméthyl sulfoxyde (D.M.S.O.) et le diméthyl formamide (D.M.F) mais peu soluble dans les éthers, les cétones, les esters et les alcools. Sa balance polaire, apolaire largement en faveur de la partie hydrophobe limite la solubilité de l'amphotéricine B en phase aqueuse : ainsi, à des concentrations inférieures à  $10^{-7}M$ , elle existe sous forme monomérique, alors qu'à des concentrations supérieures à  $10^{-7}M$  commencent à apparaître des oligomères et des agrégats (HEMENGER, R.P et col. 1983); (MAZERSKI, T et col.1982); (MAZERSKI, T et col.1990).



Ce caractère pose beaucoup de difficultés d'administration en milieu hospitalier, et, administrée par voie parentérale présenterait une forte toxicité. Par contre son dérivé semi-synthétique (méthyl ester) ou associée avec des sels présentent une meilleure hydrosolubilité. En effet, grâce à l'adjonction de désoxycholate de sodium, l'AmB se présente sous la forme d'une solution colloïde adéquate pour l'administration parentérale.

Son spectre d'action est très large. Elle agit sur *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatidis*. Elle agit aussi sur les moisissures et sur les dermatophytes.(HAKKOU.A.1988)

Son schéma thérapeutique est résumé dans le **tableau n°1**.

**Tableau N°1 : Schéma thérapeutique de l'Amphotéricine B (CANIAUX, I et col.1984)**

Forme pharmaceutique	Utilisation thérapeutique	Posologie
Pommade	Candidoses cutanéomuqueuses	4 puis 2 applications par jour pendant 2 à 3 semaines (plus pour les onyxis)
Comprimés Gynécologiques	Candidoses vaginales	2 comprimés le soir au coucher, 15 jours consécutifs
Lotion	Pityriasis du cuir chevelu et eczéma séborréïque	1 à 2 applications par semaine
	Candidoses cutanéomuqueuses	2 Applications par jour pendant quelques jours
	Candidoses unguéales	3 Applications par jours pendant 15 jours à 3 mois
Suspension buccale ou capsules pour voie orale	Candidoses buccales ou intestinales prévention des candidoses, mycoses entretenues par un foyer intestinale à candida	50 à 100 mg/kg/j en 2 prises pendant 2 à 3 semaines
Voie intraveineuse ou injection in situ	Mycoses profondes	0,1 mg/kg et augmentation progressive de 0,1mg/kg jusqu'à 1 mg/kg. la durée du traitement varie en fonction de la gravité de la maladie (4 à 8 semaines) Chez l'enfant, les posologies très faibles au début peuvent être augmentées pour atteindre les mêmes doses que chez les adultes. Les perfusions doivent être administrées lentement et espacées de un ou plusieurs jours. Au cours du traitement, une surveillance médicale est impérative (hépatique, sanguine, rénale).

### **1.2. Caractéristiques biologiques**

Comme tous les antifongiques polyéniques, l'amphotéricine B agit en augmentant la perméabilité des cellules fongiques par liaisons aux stérols membranaires (**figure N°2**), notamment les stérols ayant une fonction  $3\beta$  hydroxy et une chaîne latérale (KITO, M et col. 1987).

La formation de ces complexes insolubles stérols-AmB s'organisent de manière à former des pores dans la membrane plasmique (**Figure N°3**) ce qui entraîne une augmentation de perméabilité membranaire, une perte d'ions et de protéines, une augmentation de l'activité enzymatique et une acidification interne par échange  $K^+/H^+$  (CYBULSKA, B et col.1984).

L'action de l'amphotéricine B sur la perméabilité dépend de sa concentration (KOTLER-BRAJTBURG, J et col.1979): à faible concentration (0,6  $\mu\text{g/ml}$ ), Il y a une fuite réversible des ions potassium, aux concentrations intermédiaires, la perméabilité est irréversible, à forte concentration (6 $\mu\text{g/ml}$ ), l'amphotéricine B entraîne une lyse cellulaire.

L'amphotéricine B exerce aussi des effets métaboliques qui restent encore aux premiers stades des études.

La base de l'effet toxique de ces antifongiques viendrait du fait que les membranes des fongis renferment de l'ergostérol alors que celles des cellules animales supérieures contiennent du cholestérol (**figure N°4 a et b**) (BAGINSKI, M et col.1989).

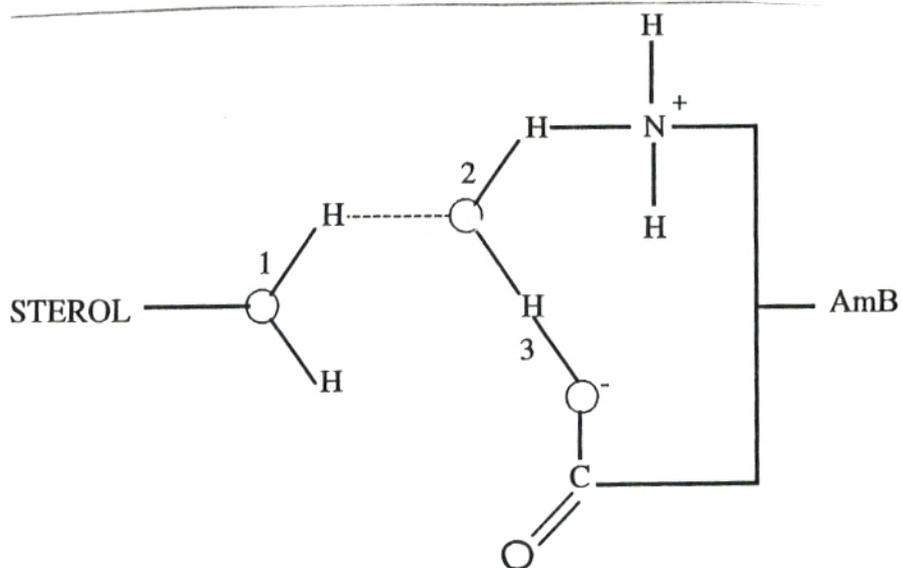
Cependant ces substances ont une plus grande affinité pour les membranes qui renferment de l'ergostérol (MADDUX, M.S et BARRIERE, S.L.1980)

### **1.3. Caractéristiques cliniques :**

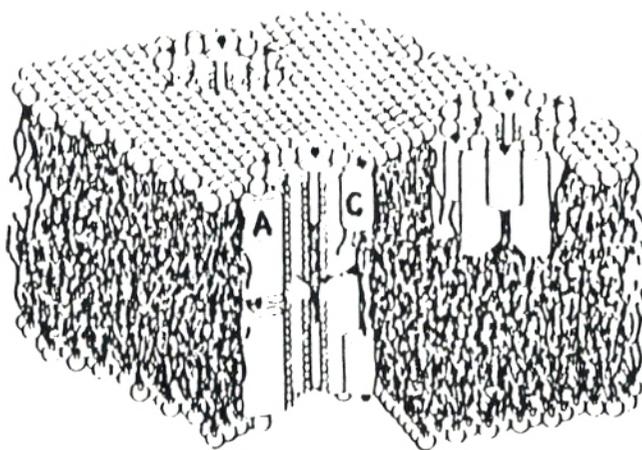
Par voie orale, l'amphotéricine B est mal absorbée par le tube digestif et seule son administration associée au désoxycholate de sodium en perfusion intraveineuse lente est recommandée comme traitement des infections systémiques.

Sa liaison aux protéines sériques et de 90% environ, par contre, elle n'est que de 20% pour les lipoprotéines sériques.

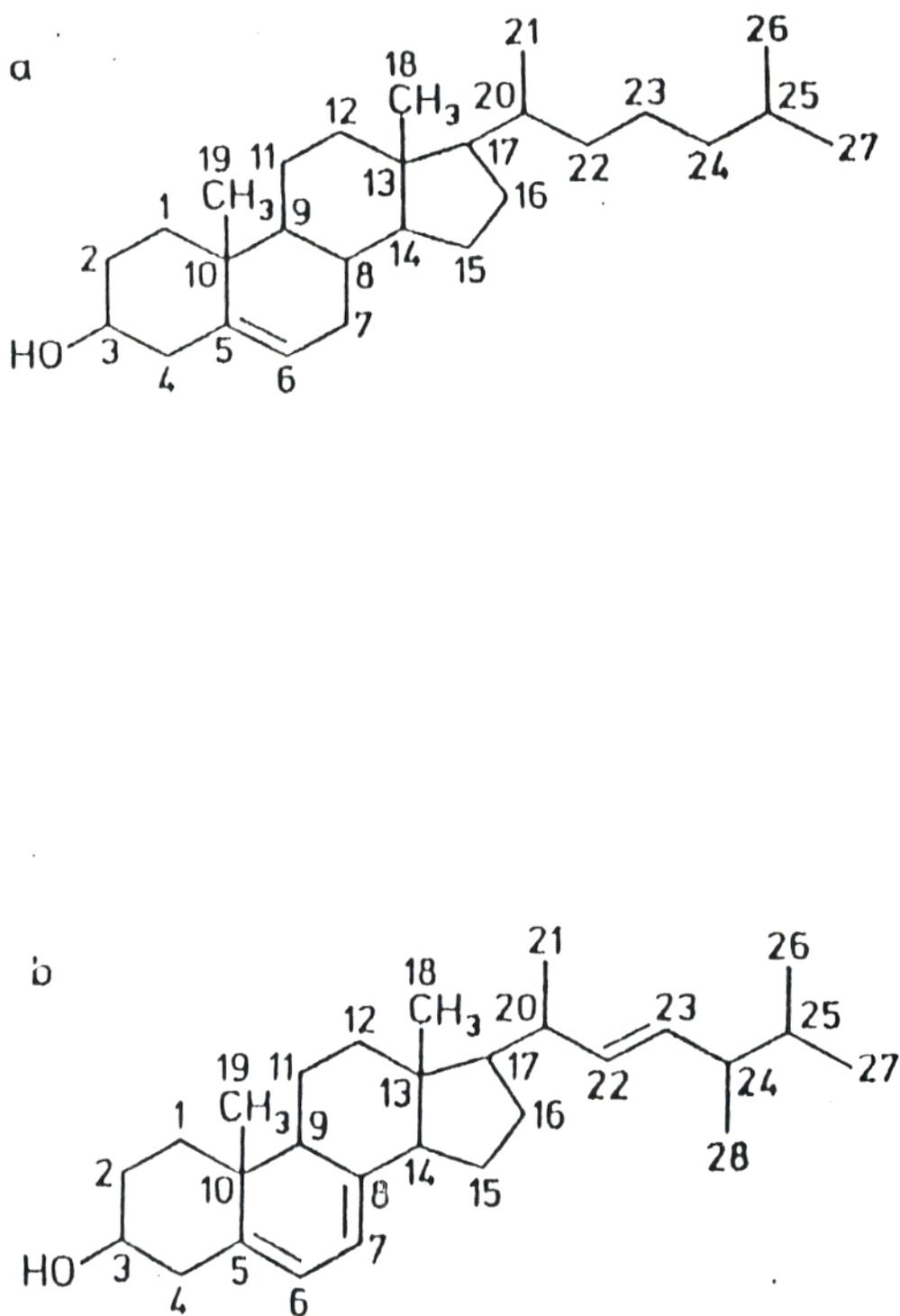
Le volume de distribution de l'amphotéricine B de l'organisme est élevé (4l/kg) du fait des dépôts tissulaires avec relargage dans le sang (NEWMAN, M.1990).



**Figure N°2** : Représentation schématique de la formation des ponts hydrogènes entre les groupes polaires des polyènes et le groupe OH des stérols (HERVE, M et col. 1989)



**Figure N°3** : représentation schématique du complexe polyène-stérol  
Pores formés par l'amphotéricine B (A) et le cholestérol (C)  
(MARTY, A et FINKELSTEIN, A. 1975)



**Figure N°4** : Structure chimique du cholestérol (a) et de l'ergostérol (b)  
(KITO, M et col. 1987)

CHRISTIANSEN et col.1985, par autopsie de 8 patients, ont étudié la distribution de l'amphotéricine B dans différentes parties de l'organisme, ils ont trouvé:

41% de l'antifongique dans le foie, 11% dans la rate, 6,5% dans les reins, 4,8% dans les poumons, 1,8% dans le coeur et des traces au niveau des muscles, d'oesophage et des tissus adipeux.

L'amphotéricine B associée au désoxycholate est stockée et concentrée de façon prolongée dans le tissu rénal.

L'élimination de l'amphotéricine B par l'organisme est très lente. Son temps de demi-vie serait d'environ 15 jours, mais cet antibiotique est détecté dans le sang 7 semaines après l'arrêt du traitement et sa disparition totale n'est constatée qu'après 13 semaines de son administration (VAN BOSSCHE, H et col.1987).

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.

(SNOECK, R et MEUNIER,F.1989).

L'amphotéricine B présente des effets indésirables fréquents, directement liés à sa toxicité:

- Réactions immédiates d'ordre général : Frissons, Fièvre, Céphalées et Malaises cardiaques.

- Effets néphrotoxiques, hépatotoxiques, hématotoxiques, cardiotoxiques et des troubles électrolytiques.

Les problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité limitent l'utilisation de l'amphotéricine B en milieu clinique.

C'est pourquoi, de nouveaux travaux ont pour objet l'élaboration d'une stratégie tendant à augmenter l'index thérapeutique et à diminuer la toxicité des antifongiques polyéniques en général et de l'amphotéricine B en particulier. Parmi les différents axes de recherches, on peut citer :

- La recherche de dérivés de l'amphotéricine B plus actifs sur les levures et les champignons et moins toxiques sur les cellules de mammifères.

Les caractéristiques de l'amphotéricine B, telle que son insolubilité dans l'eau, son instabilité, ont conduit les auteurs à rechercher à modifier la structure chimique de la molécule. Ce qui a aboutit à des dérivés solubilisés et des dérivés

semi-synthétiques (dérivés N-Acyl, N-Méthyl, N-Glycosylé, N-Amino acétylé et N-Guanidine de l'amphotéricine B) (URBINA, J.A et col.1987); (SZPONARSKI, W et col.1988); (HERVE, M et col.1989); (WIETZERBIN, J et col.1990).

- La recherche de combinaisons synergiques permettant de diminuer la dose efficace de l'amphotéricine B.

La combinaison de l'amphotéricine B avec différents antifongiques montre des résultats encourageants dans la prophylaxie des infections et dans la lutte contre les agents mycosiques. Notamment l'association AmB-Flucytosine (5.F.C) qui semble être le traitement de choix d'une méningite cryptococcique (BRAJTBURG, J et col.1990 a); (KOBAYASHI, G.S et MEDOFF, G.1977); (CANIAUX, I et col.1984).

- La recherche de systèmes vecteurs susceptibles d'augmenter la toxicité sélective de l'amphotéricine B. Parmi ces systèmes, les liposomes ont fait l'objet d'études intensives.

#### • Les essais d'incorporation de l'amphotéricine B dans les liposomes

Plus récemment, on prépare une amphotéricine B encapsulée dans des liposomes (ampholiposome). Trois systèmes liposomaux différents ont été utilisés : les systèmes liposomaux multilamellaires (multilamellar vesicles : M.L.V) faits de plusieurs couches lipidiques et de diamètre de l'ordre de 0,4 à 0,9 $\mu$ m, les liposomes de petite taille (small unilamellar vesicles : S.U.V) faits d'une seule couche de lipides et de taille de l'ordre de 200 Å et les liposomes unilamellaires larges ou de grande taille (large unilamellar vesicles : L.U.V.) de diamètre 1000 Å.

La multiplicité des résultats publiés dans ce domaine et parfois contradictoire et particulièrement les effets in vivo et in vitro.

En effet, les études menées in vitro ont montré que l'amphotéricine B encapsulée dans les liposomes ne contenant pas de stéroïls est moins toxique que l'amphotéricine B sous forme désoxycholate. Par contre, les mêmes expériences menées in vivo ont montré des effets contraires, à savoir, une faible toxicité de l'amphotéricine B encapsulée dans les liposomes qui contiennent les stéroïls en comparaison avec l'amphotéricine B liposomale sans stéroïls et à fortiori l'amphotéricine B seule.

(Classement dans l'ordre de réduction de la létalité: Liposomes contenant l'ergostérol > liposomes contenant le cholestérol > liposomes sans stérols > amphotéricine B seule) (MEHTA, R et col.1986).

Toutefois, l'ampholiposome demeure moins toxique que l'AmB-désoxycholate quelque soit le système liposomal utilisé et cela grâce à un transfert sélectif des liposomes aux cellules fongiques mais pas aux membranes des cellules de l'hôte traité. (CASS, A et col.1970); (VAN HOOGEVEST, P et DE KRUIJFF, B 1978); (BOLARD, J et col.1980); (CYBULSKA, B et BOROWSKI, E.1981); (VERTUT-CROQUIN, A et col.1983); (VERTUT-CROQUIN, A et col.1984); (CYBULSKA, B et col.1985); (HOPFER, R et col.1984); (HERVE, M et col.1985); (CLEJAN, S et BITTMAN, R.1985); (SZOKA, F.C.JR et col.1987).

• **La complexation de l'amphotéricine B avec les lipoprotéines du sérum sanguin humain**

Partant de l'idée que les lipoprotéines sériques sont des macromolécules susceptibles de présenter un certain nombre d'avantages :

- Une facilité d'incorporation de l'amphotéricine B dans leurs couches lipidiques en raison de la forte hydrophobicité de l'antifongique. Ce qui rend la molécule d'amphotéricine B plus soluble dans les milieux biologiques et peut ainsi diminuer sa toxicité.

- Une efficacité des lipoprotéines par suite d'un changement de distribution de l'amphotéricine B dans l'organisme, d'une modification de l'interaction amphotéricine B - cellules réceptrices ou d'une modification des quantités d'amphotéricine B interagissant avec les cellules réceptrices et cela du fait de la présence de cholestérol dans les molécules de lipoprotéines.

·D'où l'intérêt de les tester sur la cytotoxicité cellulaire.

La complexation de l'amphotéricine B avec les lipoprotéines du sérum sanguin humain reste jusqu'à présent un sujet discuté.

Les travaux de NORMAN et col.1972 ont montré que les antifongiques polyéniques interagissent avec le cholestérol libre dans l'ordre suivant : Filipine > Etrusco-mycine > Amphotéricine B > Nystatine = Pimaricine, alors qu'avec le cholestérol des membranes biologiques comme la membrane érythrocytaire l'ordre devient : Filipine > Amphotéricine B > Etrusco-mycine > Pimaricine = Nystatine.

Sur la base de l'interaction de l'amphotéricine B avec les stérols, KLIMOV, A.N et NIKIFOROVA, A.A. 1972 ont envisagé une interaction de l'amphotéricine B avec les lipoprotéines du sérum sanguin humain qui contiennent du cholestérol.

Des expériences conduites *in vitro* par BRAJTBURG, J et col.1984 et 1986, sur l'interaction de l'amphotéricine B avec des molécules transportrices de stérols (protéines et lipoprotéines du sérum sanguin) ont permis de mettre en évidence l'existence d'une interaction compétitive de l'amphotéricine B avec d'une part les stérols membranaires de la cellule hôte et du fongi, et, d'autre part avec les constituants du plasma sanguin à savoir les protéines et les lipoprotéines. Ceci entraîne une protection du globule rouge mais pas du *Candida albicans* dont la membrane plasmique contient de l'ergostérol.

Si les résultats ayant trait à l'action de l'amphotéricine B *in vitro* ont été satisfaisants, il n'en est pas de même avec les expériences menées *in vivo* qui ont révélées que l'amphotéricine B associée aux L.D.L (Low. Density. Lipoproteins) est plus toxique que l'amphotéricine B administrée seule (KOLDIN, M.H et col.1985).

Dans le cadre prometteur de ces essais d'incorporation de l'amphotéricine B dans des systèmes vecteurs notre choix a été orienté vers les lipoprotéines du sérum sanguin humain en large partie pour des raisons pratiques de moyens disponibles.

Partant des résultats contradictoires *in vivo* et *in vitro*, nous avons alors envisagé d'entreprendre une étude dans des conditions expérimentales soigneusement contrôlées, de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines du sérum sanguin humain.

Dans cet ensemble nous avons étudié les effets des caractéristiques des lipoprotéines utilisées : Nature des lipoprotéines (lipoprotéines lourdes ou H.D.L et lipoprotéines légères ou L.D.L), composition en stérols de ces lipoprotéines, de la concentration en antibiotique polyénique, de l'état d'énergisation des cellules cibles et de paramètres physico-chimiques du milieu extérieur tel que le pH.

Avant de commenter les résultats de nos travaux, nous allons donner d'abord un bref aperçu sur les lipoprotéines du sérum sanguin, domaine qui touche de près le sujet de recherche sur lequel nous travaillons.

## **2. LIPOPROTEINES DU SERUM SANGUIN**

### **2.1. Définition et propriétés**

Les lipoprotéines plasmatiques humaines sont des macromolécules constituées d'une part de lipides et d'autre part de protéines spécifiques connues sous le nom d'apolipoprotéines.

Le rôle physiologique des lipoprotéines est d'assurer le transport ainsi que la distribution des graisses d'origine exogène ou endogène et des substances liposolubles.

La structure de ces lipoprotéines n'est encore que partiellement connue, bien que les progrès récents soient très significatifs. On considère que leur noyau central est constitué de lipides hydrophobes comme le cholestérol estérifié et les triglycérides, alors que les constituants de surface sont le cholestérol libre, les phospholipides et les apolipoprotéines.

Ce revêtement externe hydrophile des lipoprotéines donne à ces structures riches en lipides une solubilité dans l'eau **figures N°5 et 6**.

### **2.2. Classification**

Sur la base de leur mobilité électrophorétique et de leur densité, reflet de leur composition lipidique (**tableau N°2**), on a défini quatre grandes classes de lipoprotéines (PUCHOIS, P et col.1985).

#### **2.2.1. Lipoprotéines lourdes (High Density Lipoproteins : H.D.L.)**

Elles ont une densité comprise entre 1,063 et 1,21 g/ml. Elles contiennent approximativement 50% de protéines et 50% de lipides (constitués eux-mêmes pour moitié de phospholipides, pour un quart de cholestérol estérifié pour 20% de triglycérides et pour 5% d'acides gras non estérifié). Elles assurent le transport sanguin des phospholipides et, à un degré moindre, du cholestérol.

#### **2.2.2. Lipoprotéines légères ( Low Density Lipoproteins : L.D.L)**

Elles ont une densité comprise entre 1,006 et 1,063 g/ml. Elles contiennent 25% de protéines pour 75% de lipides (constitués eux-mêmes par 20% de phospholipides, 15% de triglycérides, 50% de cholestérol estérifié, 12% de cholestérol libre et 3% d'acides gras non estérifié).

Ces lipoprotéines légères sont les principaux transporteurs sanguins du cholestérol depuis le foie jusqu'aux tissus périphériques.

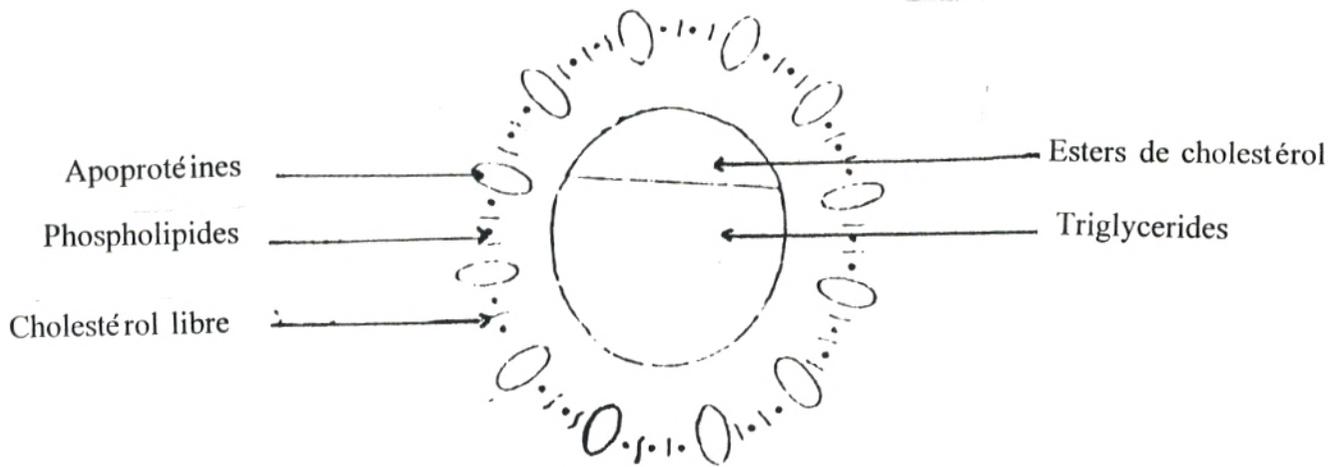
### **2.2.3. Lipoprotéines très légères (Very Low Density Lipoproteins: V.L.D.L)**

Leur densité est comprise entre 0,95 et 1,006g/ml. Elles sont composées de 10% de protéines et de 90% de lipides (constitués eux-mêmes par 20% de phospholipides, 15% de cholestérol estérifié, 8% de cholestérol non estérifié, 50% de triglycérides et 7% d'acides gras non estérifié). Elles assurent le transport sanguin des triglycérides depuis le foie jusqu'aux tissus périphériques.

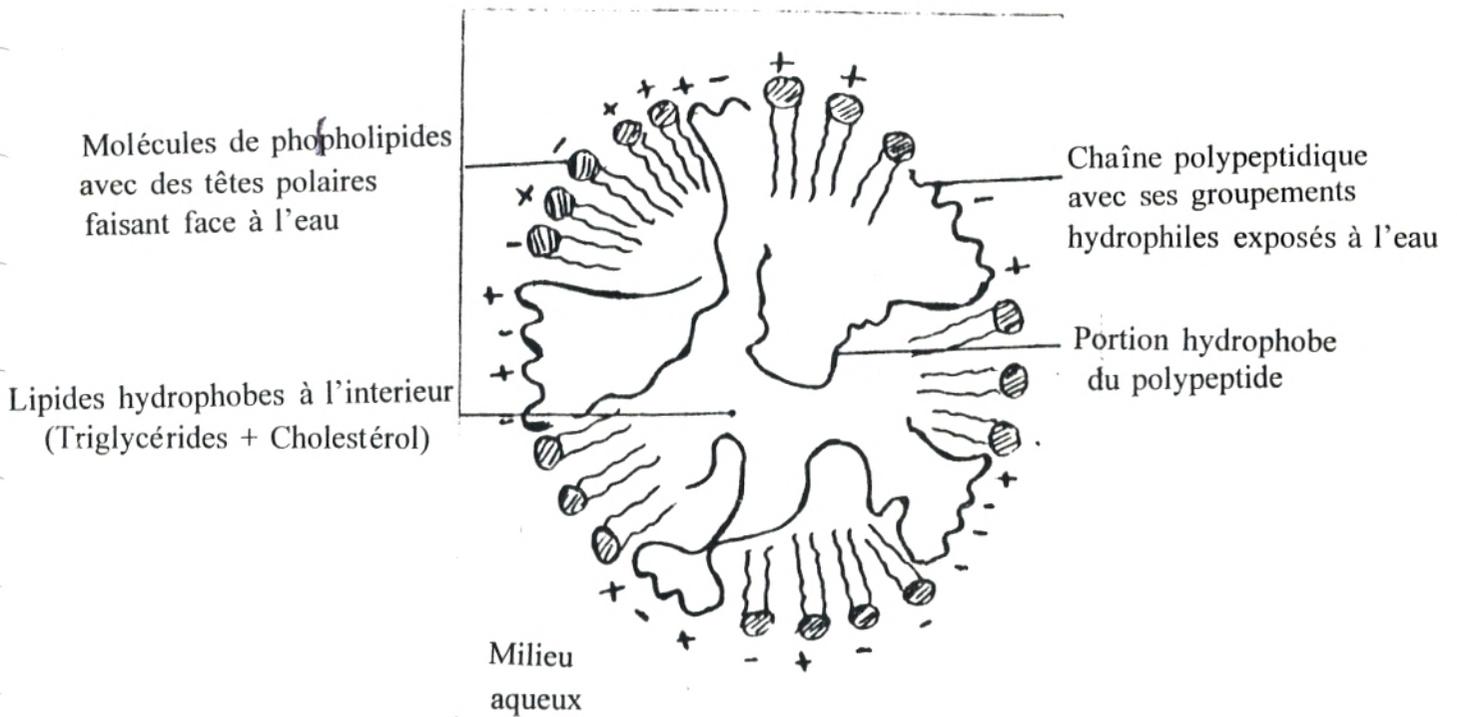
### **2.2.4. Chylomicrons et Lipomicrons**

Ce sont des particules de densité inférieure à 0,96g/ml. Ils ne contiennent que 1% de protéines pour 99% de lipides (constitués de 85% de triglycérides, 10% de phospholipides et 5% de cholestérol). Elles assurent le transport sanguin des triglycérides depuis l'intestin grêle jusqu'aux zones de dépôts lipidiques.

Ces différentes classes de lipoprotéines échangent continuellement entre elles des lipides.



**Figure N°5 :** Structure générale d'une lipoprotéine  
(GOLDSTEIN, J.L. et BROWN, M.S. 1971)



**Figure N°6 :** Représentation schématique d'une lipoprotéine plasmatique  
(LEHNINGER, A.L. 1982)

**Tableau N°2 : Caractéristiques des principales lipoprotéines**  
**BASDEVANT, A et col.(1984)**

Dénomination	Densité g/ml	Migration électrophorétique	Taille nm	Composition % poids/s					Apoprotéines	Origine	C.L./P.L
				TG	CL	CE	PL	P			
Chylomicron	0,94	Origine	100 à 1000	84	2	5	7	2	B C A	Intestin	0,28
V.L.D.L	0,94-1,006	Pré $\beta$	30 à 75	53	7	12	18	10	C1,2,3 B	Foie intestin	0,38
L.D.L	1,006-1,063	$\beta$	20	10	8	37	22	23	B	V.L.D.L	0,36
H.D.L.	1,063-1,21	$\alpha$	10 à 75	3	4	16	27	50	A1,2 C	Foie	0,14

T.G : Triglycérides  
 C.L : Cholestérol libre  
 C.E : Cholestérol estérifié  
 P.L : Phospholipides  
 P : Protéines

**DEUXIEME PARTIE**  
**MATERIEL ET METHODES**

## **1. MATERIEL BIOLOGIQUE**

Dans ce travail nous avons utilisé le globule rouge, modèle universel de cellule animale choisi pour les études de cytotoxicité.

Il s'agit du globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain.

## **2. METHODES**

### **2.1. Préparation des globules rouges :**

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 5000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé avec une solution saline (NaCl 150mM/l) tamponnée avec du tampon phosphate de sodium 10mM/l pH 7,4(P.B.S.), puis centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions, le culot ainsi obtenu est ressuspendu dans le même tampon.

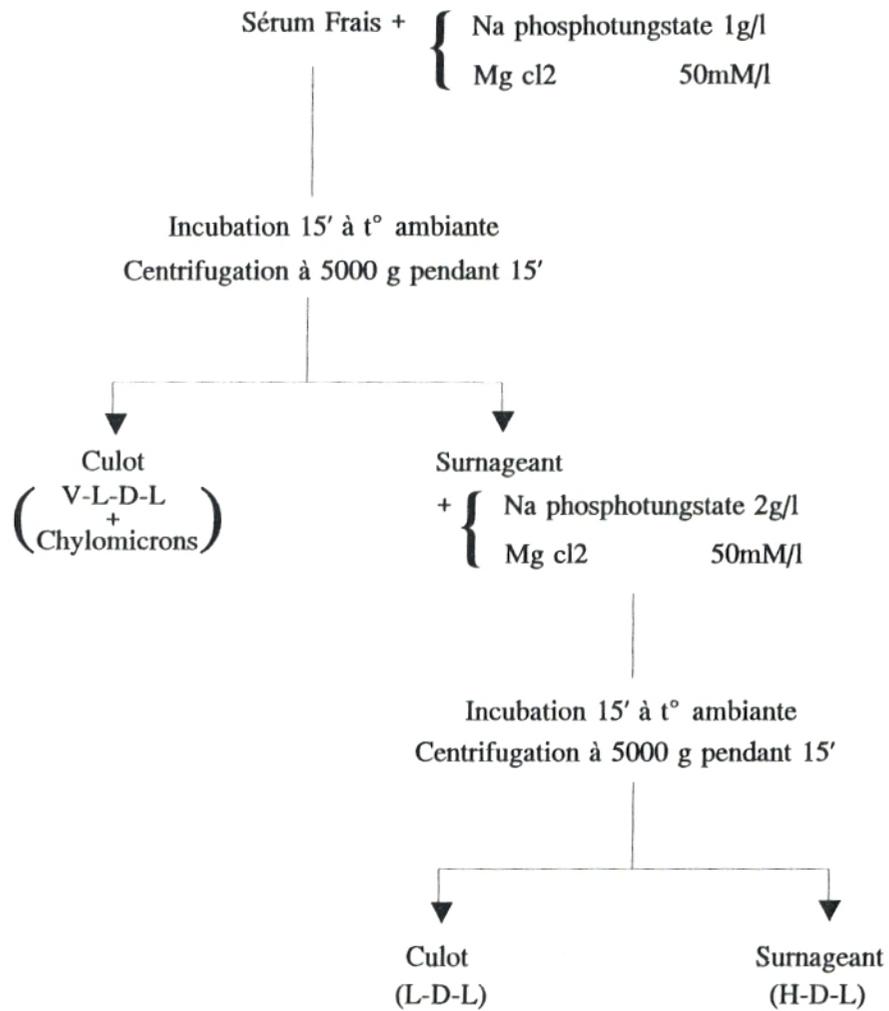
### **2.2. Préparation des lipoprotéines :**

Le sérum total frais a été collecté au niveau du service de Biochimie du Centre-Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

A ce dernier est ajoutée une solution d'acide phosphotungstique à la concentration finale de 1g/l et du chlorure de magnésium à 50mM/l. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, on centrifuge le milieu à 5000 tours/minute pendant 15 minutes. On récupère le surnageant qui contient les H.D.L. et les L.D.L, (les V.L.D.L et les chylomicrons restent dans le culot). A ce surnageant on ajoute de nouveau de l'acide phosphotungstique pour atteindre la concentration finale de 2g/l. Le chlorure de magnésium reste à 50mM/l.

Ces conditions permettent la précipitation des L.D.L que l'on récupère comme précédemment par centrifugation, les H.D.L sont récupérés dans le surnageant.

**Figure N°7.**(BURSTEIN, M et col.1970)



**Figure N°7 : Schéma de séparation des lipoprotéines par précipitation  
(BURSTEIN, M et col. 1970)**

#### **2.3.4. Résultats**

La lecture au densitomètre permet de visualiser 3 fractions de lipoprotéines sériques: H.D.L, L.D.L et V.L.D.L; les chylomicrons étant très rares. **Figures N°8 et N°9.**

#### **2.4. Préparation des solutions antifongiques**

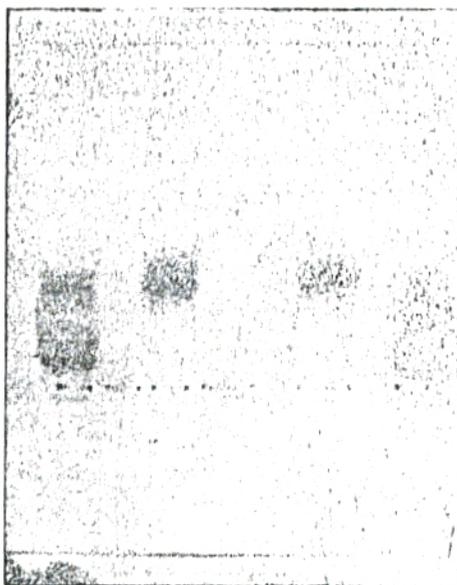
Les antifongiques pyéniques utilisés dans ce travail sont :

- Amphotéricine B : Provenant de chez SIGMA
- Fungizone : Forme commercialisée de l'amphotéricine B (SQUIBB) présentée sous forme de poudre et sa composition est la suivante :

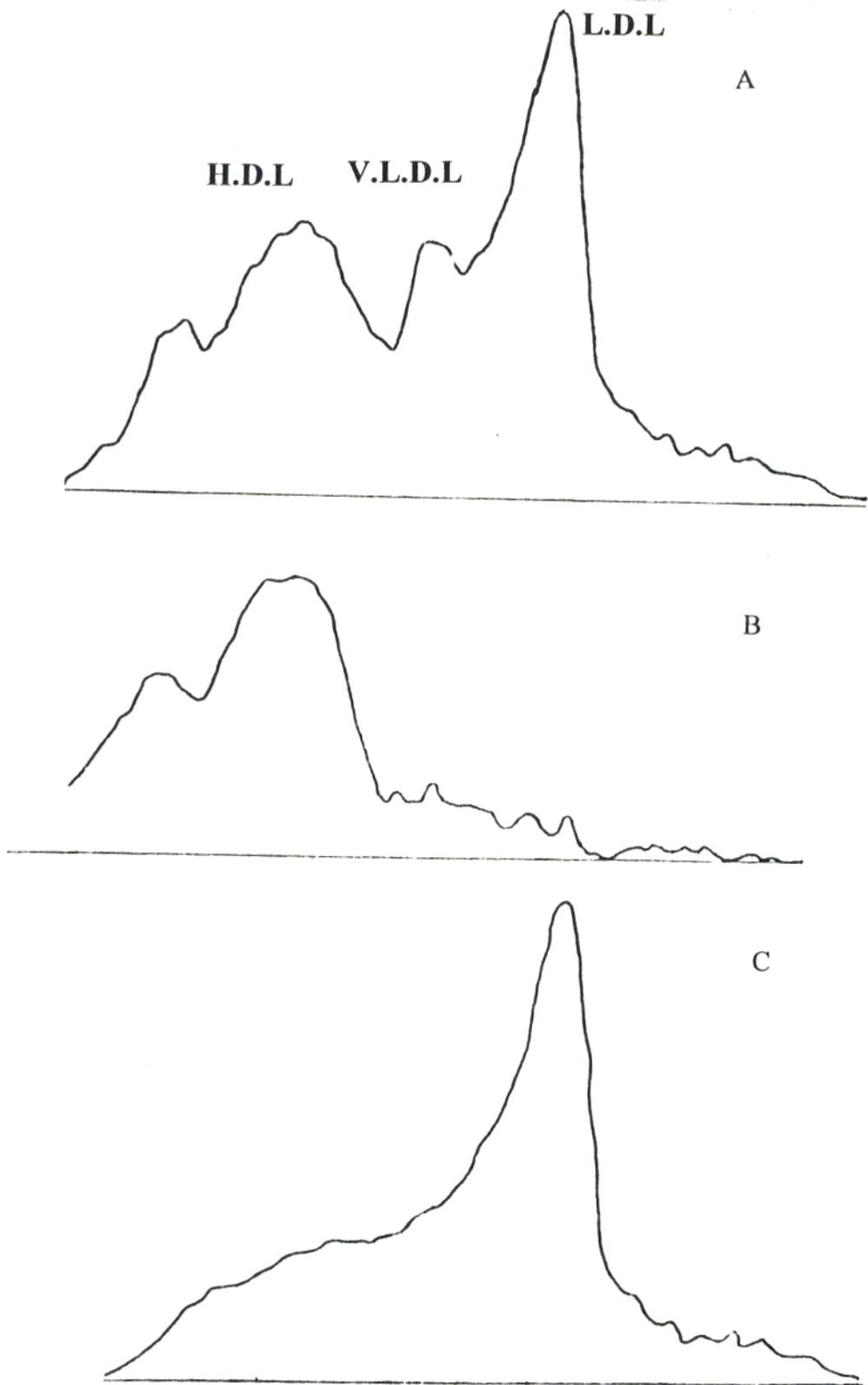
50% d'amphotéricine B, 38,75% de désoxycholate de sodium, qui facilite la solubilisation de l'amphotéricine B dans un milieu aqueux, 10% de phosphate disodique et 0,887% de phosphate monosodique. L'amphotéricine B est dissoute dans du diméthyl sulfoxyde (D.M.S.O). Les solutions ainsi préparées sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C pendant au moins 12 heures avant leurs utilisation pour assurer une meilleure solubilité et une bonne solubilisation.

#### **2.5. Dosage des protéines totales**

Le dosage des protéines totales a été effectué par la méthode de BIURET.



**Figure N°8 : Séparation des lipoprotéines par électrophorèse sur bandes d'acétate  
de cellulose**

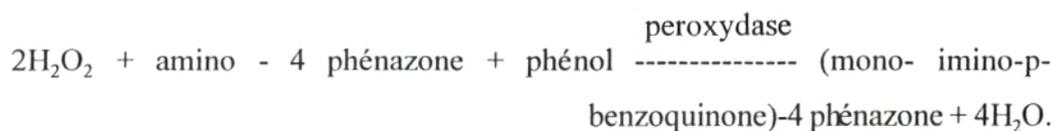
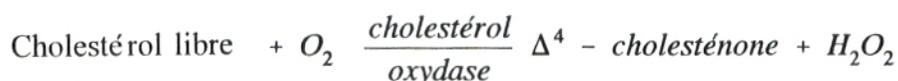
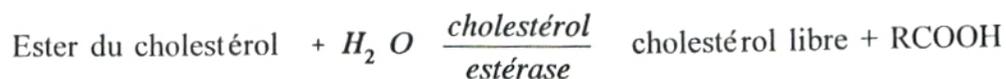


**Figure N°9 : Profils densitométriques des fractions lipoprotéiques**

**A : Sérum total B : H.D.L C : L.D.L**

## 2.6. Dosage du cholestérol total

### 2.6.1. Principe



### 2.6.2. Mode opératoire

Dans des tubes à essais, introduire :

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

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

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

### **2.6.3. Calcul**

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

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

### **2.7. Etude de la cytotoxicité**

Les globules rouges sont placés dans une solution saline (NaCl 150mM/l) tamponnée avec du tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4 a une concentration de 5% en présence d'amphotéricine B.

La préparation ainsi obtenue est placée dans un bain-marie à 37°C sous agitation.

Depuis le temps zéro qui correspond à l'addition de l'antifongique, on prélève 500µl de la solution réactionnelle auxquels on ajoute 4ml de la solution de lavage glacée (NaCl 150mM/l, MgCl<sub>2</sub> 2mM/l).

Après centrifugation pendant 5 minutes à 5000 tours/minutes, on récupère d'une part le surnageant sur lequel on dose l'hémoglobine libérée des globules rouges témoin de la lyse cellulaire, d'autre part, le culot sur lequel on dose le potassium intracellulaire.

#### **2.7.1. Etude de la lyse cellulaire**

La lyse cellulaire est suivie par dosage de l'hémoglobine libérée des cellules par mesure de la densité optique du surnageant à une longueur d'onde de 548,5 nm. L'appareil utilisé est le spectrophotomètre (Shimadzu).

#### **2.7.2. Dosage du potassium**

Le dosage du potassium est réalisé par photométrie de flamme au service de Biochimie du C.H.U de Tlemcen.

L'appareil utilisé est le spectrophotomètre de flamme (Eppendorf).

**TROISIEME PARTIE**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

L'amphotéricine B agit sur les cellules des eucaryotes et des procaryotes en perturbant l'organisation de leurs membranes plasmiques.

Comme tous les antifongiques polyéniques, l'amphotéricine B provoque une augmentation de la perméabilité cellulaire précédant la mort par fuite de certains constituants essentiels et/ou par la lyse de la cellule.

Il est largement admis que cet effet est lié à des interactions privilégiées entre les polyènes et les stérols membranaires. (DEACON, J.W.1980); (HERVE, M et col .1994). Il s'agit du cholestérol chez les cellules animales supérieures et de l'ergostérol chez les levures et les fongis.

De ces données, il semble ressortir que l'action antifongique et les effets toxiques de l'amphotéricine B seraient l'expression d'un même mécanisme d'action, à savoir la similarité d'interaction entre les polyènes et les stérols membranaires des deux types de cellules.

L'importante toxicité et le faible index thérapeutique de l'amphotéricine B ont amené les auteurs à proposer un certain nombre de solutions évoquées dans la partie introduction.

Sur la base des indications données ci-dessus et des caractéristiques de l'amphotéricine B, à savoir son insolubilité dans l'eau, son instabilité et sa haute toxicité, il nous a paru intéressant d'envisager parmi les nouvelles formulations possibles de cet antifongique : la forme complexée aux lipoprotéines du sérum sanguin.

L'utilisation de ces macromolécules circulantes présente en effet un certain nombre d'avantages : d'une part, par les couches lipidiques qu'elles renferment, les lipoprotéines offrent un environnement hydrophobe nécessaire à une meilleure solubilisation de l'amphotéricine B, d'autre part, par la présence de cholestérol, cible principale des antifongiques polyéniques, les lipoprotéines sériques humaines pourraient constituer un outil permettant d'améliorer l'index thérapeutique.

Cette amélioration peut être attendue sur la base des modulations possibles suivantes:

- modification des quantités d'amphotéricine B interagissant avec les cellules cibles suite à une répartition de l'antifongique libre introduite en phase aqueuse entre les levures ou fongis et les cellules animales de l'hôte.

- Un changement possible de distribution de l'amphotéricine B dans l'organisme. Les macromolécules vont se distribuer en fonction de leur affinité tissulaire et de leur métabolisme.

- Modification de l'interaction AmB-cellules cibles dans la mesure où vis-à-vis des lipides membranaires l'affinité de l'amphotéricine B libre serait différente de celle de l'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines sériques. Dans ce contexte, nous avons abordé quelques aspects des interactions amphotéricine B - lipoprotéines. Ces interactions conditionnées par les caractéristiques des lipoprotéines utilisées (composition lipidique, phospholipidique, en cholestérol libre, estérifié, type d'apoprotéines, rapport cholestérol libre/phospholipides, ...) sont susceptibles de modifier l'interaction polyène-cellules cibles, ou les quantités d'amphotéricine B interagissant avec les cellules cibles.

Dans le cadre de ce vaste travail, nous avons envisagé d'étudier l'influence de quelques paramètres sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain.

Notre choix a porté :

- Premièrement, sur la nature des lipoprotéines ; les lipoprotéines lourdes, H.D.L, et les lipoprotéines légères, L.D.L ont été testées en raison de leur différence de composition qualitative et quantitative en lipides et apoprotéines.

Pour cela, nous avons étudié, d'une part, l'effet protecteur du plasma sanguin total, et des lipoprotéines natives. D'autre part, nous avons testé l'effet de la variation du contenu des lipoprotéines en cholestérol sur la cytotoxicité aigüe induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain.

- Deuxièmement, sur la nature et le mode d'addition des stérols dans le milieu externe.

L'ergostérol et le cholestérol ont été les deux stérols utilisés dans nos protocoles expérimentaux soit sous forme libres, soit véhiculés par un transporteur, il s'agit, des lipoprotéines sériques et d'une protéine plasmatique (la sérum albumine bovine).

- Troisièmement, sur la concentration et le mode d'introduction de l'amphotéricine B.

Nous avons étudié d'une part, l'effet de concentrations croissantes d'amphotéricine B (de 0 à 10 µg/ml) sur la fuite potassique chez le globule rouge.

D'autre part, l'effet du mode d'addition de l'amphotéricine B soit complexée aux lipoprotéines, soit sous sa forme libre.

- Quatrièmement, sur l'état énergétique de la cellule. Pour ce faire, nous avons utilisé un composé énergétique, le glucose à une concentration de 20 mM/l.

- Cinquièmement, sur certaines conditions physico-chimiques du milieu externe notamment la valeur du pH. Nous avons étudié l'effet de trois pH différents (5,4, 6,4 et 7,4) sur la toxicité de l'amphotéricine B.

### **1. EFFET DE LA NATURE DES LIPOPROTEINES**

Le fait que les lipoprotéines du sérum sanguin renferment dans leur partie lipidique des phospholipides et du cholestérol dont une partie est sous forme non estérifiée confèrent à ces macromolécules deux propriétés :

- D'une part, ces particules sont susceptibles d'échanger les lipides cités plus haut avec les cellules que l'on met à leur contact; le sens des échanges lipidiques est conditionné par les valeurs relatives chez la particule lipoprotéique et chez la cellule cible du rapport cholestérol libre/phospholipides (BRAJTBURG, J et col.1984); (SILBERNAGL, S et DESPOPOULOS, A.1985), et par la composition quantitative et qualitative de la partie protéique de la lipoprotéine vectrice.

- D'autre part, elles offrent par l'intermédiaire des molécules de cholestérol libre qu'elles renferment des sites de complexation à l'amphotéricine B modulant ainsi la concentration d'antifongique libre dans le milieu externe.

Comme les lipoprotéines lourdes, H.D.L et les lipoprotéines légères, L.D.L, différent tant par leur composition qualitative et quantitative en lipides et en protéines, que par leur rapport cholestérol libre/phospholipides, leur comportement dans des interactions avec l'amphotéricine B et des cellules cibles sera probablement différent.

Etant donné que ces interactions conditionnent les phénomènes de toxicité, la question qui se pose alors est de savoir si la nature de la lipoprotéine utilisée joue un rôle dans la modulation de la toxicité aiguë induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain.

Les tests de cytotoxicité portent sur la perméabilité au potassium et sur la lyse cellulaire suivie par la libération de l'hémoglobine que nous avons dosée par méthode spectrophotométrique.

Dans les expériences qui suivent les cellules de globules rouges isolées à partir du sang fraîchement collecté d'un donneur unique sain, sont ressuspendues dans une solution saline isotonique tamponnée à pH 7,4.

Ces cellules riches en potassium (concentration moyenne de l'ordre de 125mM/l d'eau intracellulaire) sont incubées en présence ou en l'absence de plasma total ou d'une fraction lipoprotéique H.D.L ou L.D.L avec ou sans amphotéricine B.

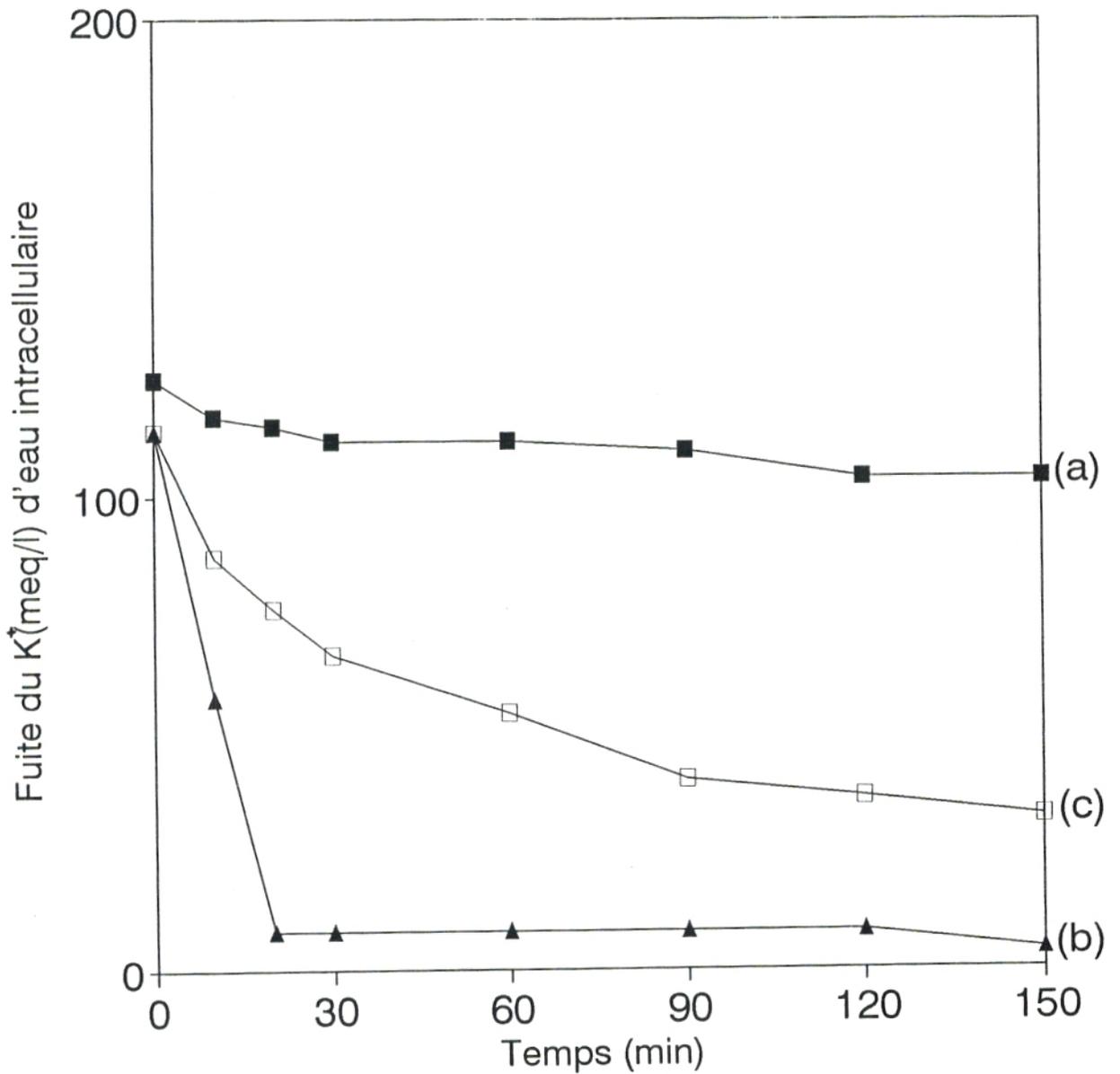
Il faut préciser que l'amphotéricine B est d'abord préincubée pendant une heure à 37°C avec les lipoprotéines avant d'être ajoutée à la suspension érythrocytaire de travail. Les fractions lipoprotéiques sont isolées à partir du sérum sanguin frais par méthode de précipitation décrite dans la partie matériel et méthodes.

### **1.1. Perméabilité au potassium**

Dans un premier temps nous avons testé l'effet de la présence de plasma sanguin humain total dans le milieu d'incubation sur la perméabilité cellulaire du globule rouge au potassium induite par 5 µg/ml d'amphotéricine B. Le plasma sanguin étant une solution ionique tamponnée à pH 7,4, isotonique au globule rouge et renfermant des protéines et diverses lipoprotéines.

La **figure N°10** représente la fuite du potassium intracellulaire en fonction du temps en présence et en l'absence de plasma total. Sur la base des résultats obtenus, il ressort clairement que :

- Des globules rouges fraîchement collectés renferment 125mM de K<sup>+</sup>/l d'eau intracellulaire (ou 175mM/mg de protéines cellulaires), incubés à 37°C en l'absence d'amphotéricine B, et en présence d'une source d'énergie comme le glucose à une concentration de 20mM/l, n'ont pas perdu plus de 20% de leur potassium interne après 2<sup>h</sup> 30 min de temps (courbe a).



Courbe (a) : Contrôle : globule rouge seul

Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml

Courbe (c) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + Plasma total

**Figure N°10** : Effet du plasma total sur la cytoxicité induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain

• L'addition d'amphotéricine B (5µg/ml) seule entraîne chez le globule rouge une fuite massive de potassium intracellulaire (courbe b) : En 20 minutes d'incubation à 37°C, le potassium retenu par les cellules est inférieur ou égale à 10% du contrôle sans antifongique et sans plasma total soit environ 4mM de K<sup>+</sup> /l d'eau intracellulaire.

Au bout de 2<sup>h</sup> 30 min, le taux de potassium intracellulaire n'est plus que de 4%, dans ces conditions les globules rouges ont donc perdu tout leur potassium.

Lorsque l'amphotéricine B à été préincubée une heure avec du plasma total puis ajoutée sous cette forme complexée dans le milieu d'essai contenant des globules rouges (courbe c), la perméabilité au potassium est significativement réduite : En 20 minutes d'incubation à 37°C, les cellules retiennent 70% du maximum de leur potassium intracellulaire par rapport au contrôle ne contenant ni plasma ni antifongique (courbe a). Au bout de 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation, les globules rouges retiennent encore plus de 30% de leur potassium.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de la présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, puis des lipoprotéines légères, L.D.L, dans le milieu externe sur la modification de distribution transmembranaire de potassium induite par 5µg/ml d'amphotéricine B.

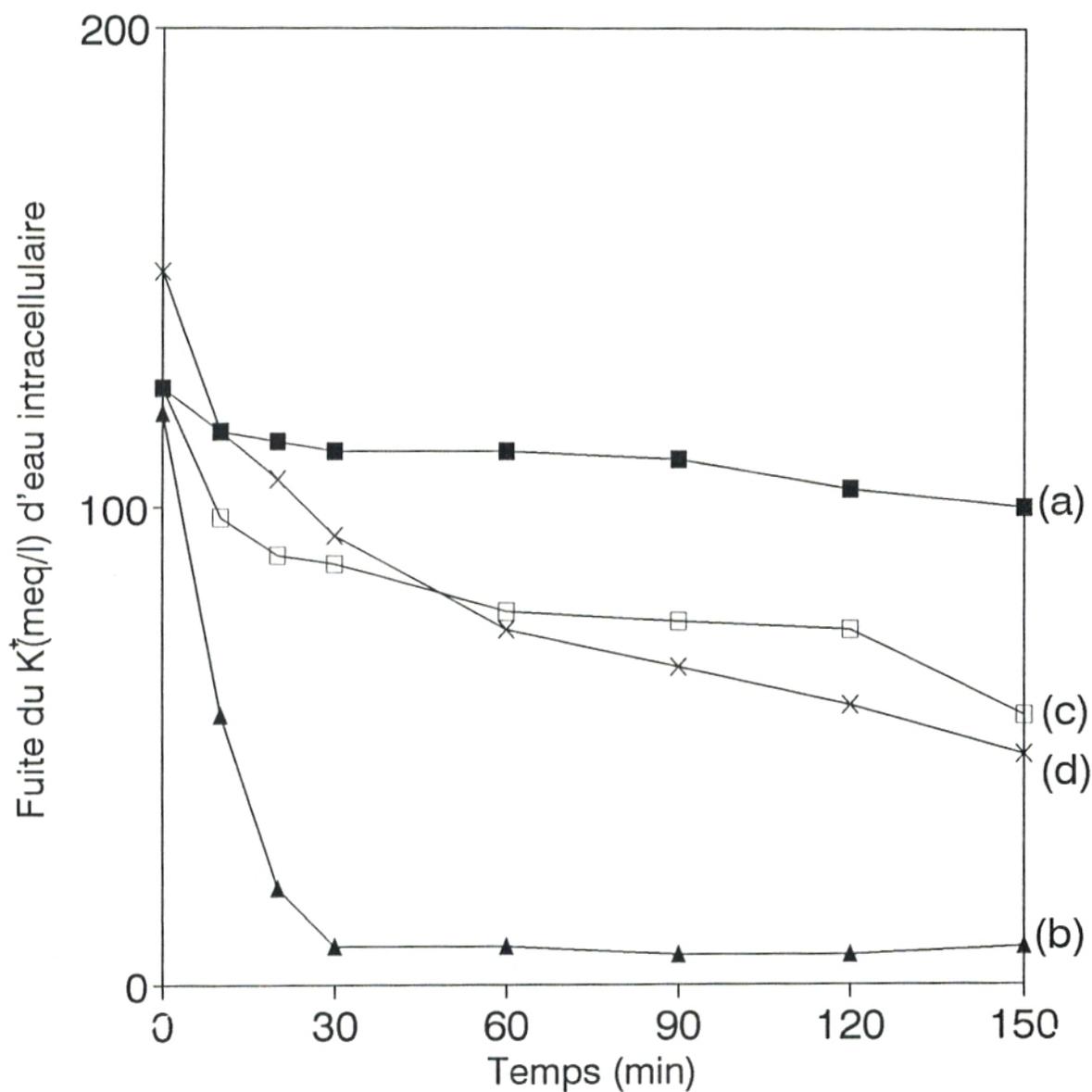
Les concentrations des lipoprotéines utilisées sont équivalentes à celles du plasma sanguin. Les résultats obtenus sont rassemblés sur la **figure N°11**.

Nous constatons que :

• L'amphotéricine B seule est très toxique (courbe b). La fuite du potassium intracellulaire est très rapide, et au bout de 60 minutes d'incubation il n'y a plus que 4% de potassium retenu par les cellules par rapport au contrôle sans antifongique et sans lipoprotéines (courbe a).

• En présence de lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbe c), la fuite du potassium est fortement inhibée. Au bout de 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation les cellules retiennent 60% de leur potassium.

• En présence de lipoprotéines légères, L.D.L, (courbe d), la fuite du potassium est réduite, mais cette réduction reste inférieure tant sur le plan cinétique qu'à l'état stationnaire à celle observée avec les H.D.L.



Courbe (a) : Contrôle : Globule rouge seul  
Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5μg/ml  
Courbe (c) : Globule rouge + AmB à 5μg/ml + H.D.L.  
Courbe (d) : Globule rouge + AmB à 5μg/ml + L.D.L.

**Figure N°11** : Effet de la nature des lipoprotéines sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain

Après 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation 37°C les globules rouges retiennent 50% de leur potassium.

Ces résultats montrent qu'en ce qui concerne la perméabilité potassique dans nos conditions expérimentales, les lipoprotéines isolées à partir du sérum sanguin humain ont pour les hématies un effet protecteur significativement supérieur à celui du plasma total, d'autre part, les H.D.L, réduisent la cytotoxicité de manière plus importante que les L.D.L.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de l'équipe de BRAJTBURG (BRAJTBURG, J et col.1984);(BRAJBURG,J et col.1986) qui confirment que les lipoprotéines légères, L.D.L, protègent le globule rouge de l'action toxique de l'amphotéricine B mieux que ne le font les lipoprotéines lourdes, H.D.L. Selon ces mêmes auteurs, pour inhiber la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge humain, les lipoprotéines lourdes nécessitent un rapport cholestérol des lipoprotéines/antifongique plus élevé que celui des lipoprotéines légères. De ce fait, il passe de 20,7 pour les L.D.L à 102,0 pour les H.D.L.

### **1.2. Hémolyse**

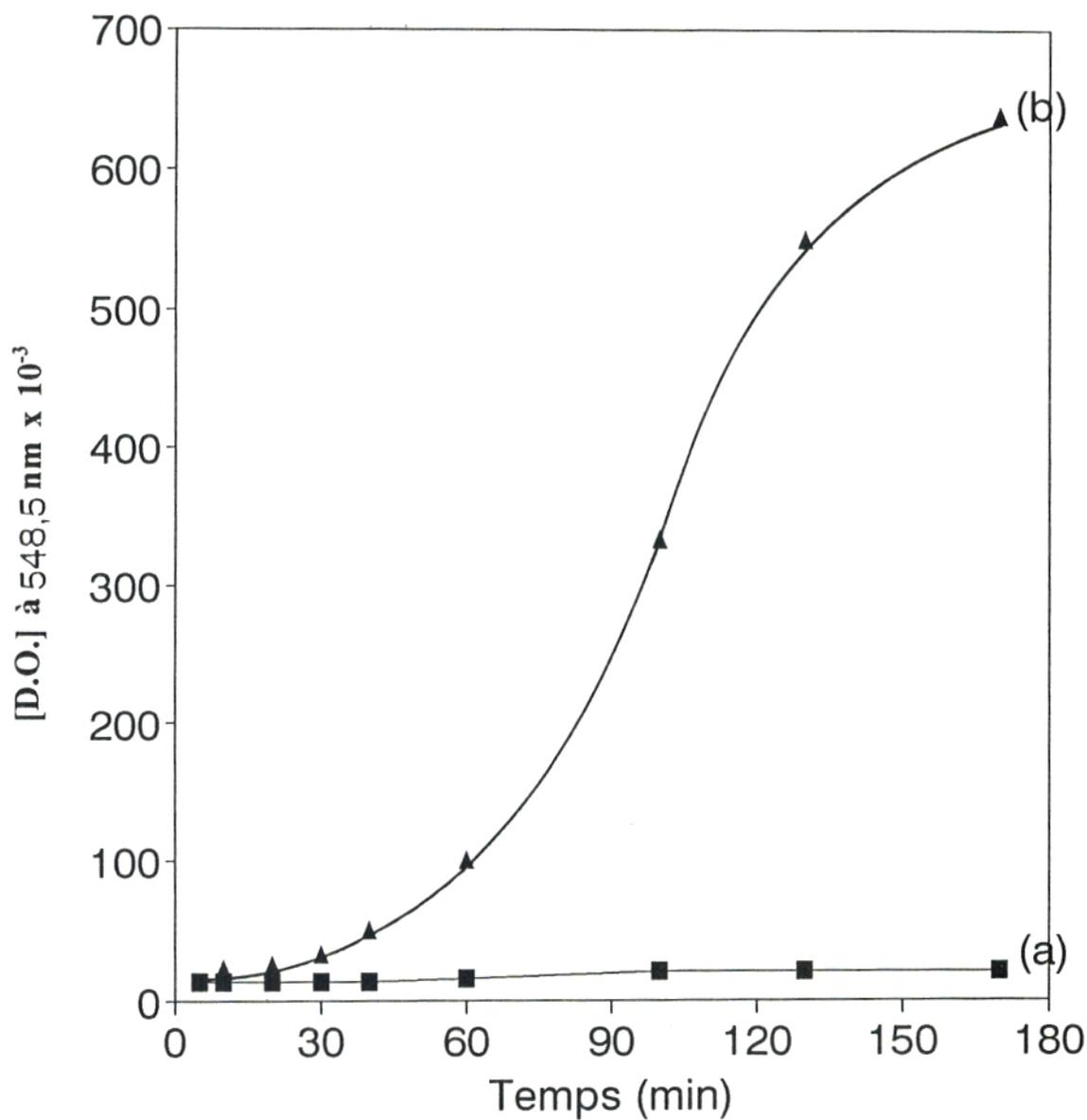
Sur la base de la condition expérimentale décrite ci-dessus qui nous a permis de contrôler les niveaux de protection des globules rouges contre la toxicité aigüe de l'amphotéricine B et ce au niveau de la perméabilité au potassium, il était nécessaire d'exploiter par ce biais le contrôle du niveau de protection contre l'hémolyse induite par cet antifongique. La **figure N° 12** montre la fuite de l'hémoglobine en fonction du temps en présence et en l'absence d'amphotéricine B à la concentration de 5µg/ml sans addition de lipoprotéines.

Nous constatons qu'en l'absence d'amphotéricine B (courbe a), les globules rouges retiennent leur hémoglobine.

En présence d'antifongique(courbe b), après 30 minutes d'incubation à 37°C, la fuite de l' hémoglobine est presque nulle mais qu'elle augmente progressivement pour atteindre les 100% par rapport au contrôle sans antifongique au bout de 3 heures d'incubation.

Nous avons réalisé par la suite, la même expérience mais cette fois-ci en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes,H.D.L.

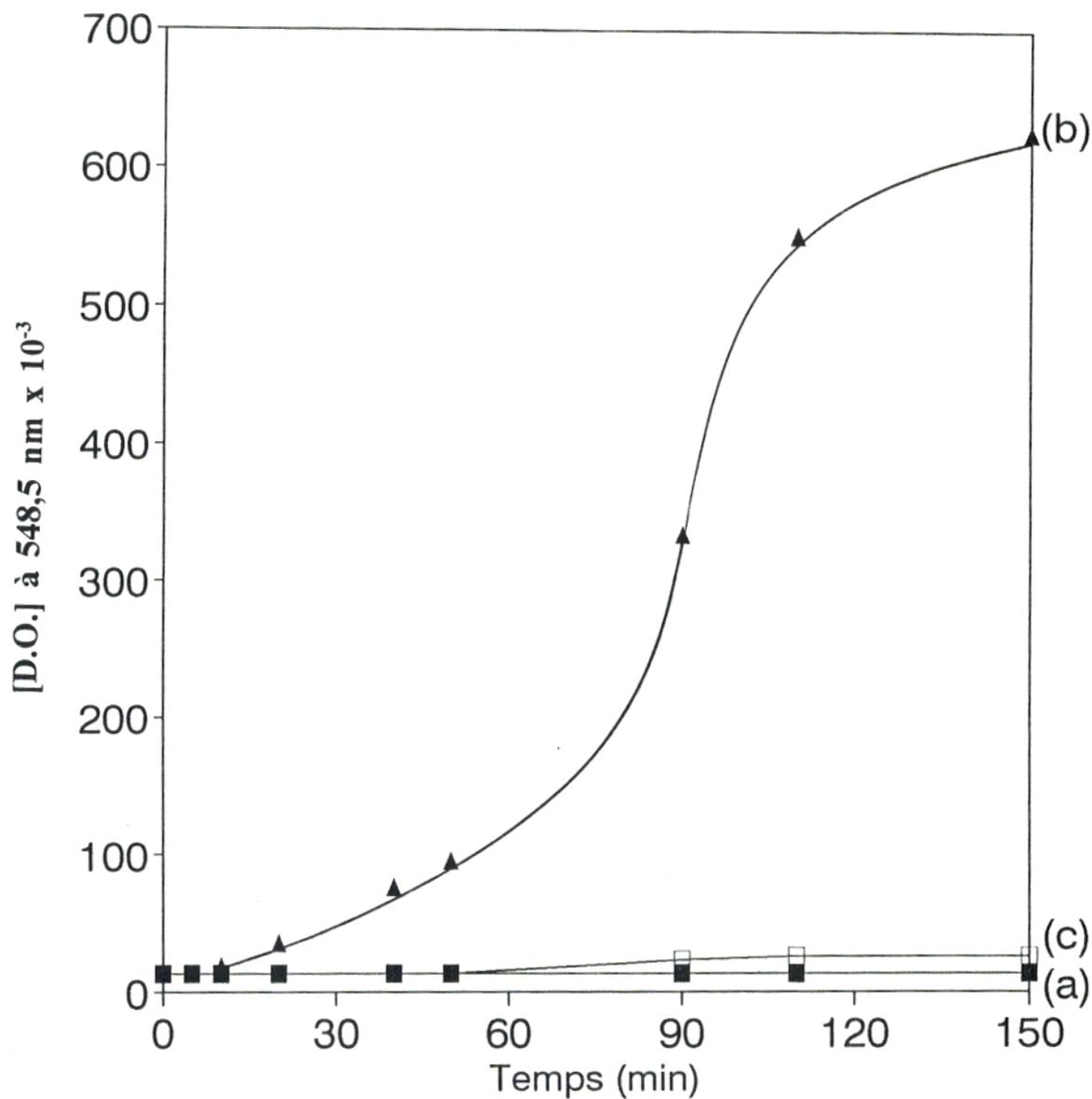
Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure N° 13**.



Courbe (a) : Contrôle : Globule rouge seul

Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml

**Figure N°12** : Effet de l'amphotéricine B sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez le globule rouge humain



Courbe (a) : Contrôle : Globule rouge seul

Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5 $\mu$ g/ml

Courbe (c) : Globule rouge + AmB à 5 $\mu$ g/ml + H.D.L

**Figure N°13** : Effet de l'amphotéricine B sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire en présence de lipoprotéines lourdes, H.D.L.

Nous remarquons que les lipoprotéines lourdes diminuent significativement la fuite de l'hémoglobine. En effet, après 3 heures d'incubation à 37°C et en absence de lipoprotéines (courbe b), les cellules se vident complètement de leur hémoglobine, par contre, l'addition des H.D.L (courbe c) inhibe cette fuite qui reste pratiquement constante et ne dépasse pas les 4% par rapport au contrôle sans lipoprotéines.

Nous pouvons conclure que l'effet protecteur des lipoprotéines est plus important sur l'hémolyse que sur la fuite potassique. En effet, à une concentration d'amphotéricine B égale à 5µg/ml en présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, les globules rouges humains retiennent 60% de leur potassium après 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation, par contre la fuite de l'hémoglobine est très faible, elle est de 4% après 3 heures d'incubation à 37°C.

### **1.3. Conclusion**

Les résultats obtenus jusqu'à ce niveau montrent clairement que les deux types de lipoprotéines sériques que nous avons testés (lipoprotéines lourdes et lipoprotéines légères) diminuent la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge humain mais que les lipoprotéines lourdes, H.D.L, protègent mieux la cellule animale que ne le font les lipoprotéines légères, L.D.L.

Cela peut être expliqué par le fait que les H.D.L se chargent en cholestérol non estérifié (site d'action de l'amphotéricine B), alors que les L.D.L livrent le cholestérol aux cellules cibles (MEYER, P.1983). D'autre part, l'effet protecteur des lipoprotéines lourdes, H.D.L, atteint 100% lorsque celles-ci existent en concentrations équivalentes ou voisines de celles du sérum sanguin natif.

### **2. EFFET DOSE-REPONSE**

Dans le but de déterminer les conditions expérimentales optimales de protection du globule rouge contre les effets toxiques de l'amphotéricine B, nous avons entrepris une étude de l'effet de doses croissantes de lipoprotéines ou d'antifongique.

Nous avons vu ci-dessus que les lipoprotéines étaient, d'une part, capables d'échanger leurs lipides avec les cellules avec lesquelles elles étaient mises en contact, d'autre part, d'offrir par l'intermédiaire du cholestérol non estérifié qu'elles renferment des sites de fixation à l'amphotéricine B.

En théorie, ces propriétés peuvent permettre de moduler les interactions amphotéricine B - cellules cibles. Ce qui permettrait de contrôler chez le globule rouge les phénomènes de toxicité liés à ces interactions.

Sur la base des résultats expérimentaux obtenus ci-dessus et des propriétés des lipoprotéines, la quantité d'amphotéricine B mise à disposition pour une interaction avec des cellules cibles peut être modulée de deux façons différents :

- Soit en faisant varier la concentration de lipoprotéines dans le milieu, celle de l'amphotéricine B restant constante.
- Soit inversement, en faisant varier la concentration d'amphotéricine B, celle des lipoprotéines restant fixe.

Les résultats que nous avons obtenus en utilisant ces deux protocoles sont décrits ci-dessous :

### **2.1. Effet de concentrations croissantes de lipoprotéines sur l'amplitude des phénomènes toxiques induits par l'amphotéricine B.**

En utilisant une concentration fixe de 2µg/ml d'amphotéricine B, et en faisant varier les concentrations des lipoprotéines sériques, nous avons mesuré les niveaux intracellulaires de potassium des globules rouges humains. Le paramètre perméabilité au potassium  $P(K^+)$  a été utilisé du fait de sa plus grande sensibilité comme test de sensibilité à l'amphotéricine B.

Mais, il nous a paru nécessaire de nous assurer de deux préalables expérimentaux. Nous avons vérifié que:

- D'une part, en l'absence de lipoprotéines, la concentration de 2µg/ml d'amphotéricine B est suffisante pour induire l'effet toxique aussi bien chez le globule rouge que chez *Saccharomyces cerevisiae*, cellule utilisée comme modèle de levure.

Les **figures N°14** et **N°15** illustrent clairement l'efficacité de l'antifongique dans les conditions expérimentales choisies. En effet les courbes a et b de la **figure N°14** montrent que l'amphotéricine B ajoutée dans le milieu de culture à la concentration de 2µg/ml au temps zéro de la culture c'est à dire en même temps que l'inoculum induit une augmentation de la phase de latence et du temps de génération qui passent respectivement de 2 à 9 heures et de 40 minutes à 3<sup>h</sup> 40 min.

La même concentration provoque une fuite massive du potassium intracellulaire chez le globule rouge humain.

Il ressort de la **figure N°15** courbes a et b, que les niveaux de potassium intracellulaires passent de 100% à 40% après 30 minutes d'incubation à 37°C. Au bout de 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation ce niveau reste fixe et égale à 40%

• D'autre part, en présence de lipoprotéines, à des concentrations équivalentes aux concentrations du sérum sanguin, l'amphotéricine B à 2µg/ml garde sa toxicité vis-à-vis des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* les résultats affirmatifs sont montrés sur la **figure N°14** courbes c et d .

En effet, en l'absence d'amphotéricine B, nous avons noté une stimulation de la croissance de la levure qui est due à la présence dans le milieu de culture des H.D.L, structures qui renferment des lipides et des protéines.

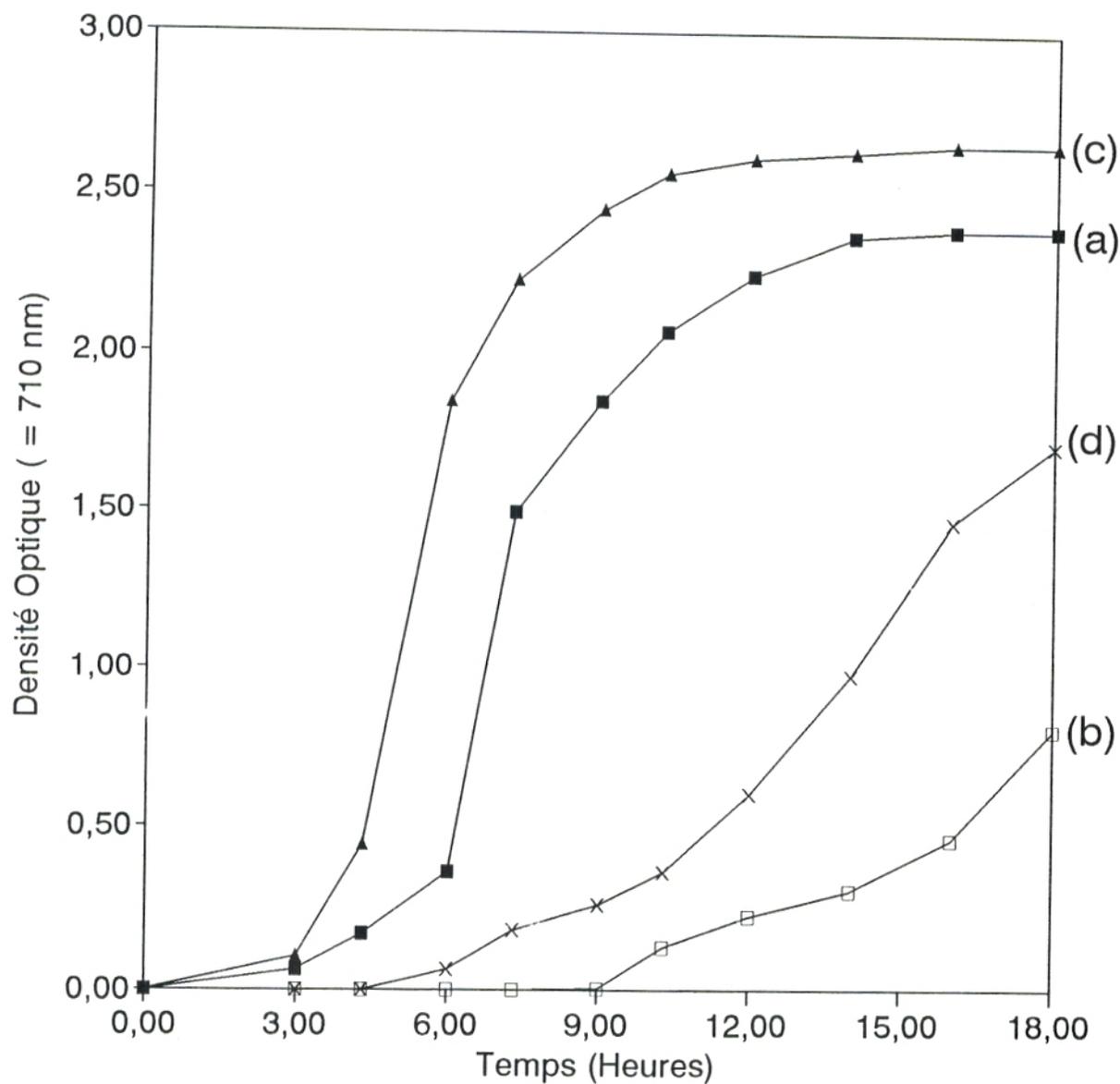
L'addition d'amphotéricine B dans le milieu de culture au temps zéro de la culture provoque une forte inhibition de la croissance. La phase de latence et le temps de génération passent respectivement de 1<sup>h</sup> 20 min à 4<sup>h</sup> 30 min et de 30 minutes à 3<sup>h</sup> 30 min.

Sur la **figure N°16** sont représentés les résultats obtenus en faisant varier la concentration de lipoprotéines suivie par le taux de cholestérol total qu'elles renferment tout en maintenant la concentration d'amphotéricine B à la valeur de 2µg/ml.

Nous remarquons d'abord qu'en présence de 2µg/ml d'amphotéricine B mais en l'absence de lipoprotéines, la concentration de potassium retenu dans les cellules représente seulement 14% de la concentration potassique chez les cellules intactes qui n'ont pas été traitées ni à l'amphotéricine B ni aux lipoprotéines.

Ensuite, lorsque la concentration de lipoprotéines exprimée en mg de cholestérol/l de milieu augmente de 0 à 100mg/l, les niveaux de potassium intracellulaires varient progressivement de 14 à 80% du niveau contrôle (correspondant à celui des cellules intactes n'ayant subi aucun traitement).

Au delà de 100mg de cholestérol/l de milieu, le niveau de potassium interne atteint rapidement un maximum. La protection maximale des globules rouges mis en présence d'amphotéricine B complexée aux lipoprotéines légères, L.D.L, (courbe a), est seulement de 85% en comparaison avec les cellules intactes.



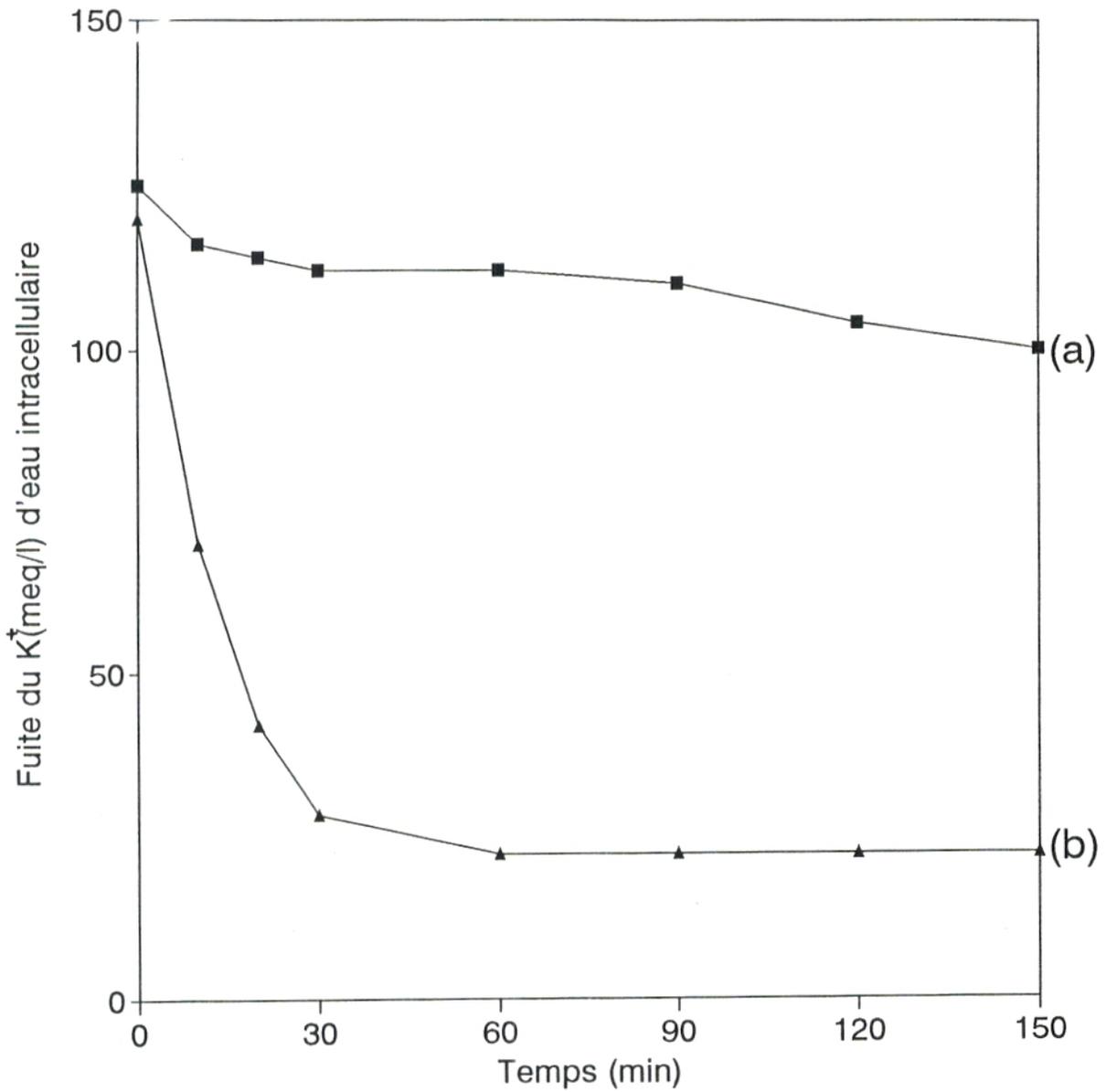
Courbe (a) : *Saccharomyces cerevisiae* seule

Courbe (b) : *Saccharomyces cerevisiae* + AmB à 2 $\mu$ g/ml

Courbe (c) : *Saccharomyces cerevisiae* + H.D.L

Courbe (d) : *Saccharomyces cerevisiae* + AmB à 2 $\mu$ g/ml + H.D.L

**Figure N°14** : Effet de l'amphotéricine B sur la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* en présence et en l'absence de lipoprotéines lourdes, H.D.L.



Courbe (a) : Contrôle : Globule rouge seul  
Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 2  $\mu\text{g/ml}$

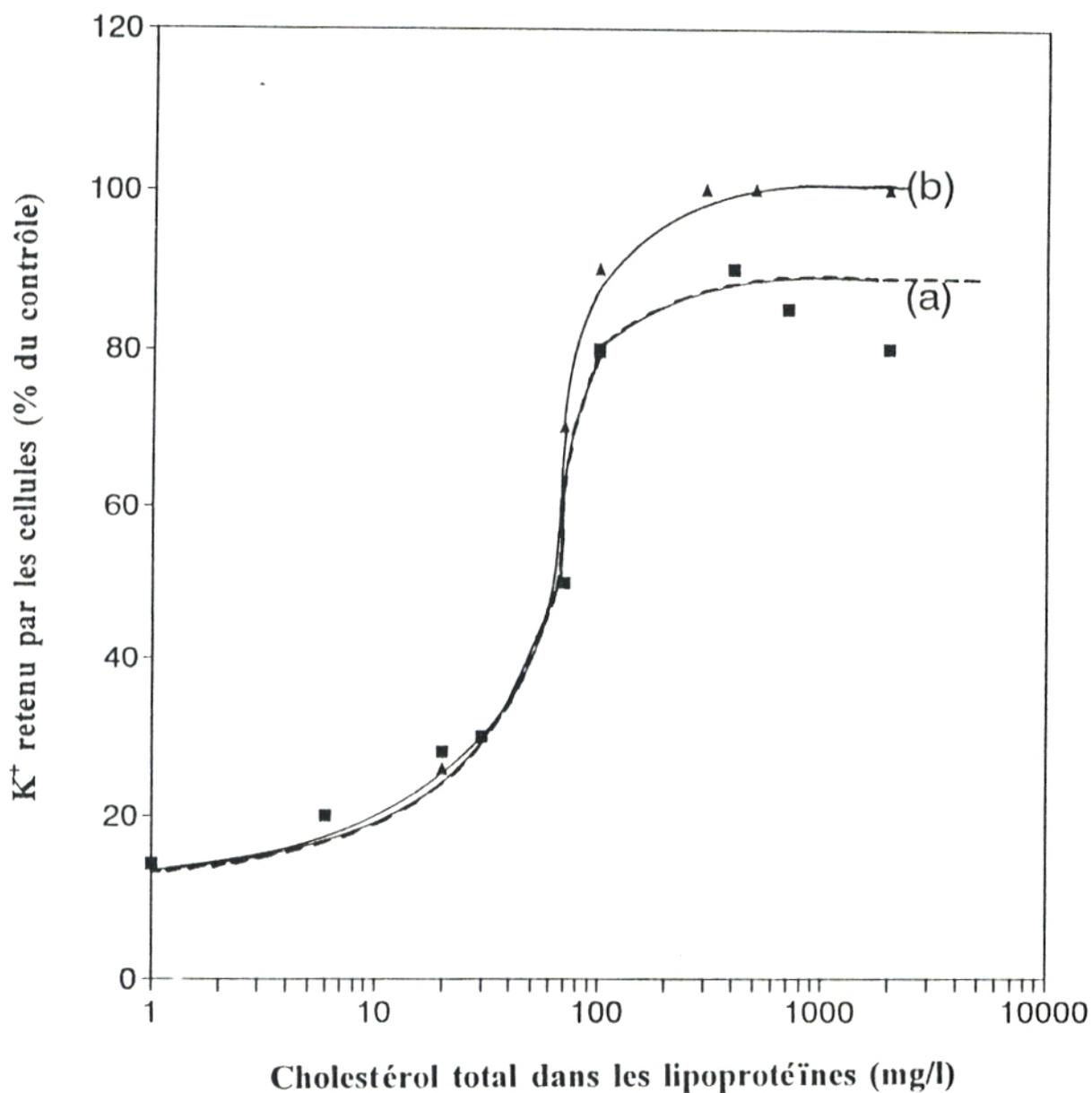
**Figure N°15** : Effet de l'amphotéricine B sur la fuite du potassium chez le globule rouge humain

Alors qu'en présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbe b), la protection des globules rouges contre l'effet de perméabilisation de l'amphotéricine B est totale : Dans ce cas, les cellules gardent en effet l'intégralité de leur contenu potassique.

Nous pouvons conclure qu'une augmentation progressive d'un facteur 6 de la protection du globule rouge est observée entre l'état des cellules non protégées et l'état de cellules totalement protégées.

Les résultats que nous avons obtenus en utilisant l'amphotéricine B ne concordent pas avec ceux rapportés par BRAJTBURG, J et col.(1986) qui ont utilisé un autre antifongique polyénique à grand macrocycle, il s'agit de la nystatine. Ils ont remarqué que: En présence des lipoprotéines légères, L.D.L, pour des concentrations en cholestérol non estérifié allant de 0 à 100 mg de cholestérol/l de milieu les niveaux de potassium intracellulaire des globules rouges passent de 20% à 80% . Au delà de 100mg de cholestérol libre/l de milieu, ce niveau reste fixe est égale à 80% de potassium intracellulaire. Alors qu'en présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, pour des concentrations en cholestérol libre allant de 0 à 50mg /l de milieu, les niveaux de potassium intracellulaire passent de 20% à 40%. Lorsque la concentration en cholestérol non estérifié passe de 50 à 100mg/l de milieu, les niveaux de potassium intracellulaire passent de 40% à 80% .

Sur la base des effets observés aux faibles concentrations de cholestérol libre (< 100mg/l de milieu), ces auteurs ont conclu que les lipoprotéines légères, L.D.L, protègent mieux le globule rouge que les lipoprotéines lourdes, H.D.L. Par contre, les effets observés aux concentrations élevées de cholestérol (> 100mg/l de milieu), ne sont pas commentés par les auteurs. Et à ces concentrations élevées de cholestérol, nous avons remarqué sur la figure résumant leur résultats que les H.D.L assurent une meilleure protection du globule rouge que ne le font les L.D.L.



Courbe (a) : Globule rouge + AmB à 2 $\mu$ g/ml + L.D.L.

Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 2 $\mu$ g/ml + H.D.L.

**Figure N°16** : Effet de concentrations croissantes de cholestérol non estérifié des lipoprotéines sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain

## **2.2. Effet de concentrations croissantes d'amphotéricine B sur l'amplitude des phénomènes toxiques**

Sur la base des résultats précédents, il est clair que pour une concentration d'amphotéricine B égale à 2µg/ml c'est à dire 2 fois la concentration minimale inhibitrice (C.M.I), l'effet toxique sur le globule rouge humain est nettement réduit en présence des lipoprotéines natives. La question qui se pose alors est de savoir si ces macromolécules utilisées à des concentrations équivalentes à celles du sérum sanguin humain conservent le même effet protecteur pour des concentrations d'antifongique supérieures à 2µg/ml.

Pour cela, nous avons réalisé une série d'expériences avec des concentrations croissantes d'amphotéricine B et nous avons suivi la perméabilité aux ions K<sup>+</sup> et l'hémolyse en l'absence et en présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L natives.

### **2.2.1. Perméabilité au potassium**

Les résultats relatifs à la perméabilité des globules rouges au potassium à différentes concentrations d'amphotéricine B en l'absence et en présence de lipoprotéines lourdes, H.D.L, sont représentés sur la **figure N°17**.

Nous pouvons noter que :

- En l'absence de lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbe a), lorsque la concentration en antifongique passe de 0 à 1µg/ml, (concentration minimale inhibitrice de l'amphotéricine B) la fuite du potassium intracellulaire est massive. Elle varie de 0% à 70% par rapport au contrôle correspondant aux cellules n'ayant été prétraitées ni à l'amphotéricine B ni aux lipoprotéines lourdes, H.D.L. Au delà de cette concentration (1µg/ml), la fuite potassique est presque totale et atteint un maximum de 80% pour une concentration d'amphotéricine B égale à 10µg/ml.

• En présence de lipoprotéines lourdes, H.D.L utilisées à des concentrations équivalentes à celles du sérum natif (courbe b), pour des concentrations sub-inhibitrices d'amphotéricine B (de 0 à 1µg/ml) les cellules retiennent tout leur potassium.

La fuite potassique est nulle. Lorsque la concentration d'amphotéricine B augmente de 2 à 5µg/ml, la fuite du potassium intracellulaire varie de 10% à 50% par rapport au contrôle sans H.D.L et sans antifongique.

Au delà de 5µg/ml d'amphotéricine B le niveau de potassium intracellulaire reste pratiquement constant est égale à 45% pour une concentration d'antifongique très élevée 10µg/ml (c'est à dire 10 fois la C.M.I).

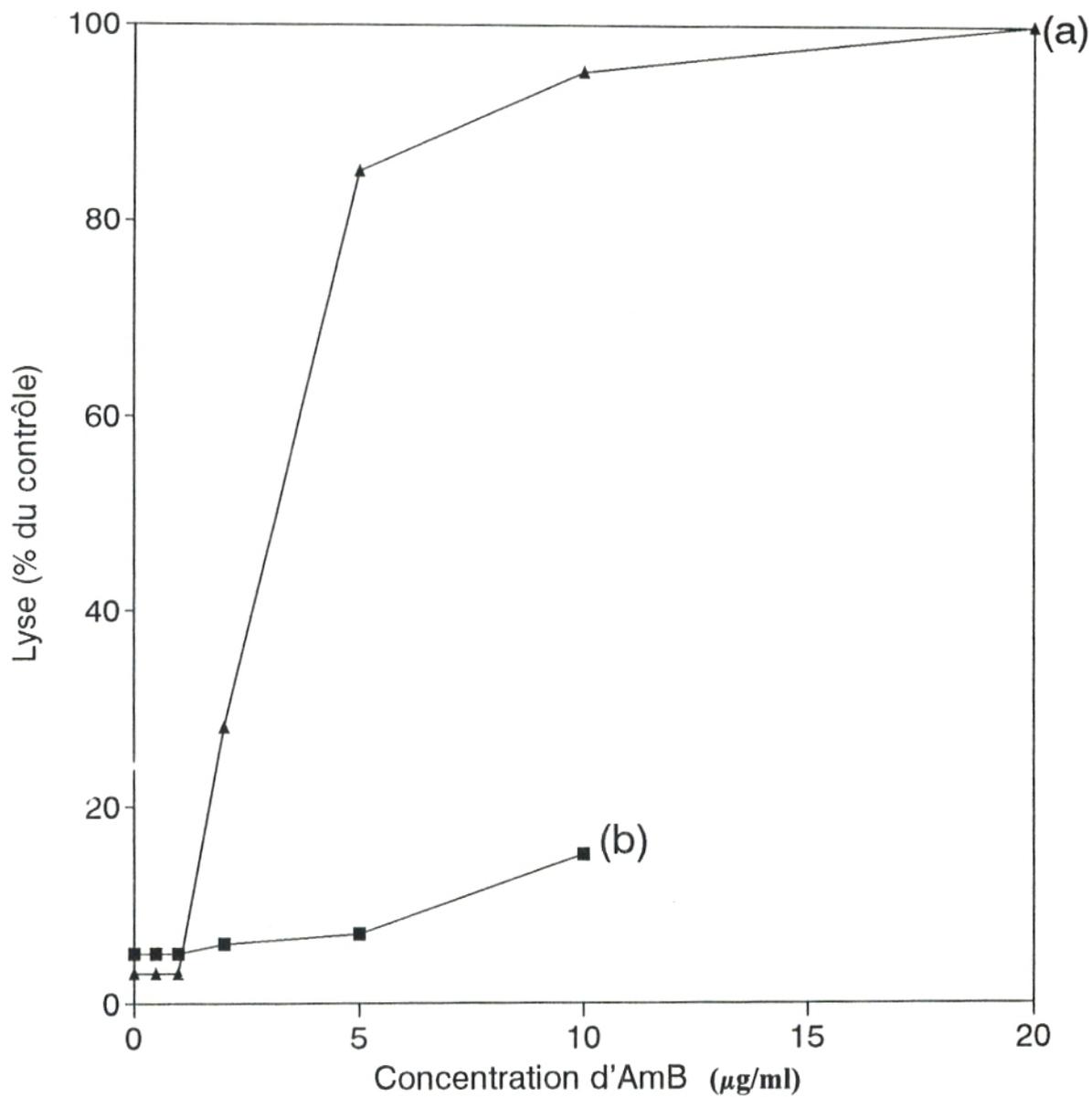
### 2.2.2. Hémolyse

Sur la **figure N°18** sont représentés les résultats de la lyse cellulaire pour différentes concentrations d'amphotéricine B en l'absence et en présence d'une concentration fixe de lipoprotéines lourdes, H.D.L, équivalente à celle du sérum sanguin natif.

Cette figure montre que :

• En l'absence de lipoprotéines (courbe a), lorsque la concentration d'amphotéricine B augmente de 0 à 1µg/ml, nous n'observons pas de lyse cellulaire. Les 2% d'hémoglobine libérés dans le milieu externe correspondent à l'hémolyse mécanique observée lors de la manipulation des globules rouges. Pour des concentrations d'amphotéricine B supérieures à 1µg/ml et jusqu'à 5µg/ml, nous observons une augmentation progressive de la fuite de l'hémoglobine cellulaire qui varie de 2% à 85% du contrôle sans lipoprotéines et sans amphotéricine B. Au delà de 5µg/ml d'amphotéricine B, la lyse cellulaire devient totale.

• En présence de lipoprotéines (courbe b) pour des concentrations sub-inhibitrices ( $\leq$  1µg/ml) d'amphotéricine B, l'hémolyse est nulle. Pour des concentrations d'antifongique supérieures à 1µg/ml et jusqu'à 5µg/ml nous observons une très légère fuite de l'hémoglobine intracellulaire qui reste inférieure à 10% du contrôle. Au delà de la concentration de 5µg/ml d'amphotéricine B, le taux d'hémolyse atteint un maximum de 15% pour 10µg d'amphotéricine B /ml de milieu.



Courbe (a) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml

Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + H.D.L

**Figure N°18:** Effet de concentrations croissantes d'amphotéricine B sur la fuite de l'hémoglobine intracellulaire chez le globule rouge humain.

• en présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, nous n'observons ni fuite potassique ni hémolyse jusqu'à 2 $\mu$ g/ml d'amphotéricine B, a des concentrations d'antifongique supérieures à 2 $\mu$ g/ml , la perméabilité au potassium augmente progressivement pour atteindre à partir de 5 $\mu$ g/ml une valeur quasi-stationnaire de l'ordre de 40% à 50% et ce n'est qu'à partir de cette concentration d'amphotéricine B que débute le phénomène d'hémolyse.

Un certain nombre d'auteurs ont expliqué ce phénomène par le fait que l'amphotéricine B polyène à grand macrocycle est insoluble dans un milieu aqueux, il produit des agrégats de particules dans la membrane de la cellule cible (GRUDA, I et col.1980);(RINNERT,H.THIRION, C.1977). En effet, la complexation de l'amphotéricine B avec les lipoprotéines augmente sa solubilité et diminue par conséquent sa toxicité.

### **3. EFFET DE L'ADDITION DE STEROLS LIBRES EXTERNES**

En 1958, GOTLIEB et col, puis, LAMPEN et col(1960) mirent en évidence le rôle protecteur des stérols contre l'action antifongique des polyènes chez des organismes sensibles. Ils ont expliqué ce phénomène par le fait que toutes les membranes riches en stérols sont sensibles aux antifongiques polyéniques, alors que celles qui en sont dépourvues ne le sont pas, comme les membranes des bactéries. Cette constatation a amené plusieurs auteurs à émettre un avis commun sur ce qu'il fut appelé "Sterol-hypothesis" (LAMPEN et col.1966);(DE KRUIJFF et col.1974); (MEDOFF et col.1983). C'est à dire reconnaître que la cible principale des antifongiques polyéniques est formée des stérols membranaires.

Ainsi, l'amphotéricine B, antifongique polyénique, interagit avec les stérols membranaires induisant la formation de pores à travers lesquels des ions et petites molécules peuvent passer.

Les membranes biologiques des levures renferment essentiellement de l'ergostérol alors que celles des cellules animales supérieures contiennent le cholestérol comme stérol dominant. De ce fait, l'amphotéricine B manifeste sa toxicité pour les deux types de membranes(HERVE, M et col.1994).

### **3.3. Conclusion :**

De toutes les expériences décrites ci-dessus, il ressort clairement que l'effet protecteur des stérols non estérifiés externes augmente en présence d'un vecteur tel que les lipoprotéines du sérum sanguin humain ou la sérum albumine bovine et par conséquent diminue la toxicité de l'amphotéricine B.

Plus la concentration en cholestérol libre externe dans le milieu est élevée, meilleure est la protection du globule rouge.

L'existence d'un tel phénomène a déjà été signalé par BRAJTBURG, J et col.(1984) qui confirment que la cible principale de l'amphotéricine B est le cholestérol non estérifié.

### **4. MODE D'ADDITION DE L'AMPHOTERICINE B**

La présence des lipoprotéines dans le milieu permet d'augmenter les sites de fixation de l'amphotéricine B ainsi, l'antifongique se trouve sous trois formes différentes : AmB-lipoprotéines, AmB-globule rouge et amphotéricine B seule.

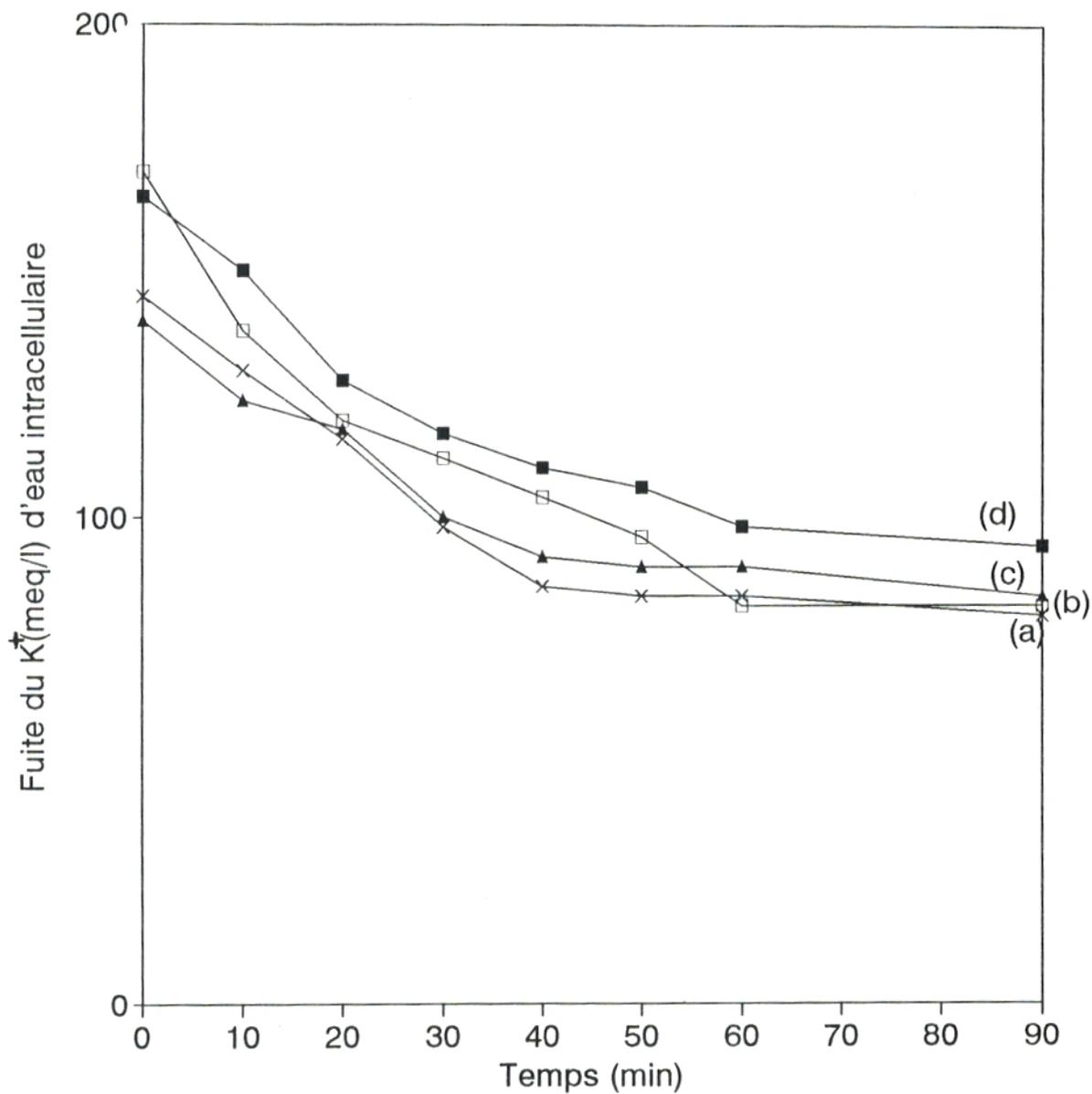
Nous nous sommes donc demandés si une préincubation de l'amphotéricine B avec les lipoprotéines n'induit pas une saturation de ses sites actifs et par conséquent protéger le globule rouge.

Pour cela, nous avons effectué une série d'expériences en procédant d'une part à la complexation de l'antifongique avec les lipoprotéines lourdes ou légères suivie de l'addition de la cellule animale. D'autre part, nous avons préincubé les lipoprotéines avec les globules rouges suivie de l'ajout de l'amphotéricine B.

Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure N°23**.

Nous remarquons que :

- La préincubation de l'amphotéricine B à une concentration de 5µg/ml avec les lipoprotéines lourdes ou légères en concentrations équivalentes à celles du sérum sanguin humain (courbes a et b), augmente l'effet protecteur des lipoprotéines vis-à-vis du globule rouge. Ainsi, après 90 minutes d'incubation à 37°C, les cellules retiennent encore 60% de leur potassium en présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, et 50% en présence des lipoprotéines légères, L.D.L.



Courbe (a) : Globule rouge + AmB à 5 $\mu$ g/ml + L.D.L  
 Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5 $\mu$ g/ml + H.D.L  
 Courbe (c) : Globule rouge + L.D.L + AmB à 5 $\mu$ g/ml  
 Courbe (d) : Globule rouge + H.D.L + AmB à 5 $\mu$ g/ml

**Figure N°23** : Effet du mode d'addition de l'amphotéricine B en présence de lipoprotéines sur la cytotoxicité induite chez le globule rouge humain

• La préincubation des globules rouges avec les lipoprotéines lourdes ou légères suivie de l'ajout de l'amphotéricine B (courbes c et d), nous a permis d'obtenir le même effet protecteur pour les lipoprotéines lourdes, H.D.L, et les lipoprotéines légères, L.D.L.

### **5. ETAT D'ENERGISATION DE LA CELLULE CIBLE**

Comme tous les antifongiques polyéniques, l'amphotéricine B accélère la décomposition de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP). Donc, il s'agit d'une stimulation de l'activité de l'ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ )transmembranaire (DROUET et col.1960).

L'accélération de l'ATPase entraîne une entrée de potassium dans le but de compenser la fuite massive de ce dernier qui est due à la présence de l'amphotéricine B.

Ceci nous a conduit à penser que l'apport d'une source d'énergie comme le glucose qui après dégradation fournit de l'énergie sous forme d'ATP nécessaire au fonctionnement de l'ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ), peut inhiber l'effet toxique de l'amphotéricine B.

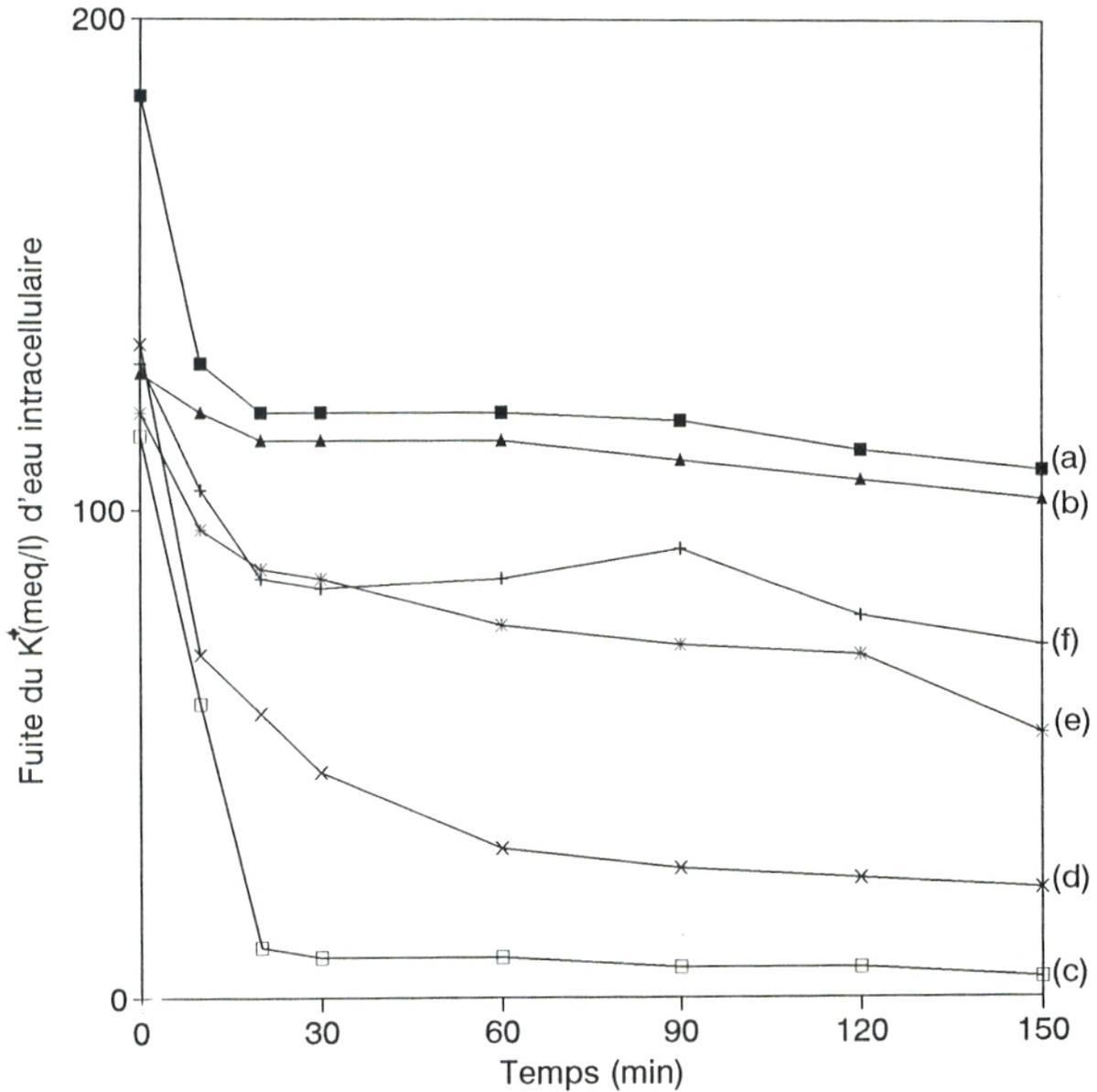
Pour cela, nous avons mesuré la fuite du potassium intracellulaire induite par 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'amphotéricine B en présence de glucose à une concentration finale de 20mM/l et de lipoprotéines lourdes, H.D.L.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la **Figure N°24**

Nous constatons que :

• En l'absence d'amphotéricine B et des lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbes a et b), les niveaux intracellulaires de potassium sont pratiquement les mêmes pour les globules rouges placés en présence de glucose ou en son absence.

• En présence de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'amphotéricine B et en l'absence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, l'addition du glucose dans le milieu entraîne une modification des cinétiques de fuite du potassium intracellulaire. En effet, en l'absence de glucose (courbe c), les niveaux de potassium intracellulaires passent de 100% à 10% après seulement 20 minutes d'incubation à 37°C. Ce niveau reste inchangé après 2<sup>h</sup>30 min d'incubation.



- Courbe (a) : Contrôle : Globule rouge seul  
 Courbe (b) : Contrôle : Globule rouge + glucose à 20mM/l  
 Courbe (c) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml  
 Courbe (d) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + glucose à 20mM/l  
 Courbe (e) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + H.D.L  
 Courbe (f) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + H.D.L + glucose à 20mM/ml

**Figure N°24** : Effet de l'état d'énergisation de la cellule cible sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain.

Par contre, l'addition d'une source d'énergie (courbe d), réduit la toxicité de l'amphotéricine B. La cinétique de fuite potassique est relativement lente, après 30 minutes, d'incubation à 37°C, les cellules retiennent environ 40% de leur potassium. Au bout de 2<sup>h</sup>30 min d'incubation, le niveau de potassium dans les globules rouges est de 20% par rapport au contrôle.

- En présence de 5µg/ml d'amphotéricine B et de lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbes e et f), l'effet du glucose sur la cinétique de fuite du potassium intracellulaire ne semble pas être significatif.

A partir de ces résultats, nous pouvons envisager l'hypothèse suivante : l'addition du glucose dans le milieu en présence d'amphotéricine B entraîne la formation d'un pool d'ATP nécessaire au fonctionnement de l'ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) qui tend à réduire la fuite potassique, mais cet effet n'est pas significatif du fait que d'une part, l'amphotéricine B est utilisée à une forte concentration (5µg/ml) et nous savons que dans cette zone l'effet de l'antifongique sur la fuite du potassium est irréversible (BRAJTBURG, J et col. 1980). D'autre part, l'amphotéricine B induit des changements dans la perméabilité membranaire en créant des pores de 0,8nm de diamètre (DE KRUIJFF, B et DEMEL, R.A. 1974).

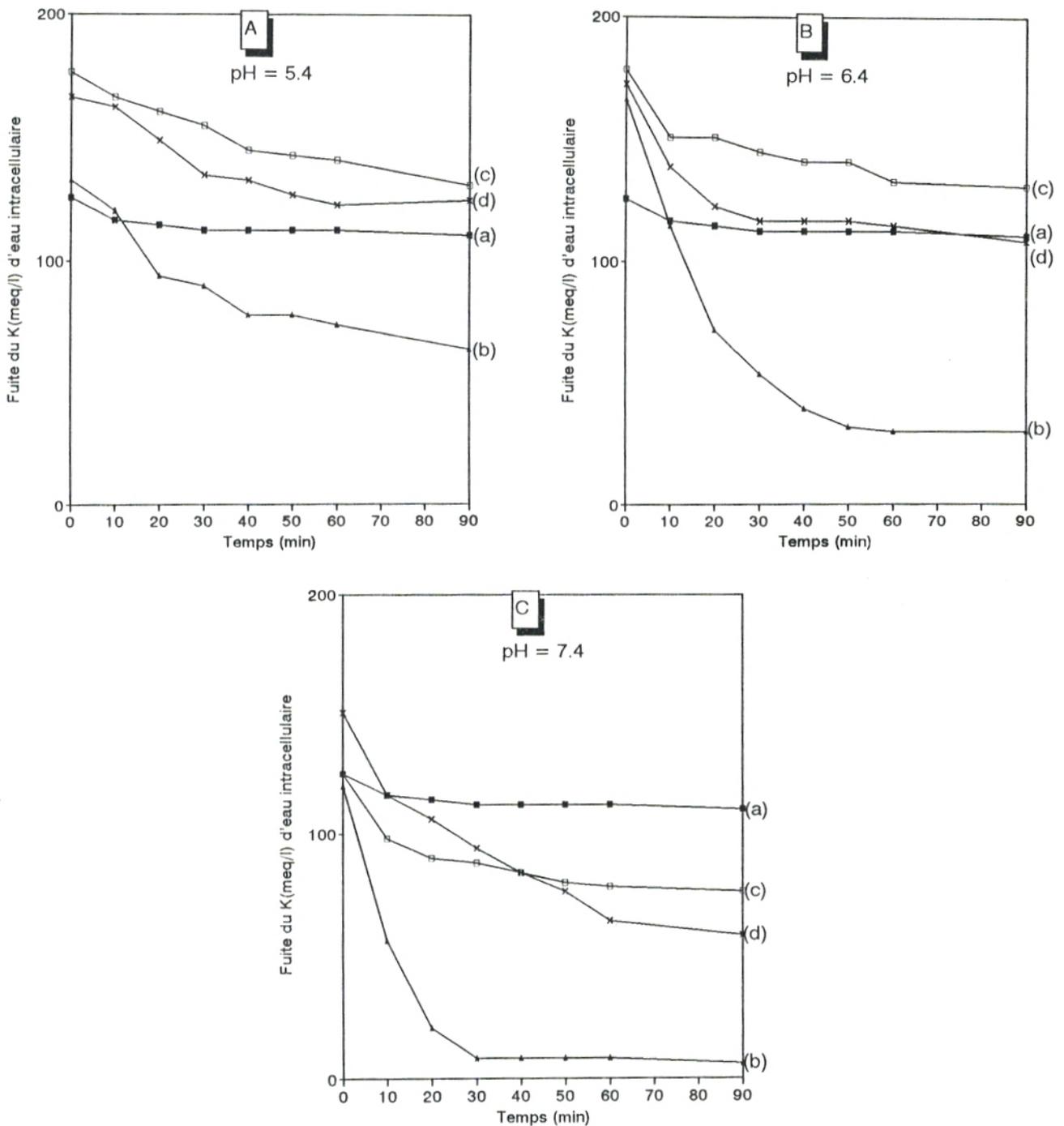
Ainsi l'ATPase ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ne peut pas compenser la sortie du potassium intracellulaire.

## 6. pH DU MILIEU

Il est connu que le pH physiologique de l'organisme est de 7,4. Nous avons montré qu'à ce pH en l'absence de lipoprotéines, l'amphotéricine B est hautement toxique pour le globule rouge.

Nous nous sommes donc intéressés à la possibilité d'une influence du pH du milieu sur la cytotoxicité de cet antifongique.

Les résultats expérimentaux de la fuite du potassium en fonction du temps à des pH différents 5,4, 6,4 et 7,4 sont représentés respectivement sur la **figure N°25 A, P et C**.



Courbe (a) : Contrôle : Globule rouge seul  
Courbe (b) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml  
Courbe (c) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + H.D.L  
Courbe (d) : Globule rouge + AmB à 5µg/ml + L.D.L

**Figure N°25** : Effet du pH du milieu sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B en présence et en l'absence de lipoprotéines chez le globule rouge humain.

Nous remarquons que :

- L'amphotéricine B additionnée à 5µg/ml à une suspension érythrocytaire entraîne à pH 5,4, en l'absence de lipoprotéines (courbe A b) une protection du globule rouge. En effet, après 90 minutes d'incubation à 37°C les niveaux de potassium intracellulaire varient de 100% à 50% par rapport au contrôle sans amphotéricine B et sans lipoprotéines (courbe A a). Cette protection augmente en présence des lipoprotéines lourdes ou légères. En effet, les niveaux de potassium interne atteignent respectivement 75% pour les lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbe A c) et 70% pour les lipoprotéines légères, L.D.L, (courbe A d) après 90 minutes d'incubation à 37°C.

- A pH 6,4, en l'absence de lipoprotéines (courbe B b), les globules rouges perdent 70% de leur potassium intracellulaire après 90 minutes d'incubation à 37°C avec 5µg/ml d'amphotéricine B par rapport au contrôle sans antifongique et sans lipoprotéines (courbe B a). En présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbe B c), les cellules ne perdent que 28% de leur potassium. Ce niveau cellulaire de potassium passe à 35% lorsqu'il s'agit des lipoprotéines légères, L.D.L, (courbe B d).

- A pH 7,4, en l'absence de lipoprotéines (courbe C b), les cellules de globules rouges perdent 95% de leur potassium interne après 90 minutes d'incubation à 37°C en présence d'amphotéricine B à la concentration de 5µg/ml par rapport au contrôle sans antifongique et sans lipoprotéines (courbe C a). En présence des lipoprotéines lourdes, H.D.L, (courbe C c) la fuite du potassium intracellulaire est réduite. Après 90 minutes d'incubation les cellules gardent encore 60% de leur potassium interne. Les globules rouges retiennent 50% de leur potassium interne après 90 minutes d'incubation lorsqu'il s'agit des lipoprotéines légères, L.D.L (courbe C d).

Nous pouvons conclure qu'en absence de lipoprotéines, l'amphotéricine B est relativement moins toxique à pH acides (5,4 et 6,4). En revanche, en présence de lipoprotéines, nous avons noté une bonne protection aux différents pH.

Cependant, il reste à noter que l'amphotéricine B est active pour des pH supérieurs à quatre. (LAMPEN, J.O. 1966).

**QUATRIEME PARTIE**  
**CONCLUSION GENERALE**

Le but qui avait été défini pour le présent travail était l'évaluation in vitro de l'effet de la complexation de l'amphotéricine B, antifongique polyénique, aux lipoprotéines du sérum sanguin, macromolécules renfermant du cholestérol sur la toxicité induite par cet antibiotique chez le globule rouge humain.

En effet, il est admis d'une part, que les antifongiques polyéniques rompent l'intégrité membranaire en se liant aux stérols des membranes des cellules des levures et des mammifères, et d'autre part, que la similarité d'interaction entre les polyènes et les stérols des cellules animales et ceux des microorganismes (levures et fongis) ont pour origine l'analogie structurale des membranes des deux types de cellules (présence d'ergostérol chez les levures et les fongis et du cholestérol chez les cellules animales) (BRAJTBURG. J et col. 1990b).

Des travaux antérieurs dans le domaine aboutissaient à des résultats in vitro et in vivo contradictoires. La critique majeure à laquelle donnait prise ces travaux était une interprétation incomplète des résultats et un mauvais contrôle des conditions expérimentales :

- Résultats inexploités aux hautes concentrations de cholestérol des lipoprotéines (effet protecteur des H.D.L > L.D.L)
- Administration de lipoprotéines d'origine humaine à des lapins
- Pas de vérification de l'innocuité de ces lipoprotéines humaines seules chez le lapin (c'est à dire sans amphotéricine B).

C'est pourquoi nous avons envisagé d'entreprendre une étude de l'effet des lipoprotéines sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B en réalisant un meilleur contrôle des caractéristiques de ces macromolécules utilisées (nature des lipoprotéines lourdes ou légères, composition en stérols, concentration en amphotéricine B et rapport antifongique / stérols) permettant ainsi une meilleure évaluation des résultats obtenus. D'autre part, il est intéressant d'évaluer l'effet d'énergisation des cellules cibles, du mode d'addition de l'amphotéricine B et de paramètres physico-chimiques du milieu externe (pH).

Les résultats que nous avons obtenus dans ce domaine montrent que :

- L'addition des lipoprotéines dans le milieu réduit la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain. En l'absence des lipoprotéines, les globules rouges se vident de leur potassium interne après seulement 20 minutes

d'incubation à 37°C. Ce résultat est en accord avec les travaux de HAMMOND et col (1974) qui ont montré que la perturbation de la perméabilité ionique est de courte durée, elle se produit au cours des premières minutes de contact avec l'antifongique. L'ajout des lipoprotéines dans le milieu inhibe significativement la cinétique de fuite du potassium intracellulaire.

En présence des lipoprotéines lourdes ou H.D.L, les globules rouges retiennent 60% de leur potassium après 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation à 37°C. Les lipoprotéines légères ou L.D.L réduisent aussi la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis du globule rouge, mais cette réduction reste inférieure tant sur le plan cinétique qu'à l'état stationnaire à celle observée avec les H.D.L : au bout de 2<sup>h</sup> 30 min d'incubation, les cellules retiennent 50% de leur potassium interne.

A l'inverse des résultats obtenus par l'équipe de BRAJTBURG et col (1984; 1986), nous avons observé que les lipoprotéines lourdes ou H.D.L protègent mieux le globule rouge jusqu'à des concentrations deux fois moindre de cholestérol des lipoprotéines. Ce n'est qu'à de très faibles concentrations de lipoprotéines (1/4 des concentrations sériques) que l'effet protecteur devient de même amplitude avec les classes lourdes et légères.

Les lipoprotéines lourdes ou H.D.L assurent la protection du globule rouge humain jusqu'à des concentrations très élevées en amphotéricine B (10µg/ml : 10 fois la concentration minimale inhibitrice).

- En ce qui concerne l'effet des stérols libres externes, les résultats obtenus dans nos conditions expérimentales montrent que l'effet protecteur du cholestérol non estérifié sous forme d'agrégats, dépend de la présence d'un transporteur protéique (lipoprotéine ou sérum albumine bovine).

En utilisant comme vecteur les lipoprotéines lourdes, à une concentration d'amphotéricine B égale à 5µg/ml, l'effet protecteur du cholestérol libre externe augmente significativement.

En effet, après 2<sup>h</sup>30 min d'incubation à 37°C les globules rouges retiennent 80% de leur potassium interne. Ce taux est de 70% en présence des lipoprotéines légères.

Par contre, en présence de cholestérol libre externe combiné à la sérum albumine bovine, les cellules retiennent 40% de leur potassium interne après 90 minutes d'incubations à 37°C.

- L'addition d'une source d'énergie dans le milieu extérieur tel que le glucose à une concentration finale de 20mM/l a peu d'influence sur la protection du globule rouge contre l'action toxique de l'amphotéricine B libre ou complexée aux lipoprotéines sériques.

- En fin, l'effet protecteur des lipoprotéines augmente significativement avec la baisse du pH du milieu externe

Parallèlement à nos expériences, nous avons vérifié que dans les conditions utilisées pour le globule rouge, l'amphotéricine B gardait son efficacité et donc son effet toxique sur *Saccharomyces cerevisiae*, (modèle de levures). En effet, la croissance de la levure est fortement inhibée par l'amphotéricine B liée aux lipoprotéines sériques à une concentration de 2µg/ml.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant d'étudier l'intensité et le sens des échanges de lipides (notamment cholestérol, phospholipides et acides gras) entre les lipoprotéines et les cellules cibles, d'autre part, de vérifier si nous retrouvons les résultats analogues in vivo c'est à dire chez l'animal.

**Prolongements** : extension à d'autres substances médicamenteuses toxiques.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. BAGINSKI. M, TEMPEZYK.E, and BOROWSKIE (1989)  
Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics  
Euro. Biophy.J. (17) : 159 - 166
2. BASDEVANT. A, LECOMPTE. T, and GUY-GRAND. B (1984)  
Lipides et cardiopathies ischémiques  
J. Conférences de cardiologie. Maloine ed. (6) : 37 - 53
3. BOLARD. J, SEIGNEURET. M, and BOUDET. G (1980)  
Interaction between phospholipid bilayer membrane and polyene antibiotic amphotericin B  
Biochim. Biophys. Acta (599) : 280 - 293
4. BOLARD. J (1986)  
How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties?  
Biochim. Biophys. Acta (864) : 257 - 304
5. BRAJTBURG. J, MEDOFF.G, KOBAYASHI. G.S, and ELBERG. S (1980)  
Influence of extracellular  $K^+$  or  $Mg^{2+}$  on the stages of the antifungal effects of amphotericin B and filipin Antimicrobial. Agents and Chemother (18).  
N°4 : 593 - 597
6. BRAJTBURG.J, ELBERG.S, BOLARD.J, KOBAYASHI.G.S, LEVY.R.A, OSTLUND.R.E, SCHLESSINGER.D, and MEDOFF.G (1984)  
Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B  
J. Inf. Dis. (149). N°6 : 986 - 997
7. BRAJTBURG.J, ELBERG.S, KOBAYASHI.G.S and MEDOFF.G (1986)  
Effets of serum lipoproteins on damage to erythrocytes and *Candida albicans* cells by polyene antibiotics  
J. Inf. Dis. (153). N°3 : 623 - 626
8. BRAJTBURG.J, POWDERLY.W.G, KOBAYASHI.G.S, and MEDOFF.G (1990a)  
Amphotericin B : Current understanding of mechanisms of action  
Antimicrobial. Agents and Chemother. (34). N°2 : 183 - 188
9. BRAJTBURG.J, POWDERLY.W.G, KOBAYASHI.G.S, and MEDOFF.G (1990b)  
Amphotericin B : Delivery systems  
Antimicrobial. Agents and Chemother. (34). N°3 : 381 - 384
10. BURSTEIN.M, SCHOLNICK.H.R and MORFIN.R (1970)  
Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions  
J. Lipid. Research (11) : 383 - 393
11. CANIAUX.I, VILLARD.J, PORTE.M and ODDOUX.L (1984)  
Les antifongiques utilisés en thérapeutique humaine  
Lyon pharmaceutique (35). N°3 : 131 - 141

12. CASS.A, FINKELSTEIN.A, and KRESPI.V (1970)  
The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatine and amphotericin B  
J. General. Physiology (56) : 100 - 124
13. CLEJAN.S, and BITTMAN.R (1985)  
Rates of amphotericin B and filipin association with sterols  
J. Biol. Chem. (260). N°5 : 2884 - 2889
14. CHRISTIANSEN.J.K, BERNARD.E.M, GOLD.J.W.M, and ARMSTRONG.D (1985)  
Distribution and activity of amphotericin B in human  
J. Inf. Dis (152) : 1037 - 1043
15. CYBULSKA.B, BOROWSKI.E, PRIGENT.Y and GARY-BOBO.C.M (1981)  
Cation permeability induced by two aromatic heptaenes, vacidin A and candidin D on phospholipid unilamellar vesicles  
J. Antibiotics (34). N°7 : 884 - 891
16. CYBULSKA.B, MAZERSKI.I, BOROWSKI.E and GARY-BOBO. C.M (1984)  
Haemolytic activity of aromatic heptaene.  
A groupe of polyene macrolide antifungal antibiotics  
Biochem. and Pharmac. (33). N°1 : 41 - 46
17. CYBULSKA.B, HERVE.M, and GARY-BOBO.C.M (1985)  
Effect of the polar head structure of polyene macrolide antifungal antibiotics on the mode of premeabilization of ergosterol-and cholesterol-containing lipidic vesicles studies by <sup>31</sup>P- N.M.R.  
Molec. Pharmac. (29) : 293 - 298
18. DEACON.J.W (1980)  
Introduction to modern mycology  
Basic Microbiology (7). Ed Blackwell Scientific Publications.
19. DE KRUIJFF.B, and DEMEL.R.A (1974) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes  
III. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexe  
Biochim. Biophys. Acta (339): 57 - 70
20. DROUHET.E, HIRTH.L, and LEBEURIER.G (1960)  
Some aspects of the mode of action of polyene antifungal antibiotics  
Ann. N.Y. Acad. Sci. (89) : 134 -155
21. GOLDSTEIN. J.L, and BROWN.M.S (1977)  
The low density lipoproteins and its relation to atherosclerose.  
Ann. Rev. Biochem. (46) : 897
22. GOTTLIEB.D, CARTER.H.E, and AMMANN.A (1958)  
Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols  
Science (129) : 361

23. GRUDA.I, NADEAU.P, BRAJTBURG.J, and MEDOFF.G (1980)  
Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B - sterol complexes *Biochim. Biophys. Acta* (602): 260-268
24. HAKKOU.A (1988)  
Mode d'action des antifongiques polyéniques sur l'enveloppe cellulaire de la levure *Kluyveromyces lactis*.  
Etude du phénomène de résistance  
Thèse de biochimie-pharmacologie. Nancy I
25. HAMMOND.S.M, LAMBERT.P.A, and KLIGER.B.N (1974)  
The mode of action of polyene antibiotics; Induced potassium leakage in *Candida albicans*  
*J. Gen. Microbial.* (81) : 325 - 330
26. HERVE.M, CYBULSKA.B, and GARY-BOBO.C.M (1985)  
Cation permeability induced by valinomycin, gramicidin D, and amphotericin B in large lipidic unilamellar vesicles studied by  $^{31}\text{P}$  - N.M.R  
*Eur. Biophys. J.* (12) : 121 - 128
27. HERVE.M, DEBOUZY.J.C, BOROWSKI.E, CYBULSKA.B, and GARY BOBO.C.M (1989)  
The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interactions with sterols and their selective toxicity. A  $^{31}\text{P}$  - N.M.R study  
*Biochim. Biophys. Acta* (980) : 261 - 272
28. HERVE.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 multinoyaux  
*Société. Française de Microbiologie (colloque. Mars)* : 91
29. HOPFER.R.L, MILLS.K, MEHTA.R, LOPEZ-BERESTEIN.G FAINSTEIN.V and JULIANO.R.L (1984)  
In vitro antifungal activities of amphotericin B and liposome encapsulated amphotericin B  
*Antimicrob. Agents. Chemother* (25). N°3 : 387 - 389
30. KERRIDGE.D (1986)  
Mode of action of clinically important antifungal drugs  
*Advances in microbial physiol* (27) : 1 - 64
31. KITO. M, AKUTSU.H, SUGETA.H, KYOGOKU.Y, SOHN.D.H, and YU.B.S (1987)  
Association of polyene antibiotics with sterols  
*Chem. Biol. Interactions* (64) : 61 - 70
32. KLIMOV.A.N, and NIKIFOROVA.A.A (1972)  
Interaction of polyene antibiotics and serum lipoproteins  
*Antibiotics* (29) : 661 - 663

33. KOBAYASHI.G.S and MEDOFF.G (1977)  
Antifungal agents : Recent developments  
Ann.Rev.microbiol (31) : 291 - 308
34. KOLDIN.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). N°1 : 144 - 145
35. KOTLER - BRAJTBURG.J, MEDOFF.G, KOBAYASHI.G.S BOGGS.S,  
SCHLESSINGER.D, PANDEY.R.C, and RINEHART.K.L.JR (1979)  
Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects  
Antimicrob. Agents and Chemother (15). N°5 : 716 - 722
36. LAMPEN.J.O, ARNOW.P.M and SAFFERMAN.R.S (1960)  
Protection by sterols against polyene antibiotics  
J.Bacteriol (80) : 1152 - 1160
37. LAMPEN.J.O (1966)  
Interference by polyenic antifungal antibiotics (Especially nystatin and filipin) with specific membrane function  
Symp. Soc. Gen. Microbio. (16) : 111 - 130
38. LEHNINGER.A.L (1982)  
Principes de biochimie. P.P : 316  
ed. Flammarion Médecine - Sciences
39. LOUISOT.P (1983)  
Biochimie générale et médicale  
Structurale, métabolique, sémiologique. P.P : 426 - 295  
ed. SIMEP
40. MADDUX.M.S, and BARRIERE.S.L (1980)  
A review of complications of amphotericin B - therapy : recommendations for prevention and management  
Drug intelligence and clinical pharmacy (14) : 177 - 181
41. MARTY.A and FINKELSTEIN.A (1975)  
Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin  
Differences in its one-sided and two-sided action  
J.Gen. physiol (65) : 515 - 526
42. MEDOFF.G, BRAJTBURG.J, and KOBAYASHI.G.S. (1983)  
Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections  
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol (23) : 303 - 330
43. MEHTA.R, LOPEZ - BERESTEIN.G, HOPFER.R, MILLS.K, and JULIANO.R.L (1984)  
Liposomal amphotericin B is toxic of fungal cells but not to mammalian cells  
Biochim. Biophys. Acta. (770) : 230 - 234

44. MEYER.P (1983)  
Physiologie humaine P.P : 94  
ed. Flammarion médecine-sciences
45. NEWMAN.M. (1990)  
Vade- Mecum des antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux  
5<sup>e</sup> édition. Maloine.
46. NORMAN.A.W, DEMEL.R.A, DE KRUIJFF.B, GEURTS.W.S.M, VAN KESSEL and  
VAN DEENEN.L.L.M (1972)  
Studies on the biological properties of polyene antibiotics :  
Comparaison of other polyenes with filipin in their ability to interact  
specifically with sterol  
Biochim. Biophys. Acta (290) : 1 - 14
47. PUCHOIS.P, ALAUPOVIC.P, and FRUCHART.J.C (1985)  
Mise au point sur les classifications des lipoprotéines plasmatiques  
Ann. Biol. clin (43) : 831 - 840
48. RINNERT.H, THIRION.C, DUPONT.G, and LE MATRE.J (1977)  
Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of a polyene antibiotic :  
Amphotericin B  
Biopolymers (16) : 2419 - 2427
49. SILBERNAGL.S, and DESPOPOULOS.A (1985)  
Atlas de poche de physiologie  
ed. Flammarion
50. SNOECK.R, and MEUNIER.F (1989)  
Antifongiques. In. Pharmacologie des concepts fondamentaux aux applications  
thérapeutiques  
SCHORDERET.M  
O.P.U (Alger) 767 - 774
51. URBINA.J.A, ELEAZAR COHEN.B, PEROZO.E and CORNIVELL.L (1987)  
Spin-labeled amphotericin B : synthesis, characterization biological and spectroscopic  
properties  
Biochim. Biophys. Acta (897) : 467 - 473
52. SZOKA.JR.FC, MILHOLLAND.D, and BARZA.M (1987)  
Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and in vitro fungicidal  
activity of liposome - intercalated amphotericin B.  
Antimicrob. Agents and chemother (31) N°3 : 421 - 429
53. SZPONARSKI.W, WIETZERBIN.J, BOROWSKIE, and GARY-BOBO.C.M  
(1988)  
Interaction of <sup>14</sup>C- labelled amphotericin B derivatives with human erythrocytes:  
relationship between binding and induced K<sup>+</sup> leak  
Biochim. biophys. Acta (938) : 97 - 106

- 
54. VANDEN BOSSCHE.H, WILLEMSSENS.G, and MARICHAL.P (1987)  
Anti - Candida drugs. The biochemical basis for their activity  
C.R.C Critical. Rev in Microbiol. (15) : 57 - 72
55. VAN HOOGEVEST.P, and DE KRUIJFF.B (1978)  
Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg  
phosphatidyl choline and didocosenoylphosphatidyl choline.  
A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in  
membranes  
Biochim. Biophys. Acta (511) : 397 - 407
56. VERTUT-CROQUIN.A, BOLARD.J, CHABBERT.M and GARY-BOBO. C.M (1983)  
Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B  
With cholesterol - or ergosterol-containing phospholipid vesicles  
A circular dichroism and permeability study  
Biochimistry (22) : 2939 - 2944
57. VERTUT-CROQUIN.A, BOLARD.J, and GARY-BOBO.C.M (1984)  
Enhancement of amphotericin B selectivity by antibiotic incorporation into gel state  
vesicles.  
A circular dichroism and permeability study  
B.B.R.C (125) N°1 : 360 - 366
58. WIETZERBIN.J, SZPONARSKI.W, BOROWSKI.E, and GARY-BOBO.C.M (1990)  
Kinetic study of interaction between [<sup>14</sup>C] amphotericin B derivatives and human  
erythrocytes : relationship between binding and induced K<sup>+</sup> leak  
Biochim. Biophys. Acta (1026) : 93 - 98