

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

« LapSab »

Thèse

Présentée

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat

En Biologie Cellulaire et Biochimie

Option : Substances à visée thérapeutique

Par

Mlle BENMANSOUR Wafaâ

Thème

Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.
Interaction avec quelques constituants membranaires

Soutenue le :

Devant le jury :

Président :	Mr BOUCHERIT Kebir	Professeur, Centre Universitaire de Nâama
Promoteur :	Mme BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Professeur, Université de Tlemcen
Examineurs :	Mme MOKHTARI-SOULIMANE Nassima	Professeur, Université de Tlemcen
	Mr BABA HAMED Ahmed Bey	Professeur, Université d'Oran-Es-senia
	Mr SLIMANI Miloud	Professeur, Université de Saïda
	Mr LAHFA Farid Boucif	Maitre de conférences A, Université de Tlemcen

Année Universitaire: 2014-2015

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

« LapSab »

Thèse

Présentée

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat

En Biologie Cellulaire et Biochimie

Option : Substances à visée thérapeutique

Par

Mlle BENMANSOUR Wafaâ

Thème

Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.
Interaction avec quelques constituants membranaires

Soutenue le :

Devant le jury :

Président :	Mr BOUCHERIT Kebir	Professeur, Centre Universitaire de Nâama
Promoteur :	Mme BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Professeur, Université de Tlemcen
Examineurs :	Mme MOKHTARI-SOULIMANE Nassima	Professeur, Université de Tlemcen
	Mr BABA HAMED Ahmed Bey	Professeur, Université d'Oran-Es-senia
	Mr SLIMANI Miloud	Professeur, Université de Saïda
	Mr LAHFA Farid Boucif	Maitre de conférences A, Université de Tlemcen

Année Universitaire: 2014-2015

**Louange à ALLAH, Seigneur de l'univers. Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux. Maître du jour de la rétribution.
Que les Prières et les Salutations d'Allah soient sur notre Prophète Mohammed ainsi que sur sa famille et ses compagnons**

Je dédie ce modeste travail à :

A mes parents

Arrivée jusque là ça n'a pas été toujours simple, je tiens à remercier très fort mes très chers parents, qui n'ont jamais cessé de prier pour moi et qui sans eux je n'aurai jamais eu le courage de faire quoique se soit.

Thank you

For showing me how to be strong, when I wanted to give up.

Thank you

For showing me the right way, when I did not see the path.

Thank you

For showing me how to listen, when all I wanted was to scream.

Thank you

For showing me how to give, when all I wanted was to receive.

Thank you

For showing me how to believe in myself, even when no one else did.

A toutes les personnes qui me sont chères

A mes deux frères

A toute ma famille

A la mémoire de tous ceux qui me sont chers

Que leurs âmes reposent en paix

Tu me disais toujours :

« Ne baisse jamais les bras »

« Dieu est généreux »

Que dieu t'héberge dans son vaste paradis

Remerciements

Réaliser une thèse n'est pas toujours simple, le plus délicat est de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à son aboutissement. J'ai eu la chance d'être entourée professionnellement par des personnes formidables qui m'ont soutenu durant toutes ces années et les mots parfois sont insuffisants pour exprimer ma gratitude envers chacun d'eux. Dans les lignes qui suivent j'aimerais souligner, de manière non exhaustive et sans ordre respecté, les contributions de chacun. Que ceux qui ne sont pas mentionnés ne m'en tiennent pas rigueur.

Je tiens tout d'abord, avec mon plus vif et sincère enthousiasme rendre mérite à ma directrice de thèse Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Directrice du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) », pour avoir accepté la charge de m'encadrer et pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Elle a su par ses qualités tant personnelles que professionnelles m'initier et me former à ce métier. Elle a su par sa grande et généreuse personne être plus qu'une directrice de thèse mais aussi un modèle pour moi. Je vous remercie pour votre écoute, votre exigence, votre rigueur, votre patience, votre enthousiasme, votre confiance, votre aide scientifique si précieuse, votre amour et votre clémence « dont je ne suis pas la seule à en témoigner ». Merci de m'avoir rendu meilleure. Je leur dis toujours, c'est très facile de trouver un professeur qui soit connu par des qualités scientifiques, mais c'est très rare et je dirais même que c'est très très rare de rencontrer un professeur qui soit connu comme Madame Boucherit, par des qualités où toutes les valeurs humaines et scientifiques sont réunies. Je ne vous remercierais jamais assez et un seul paragraphe n'est pas suffisant pour exprimer le respect que j'ai pour vous madame.

J'adresse également mes vifs remerciements à Monsieur Boucherit Kebir Professeur au Centre Universitaire de Nâama, pour avoir apporté un regard constructif sur le travail, pour avoir consacré du temps pour une relecture enrichissante du manuscrit malgré ses multiples occupations, pour m'avoir donné de précieux conseils tout au long de mon cursus scientifique et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury. Qu'il trouve ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Je suis très honorée que Madame Mokhtari-Soulimane Nassima, Professeur à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, ait accepté d'examiner ce travail.

J'aimerais témoigner ma profonde reconnaissance à Monsieur Baba Hamed Ahmed Bey, Professeur à la faculté des sciences. Université d'Oran Es-senia, qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury

Je souhaite remercier très sincèrement Monsieur Slimani Miloud, Professeur à l'université Moulay Taher de Saïda, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de siéger parmi les membres du jury.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Lahfa Farid Boucif, Maître de Conférences classe A, Doyen de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour les riches enseignements, que nous avons hérités de sa personne et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail.

J'adresse un grand merci à tous les membres du laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) qui m'ont soutenu, compris et aidé pour réaliser le maximum. Merci à tous et plus particulièrement à Imene et Hidayate. Merci pour votre aide et votre amitié qui m'ont été bien précieuses tout au long de ce travail.

J'exprime ma sincère gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire « microscopie électronique II (MEII)». Faculté des Sciences. Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen. Je vous remercie d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour analyser tous mes échantillons et d'avoir partager avec moi une multitude de connaissances en matière de microscopie électronique.

Je souhaite remercier également tous les membres du laboratoire « Structure et fonction des membranes biologiques (SFMB) » Université libre de Bruxelles qui m'ont accueilli au sein de leur établissement. Je vous remercie pour la riche expérience scientifique que vous m'avez transmise et pour la confiance que vous m'avez accordée en mettant à ma disposition tous les moyens matériels nécessaires pour l'accomplissement de mes travaux.

Enfin, je remercie du fond du cœur tout ceux et celles qui, de près ou de loin, se sont intéressés à mon travail et qui m'ont aidé par tous leurs moyens durant toutes ces années.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو المساهمة في فهم آليات الغشاء البلازمي، المتدخل في ظاهرة النوم الخلوي عند خميرة *Candida albicans* ATCC10231 والتي تحدث تحت تأثير الأمفوتريسين ب-ب. المضافة بتركيز 0.4 ميكرو غرام / ملل الدراسة بالمجهر الالكتروني الماسح (MEB) و بمطيافية الأشعة السينية المشتتة للطاقة (SDE-X) أظهرت تحولات مورفولوجية غشائية هامة عند الخلايا النائمة لخميرة *Candida albicans* ATCC10231. النتائج المحصل عليها بينت وجود تشوه يقدر بـ 2 ميكرومتر $2\ \mu\text{m}$ من السطح الخارجي للخلايا النائمة، ما يعادل نسبة 33.25% من الغشاء الخارجي الكلي للخلاية، مع ظهور تسرب أيونات خاصة الصوديوم 16.4% و الكلور 55.5%. التحاليل بمطيافية الأشعة تحت الحمراء (IRTF-RTA) أوضحت أهمية العلاقة الموجودة بين التشوه الغشائي وتحولات جزيئات الدسم الغشائية. الأطياف المحصل عليها من الخلايا النائمة أثبتت تحولات جزيئية هامة على مستوى جزيئات الفوسفوليبيد و البروتينات الغشائية. التحاليل الإحصائية أكدت في البداية على ظهور بروتينات خاصة ذات شكل ثنائي من نوع (β) أو ماتسمى بالبروتينات البائية ثم على ظهور تحولات جزيئية لجزيئات الفوسفوليبيد و الستيرول الموجودة في الغشاء البلازمي قبل زوال ظاهرة النوم الخلوي. هذه النتائج حثت على وضع نموذج رياضي يمثل عدة استنتاجات. الاستراتيجية التي وضعت تتمثل في استخدام نمذجة على أساس نظام متعدد العوامل. النتائج المحصل عليها من هذا النموذج سمحت بوضع استراتيجية تقوية الروابط الموجودة بين الأمفوتريسين ب-ب. ومكونات الغشاء البلازمي الدسمة المسماة في هذه الحالة (L_{AmB}) .

الكلمات المفتاحية: النوم الخلوي -امفوتريسين ب-ب- مكونات الغشاء البلازمي- آلية التفاعل -النمذجة - *Candida albicans*

RÉSUMÉ

L'objectif de ce travail est une contribution à la compréhension des mécanismes membranaires, impliqués dans la dormance de *Candida albicans* ATCC10231 en présence d'amphotéricine B à $0,4\ \mu\text{g}/\text{mL}$. L'étude par microscopie électronique à balayage (MEB) et spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X) a mis en évidence des transitions morphologiques et membranaires importantes chez les cellules dormantes de *Candida albicans* ATCC10231. Les résultats révèlent l'existence d'une déformation d'un diamètre de $2\ \mu\text{m}$, au niveau des surfaces cellulaires. Cette dernière représente 33,25 % de la surface cellulaire globale et est accompagnée d'une fuite d'ions, notamment le sodium (16,4%) et le chlore (55,5%).

Les analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA), ont montré l'importance du lien qui existe entre cette déformation et la transition des phases lipidiques. Les spectres IRTF-RTA des cellules dormantes, révèlent des variations importantes en phospholipides et en protéines membranaires. Les analyses statistiques ont confirmé l'apparition de protéines spécifiques, en conformation secondaire de type β « bêta » et des vibrations de phospholipides et stérols qui induisent des séparations lipidiques, avant la levée de la dormance. Ces résultats ont suscité la conception d'un modèle mathématique, qui traduit ces différentes constatations. La stratégie utilisée fait intervenir la modélisation à base de système multi-agents (SMA). Les résultats de cette modélisation, ont permis de mettre en place une stratégie de ciblage moléculaire dont le but principal est d'augmenter la stabilité des phases lipidiques associées à l'amphotéricine B, appelées dans notre étude phases (L_{AmB}) .

Mots clés : Dormance - *Candida albicans* - Amphotéricine B - Constituants membranaires - Mécanisme d'action- Modélisation

SUMMARY

The objective of this work is a contribution to understanding mechanisms of membrane, involved in the dormancy of *Candida albicans* ATCC10231 in the presence of amphotericin B added to $0.4\ \mu\text{g}/\text{mL}$. The study by scanning electron microscopy (SEM) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX), Highlighted important morphological transitions in dormant cells of *Candida albicans* ATCC10231. The results show the existence of deformation with a diameter estimated to 2 microns. This deformation represents 33.25 % of the overall cell surface, and is accompanied an leakage of ions, especially Sodium (16.4%) and Chlorine (55.5%). Analysis by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), showed the importance of the relationship between the deformation and the phase transition of lipid membranes. FTIR spectra of dormant cells reveal important variations in phospholipids and membrane proteins. The statistical analysis confirmed the occurrence of specific proteins; with secondary conformation type β -Sheets "beta" and vibrations of phospholipids and sterols. These variations induce lipid separations before lifting of the dormancy. These results have motivated the development of a mathematical model, which reflects these findings. The strategy involves modeling based on multi-agent system (MAS). The results of this modeling were used to develop a molecular targeting strategy whose main purpose is to increase the stability of the lipid phases associated with amphotericin B, called in our study (L_{AmB}) .

Keywords: Dormancy - *Candida albicans* - Amphotericin B - Constituents membrane - Mechanism of action - Modeling

Table des matières

Introduction.....	1
Première partie : Synthèse bibliographique.....	4
1- Propriétés de l'amphotéricine B	5
1-1- Propriétés physico-chimiques	5
1-2- Propriétés biologiques	10
1-2-1- Spectre d'action.....	10
1-2-2- Administration par voie intraveineuse (IV).....	10
1-2-3- Pharmacocinétique	10
1-2-4- Toxicité et effets indésirables	11
2- Nouvelles formulations de l'amphotéricine B	11
3- Membrane plasmique	12
3-1- Composition et structure	14
3-1-1- Lipides	14
a- Phospholipides	14
b- Stérols	14
3-1-2- Protéines	16
3-2- Dynamique et organisation fonctionnelle.....	17
3-2-1- Formation des radeaux lipidiques «rafts»	17
3-2-2- Rôle biologique des radeaux lipidiques	19
3-2-3- Perturbation des microdomaines.....	21
4- Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	22
4-1- Effets membranaires	22
4-2- Autres effets cellulaires	24
4-3- Phénomène de dormance	27
5- État de l'art et conception de la thèse	28
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	30
1 ^{er} chapitre : Analyse morphologique des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B.....	31
1- Matériel	31
1-1- Milieu de culture	31
1-2- <i>Candida albicans</i>	31
1-3- Amphotéricine B	31

2- Méthodes.....	32
2-1- Croissance des levures.....	32
2-1-1- Préparation de la préculture	32
2-1-2- Croissance en milieu liquide	32
2-2- Analyse morphologique par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à un système d'analyse par spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X).....	33
2-2-1- Principe	33
2-2-2- Préparation des échantillons	36
2-2-3- Analyse microscopique.....	36
a- Calcul de l'indice morphologique (Mi) des cellules	36
b- Modélisation de la morphologie en 3 dimensions (3D)	37
 2 ^{ème} chapitre : Analyse biochimique de la surface membranaire des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B	38
1- Matériel	38
1-1- <i>Candida albicans</i>	38
1-2- Amphotéricine B.....	38
2- Méthodes.....	38
2-1- Croissance des levures	38
2-1-1- Préculture	38
2-1-2- Culture	38
2-2- Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA).....	39
2-2-1- Principe.....	39
2-2-2- Préparation des échantillons	40
2-2-3- Acquisition des spectres IRTF-RTA	41
2-3- Analyse des données	41
2-3-1- Prétraitement des spectres IRTF-RTA	42
2-3-2- Analyse paramétrique des données	42
a- Test de Student	42
b- Analyse en composantes principales (ACP)	43
c- Classification hiérarchique ascendante (méthode de Ward)	45

3 ^{ème} chapitre : Simulation à base de système multi-agents (SMA) de la dynamique membranaire, modélisée en l'absence et en présence d'amphotéricine B	46
1- Fondements de la modélisation	46
1-1- Principe de la modélisation	46
1-2- Principe de la simulation multi-agents à gros grains.....	47
2- Expérimentation <i>in silico</i>	48
2-1- Conception et construction du modèle	48
2-1-1- Équations mathématiques	48
2-1-2- Fondements de la simulation	49
2-2- Implémentation du modèle	49
2-3- Simulation.....	52
Troisième partie : Résultats et discussion.....	55
1 ^{er} chapitre : Analyse morphologique des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B.....	56
1-Croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL	57
2- Morphologie des cellules	60
2-1- Indice de morphologie (Mi)	60
2-2- Analyse de la surface des cellules par microscopie électronique à balayage (MEB)	62
2-3- Modélisation de la morphologie en 3 dimensions (3D).....	64
3- Eléments surfaciques détectés par spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X)	66
4- Discussion	71
5- Conclusion.....	74
2 ^{ème} chapitre : Analyse biochimique de la surface membranaire des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B.....	75
1- Spectres IRTF-RTA des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B	75

2- Spectres IRTF-RTA des cellules de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL.....	78
2-1- Analyse spectrale comparative entre cellules récupérées en phase de latence et en phase exponentielle	80
2-1-1- Analyse globale des spectres.....	80
a-Test de Student	80
b-Analyse en composantes principales (ACP)	82
2-1-2- Variation de la composition protéique dans la région allant de 1700 à 1500 cm ⁻¹	86
a-Analyse des spectres.....	86
b-Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward	89
2-1-3- Variation de la composition lipidique dans la région allant de 1500 et 900 cm ⁻¹	91
a-Analyse des spectres.....	91
b-Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward.	95
2-2- Profil évolutif des cellules dormantes en fonction du temps d'incubation...	97
2-2-1- Analyse globale des spectres	97
2-2-2- Variation de la composition protéique dans la région allant de 1700 à 1500 cm ⁻¹	99
a- Analyse des spectres.....	99
b-Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward	102
2-2-3- Variation de la composition lipidique dans la région allant de 1500 à 900 cm ⁻¹	104
a-Analyse des spectres.....	104
b-Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward	107
3- Discussion	109
4- Conclusion	116
 3 ^{ème} chapitre : Simulation à base de système multi-agents (SMA) de la dynamique membranaire modélisée en l'absence et en présence d'amphotéricine B	 118
1- Formation et stabilité des domaines en phase (Lo)	119
2- Formation de la phase Lo en présence d'amphotéricine B	122
2-1- Effet de l'amphotéricine B ajoutée à 20%	122
2-2- Effet de la séquestration de l'ergostérol par l'amphotéricine B	124

2-3- Reformation de la phase (Lo) en présence d'amphotéricine B.....	126
3- Stratégie de ciblage et formation des phases (L_{AmB})	128
4- Conclusion	132
Quatrième partie : Conclusion générale.....	135
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	139
Sixième partie : Annexes.....	151
Publication.....	156

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
AFM	Atomic Force Microscopy
AmB	Amphotéricine B
CDP	Cell Death Phases
Chol	Cholestérol
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
DIB	Domaine-Induced-Budding
DMF	Dimethyl formamide
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DRM	Detergent-Resistant-Membranes
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IAD	Intelligence Artificielle Distribuée
IR	Infrarouge
IRTF	Infrarouge à transformée de Fourier
IRTF-RTA	Infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée
IV	Intraveineux
L _{AmB}	Liquide-ordonnée associée à l'amphotéricine B
Lo	Liquide-ordonnée
MCT	Mercure Cadmium Telluride
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
Mi	Morphology Index
MIR	Moyen infrarouge
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PG	Phosphatidylglycérol
PI	Phosphatidylinositol
PKs	Polyktidesynthase
PS	Phosphatidylsérine
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SDE-X	Spectroscopie des rayon-X à dispersion d'énergie
SMA	Systèmes Multi-agents
Sphingo	Sphingophospholipides
Tm	Temperature meeting

Liste des tableaux

- Tableau n° 1 :** Indice de morphologie ($M_i = l_s/d^2$) de *Candida albicans* ATCC10231 cultivées dans le milieu Sabouraud liquide à 30°C en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL.
- Tableau n° 2 :** Surface et périmètre de la partie observée de *Candida albicans* ATCC10231. La surface est calculée en utilisant le logiciel ImageJ (Parcelle de surface).
- Tableau n° 3 :** Attributions des principales bandes IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4µg d'AmB/mL dans la région allant de 1700 à 1600 cm^{-1} . (Les vibrations d'élongation sont notées ν , et les vibrations de déformation sont notées δ).
- Tableau n° 4 :** Attributions des principales bandes IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL dans la région allant de 1500 à 900 cm^{-1} . (Les vibrations d'élongation sont notées ν et les vibrations de déformation sont notées δ).
- Tableau n° 5 :** Attributions des principales bandes IRTF-RTA obtenues dans la phase de dormance des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL dans la bande amide I et amide II. (Les vibrations d'élongation sont notées ν et les vibrations de déformation sont notées δ).
- Tableau n° 6 :** Attributions des principales bandes IRTF-RTA des cellules dormantes de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL dans la région allant de 1500 à 900 cm^{-1} (ν vibration d'élongation, δ vibration de déformation).
- Tableau n° 7 :** Assignations des différentes bandes IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B.
- Tableau n° 8 :** Assignations des différentes bandes IRTF-RTA, des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B.
- Tableau n° 9 :** Assignations des différentes bandes IRTF-RTA des cellules dormantes.
- Tableau n°10 :** Représentation schématique et classification des formes pléomorphiques de *Candida albicans*.
- Tableau n°11 :** Assignation des bandes IRTF-RTA.

Liste des figures

- Figure n°1 :** Étapes de la biosynthèse (a) et structure chimique de l'amphotéricine B (b) (Volmer A. *et coll.*, 2010).
- Figure n°2 :** Structure stéréochimique de l'amphotéricine B (Espada R. *et coll.*, 2008).
- Figure n°3 :** Spectres d'absorption de l'amphotéricine B (a)- Spectre ultraviolet (UV) (b)- Spectre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) (Gagos M. et Arczewska M., 2010).
- Figure n°4 :** Représentation schématique de la membrane plasmique (a)- bicouche lipidique (b)- les phospholipides (c)- les stérols et (d)- les protéines (Darnell J. *et coll.*, 1993).
- Figure n° 5 :** Structure chimique des stérols membranaires (a)- cholestérol et (b)- ergostérol.
- Figure n° 6 :** Structure des protéines transmembranaires (a)- Structure en feuillettes β «béta», (b)- Structure en hélice α «alpha» (Walian P. *et coll.*, 2004).
- Figure n°7 :** Visualisation par fluorescence de l'influence de la variation de la température et du taux de stérol sur l'inversion de la phase liquide-ordonnée (Lo) et de la phase liquide-désordonnée (Ld) (Vealth S. et Keller S. L., 2002).
- Figure n° 8 :** Schéma du radeau lipidique «raft» (Albert C. M. *et coll.*, 2002).
- Figure n° 9 :** Bourgeonnement d'un domaine membranaire (β) inclus dans des phases liquides (α). La longueur du bord diminue pendant le processus de bourgeonnement de (1) à (3) et conduit à une déformation membranaire (Lipowsky R., 1993).
- Figure n°10 :** Différents états d'équilibre et de non équilibre des phases lipidiques en présence d'un agent perturbateur (Fan J. *et coll.*, 2010).
- Figure n°11 :** Représentation schématique des interactions de l'amphotéricine B avec la membrane plasmique. (a)- Les interactions moléculaires AmB/stérol et (b)- AmB/phospholipides [(Matsuoka S. *et coll.*, 2003) ; (Wilcock B. *et coll.*, 2013)].
- Figure n° 12 :** Interaction de l'amphotéricine B avec les stérols membranaires (a)- AmB/ergostérol et (b)- AmB/cholestérol (Neumann A. *et coll.*, 2013).
- Figure n°13 :** Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B (Mesa-Arango A. C. *et coll.*, 2012).

- Figure n° 14 :** Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage (MEB) équipé d'un spectromètre des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X).
- Figure n° 15 :** Représentation schématique des interactions détectées entre les faisceaux d'électrons et la surface de l'échantillon (poire de diffusion).
- Figure n° 16:** Principe du calcul de l'indice morphologique chez *Candida albicans* ATCC10231 (Merson-Davies L. A. et Odds F. C., 1989).
- Figure n° 17 :** Spectre électromagnétique et domaine infrarouge.
- Figure n° 18:** Rotation des axes originaux par une ACP dans un espace à deux dimensions. L'ellipse représente la distribution des données. X1 et X2 sont les axes de départ et la rotation effectuée par l'ACP fournit le nouveau système d'axes CP1, CP2.
- Figure n°19 :** Représentation d'un dendrogramme.
- Figure n° 20 :** Processus de modélisation et de simulation.
- Figure n° 21 :** Principe de la simulation multi-agents.
- Figure n°22 :** Représentation schématique de la composition et l'organisation des radeaux lipidiques (Mongrand S. *et coll.*, 2010).
- Figure n°23 :** Structure algorithmique de la séparation des phases lipidiques.
- Figure n°24 :** Interface du logiciel NetLogo et paramètres du modèle.
- Figure n°25 :** Croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL. L'amphotéricine B est ajouté au temps zéro de la croissance au même moment que l'inoculum. La concentration cellulaire de départ est de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation continue (130 tours/minute).
- Figure n°26 :** Microphotographies et tracés de la surface cellulaire en 3D (a)- *Candida albicans* ATCC 10231 incubée en l'absence d'amphotéricine B (b)- *Candida albicans* ATCC 10231 incubée en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. L'axe Z est une fonction à valeur unique définie sur une grille géométrique rectangulaire qui signifie l'intensité lumineuse ainsi que la hauteur de la surface (barre=10µm).
- Figure n°27 :** Déformations cellulaires observées par microscope électronique à balayage (MEB) chez *Candida albicans* ATCC10231. (a)- cellules témoins (b)- cellules exposées à 0,4µg/mL d'amphotéricine B.

- Figure n°28:** Cartographie de l'intensité lumineuse (Fausses couleurs : LUT spectrum) de la cellule individuelle de *Candida albicans* ATCC 10231 (a)-cellule témoin (b)-cellule exposée à 0,4µg/mL d'amphotéricine B (c)- configuration en 3D (surface plot) de la cellule témoin et (d)- de la cellule exposée à l'amphotéricine B. (e)- Profil de l'intensité représenté en valeurs de gris de la cellule témoin et (f)- de la cellule exposée à l'amphotéricine B (Barre= 1,30 µm).
- Figure n°29 :** (a)- Configuration en 3D (surface plot) (b)- histogramme d'intensité lumineuse et (c)- spectre SDE-X des microéléments présents à la surface des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B (cellules témoins). Tous les éléments sont normalisés, le temps d'acquisition des spectres est de 10.0 et la tension d'accélération est de 15.0 (keV).
- Figure n°30 :** (a)- Configuration en 3D (surface plot) (b)- histogramme d'intensité lumineuse et (c)- spectre SDE-X des microéléments présents à la surface des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B. Tous les éléments sont normalisés, le temps d'acquisition des spectres est de 10.0 et la tension d'accélération est de 15.0 (keV).
- Figure n°31 :** Histogramme représentant le dosage des éléments présents sur la surface cellulaire de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. Le pourcentage massique des éléments est obtenu par microanalyse SDE-X (Tous les éléments sont normalisés).
- Figure n° 32 :** Représentation schématique de la morphologie cellulaire de *Candida albicans* ATCC 10231 (a)- cellules témoins (b)- levures incubées en la présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B.
- Figure n°33 :** (a)- Courbe de croissance et (b)-représentation en 3D (temps, intensité d'absorbance, nombre d'ondes) de la signature spectrale IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B, pendant 10h de croissance ($0 < t < 3h$ =phase de latence) ($3 < t < 10h$ =phase exponentielle). Région spectrale allant de 3000 à 900 cm^{-1}
- Figure n° 34 :** (a)- Courbe de croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL (b)- Spectres IRTF-RTA aux temps 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h pendant la phase de latence et aux temps 25h, 26h et 27h pendant la phase exponentielle. Région spectrale allant de 3000 à 900 cm^{-1} .
- Figure n° 35 :** Spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL. Variations spectrales (t-Test 0,01) entre la phase de dormance (rouge) et la phase exponentielle (vert). Région allant de 3000 à 900 cm^{-1}

- Figure n° 36 :** Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les spectres des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 en phase de dormance, et en phase exponentielle. Les ellipses sont calculées dans un intervalle de confiance de 95%. (■ Barycentre des points).
- Figure n° 37 :** Attributions des variations spectrales (t-Test 0,01) de 1750 à 1500 cm^{-1} (rouge), de 1500 à 1000 cm^{-1} (jaune) et de 1000 à 900 cm^{-1} (bleu). Région spectrale globale comprise entre 3000 et 900 cm^{-1}
- Figure n° 38 :** Spectres IRTF-RTA de la bande amide I (1700 à 1600 cm^{-1}) et de la bande amide II (1600 à 1500 cm^{-1}) des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4 μg d'AmB/mL. Indication des différences d'absorption au niveau de l'amide I (flèches rouges). Région spectrale allant de 1800 à 1500 cm^{-1}
- Figure n° 39 :** Classification hiérarchique par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA de *Candida albicans* ATCC 10231 récupérée en phase de dormance (phase de latence) (G_1 :L1-L6) et en phase exponentielle (G_2 :E8-E10). Région des variations protéiques dans l'amide I allant de 1640 à 1620 cm^{-1} . Les lignes rouges et bleues représentent respectivement les seuils d'hétérogénéité à 26 et 10.
- Figure n° 40 :** Spectres IRTF-RTA de la région des faibles nombres d'onde de 1500 à 900 cm^{-1} des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 μg /mL. Indication des différences d'absorptions (flèches rouges).
- Figure n° 41 :** Classification hiérarchique ascendante par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 récupérées en phase de dormance (G_1 :L1-L6) et en phase exponentielle (G_2 :E8-E10). Région des variations lipidiques allant de 1280 à 1240 cm^{-1} . Les lignes rouges et vertes représentent respectivement les seuils d'hétérogénéité à 54 et 5.
- Figure n° 42 :** Spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 μg /mL pendant la phase de dormance aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h. Région spectrale allant de 3000 à 900 cm^{-1}
- Figure n°43 :** Spectres IRTF-RTA de la bande amide I (1700 à 1600 cm^{-1}) et de la bande Amide II (1600 à 1500 cm^{-1}) des cellules dormantes récupérées aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h. Indication des différences d'absorption (flèches rouges). Région spectrale allant de 1750 à 1460 cm^{-1}

- Figure n°44 :** Classification hiérarchique ascendante par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA des cellules dormantes récupérées aux temps [0h et 24h (G_1 (P_1))] et aux temps [1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 8h (G_2 (P_2 et P_3))]. Région des variations protéiques amide I et amide II allant de 1711 à 1485 cm^{-1} . La ligne rouge représente le seuil d'hétérogénéité à 115.
- Figure n°45 :** Spectres IRTF-RTA de la région des faibles nombres d'ondes de 1500 à 900 cm^{-1} des cellules dormantes récupérées aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h avec indication des différences d'absorption (flèches rouges).
- Figure n°46 :** Classification hiérarchique ascendante par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA des cellules dormantes récupérées aux temps [0h et 5h (G_1 (P_1))] et aux temps [1h, 2h, 3h, 4h, 8h et 24h (G_2 (P_2 et P_3))] de la phase de dormance. Région spectrale allant de 1184 à 933 cm^{-1} . Les lignes rouges représentent les seuils d'hétérogénéité à 760 et 310 respectivement.
- Figure n° 47 :** Représentation schématique du profil évolutif des différents composants membranaires détectés chez *Candida albicans* ATCC 10231 en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
- Figure n° 48 :** Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en l'absence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/Sphingo/ergostérol (1/1/20%) (barre 100 nm).
 (a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
 (b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
 (c)- Stabilité des phases ordonnées.
- Figure n° 49 :** Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%) (barre 100 nm).
 (a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
 (b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
 (c)- Stabilité des phases ordonnées.
- Figure n°50 :** Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%) constante de liaison AmB/ergostérol =1.00, constante AmB/Phospholipides= 0.2 (barre 100 nm).
 (a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
 (b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
 (c)- Stabilité des phases ordonnées.

Figure n° 51 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1 /1/20%/20%). Constante de liaison AmB/ergostérol =1.00, constante AmB/phospholipides= 0.2, et le potentiel de décompression= 100% (barre 100 nm).
(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
(c)- Stabilité des phases ordonnées.

Figure n° 52 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%). Constante de liaison AmB/ergostérol =1.00, constante AmB/phospholipides= 0.5 et le potentiel de décompression= 100% (barre 100 nm).
(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
(c)- Stabilité des phases ordonnées.

Figure n°53 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphing/ergostérol/AmB (1 /1/20%/20%). Constante de liaison AmB/ergostérol =1.00, constante AmB/phospholipides= 0.75 et le potentiel de décompression= 100% (barre 100 nm).
(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
(c)- Stabilité des phases ordonnées.

Introduction

Les mycoses systémiques sont devenues aujourd'hui à travers le monde une cause de mortalité très lourde due essentiellement au délai de diagnostic de ces infections et du terrain sur lequel elles surviennent. En effet, le nombre de ces infections fongiques a considérablement augmenté durant ces quatre dernières décennies en raison d'une extension de la population à risque et de l'allongement de la survie des patients qui la constituent.

L'utilisation de pratiques chirurgicales de plus en plus agressives et l'accroissement du nombre de patients immunodéprimés ont provoqué une augmentation de l'incidence de certaines espèces de levures tel que *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis* dans les isolats cliniques. Cependant, *Candida albicans* est de loin l'espèce la plus incriminée dans ces infections.

L'amphotéricine B, chef de file des antifongiques polyéniques, est le traitement de première ligne des mycoses systémiques malgré qu'elle soit à l'origine de phénomènes toxiques très sévères mettant en jeu parfois le pronostic vital. Son spectre d'action très large, son effet fongicide intense et la très faible fréquence d'apparition des souches résistantes constituent ses atouts majeurs.

Néanmoins, pour mieux cibler la prise en charge des mycoses systémiques, une meilleure compréhension du mécanisme d'action de cette drogue s'impose.

A l'heure actuelle, l'interaction de cet antifongique de manière statique avec quelques constituants membranaires est largement admise mais reste incomplète **(Morales-Nava R. et coll., 2013)**.

Il est connu que l'amphotéricine B, à fortes doses, interagit avec la membrane plasmique et induit un déséquilibre ionique irréversible causant la destruction de l'intégrité membranaire et l'inhibition des processus responsables de la survie cellulaire. En revanche, à faibles doses, elle provoque un déséquilibre osmotique réversible qui se traduit par une adaptation membranaire et une réparation rapide des dommages cellulaires qui sont souvent à l'origine d'échec thérapeutique **(Romero E. A. et coll., 2009)**.

Par ailleurs, en **2007**, **Boucherit et ses collaborateurs** ont mis en évidence un autre phénomène par lequel certaines levures en culture en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4µg/mL rentrent dans une phase de latence prolongée dans laquelle elles peuvent se maintenir en équilibre avant de reprendre leur croissance. Il s'agit du phénomène de dormance.

Les mécanismes moléculaires mis en jeu dans cette période d'adaptation et lors du réveil des levures pour déclencher une nouvelle division cellulaire, sont très mal connus. Une meilleure connaissance de ces mécanismes de survie cellulaire, permettrait de concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques capables d'éradiquer cette population de levures et de limiter ainsi le risque de récurrence.

Partant de ces données et en vue de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'amphotéricine B dans l'induction du phénomène de dormance cellulaire, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Faire une analyse de la morphologie des levures de *Candida albicans* ATCC10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL, par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à la spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X).
- Etudier le profil biochimique de la surface membranaire de ces levures par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA).
- Concevoir un modèle mathématique de la dynamique membranaire et la formation des radeaux lipidiques « rafts », tout en se basant sur des systèmes multi-agents (SMA). Ce modèle permettra de prédire la dynamique membranaire en présence d'amphotéricine B et de proposer une nouvelle stratégie de ciblage moléculaire.

Première partie
Synthèse bibliographique

1-Propriétés de l'amphotéricine B

1-1- Propriétés physico-chimiques

L'amphotéricine B est un antifongique polyènique qui appartient à la famille des macrolides non aromatiques. Elle est produite naturellement par fermentation d'un actinomycète tellurique, *Streptomyces nodosus* (Gold W. et coll., 1956). Les réactions nécessaires à sa biosynthèse au sein de ce champignon s'amorcent par la voie métabolique des polykétides synthases (PKS) et se termine par la voie métabolique d'addition et d'oxygénation (Caffrey P. et coll., 2001) (Figure n°1a). La stéréochimie actuelle de la molécule a été établie en 1971 à partir d'une analyse par cristallographie aux rayons X du dérivé N-iodoacétyle puis confirmée par RMN. Elle se compose de 61,09% de carbone, 29,43% d'oxygène, 7,96% d'hydrogène et 1,52% d'azote avec un poids moléculaire est de 924,09 g/mole et une formule chimique $C_{47}H_{73}NO_{17}$ (Alan Xu Q. et coll., 2011).

L'amphotéricine B est constituée d'un grand cycle lactonique de 38 atomes de carbone (famille d'agents macrocycliques). Elle comporte dans sa structure deux parties principales:

- Une partie hydrophile poly hydroxylée polaire constituée d'une fonction lactone, d'un cétal cyclique à six chaînons formés par interaction chimique entre la cétone et l'hydroxyle, d'un groupement carboxyle et d'un groupement amine (mycosamine).
- Une partie lipophile constituée de sept (7) doubles liaisons conjuguées appelée Héptaène responsable de sa forme allongée. Cette partie est responsable d'un intense spectre d'absorption dans l'U.V. dans la région 400-280 nm, ce qui permet de l'étudier par spectroscopie.

La présence de deux parties polaires et apolaires confère à l'amphotéricine B le caractère amphiphile. La présence des groupes NH_2 et $COOH$ lui donne le caractère amphotère (Neumann A. et coll., 2013) (Figure n°1b).

La structure chimique ainsi que les différentes liaisons de l'amphotéricine B sont responsables en grande partie de sa conformation et de son mécanisme d'action au niveau membranaire. En effet, Les études spectroscopiques ont montré que son absorption dépend majoritairement de sa structure stéréochimique et des différentes liaisons intermoléculaires (Gruszecki W. I. et coll., 2012).

L'amphotéricine B à une surface stéréométrique de 113 \AA^2 et des dimensions moléculaires de 6 \AA de hauteur, 7 \AA de largeur et 24 \AA de longueur (Wójtowicz K. et coll., 1998) (Figure n°2).

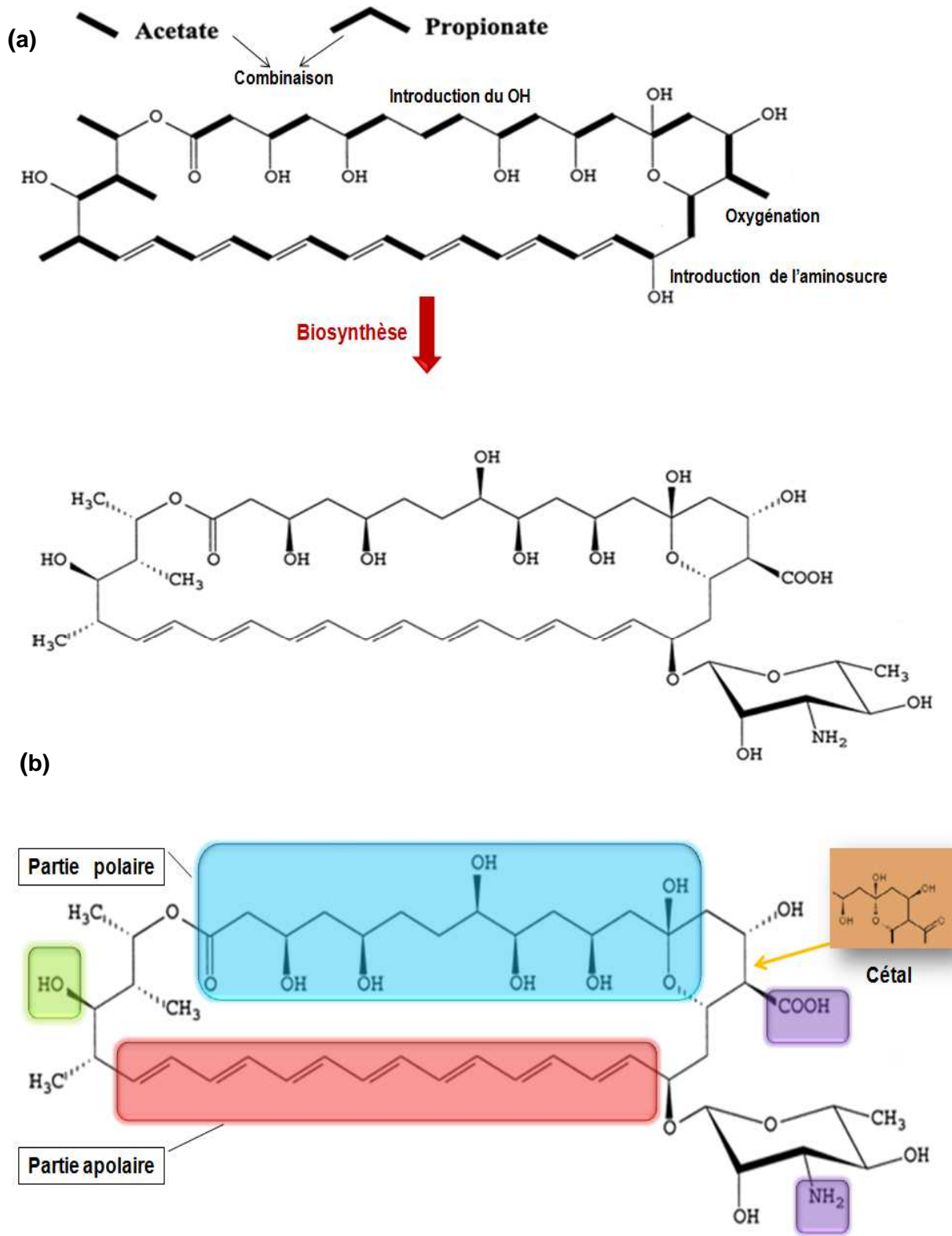


Figure n°1 : Étapes de la biosynthèse (a) et structure chimique de l'amphotéricine B (b) (Volmer A. *et coll.*, 2010)

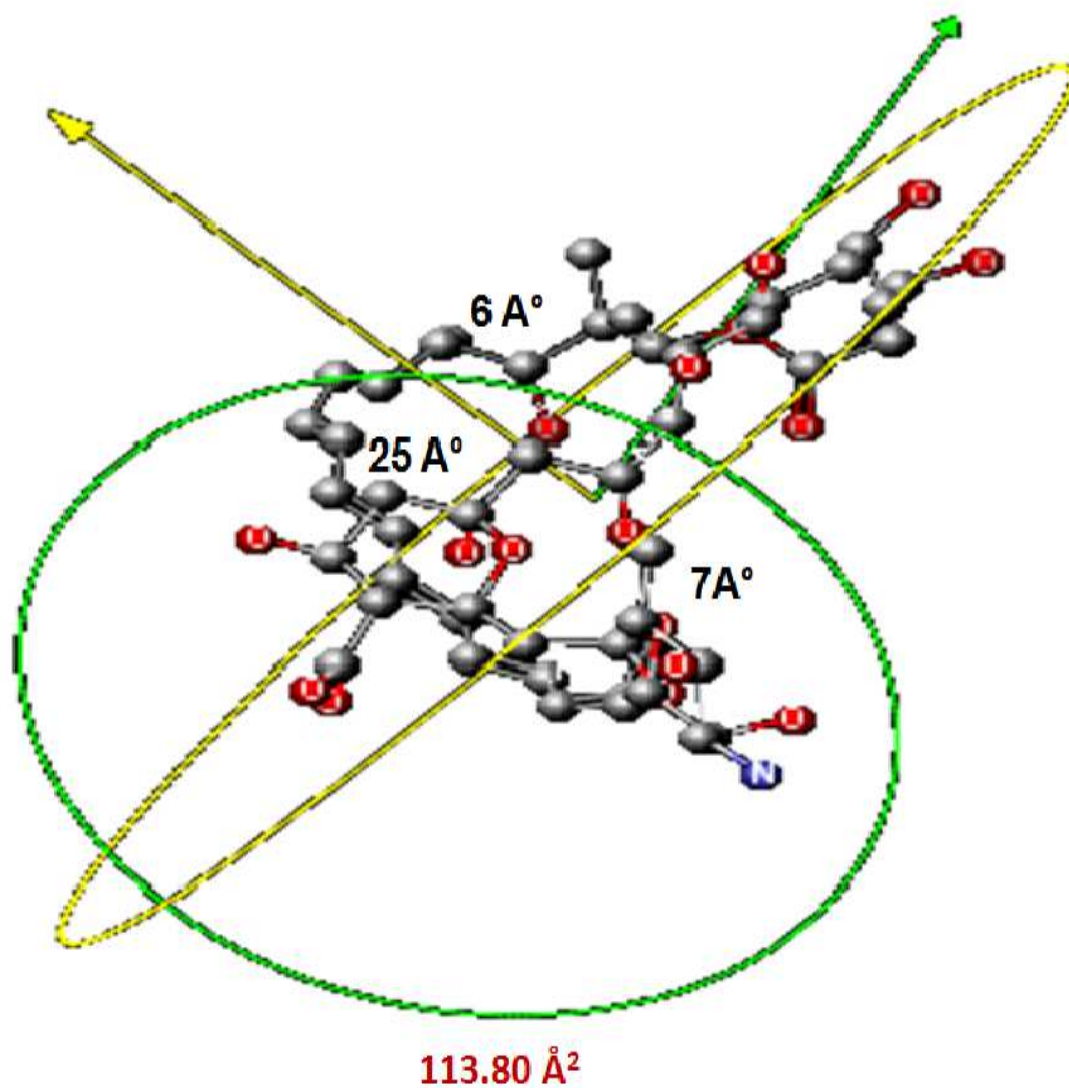


Figure n°2: Structure stéréochimique de l'amphotéricine B
(Espada R. *et coll.*, 2008)

L'intensité relative des bandes obtenues dans l'ultraviolet (UV) et l'infrarouge (IR) nous renseigne sur la structure qu'adopte cet antifongique au cours des interactions intermoléculaires.

Il faut rappeler que les spectres ultraviolets (UV) sont enregistrés dans un intervalle allant de 450 à 280 nm et sont caractéristiques des doubles liaisons conjuguées (**Figure n° 3a**). En revanche, les spectres infrarouges à transformée de Fourier (IRTF) sont enregistrés dans un intervalle allant de 3380 à 1325 cm^{-1} et sont repartis comme suit :

- 1557 cm^{-1} : vibrations associées aux groupements NH_2 et COOH
- 3380, 1325 et 1215 cm^{-1} : vibrations associées aux groupements OH et CH_3
- 1593 et 1010 cm^{-1} : vibrations associées aux doubles liaisons (**Gagos M. et Arczewska M., 2010**) (**Figure n°3b**).

L'amphotéricine B se présente sous forme de poudre jaune instable à la lumière, à l'oxygène, aux fortes températures et aux pH extrêmes. Elle est insoluble dans l'eau, peu soluble dans les alcools et soluble dans les solvants organiques tels que le dimethyl sulfoxide (DMSO) ou le dimethyl formamide (DMF) (**Schmitt S., 2002**). La toxicité de l'amphotéricine B est liée en grande partie à sa très faible solubilité en milieu aqueux à pH 6 (**Milhaud J. et coll., 2002**). En solution aqueuse, l'amphotéricine B se trouve schématiquement sous trois formes :

- Agrégée responsable de la toxicité
- Oligomérique (essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité
- Monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique

L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé, il varie selon la concentration de l'antifongique, le milieu dans lequel il est solubilisé et l'action des surfactants ou autres excipients. Nous comprenons alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion de la forme toxique de cette drogue [(**Legrand P. et coll., 1992**) ; (**Chavanet P. et coll., 1997**) ; (**Vandermeulen G. et coll., 2006**)].

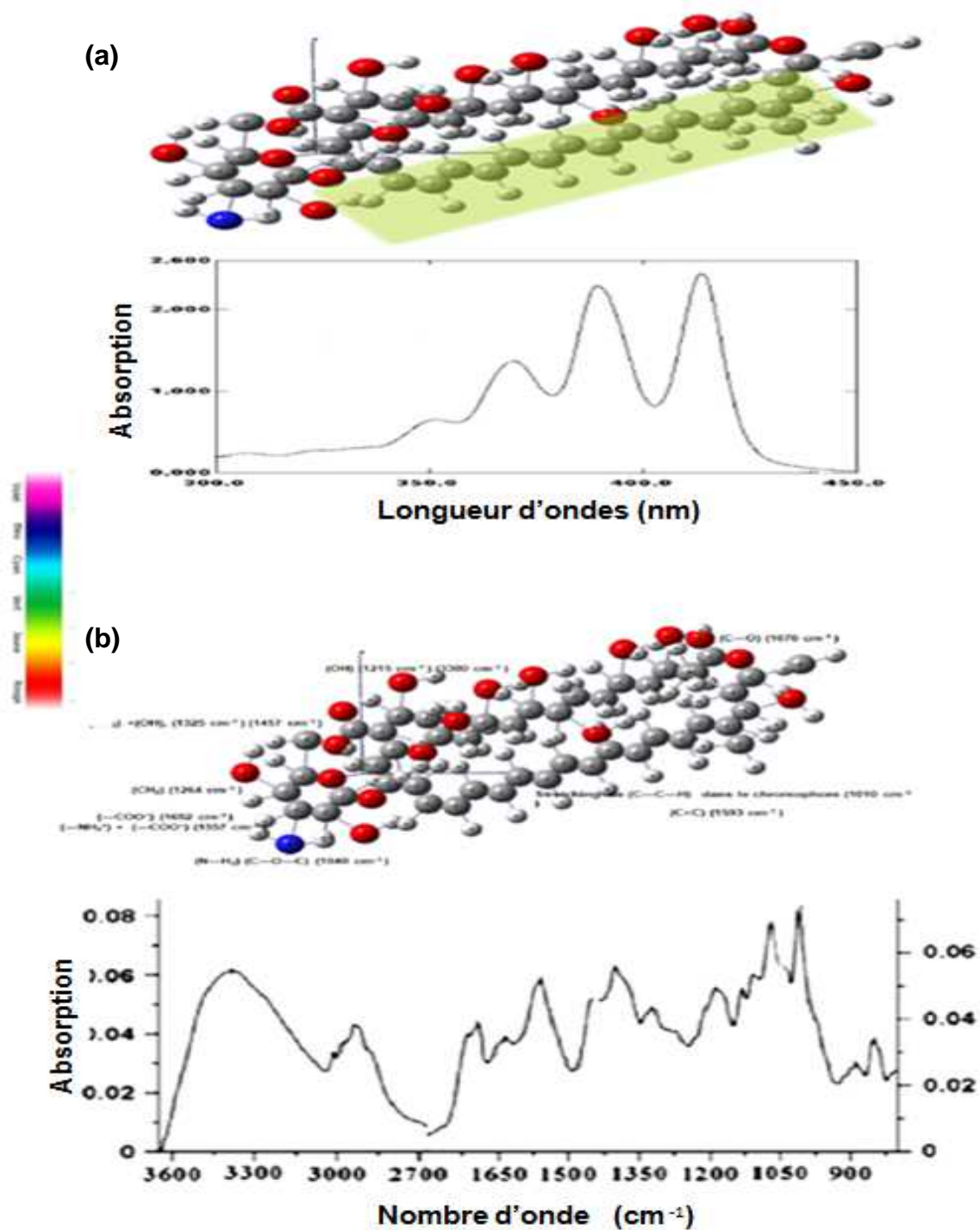


Figure n°3 : Spectres d'absorption de l'amphotéricine B (a)- Spectre ultraviolet (UV) (b)- Spectre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) (Gagos M. et Arczewska M., 2010)

1-2- Propriétés biologiques

1-2-1- Spectre d'action

L'amphotéricine B possède un large spectre d'action qui s'étend à deux types d'infections (**Wilkes G. et coll., 2010**) :

- Infections fongiques : Candidoses (*Candida albicans*), aspergilloses (*Aspergillus fumigatus*), blastomycoses (*blastomycosis dermatitidis*), coccidioidomycoses (*Coccidioides immitis*), cryptococcoses (*Cryptococcus neoformans*), histoplasmoses (*Histoplasma capsulatum*), sporotrichoses (*Sporothrix schenckii*), zygomycoses et infections à *Exserohilum* (*Exserohilum rostratum*).
- Infections parasitaires : Infections à *fusarium* et leishmanioses (*Leishmania donovani*).

Elle n'a aucun effet sur les bactéries et les virus (**Hall G. A., 2012**).

1-2-2- Administration par voie intraveineuse (IV)

Pour permettre l'administration de l'amphotéricine B par voie intraveineuse (IV), il est nécessaire d'améliorer sa solubilité en milieu aqueux afin de diminuer sa toxicité envers les cellules animales. Parmi toutes les formulations mises sur le marché à ce jour, les chercheurs et les cliniciens optent en première intention pour le traitement conventionnel commercialisé sous le nom de Fungizone® (**Sharon L. et coll., 2013**).

La tolérance à l'amphotéricine B varie d'un patient à un autre, par conséquent, la posologie et la durée du traitement sont adaptées à chaque cas clinique selon le siège, la gravité de l'infection, l'agent causal et la fonction cardio-rénale.

Son administration se fait par perfusion intraveineuse lente sur une période d'environ 2 à 8 heures et la tolérance du produit par le patient est évaluée par des doses d'essai pendant 20 à 30 minutes. En cas d'infections sévères provoquées par des germes peu sensibles, la dose maximale est de 0,7 à 1 mg/kg/J ou de 1,5 à 2 mg/kg tous les deux jours (**Lortholary O. et Duvivier C., 2012**).

1-2-3- Pharmacocinétique

Après une injection intraveineuse, la cinétique de distribution de l'amphotéricine B obéit à un modèle tricompartimental :

- Un compartiment central où la molécule lipophile se lie à plus de 90 % aux protéines plasmatiques.

- Deux compartiments périphériques, un d'équilibration rapide ($t_{1/2}$ 24-48 h) et un autre d'équilibration lente ($t_{1/2}$ 15 jours) où elle est retrouvée essentiellement dans le foie et la rate.

L'amphotéricine B a un grand volume de distribution. Des concentrations sont retrouvées dans de nombreux autres tissus tels que les liquides pleuraux, péritonéaux et les articulations. Elle est éliminée très lentement par les reins et la bile (**Atkinson A. J. et Bennet J. E., 1978**).

1-2-4- Toxicité et effets indésirables

L'amphotéricine B présente des effets indésirables dominés par quatre types de portées les plus fréquents sont les réactions liées à la perfusion qui se manifestent par la fièvre, la diarrhée, les nausées, les vomissements et les céphalées. Certains patients peuvent développer une insuffisance rénale consécutive à une diminution du débit de filtration glomérulaire qui se traduit par une augmentation de créatinémie. Des troubles électrolytiques et une anémie caractérisée principalement par une normochromie et une normocytose peuvent également être enregistrés (**Kleinberg M. E., 2010**).

2- Nouvelles formulations de l'amphotéricine B

Plusieurs stratégies de recherche sont mises en œuvre pour améliorer l'index thérapeutique de l'amphotéricine B. Elles se regroupent essentiellement autour de trois thématiques :

- Les modifications chimiques de la structure globale du macrolide par fixation de radicaux sur ses deux groupements ionisables, NH_2 et COOH [(**Szlinder-Richert J. et coll., 2004**) ; (**Hac-Wydro K. et coll., 2005**)].

- La modulation de son environnement physico-chimique par modification de la concentration finale, de la température, du taux d'oxygène et de la force ionique [(**Espada R. et coll., 2008**) ; (**Belkherroubi-Sari L., 2009**) ; (**Boucherit K. et coll., 2011**)].

- L'association aux agents solubilisants tels que les tensioactifs non ioniques, les lipides, les émulsions, les copolymères et les nanoparticules [(**Tasset C. et coll., 1992**) ; (**Vandermeulen G. et coll., 2006**) ; (**Sanchez D. A. et coll., 2014**)].

Parmi ces différentes stratégies, seules les formulations présentant un bon rapport tolérance/efficacité sont commercialisées. Actuellement, il existe quatre préparations galéniques [(Brajtburg J. et Bolard J., 1996) ; (Eriksson U. et coll., 2001)] :

- Fungizone[®]: amphotéricine B associée au désoxycholate de sodium
- Abelcet[®]: amphotéricine B associée au dimyristoyl phosphatidylcholine et dimyristoyl phosphatidylglycérobiliaire
- Amphotec[®] ou Amphocil[®]: amphotéricine B associée au sulfate de cholestérol
- Ambisome[®]: amphotéricine B incorporée dans des liposomes unilamellaires constitués de phosphatidylcholine hydrogéné, de cholestérol et de distéaroyl phosphatidylglycérol.

Il est important de rappeler que depuis sa découverte en 1951 par Hazen et Brown, plusieurs travaux tendent à mieux comprendre le mécanisme d'action de l'amphotéricine B. Cependant, et malgré le nombre important de résultats obtenus, ce dernier n'est que partiellement élucidé. Les effets de l'amphotéricine B sur les cellules fongiques et animales sont multiples et les résultats obtenus rapportent que le mécanisme d'action traditionnel de cette drogue s'exerce au niveau membranaire. C'est pourquoi, il nous a paru nécessaire de donner un aperçu de cet édifice membranaire, de ses différents constituants et de son organisation dynamique avant de décrire le mécanisme d'action de cette drogue.

3- Membrane plasmique

La membrane plasmique des cellules eucaryotes se présente comme un assemblage de molécules formant un double feuillet qui sépare la cellule de son environnement délimitant le cytoplasme cellulaire. Elle contribue de manière essentielle à la protection, à la croissance, au développement, à l'organisation et à la compartimentalisation du contenu cytoplasmique (Stillwell W., 2013). L'épaisseur de la membrane plasmique des cellules animales est d'environ 5 nm, alors que celle des cellules fongiques est d'environ 7 nm (Reshetenko T. V. et coll., 2013) (Figure n°4).

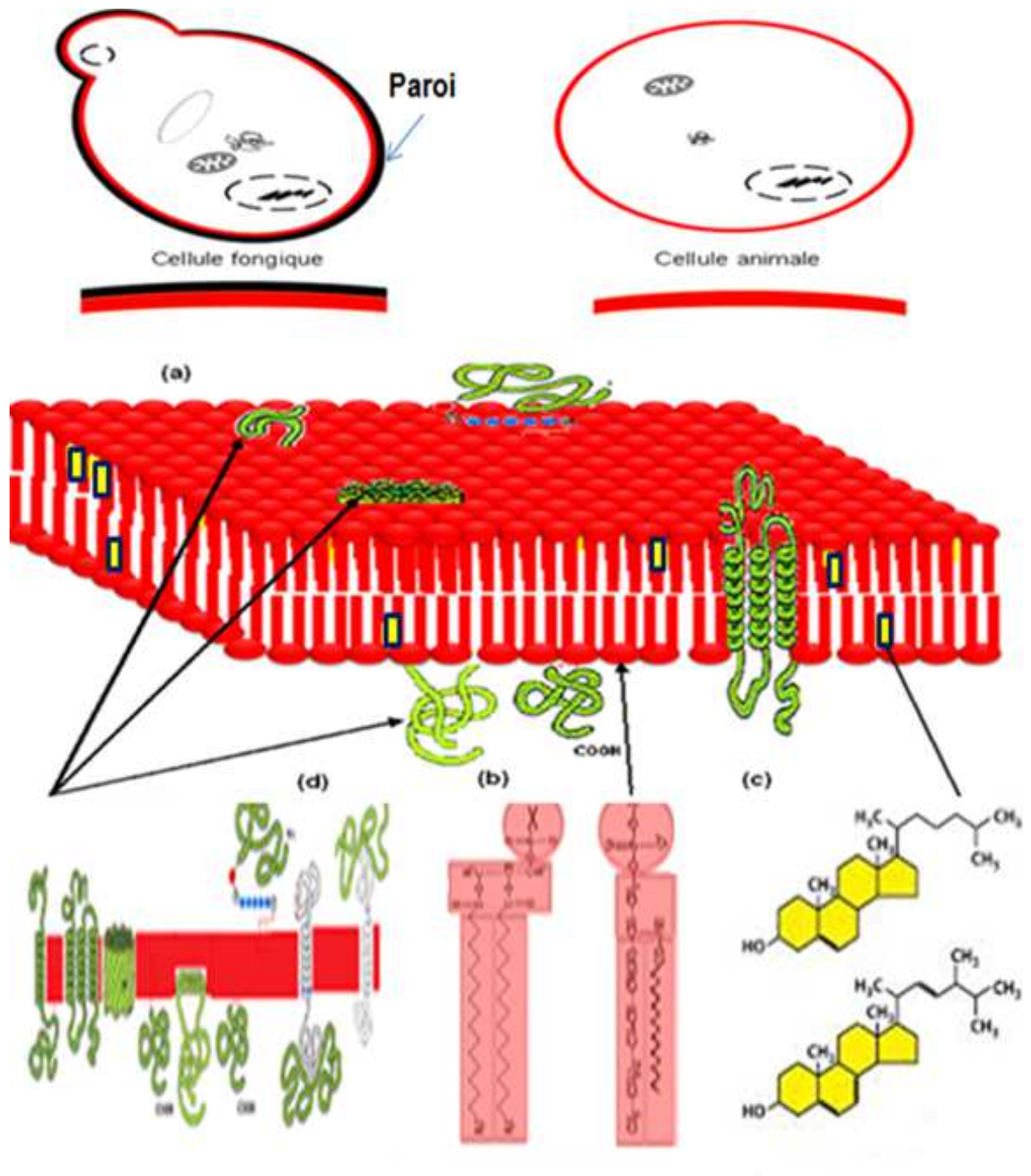


Figure n° 4 : Représentation schématique de la membrane plasmique (a)- bicouche lipidique (b)- les phospholipides (c)- les stérols et (d)- les protéines (Darnell J. *et coll.*, 1993).

3-1- Composition et structure**3-1-1- Lipides**

Nous distinguons deux grandes classes de lipides membranaires incluant les phospholipides et les stérols (**Edidin M., 2003**). Ces éléments sont capables de s'auto-organiser en bicouche avec leurs têtes hydrophiles au contact de l'eau et leurs chaînes hydrophobes compactées à l'intérieur de la membrane (**Catalá A., 2012**).

a- Phospholipides

Ils représentent la classe la plus importante dans les structures membranaires dont la variété dépend de nombreuses combinaisons possibles entre la partie polaire (hydrophile) et la partie apolaire (hydrophobe). Il existe deux types de phospholipides :

- Les glycérophospholipides qui sont des triesters du glycérol dont la fonction alcool du troisième carbone est estérifiée par l'acide phosphorique ; constituant la tête polaire orientée vers l'extérieur, tandis que les fonctions alcool des deux autres carbones sont estérifiées par des acides gras ; constituant la partie apolaire orientée vers l'intérieur (**Zeng Y. X. et coll., 2013**).

- Les sphingophospholipides qui sont des associations d'amino-alcool, d'acide gras et de substituants polaires de même type que ceux des glycérophospholipides [(**Naka T. et coll., 2003**) ; (**Valsecchi M. et coll., 2007**)]. Ils possèdent à la fois un groupement hydroxyle et un groupement amide qui peuvent être aussi bien donneur qu'accepteur de liaisons hydrogènes (**Li B. et coll., 2000**). Le ratio massique sphingophospholipides/glycérophospholipides est de 0,43 (**Sonnino S. et coll., 2007**).

b- Stérols

Cette famille est ubiquitaire des cellules eucaryotes. Elle diffère des autres classes de lipides membranaires par leur structure hydrocarbonée composée d'un noyau stéroïde, d'une chaîne hydrophobe latérale et d'une fonction alcool hydrophile (**Valitova J. N. et coll., 2011**) (**Figure n°5**).

Les stérols sont impliqués dans différentes fonctions biologiques telle que la résistance au stress osmotique, à l'oxydation et à la peroxydation des lipides (**Dupont S. et coll., 2011**). Le ratio massique cholestérol/phospholipides est d'environ 0,46 et celui de l'ergostérol/phospholipides est d'environ 0,2 (**Schneiter R. et coll., 1999**).

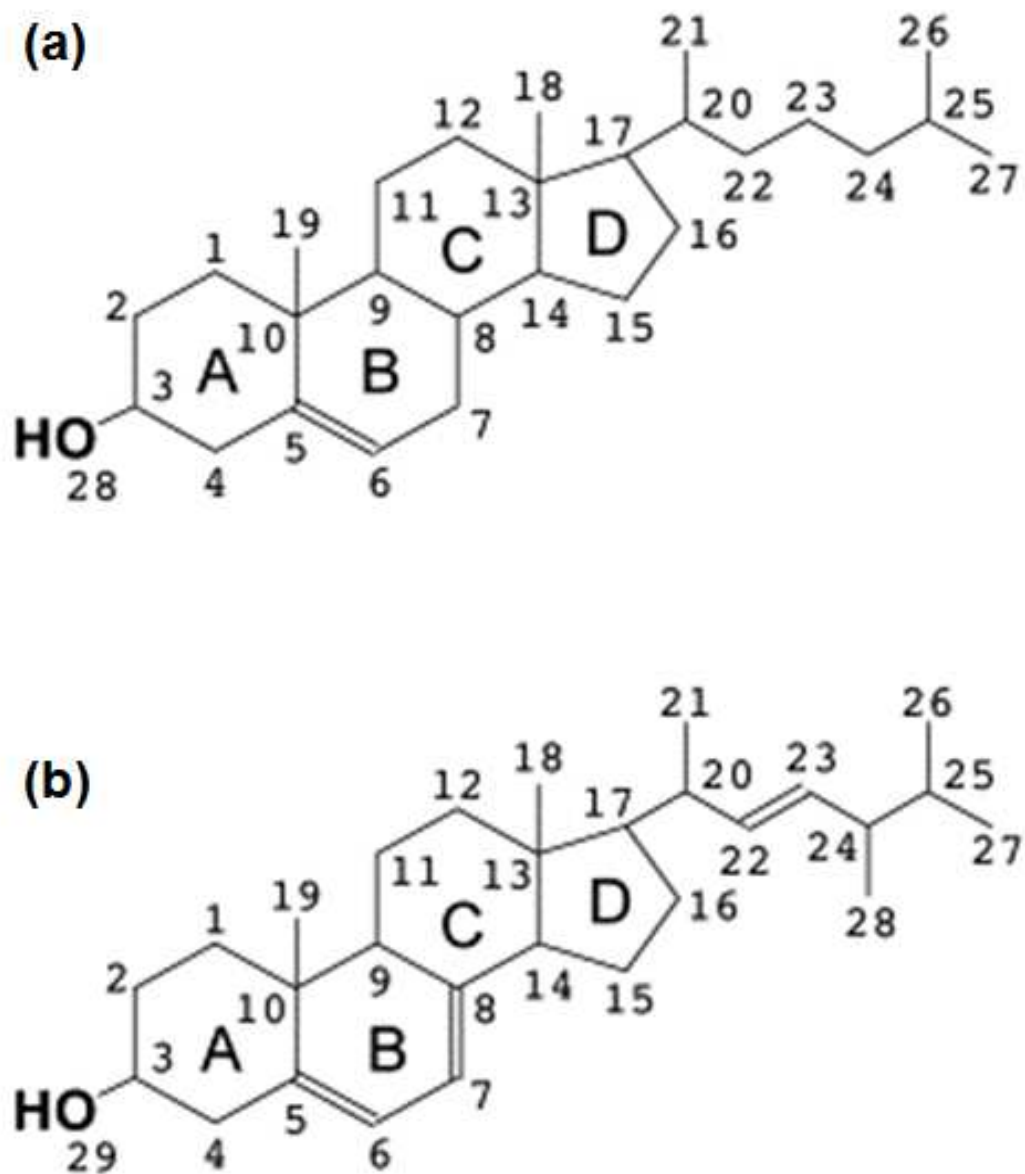


Figure n° 5 : Structure chimique des stérols membranaires (a)- cholestérol et (b)- ergostérol.

3-1-2- Protéines

Les protéines constituent 50 à 70% de la masse membranaire. Elles se présentent sous forme de polymères constitués d'acides aminés naturels reliés entre eux par des liaisons peptidiques ou amides. Les protéines membranaires peuvent être classées en deux catégories sur la base de leurs interactions avec la bicouche lipidique. Les protéines dites intégrales présentant au moins une partie incluse dans la membrane et les protéines périphériques qui n'interagissent qu'avec la partie hydrophile de la bicouche lipidique (Yeagle P. L., 2014).

Les protéines les plus rencontrés possèdent des structures secondaires qui se contractent par des interactions hydrophobes avec les lipides. Les structures de ces protéines sont complexes et divisent ces dernières en deux classes à savoir ; les protéines en spirale composées de 1 à plus de 20 hélices transmembranaires appelées protéines en hélice «alpha» et les protéines en tonneaux composées de 8 à 22 brins, appelées protéines en feuillets «béta» [(Schulz E., 2000) ; (Walian P. et coll., 2004)] (Figure n°6). La fonction principale des protéines est de fournir une perméabilité sélective à la membrane plasmique (Frost A. et coll., 2009). Dans la cellule fongique, les protéines sont associées à un périplasme constitué de 90% de polysaccharides et de 10% de protéines et de lipides.

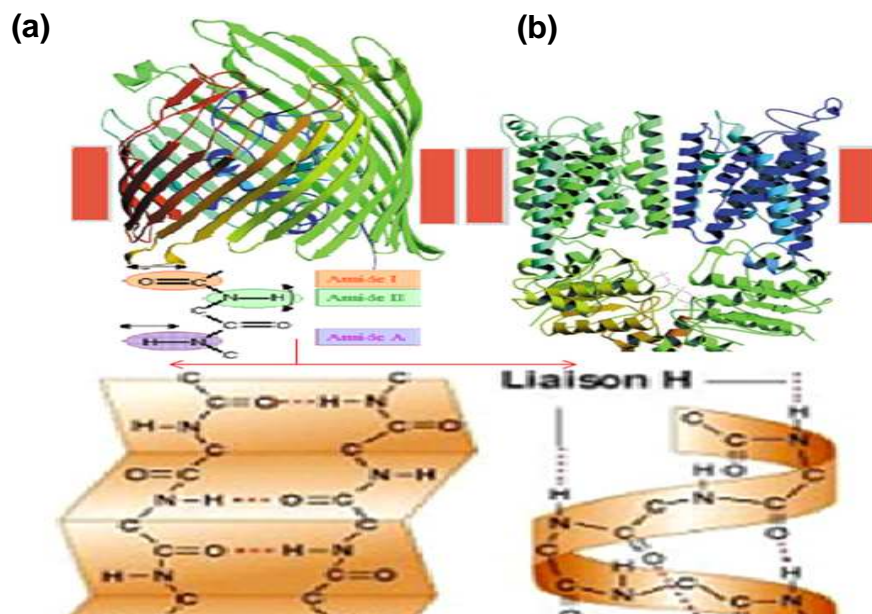


Figure n° 6 : Structure des protéines transmembranaires (a)- Structure en feuillets β «béta», (b)- Structure en hélice α «alpha» (Walian P. et coll., 2004).

3-2- Dynamique et organisation fonctionnelle

Le premier modèle de la dynamique membranaire dit de mosaïque fluide fut proposé en 1972 par **Singer** et **Nicolson** dans lequel les membranes ont tout d'abord été considérées comme des bicouches lipidiques homogènes.

Après diverses spéculations, cette organisation a pu être expliquée par une asymétrie du transport membranaire où les différents constituants peuvent s'arranger de manière latérale en fonction de leur structure moléculaire et des conditions de température et d'hydratation. Ces arrangements peuvent passer d'un état ordonné à un état désordonné ce qui peut induire une organisation qualifiée souvent de séparation de phases lipidiques **[(Simons K. et Van Meer G. 1988) ; (Simons K. et Ikonen E., 1997)]**.

3-2-1- Formation des radeaux lipidiques «rafts»

La séparation de phase latérale génère une phase liquide-ordonnée (Lo) et une phase liquide-désordonnée (Ld) **(Feigenson G. W., 2007)**. La coexistence de ces deux phases n'est possible que lors d'une variation de température, de la composition en stérol et/ou de la présence d'un stimulus externe **[(Vealth S. et Keller S. L., 2002) ; (Mangiarotti A. et coll., 2014)] (Figure n°7)**.

- La température de transition de phase (T_m) correspond à la température pour laquelle les variations d'enthalpie contrebalance le gain d'entropie et génèrent une transition entre la phase liquide-désordonnée (Ld) et la phase liquide-ordonnée (Lo) **(Gautier J. et coll., 2013)**.

- La composition en stérols conditionne l'apparition de la phase liquide ordonnée (Lo) et stabilise l'édifice membranaire.

La phase liquide-ordonnée (Lo) correspond aux radeaux lipidiques «rafts» enrichies en stérols, en sphingophospholipides et en quelques protéines **(London E., 2002) (Figure n°8)**.

La formation de ces radeaux se fait dans un intervalle de temps de 1 à 25 ms et leur taille est de l'ordre de 10 nm à 500 nm **[(Anderson R. G. et Jacobson K., 2002) ; (Dietrich C. et coll., 2002) ; (Kusumi A. et Suzuki K., 2005)]**.

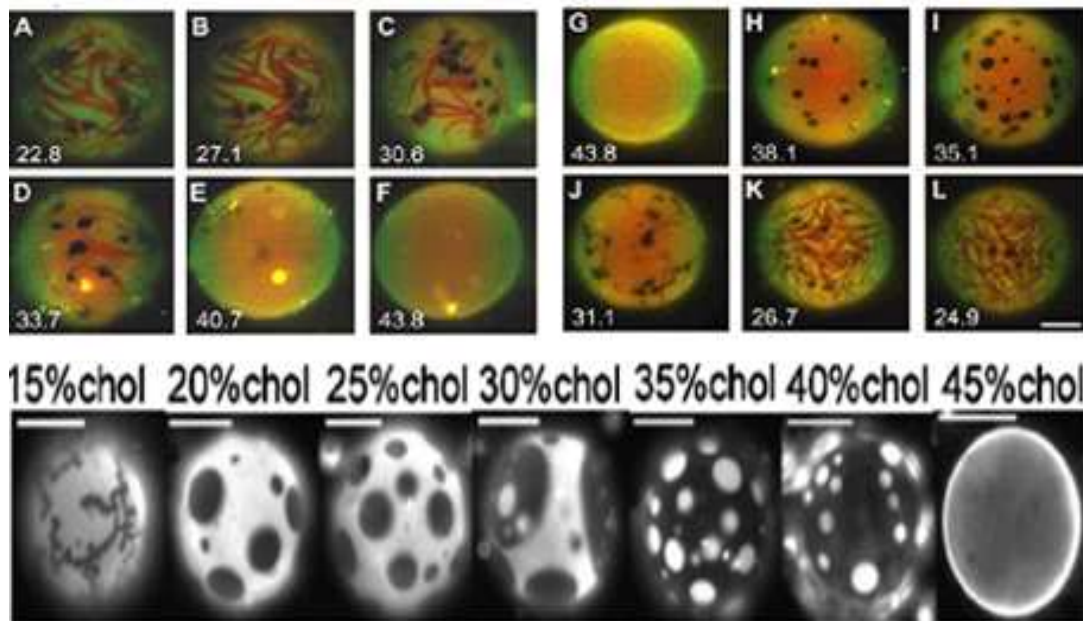


Figure n°7: Visualisation par fluorescence de l'influence de la variation de la température et du taux de stérol sur l'inversion de la phase liquide-ordonnée (Lo) et de la phase liquide-désordonnée (Ld) (Vealth S. et Keller S. L., 2002).

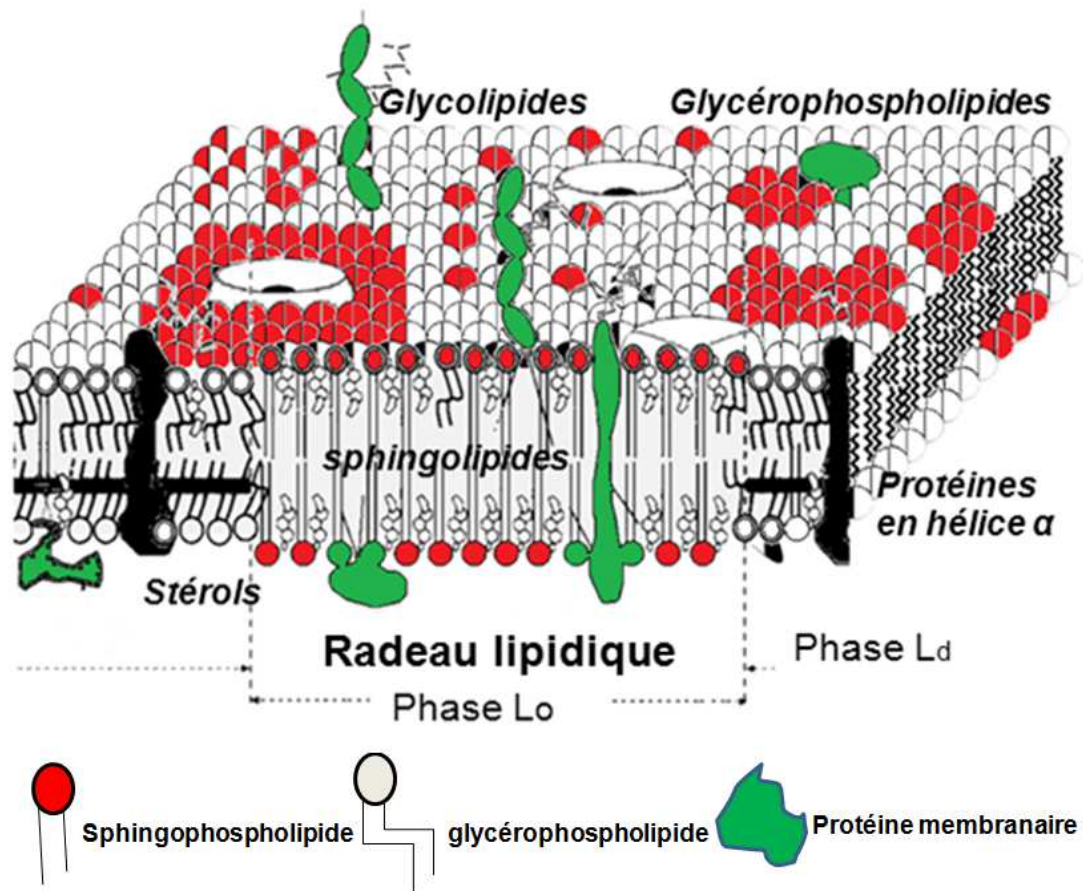


Figure n° 8 : Schéma du radeau lipidique «raft» (Albert C. M. et coll., 2002).

La capacité des cellules à former les radeaux lipidiques est liée en grande partie à la différence structurale entre les lipides membranaires. En effet, des études par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont révélé que les sphingophospholipides ont des forces d'interactions plus importantes et donnent lieu à une cohésion latérale plus grande que les glycérophospholipides.

Les fonctions amides et hydroxyles de la sphingosine des sphingophospholipides peuvent agir à la fois comme donneurs et accepteurs de liaisons hydrogènes, alors que les glycérophospholipides avec deux groupes carbonyles dans cette région ne possèdent que des caractéristiques d'accepteurs **(Gulati S. et coll., 2010)**. De plus, la longueur de l'acide gras fixé sur la fonction amide des sphingophospholipides est comprise entre 16 et 24 atomes de carbone, ce qui leur donne la capacité de s'apparier avec le squelette rigide des stérols de manière préférentielle au détriment des glycérophospholipides qui ne possède que des chaînes courtes et insaturées **[(Barenholz Y., 1984) ; (Ramstedt B. et Slotte J.P., 2002) ; (Bagatolli L. et Sunil Kumar B. P., 2009)]**.

3-2-2- Rôle biologique des radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques membranaires sont impliqués dans une grande variété de processus cellulaires tels que la transduction des signaux, l'endocytose et la morphologie cellulaire **[(Bodin S. et coll., 2003) ; (Fernow I. et coll., 2007)]**. Plusieurs phénomènes coopératifs conduisent à un couplage entre la composition et la forme membranaire. Des études récentes ont montré que les transitions conformationnelles dépendent de la composition en phospholipides, de la fluidité membranaire et de la séparation des composants dans les radeaux lipidiques **(Fortunatti C. et coll., 2014) (Figure n° 9)**. La transition de phase a non seulement pour effet de changer la courbure de la membrane mais également de regrouper les radeaux par l'intermédiaire des glycoprotéines. Les bords des courbures membranaires engendrées par les radeaux se caractérisent par une tension de bord ou de ligne qui conduit à une déformation membranaire connue sous le nom de «Domaine-Induced-Budding» (DIB) **[(Lipowsky R., 1993) ; (Dimova R. et Lipowsky R., 2012)]**.

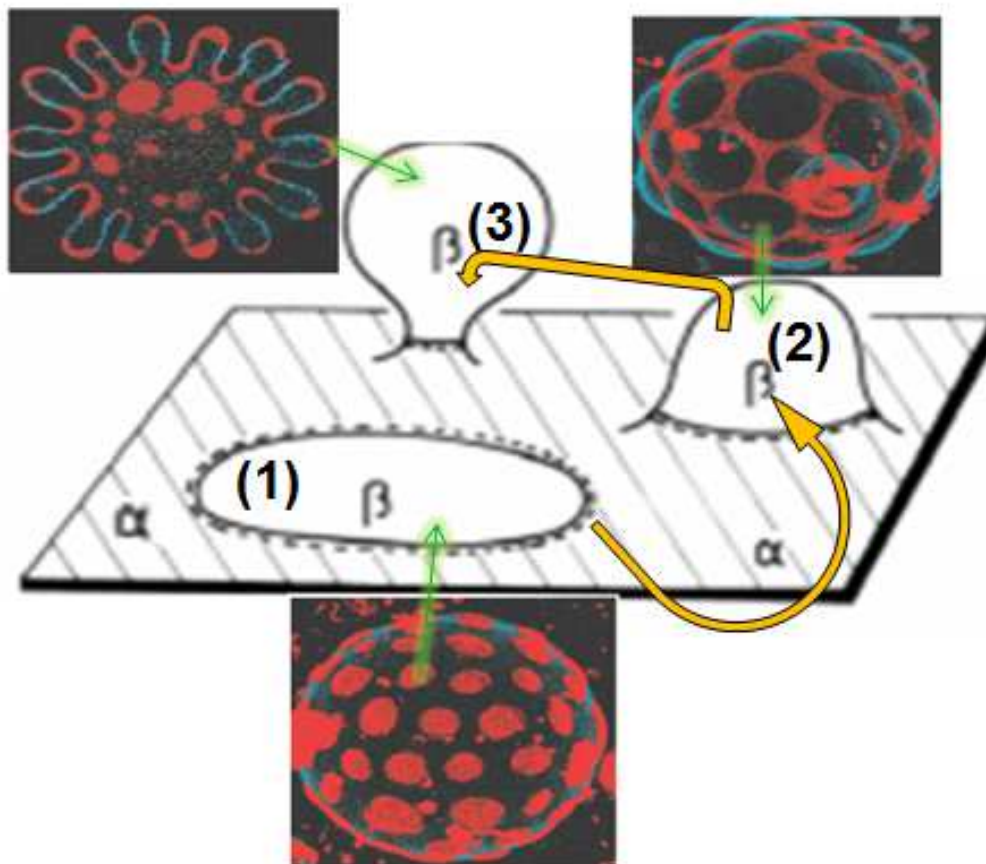


Figure n° 9 : Bourgeonnement d'un domaine membranaire (β) inclus dans des phases liquides (α). La longueur du bord diminue pendant le processus de bourgeonnement de (1) à (3) et conduit à une déformation membranaire (Lipowsky R., 1993).

3-2-3- Perturbation des microdomaines

Après l'exposition de la membrane à un stimulus externe ou à des modifications de la flexibilité par des forces et des interactions moléculaires, la distribution ainsi que le rythme de la formation des microdomaines s'altère (**Chamberlain H. L., 2004**). L'action des détergents induit une transition de phase et une formation de régions appelées detergent-resistant-membranes (DRM), similaires aux rafts biologiques et sont riches en stérols et en sphingolipides [(**Filatov A. et coll., 2003**) ; (**Brown A. D., 2006**)]. Le choc osmotique provoque une décompression au niveau des rafts, une redistribution protéique et une réduction du nombre de microdomaines [(**Toroser D. et Huber R., 1997**) ; (**Labilloy A. et coll., 2014**)]. La présence de molécules telles que les cyclodextrines ou les polyènes induit une séquestration des stérols et une déstabilisation de la formation des radeaux (**Onodera R. et coll., 2013**). Il est à noter que l'utilisation des agents exogènes ne permet pas systématiquement de détruire la membrane mais engendre une association de ces derniers à des composants spécifiques dans des régions appelés «super-rafts» (**Witkowski T. et coll., 2012**) (**Figure n°10**).

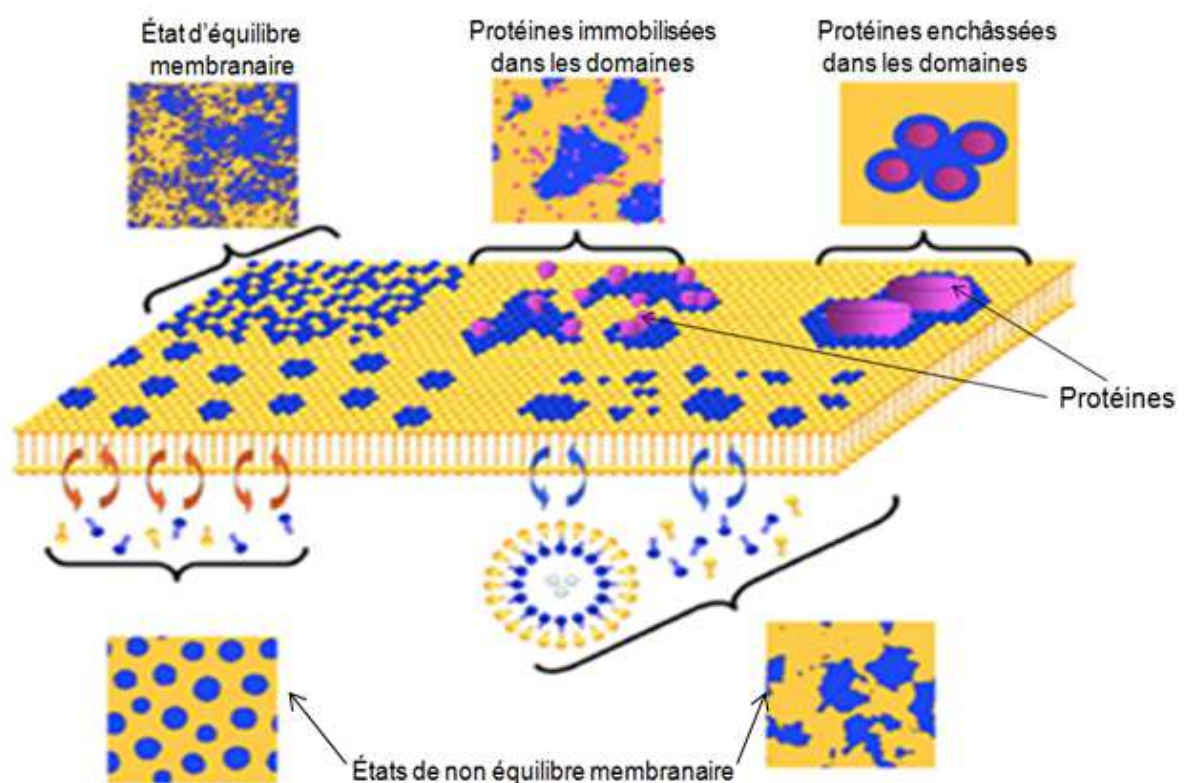


Figure n°10 : Différents états d'équilibre et de non équilibre des phases lipidiques en présence d'un agent perturbateur (**Fan J. et coll., 2010**).

4- Mécanisme d'action de l'amphotéricine B**4-1- Effets membranaires**

L'amphotéricine B interagit avec les cellules en se liant aux stérols membranaires ce qui perturbe l'organisation phasique des lipides et la perméabilité membranaire induisant ainsi la fuite de diverses petites molécules **(Morales-Nava R. et coll., 2013)**.

La formation des canaux ioniques est un processus très rapide qui se produit en millisecondes selon un modèle dans lequel les molécules d'amphotéricine B sont entourées par les stérols membranaires **[(Hartsel S. C. et coll., 1994) ; (Romero E. A. et coll., 2009)] (Figure n° 11)**.

Deux types de pores se forment successivement lorsque la concentration en amphotéricine B augmente, le premier est perméable uniquement aux cations monovalents **(Romero E. A. et coll., 2009)**. En revanche, le deuxième est perméable aux anions et aux grands électrolytes, comme le glucose **(Cohen B. E., 1992)**. La formation des canaux transmembranaires dépend non seulement de la composition en lipides et en protéines membranaires mais aussi des liaisons phospholipides/amphotéricine B qui se forment par interaction entre le groupement NH_3^+ de l'amphotéricine B et le groupement PO^{4-} des phospholipides **[(Clejan S. et Bittman R., 1985) ; (Matsuoka S. et coll., 2003) ; (Mouri R. et coll., 2008)]**.

Les complexes stérol/amphotéricine B formés par le biais des liaisons hydrogènes entre le 3- β hydroxyl du stérol et le groupement NH_2 de l'amphotéricine B sont stabilisés par des interactions de Van Der Waals entre le chromophore de l'amphotéricine B et la partie lipophile du stérol et par des forces de Colomb **[(Baran M. et coll., 2009) ; (Palacios D. S. et coll., 2011)]**.

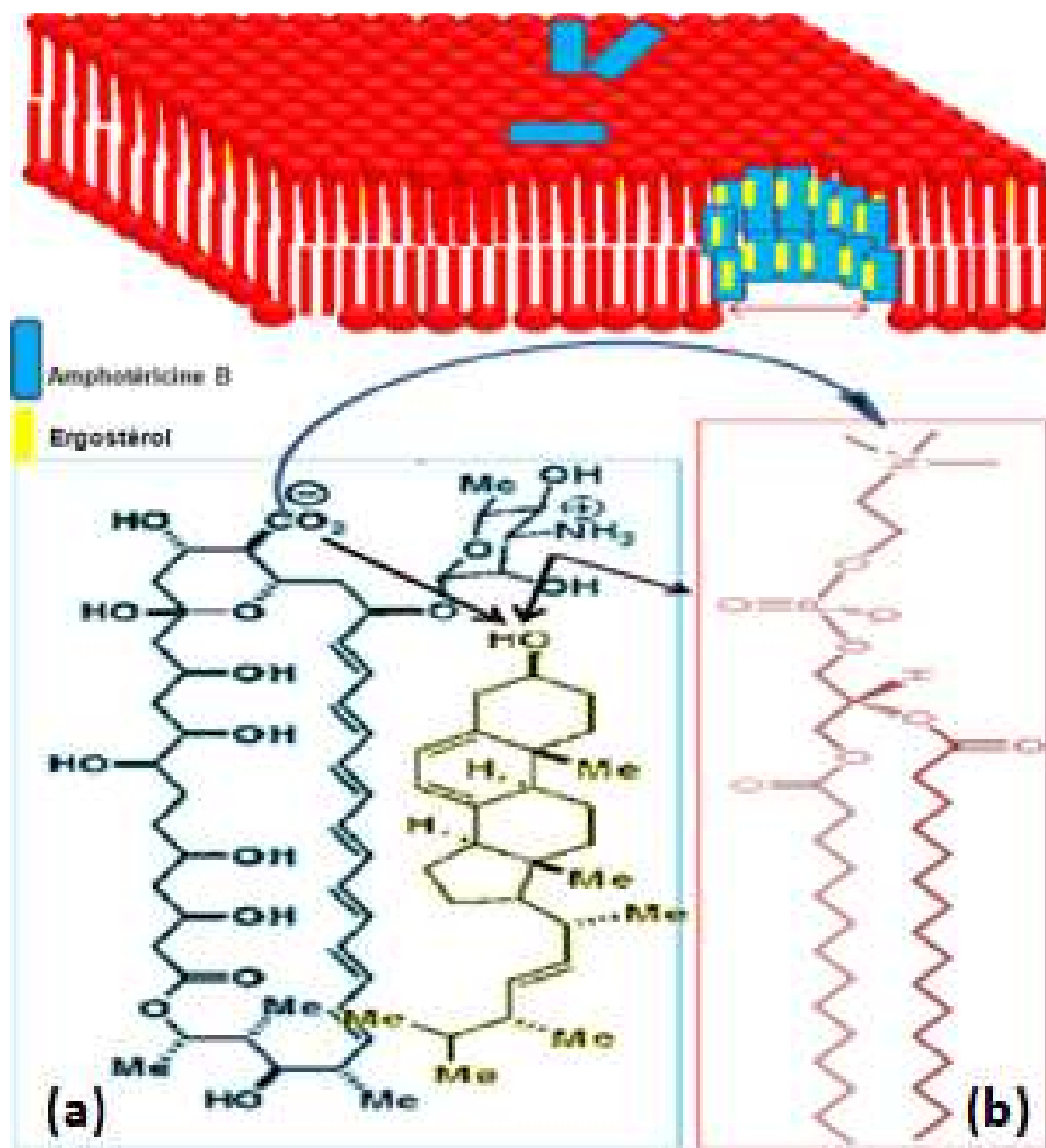


Figure n°11 : Représentation schématique des interactions de l'amphotéricine B avec la membrane plasmique.

(a)- Les interactions moléculaires AmB/stérol et (b)- AmB/phospholipides [(Matsuoka S. *et coll.*, 2003) ; (Wilcock B. *et coll.*, 2013)].

La sélectivité de l'amphotéricine B pour la cellule fongique est la conséquence d'une affinité beaucoup plus marquée pour l'ergostérol que pour le cholestérol **(Matsumori N. et coll., 2004) (Figure n° 12)**.

Cette différence d'affinité est liée aux propriétés structurales des deux stérols. En effet, la présence de doubles liaisons supplémentaires au niveau de l'ergostérol, une dans le noyau stéroïdien en C₇₋₈ et une autre dans la chaîne alkyle en C₂₂₋₂₃, augmente la densité d'électron et diminue la flexibilité membranaire **[(Norman A. W. et coll., 1972) ; (Baran M. et coll., 2009) ; (Mannock D. A. et coll., 2010)]**. De plus, l'existence des interactions électroniques de type (π - π) entre les constituants du complexe formé d'ergostérol stabilise les pores et donne au canal AmB/Ergostérol un diamètre plus large par rapport au canal AmB/Cholestérol **[(Baginski M. et coll., 2002) ; (Baran M. et coll., 2009) ; (Mannock D. A. et coll., 2010)]**.

4-2- Autres effets cellulaires

Outre la faculté à former des pores transmembranaires, l'amphotéricine B agit sur la cellule à plusieurs niveaux **(Gray K. C. et coll., 2012) (Figure n°13)**.

Elle induit la formation des radicaux libres d'O₂ responsables des peroxydations lipidiques et de la lyse cellulaire, augmente la concentration du calcium intracellulaire dans les cellules fongiques et inhibe l'action de l'ATPase à protons des cellules fongiques (*Candida albicans*) et l'ATPase Na⁺/K⁺ des cellules animales ainsi que la pénétration du phosphore minérale dans les cellules **[(Rogers P. D. et coll., 1999) ; (Sangalli-Leite F. et coll., 2011)]**. Elle peut également altérer les protéines, les acides nucléiques et quelques organites entraînant ainsi la mort cellulaire **(Mowat E. et coll., 2008)**.

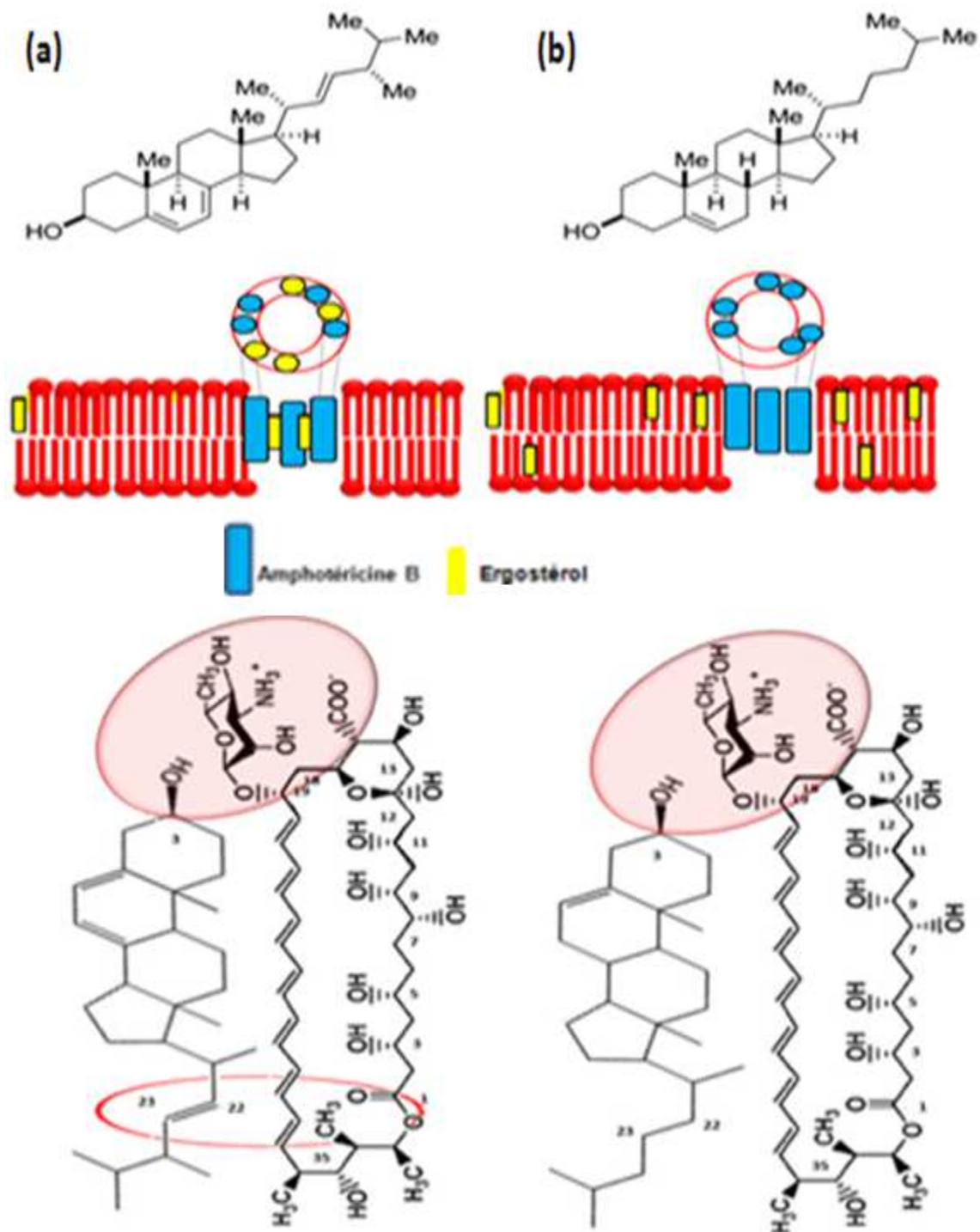


Figure n° 12 : Interaction de l'amphotéricine B avec les stérols membranaires (a)- AmB/ergostérol et (b)- AmB/cholestérol (Neumann A. *et coll.*, 2013).

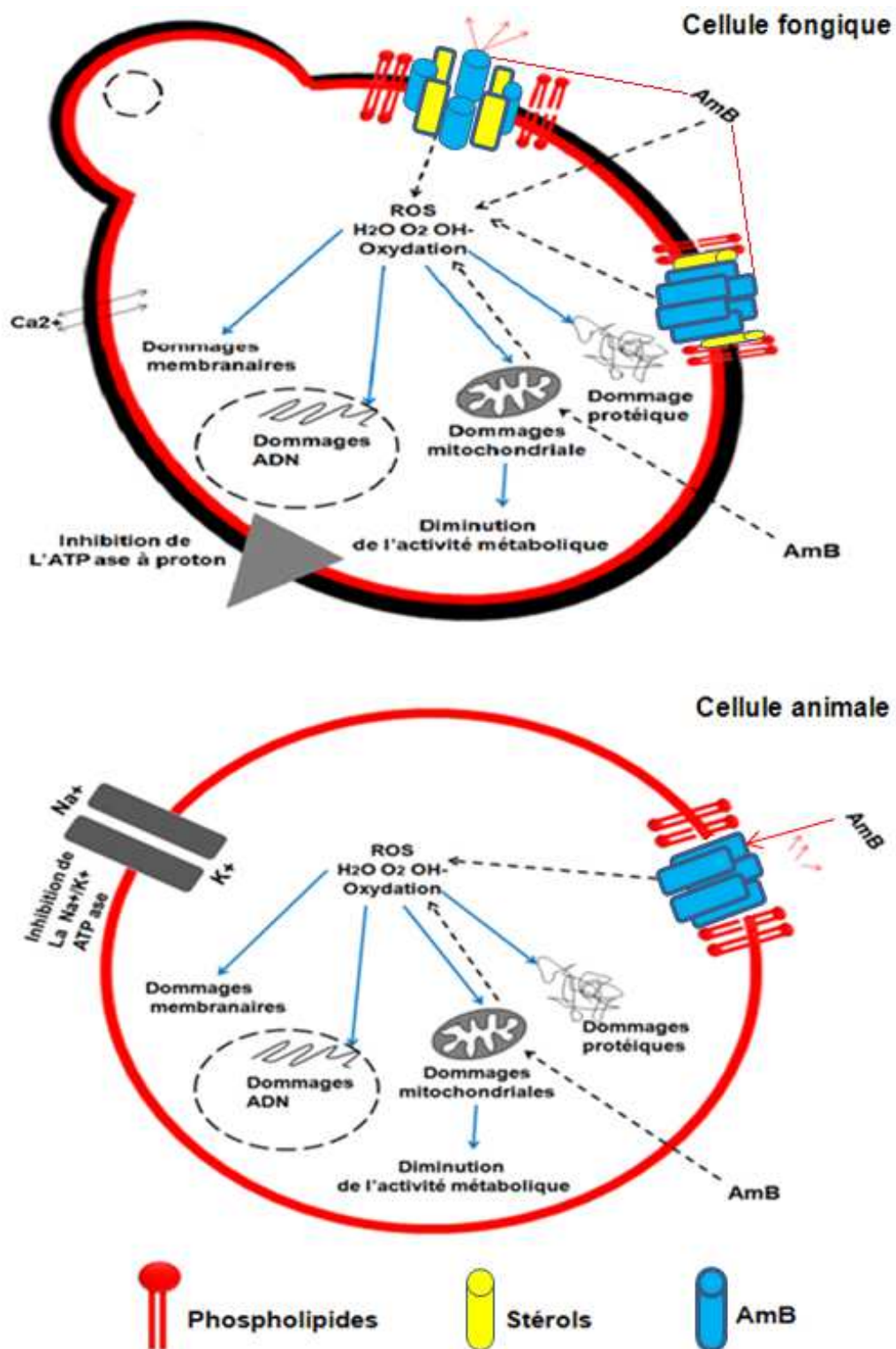


Figure n°13 : Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B (Mesa-Arango A. C. et coll., 2012).

Parmi les effets de l'amphotéricine B, l'induction de la dormance cellulaire chez les cellules fongiques est de découverte plus récente. Les mécanismes aboutissant à ce phénomène restent pour le moment très mal connus.

4-3- Phénomène de dormance

Parmi les travaux qui ont visé à comprendre ce mécanisme d'adaptation cellulaire nous pouvons citer ceux de **Liao et ses collaborateurs (1999)** et **(2003)**, qui ont montré que les cellules de *Candida albicans* exposées à des concentrations d'amphotéricine B comprises entre 0,5 et 1µg/mL sont incapables de se multiplier mais peuvent «ressusciter» si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 15h à 22°C. De plus, en **2007**, **Boucherit et ses collaborateurs**, ont étudié le phénomène de dormance en utilisant la cytométrie en flux. Ces auteurs ont évalué *in vitro* l'effet de l'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4µg/mL sur des cellules de *Candida albicans* ATCC10231. Ces auteurs ont montré que les levures qui échappent à l'effet toxique de l'amphotéricine B rentrent dans une phase de latence qui se prolonge jusqu'à 21h, avant de reprendre leur croissance avec un taux d'inhibition de 45%.

Devant ces résultats, des travaux tendent à caractériser cet état cellulaire, pour comprendre par quel mécanisme les cellules dormantes peuvent ressusciter après avoir été exposées à l'amphotéricine B. Cet état de dormance est favorisé par une organisation membranaire différente en présence de cet antifongique. En effet, les changements induits par cette drogue sont liés d'une part à une contraction volumique importante des cellules causée par la fuite d'ions. D'autre part, à une modification de l'organisation structurale des lipides membranaires qui résulte de la séquestration des stérols (**Dupont S. et coll., 2011**).

L'hypothèse principale pour expliquer la perméabilisation de la membrane plasmique implique une diminution ou une augmentation de la surface membranaire par des phénomènes de transition morphologiques. L'altération de la membrane plasmique après exposition à de fortes concentrations d'amphotéricine B résulte de la concomitance entre les transitions de phases lipidiques et la contraction volumique cellulaire.

Dans le cas d'une exposition à une concentration finale de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B où la survie cellulaire est moins affectée, les modifications membranaires ainsi que les mécanismes associés à la survie des levures sont pour le moment mal connus et méritent une étude plus approfondie afin d'être élucidés.

5- État de l'art et conception de la thèse

L'étude bibliographique a montré que l'activité pharmacologique de l'amphotéricine B est nécessairement liée à son interaction chimique ou physico-chimique avec sa cible biologique, c'est-à-dire bien souvent son site d'action cellulaire. Du degré de la complémentarité de l'amphotéricine B avec son site d'action dépendra l'intensité de la réponse biologique et la manifestation de l'activité pharmacologique sélective. L'objectif de nos travaux sur le phénomène de dormance est de développer de nouveaux outils permettant d'améliorer la compréhension du mécanisme d'action de l'amphotéricine B et de prendre en charge les échecs thérapeutiques en milieu hospitalier en proposant une stratégie de ciblage moléculaire et une surveillance adaptée.

Les stérols représentent une fraction importante des lipides membranaires et sont décrits comme composants importants pour la stabilité de la membrane plasmique. Outre leurs rôles dans des phénomènes physiologiques, ils rééquilibrent les transitions phasiques des bicouches lipidiques et sont notamment impliqués dans la résistance des cellules à des perturbations physiques, osmotiques et chimiques, comme l'exposition à l'amphotéricine B (**Dupont S. et coll., 2011**).

Un intérêt particulier a été porté sur l'étude de l'impact des domaines riches en ergostérol et leurs rôles dans la survie des levures de *Candida albicans*.

La perturbation par l'interaction membranaire de l'amphotéricine B entraîne une réorganisation membranaire qui donne aux cellules le potentiel d'acquérir des modifications morphologiques et biochimiques importantes et de s'adapter au stress osmotique causé par cette drogue.

Dans cette étude, nous avons cherché à comprendre les mécanismes membranaires impliqués dans la survie des cellules dormantes de *Candida albicans* ATCC 10231 exposées à une concentration sub-inhibitrice d'amphotéricine B (0,4µg/mL).

Cette étude a porté sur trois volets :

- Analyse morphologique des cellules par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à la spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X).
- Analyse biochimique de la surface membranaire par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier mode -réflexion totale atténuée (IRTF-RTA).
- Construction d'un modèle mathématique de la dynamique membranaire et la formation des radeaux lipidiques « rafts » tout en se basant sur des systèmes multi-agents (SMA). La démarche utilisée consiste à prédire la dynamique membranaire en présence et en l'absence d'amphotéricine B et à proposer une nouvelle stratégie de ciblage moléculaire.

Deuxième partie
Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé aux laboratoires « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) », « microscopie électronique II (LME II) » - Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen et « structure et fonction des membranes biologiques (SFMB) » - Université Libre de Bruxelles.

1^{er} chapitre : Analyse morphologique des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B

1- Matériel

1-1- Milieu de culture

Les cultures de *Candida albicans* sont menées sur milieu Sabouraud liquide dont la composition pour 1 litre est la suivante :

Extrait de levure	3g
Peptone	10g
Glucose	20g

Le pH du milieu est ajusté à $5,6 \pm 0,2$

La stérilisation du milieu liquide et solide contenant 2% d'agar-agar se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

1-2- *Candida albicans*

Nous avons utilisé comme modèle de levure la souche *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Il s'agit d'une souche de sérotypage A caractérisée par une reproduction asexuée (anamorphe). Elle est isolée chez l'homme présentant une mycose broncho-pulmonaire. Les levures sont entretenues par repiquages réguliers et successifs sur Sabouraud gélosé et conservées à +4°C.

1-3- Amphotéricine B

Nous avons utilisé l'amphotéricine B pure provenant des laboratoires Sigma. La solution mère d'antifongique est préparée en extemporané dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10^{-3} M puis ajustée à 10^{-4} M au spectrophotomètre à 416 nm selon la formule $A = \epsilon Cl$ ($\epsilon_{416} = 121\ 400$).

L'antifongique est utilisé à une concentration finale de 0,4µg/mL pour les tests d'efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 (**Boucherit Z. et coll., 2007**).

2- Méthodes**2-1- Croissance des levures****2-1-1- Préparation de la préculture**

A partir d'une culture de *Candida albicans* ATCC 10231 sur milieu Sabouraud gélose et conservée à +4°C, nous avons prélevé aseptiquement quelques colonies à l'aide d'une anse de platine que nous avons ensemencé dans des tubes stériles contenant 10 mL de milieu Sabouraud liquide. Cette première préculture est incubée à 30°C dans un incubateur de paillasse (Orbital Shaker, Thermo-forma) pendant 6h sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute.

A partir de cette dernière, un volume de 1mL est prélevé et transféré dans 10mL de milieu Sabouraud liquide puis placé dans une étuve bactériologique (Memmert) à 30°C pendant 24 heures.

2-1-2- Croissance en milieu liquide

Les cultures de *Candida albicans* ATCC10231 sont menées dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 100mL de milieu Sabouraud liquide (pH 5,6 ± 0,2) en l'absence et en présence d'amphotéricine B. La concentration cellulaire de départ est fixée à 2.10⁶cellules/mL (**Boucherit-Atmani Z., 2007**).

Les Erlenmeyers sont ensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 24 heures.

La solution d'antifongique est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 0,4 µg/mL au même moment que l'inoculum, ce qui correspond au temps zéro de la croissance.

L'incubation est réalisée dans un incubateur de paillasse (Orbital Shaker, Thermo-forma) à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minute pendant 48 heures.

La mesure de la croissance se fait par dénombrement des levures viables sur cellule de Thoma toutes les 60 minutes.

2-2- Analyse morphologique par microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à un système d'analyse par spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X)

2-2-1- Principe

La microscopie électronique à balayage est une technique qui permet de balayer la surface de l'échantillon à l'aide d'un faisceau électronique d'un diamètre de quelques nanomètres. Cela permet de visualiser des caractéristiques morphologiques avec un agrandissement élevé et une profondeur de champ accrue.

Pendant le balayage, il se crée un rayonnement X qui peut être enregistré par un système d'analyse dispersive en énergie. L'analyse spectroscopique des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X) permet de connaître la composition élémentaire qualitative et/ou quantitative d'un échantillon à partir de la mesure par une diode Si(Li) des énergies de photons X émis par la région de l'échantillon bombardée par le faisceau d'électrons **(Lyman C. E. et coll., 1990) (Figure n°14)**.

Diverses interactions entre les électrons incidents primaires et les cellules génèrent des signaux électroniques qui sont utilisés pour construire les images et d'autres des rayons-X pour la microanalyse chimique.

En pénétrant dans l'échantillon, le fin pinceau d'électrons diffuse peu et constitue un volume d'interaction (poire de diffusion) dont la forme dépend principalement de la tension d'accélération et du numéro atomique de l'échantillon **(Figure n°15)**. Sous l'impact du faisceau d'électrons accélérés, des électrons rétrodiffusés et des électrons secondaires émis par l'échantillon sont recueillis sélectivement par des détecteurs qui transmettent un signal à un écran cathodique dont le balayage est synchronisé avec le balayage des cellules.

La rencontre entre le faisceau électronique incident et les atomes de la surface de l'échantillon génère des photons X. Le traitement des signaux X permet de trier les photons par énergie, d'attribuer chaque photon détecté à un élément chimique et de compter les photons en fonction de leur énergie (en eV). Il est donc possible de procéder à une analyse chimique qualitative et quantitative. Les photons X de trop basse énergie ne peuvent être détectés, l'analyse SDE-X ne détecte pas les éléments à petit numéro atomique (H, He, Li, Be, B).

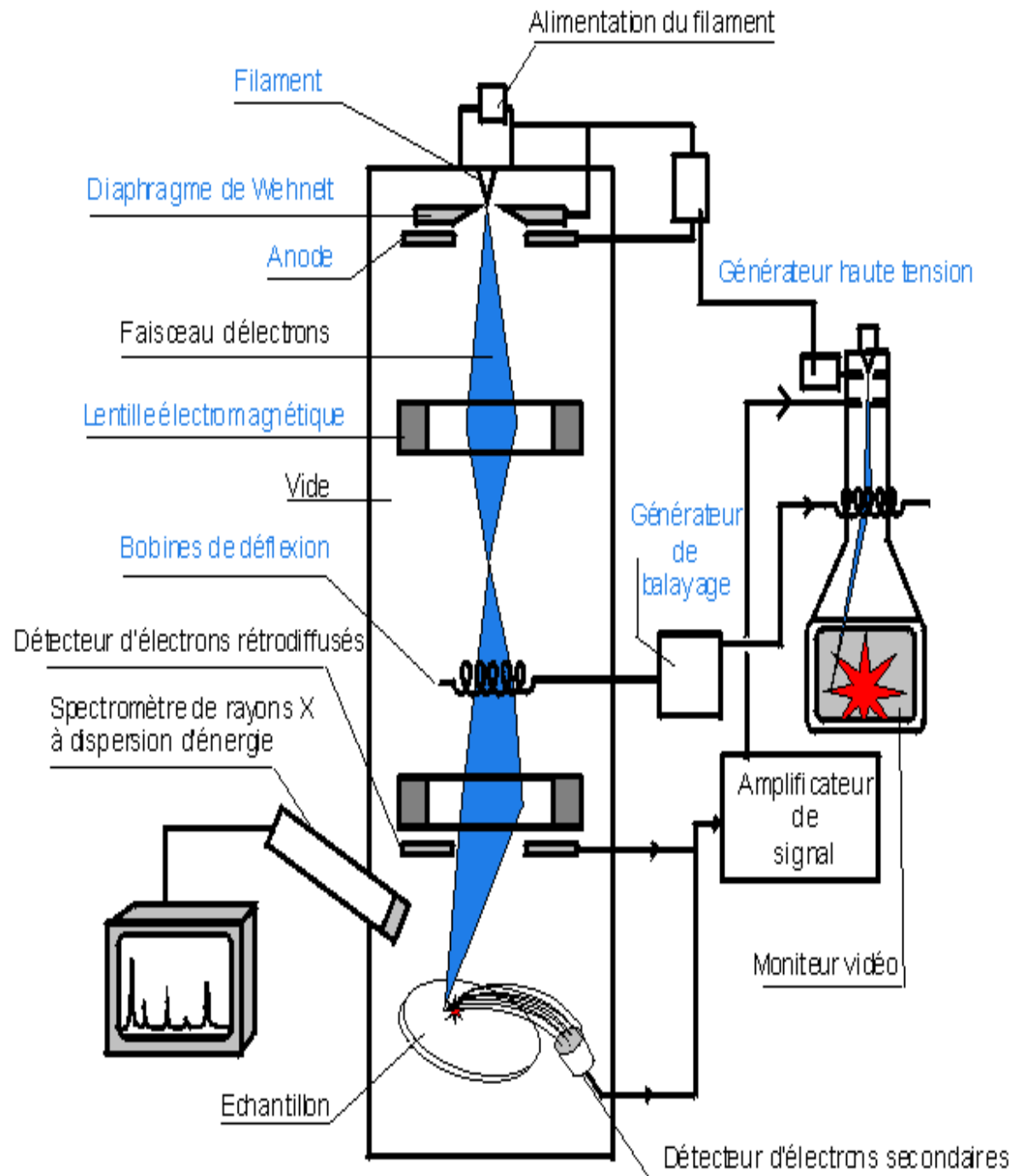


Figure n° 14 : Représentation schématique d'un microscope électronique à balayage (MEB) équipé d'un spectromètre des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X).

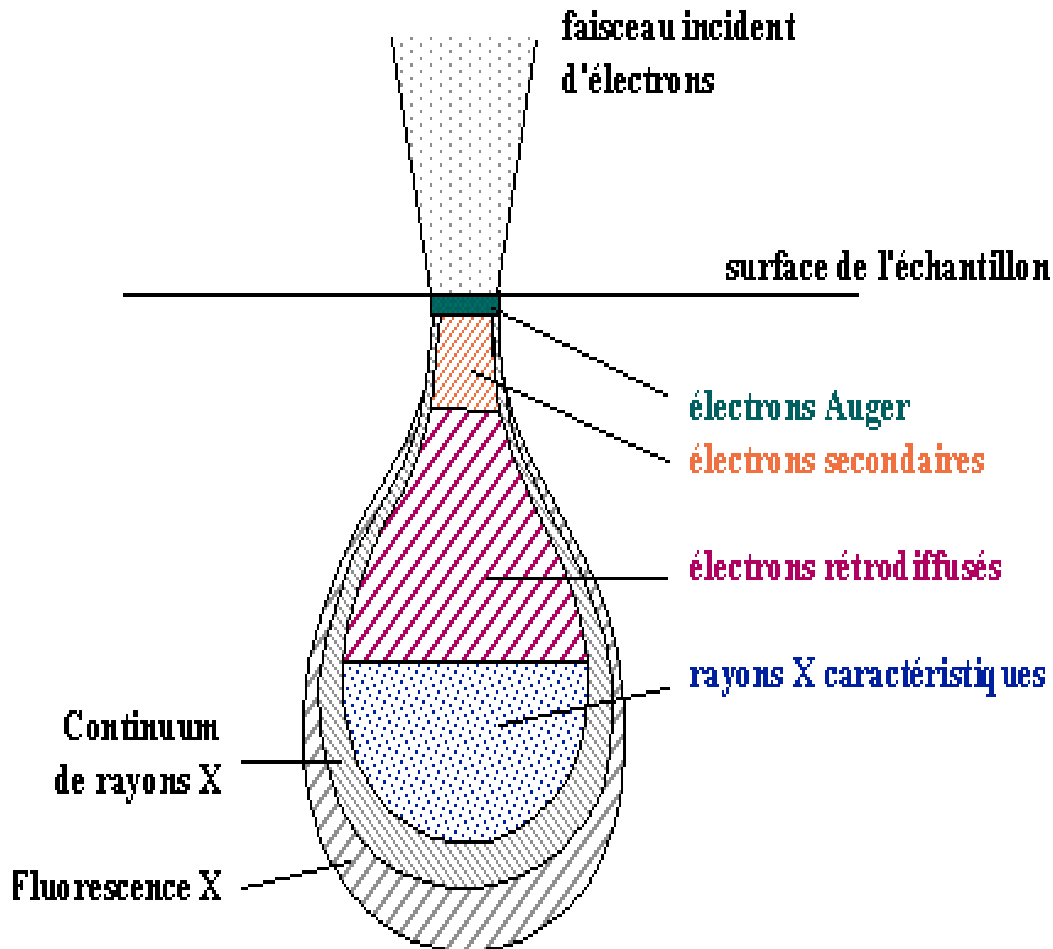


Figure n° 15 : Représentation schématique des interactions détectées entre les faisceaux d'électrons et la surface de l'échantillon (poire de diffusion).

2-2-2- Préparation des échantillons

Les levures sont prélevées aseptiquement des différentes cultures, en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL. Elles sont ensuite lavées et centrifugées à 12000 tours/min dans des tubes eppendorff stériles.

Les cellules ainsi préparées sont déposées sur des fines lamelles afin de les déshydrater et de les fixer à la chaleur en vue de leur observation au microscope électronique à balayage (Hitachi TM-1000) opérant sous une tension d'accélération de 15 KeV.

2-2-3- Analyse microscopique

a- Calcul de l'indice morphologique (Mi) des cellules

La morphologie cellulaire est examinée par microscopie électronique à balayage et déterminée par l'équation de **Merson-Davies** et **Odds** établie en **1989**. L'indice de morphologie est défini comme suit : $Mi = ls/d^2$ (**Figure n°16**).

Où : (l) est la longueur de la cellule, (d) est le diamètre maximum de la cellule et (s) le diamètre à la jonction du septum

Cet indice est déterminé pour 10 cellules prises au hasard en l'absence et en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4µg/mL. Les différentes valeurs obtenues sont analysées par une méthode statistique descriptive.

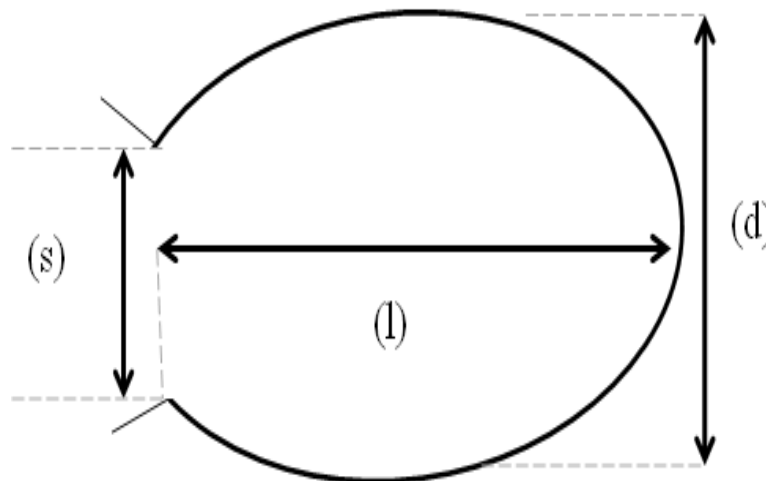


Figure n°16: Principe du calcul de l'indice morphologique chez *Candida albicans* ATCC10231 (Merson-Davies L. A. et Odds F. C., 1989).

b- Modélisation de la morphologie en 3 dimensions (3D)

Les microphotographies sont analysées par le logiciel ImageJ du domaine public écrit et développé en Java par Rorsband, depuis 1997, au NIH (*National Institutes of Health*) Bethesda, Maryland, USA, 1997-2008.

Les méthodes utilisées dans cette analyse sont des méthodes de références du tutorial ImageJ. La conversion des pixels en longueurs réelles est réalisée à l'aide de l'outil « *Straight line* » *Analyse>Set Scale* (616,029 pixels est égale à 10µm). Les microphotographies sont ajustées à 8-bits avec *Image>Type>8-bit*, avec le même contraste en utilisant la fonction *Adjust>brightness>contrast*.

Les analyses sont effectuées sur des images binarisées et le calcul des différents indices de morphologies (Mi) est effectué en utilisant *Set Measurements (Feretsdiameter)* après calibration.

Des analyses en *ROI (Region Of Interest)* sont réalisées sur des cellules sélectionnées au hasard en l'absence et en présence d'amphotéricine B. Ces dernières prennent en considération le profil d'intensité (*Plot profile*), la surface cellulaire (*Surface plot*) et l'intensité du profil en 3D (*Interactive 3D Surface plot*). Les résultats obtenus permettent de comparer qualitativement et quantitativement l'intensité et la localisation des changements surfaciques dans les échantillons d'intérêt et aussi d'en déduire l'aspect de l'altération cellulaire en présence de l'antifongique.

2^{ème} chapitre : Analyse biochimique de la surface membranaire des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B**1- Matériel****1-1- *Candida albicans***

Nous avons utilisé la souche de référence *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). La souche est conservée dans du glycérol 90% à - 80°C dans des tubes eppendorf.

1-2- Amphotéricine B

Nous avons utilisé l'amphotéricine B pure provenant des laboratoires Sigma. La solution mère d'antifongique est préparée en extemporané dans du diméthyl sulfoxide (DMSO) à une concentration de 10^{-3} M puis ajustée à 10^{-4} M au spectrophotomètre à 416 nm selon la formule $A = \epsilon Cl$ ($\epsilon_{416} = 121\ 400$)

L'antifongique est utilisé à une concentration finale de 0,4µg/mL.

2- Méthodes**2-1- Croissance des levures**

Étant donné la sensibilité de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA), les étapes de la culture cellulaire de *Candida albicans*, revêtent une importance majeure pour la reproductibilité des mesures spectroscopiques. Pour ce faire, nous avons pris en considération l'influence de plusieurs paramètres, à savoir le temps d'incubation, le milieu de culture, la méthode d'ensemencement et le mode de conservation des cellules.

2-1-1- Préculture

A partir des cellules conservées à - 80°C, nous avons préparé une préculture par incubation des levures à 30° C pendant 24h sous agitation continue à 130 tours/min.

2-1-2- Culture

Les cellules prélevées de la préculture sont mises en suspension dans le milieu Sabouraud liquide puis placées dans un incubateur de paillasse à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minute. La croissance est suivie pendant 48 heures et la mesure de la cinétique de division est réalisée par dénombrement des levures viables sur cellule de Thoma toutes les 60 minutes.

La solution antifongique est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 0,4 µg/mL au même moment que l'inoculum ce qui correspond au temps zéro de la croissance.

2-2- Analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA)

2-2-1- Principe

Le principe de la spectroscopie infrarouge est semblable à celui de la spectrophotométrie dans le visible ou l'ultraviolet. L'analyse des radiations absorbées permet d'identifier les transitions entre les niveaux d'énergie et d'en déduire des informations sur la structure de la molécule. Dans le visible et l'UV, les radiations absorbées correspondent à des transitions entre les niveaux d'énergies électroniques. Dans l'infrarouge, les énergies mises en jeu sont principalement des énergies de vibration et de rotation.

Le rayon infrarouge est arbitrairement divisé en 3 catégories, le proche infrarouge (12500-4000 cm^{-1}), le moyen infrarouge (4000-400 cm^{-1}) et le lointain infrarouge (400-10 cm^{-1}) (**Figure n° 17**).

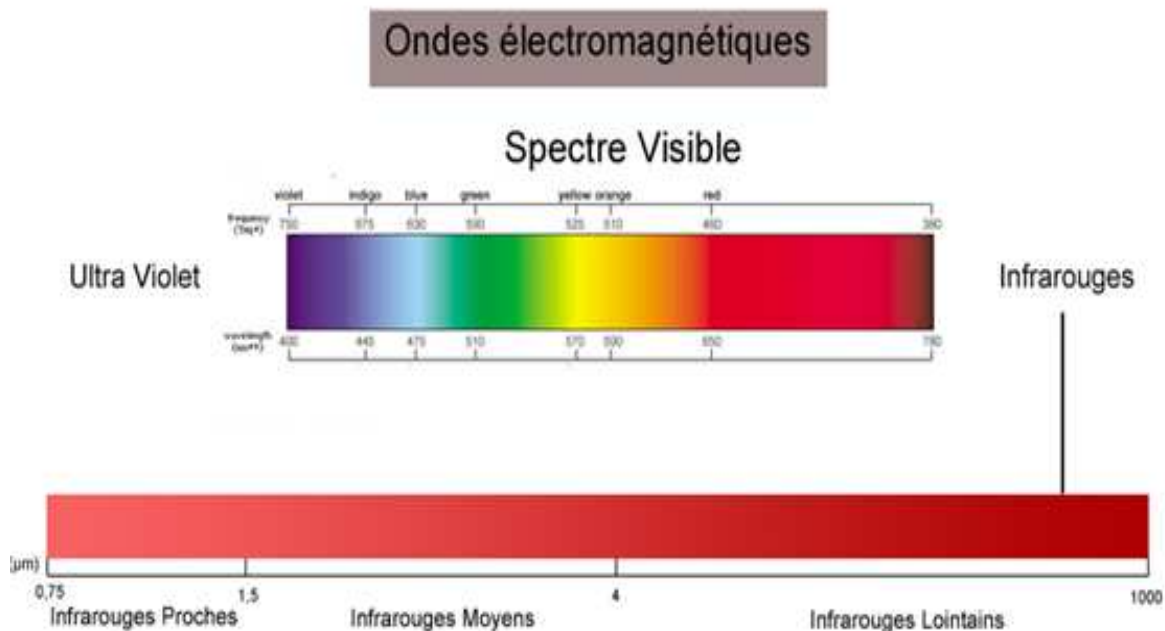


Figure n° 17 : Spectre électromagnétique et domaine infrarouge.

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA) représente plusieurs avantages, à savoir une rapidité d'acquisition, un rapport signal- bruit, une reproductibilité de l'échelle de fréquences, une bonne résolution spectrale et une fiabilité des résultats et permet de:

- Suivre le changement chimique sur une épaisseur d'environ 1µm de manière non destructive et en temps réel
- Procéder à l'analyse sans aucune préparation requise
- Analyser les macromolécules individuelles (ADN, ARN, lipides, protéines) qui constituent les cellules
- Caractériser des systèmes complexes tels que les surfaces cellulaires et tissulaires **(Barth I. et Haris P., 2009)**.

Le spectre infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) représente, par conséquent, la somme des contributions issues des protéines, des lipides, des polysaccharides et de toutes les autres espèces chimiques **(Fahmy K., 2013)**. Il donne une image instantanée sur la division, la différenciation, la croissance et le métabolisme cellulaire **(Naumann D. et coll., 1991a)**. Dès lors, le spectre infrarouge des cellules ne permet pas de fournir des informations sur un seul ou même quelques composés spécifiques présents mais procure une empreinte spectrale globale de l'échantillon **(Naumann D. et coll., 1991b)**.

Au niveau membranaire, la spectroscopie IRTF-RTA donne une information globale des composants biochimiques. La fréquence de vibrations est sensible aux interactions fines entre les groupes chimiques et leur environnement. En effet, l'avantage majeur de cette technique est de pouvoir étudier les changements dans la composition ainsi que les modifications dans la conformation des molécules biologiques.

La majorité des bandes spectrales d'absorption d'intérêt biologique se retrouve dans la gamme de fréquences qui s'étend de 4000 à 900 cm^{-1} .

2-2-2- Préparation des échantillons

A partir d'une culture de levure dans du milieu Sabouraud liquide en l'absence et en présence d'amphotéricine B, nous avons prélevé 200µL pour le dénombrement des cellules viables sur cellules de Thoma et 800 µL pour l'analyse spectroscopique.

Pour la préparation des échantillons pour l'analyse spectroscopique, nous avons séparé les cellules de leur milieu de culture par une centrifugation à une vitesse de 12000 tours/minute pendant 10 minutes.

Les cellules sont lavées trois (3) fois avec du sérum physiologique à 9‰ de NaCl puis ressuspendues dans de l'eau distillée stérile.

Un volume de 2µL de chaque préparation (suspension cellulaire lavée) est déposé sur le cristal de diamant et déshydraté à l'aide de l'azote gazeux N_2 afin d'obtenir un film cellulaire sec, transparent et d'épaisseur homogène. Rappelons que la déshydratation des dépôts est une étape indispensable en analyse IRTF-RTA car elle permet de réduire la contribution de l'eau dans les spectres.

2-2-3- Acquisition des spectres IRTF-RTA

Les analyses sont effectuées au spectromètre infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA) modèle Bruker Equinox 55 diamond (Bruker, Karlsruhe, Germany) qui fonctionne dans une gamme de fréquence allant de 7500 à 370 cm^{-1} . Il permet d'acquérir des spectres dans le moyen et le proche infrarouge. L'Equinox 55 est équipé d'une source infrarouge de type Globar, d'un interféromètre de type Rocksolid™, d'une séparatrice en KBr isolée de l'atmosphère et d'un détecteur MCT (Mercure Cadmium Telluride) refroidi à l'aide d'azote liquide. L'appareil est continuellement purgé par de l'air sec produit par un générateur de gaz pour éviter l'influence des paramètres atmosphériques sur la reproductibilité des spectres lors des mesures. Les éléments de réflexion interne de diamant sont utilisés sur une Golden Gate micro RTA de Specac (Orpington, UK). Un ordinateur en interface avec le spectromètre IRTF-RTA permet l'acquisition, la commande des mesures et le traitement des spectres par le logiciel OPUS (Bruker Optics, version 3.0).

2-3- Analyse des données

D'une manière générale, les spectres IRTF-RTA contiennent des informations qui présentent un intérêt analytique. Cependant, l'extraction de ces informations reste problématique en raison de la superposition des informations spectrales. Les spectres sont sélectionnés par le logiciel OPUS (BrukerOptics, version 3.0) qui permet non seulement de les traiter mais propose également d'autres méthodes statistiques telles que la construction des bases de données ainsi que la comparaison et la classification des profils spectraux.

2-3-1- Prétraitement des spectres IRTF-RTA

Selon les recommandations de **Goormaghtigh E. (2012)**, après sélection des spectres d'intérêt par le logiciel OPUS, les données brutes doivent être soumises à un test de qualité qui permet d'éliminer les mauvais spectres puis prétraiter les autres par des méthodes de correction, de dérivation et de normalisation.

Le prétraitement des spectres est réalisé au moyen de Kinetics (un logiciel développé sous Matlab). Il s'agit de supprimer au maximum la variance liée à l'étape de mesure et donc ne garder que celle incombée à l'échantillon biologique permettant ainsi une comparaison statistique optimale des spectres (**Sarroukh R. et coll., 2013**).

Dans un premier temps nous avons procédé à une soustraction de la contribution de la vapeur d'eau et des lignes de base en définissant une absorbance nulle pour les nombres d'onde suivants : 3970 3712 3629 2988 2700 1800 1756 1725 1481 1185 934 801 cm^{-1} . Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une normalisation des spectres en utilisant le pic de l'amide I et de l'amide II correspondant aux protéines situées entre 1725 et 1410 cm^{-1} . Enfin, nous avons filtré les spectres en définissant le bruit comme la déviation standard dans la région du spectre entre 1900 et 2000 cm^{-1} et le signal comme le maximum de la courbe comprise entre 1750 et 1480 cm^{-1} .

2-3-2- Analyse paramétrique des données

Un spectre infrarouge contient beaucoup d'informations. Chaque nombre d'onde constitue une variable. Pour une membrane cellulaire, le nombre de variables devient rapidement énorme et les données compliquées à interpréter. Dans cette partie nous avons introduit des méthodes d'analyses statistiques.

a- Test de Student

Afin de comparer les spectres des cellules de différentes populations, nous avons réalisé le test de Student. Il s'agit d'un test d'hypothèse paramétrique sur la moyenne d'un échantillon ou sur la comparaison des moyennes de deux échantillons. Dans notre cas, il est appliqué à chaque nombre d'onde de la zone spectrale contenant les informations biologiques. Dans un test d'hypothèse ayant pour but la comparaison de deux échantillons, nous avons voulu savoir s'il existe une différence significative entre la moyenne de deux échantillons. Les hypothèses testées sont :

- Hypothèse nulle $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ qui signifie qu'il n'y a aucune différence entre les moyennes des deux populations

- Hypothèse alternative $H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$ qui indique que les moyennes entre les deux populations sont significativement différentes

Ce test est réalisé avec différents seuils de signification α . La valeur de α est la probabilité avec laquelle l'hypothèse nulle risque d'être rejetée alors que celle-ci est correcte. Ce test se formule selon l'équation suivante:

$$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_p \times \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad S_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \times S_1 + (n_2 - 1) \times S_2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Où \bar{X}_1 est la moyenne de l'échantillon i

n_1 est la taille respective de l'échantillon i

S_p est l'écart type pondéré des deux échantillons

S_i représente l'écart type de l'échantillon i

b- Analyse en composantes principales (ACP)

L'analyse en composantes principales est une technique qui permet de faire la synthèse de l'information contenue dans un grand nombre de variables. L'objectif de cette analyse est de réduire le nombre de variables à un nombre plus restreint non corrélées entre elles. Ainsi, les composantes principales sont de nouvelles variables, indépendantes, combinaisons linéaires des variables initiales, possédant une variance maximale. L'ACP peut fournir une représentation graphique d'un nombre important de données permettant une interprétation de la variance contenue dans les spectres.

D'un point de vue géométrique, l'ACP est une transformation vectorielle dans l'espace (**Figure n° 18**). Il s'agit d'une transformation appliquée aux axes qui définit de nouvelles coordonnées axiales correspondant aux composantes principales. La première composante principale représente la direction avec la plus grande variance, la deuxième direction avec le plus de variabilité se retrouve dans la deuxième composante principale, orthogonale à la première.

Mathématiquement, chaque spectre IRTF-RTA est une combinaison linéaire de p nombres d'ondes. Nous avons considéré un ensemble de n spectres pour lesquels nous avons écrit une matrice A [$n \times p$] (échantillons \times variables). Un spectre correspond à une ligne et une colonne désigne un nombre d'onde. Chaque élément de cette matrice représente l'absorbance d'un spectre à un nombre

d'onde particulier. Les vecteurs propres sont obtenus en diagonalisant la matrice de covariance de A [$p \times p$ ']. Ceux-ci sont appelés les composantes principales (CP) et définissent les nouveaux axes. En pratique, presque la totalité de la variance comprise dans les données est expliquée en utilisant les 3 ou 4 premières composantes principales. L'ACP nous permet de représenter les spectres dans l'espace des composantes principales et de corréler la majorité de l'information à un nombre restreint de variables.

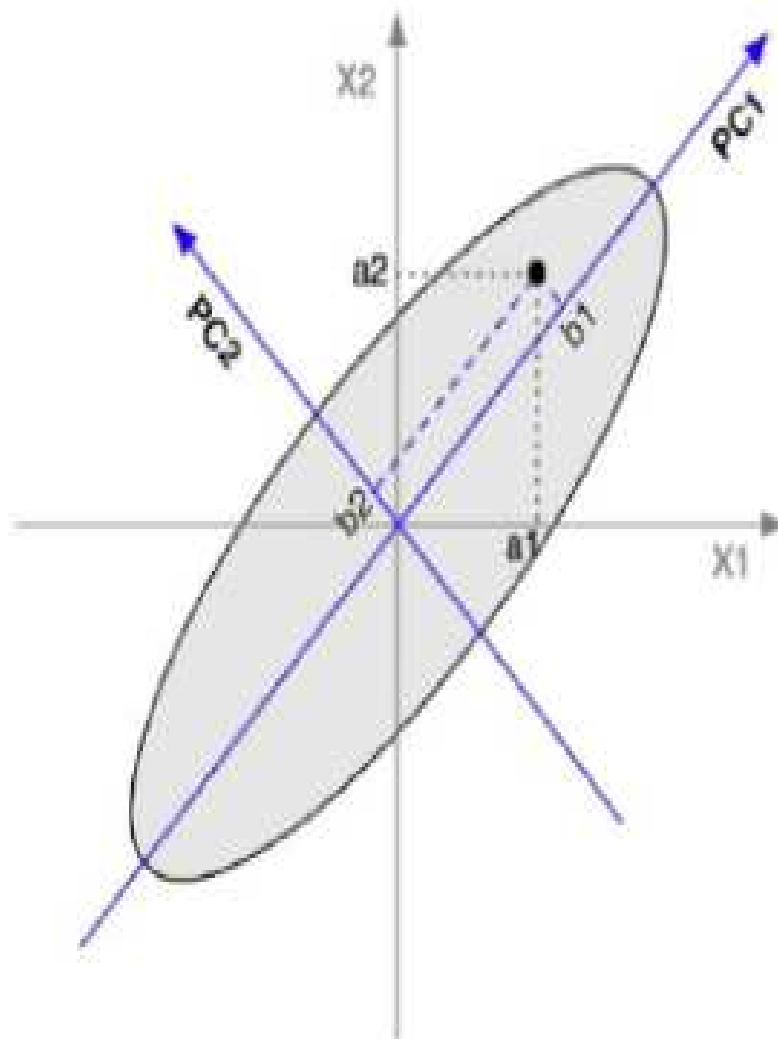


Figure n° 18: Rotation des axes originaux par une ACP dans un espace à deux dimensions. L'ellipse représente la distribution des données. X_1 et X_2 sont les axes de départ et la rotation effectuée par l'ACP fournit le nouveau système d'axes CP_1 , CP_2 .

c- Classification hiérarchique ascendante (méthode de Ward)

Cette méthode de classification rassemble les spectres qui présentent des caractéristiques communes. C'est un processus simple et répétitif qui peut être défini comme suit. Au départ, chaque spectre représente un groupe, le nombre de groupe est par conséquent égal au nombre de spectres. Ensuite les deux groupes aux caractéristiques les plus proches sont fusionnés pour créer un nouveau groupe de taille plus importante. Pour chaque groupe, la somme des carrés des écarts des membres du groupe par rapport à son barycentre est calculée. Les deux groupes qui seront fusionnés sont ceux pour lesquels l'augmentation de la somme des carrés des écarts est minimale. Le processus de fusion est répété $n-1$ fois (n étant le nombre de spectres), c'est-à-dire jusqu'à ce qu'il n'y ait plus qu'un seul et unique groupe. Le résultat de cette analyse est fourni sous la forme d'un dendrogramme (Figure n° 19).

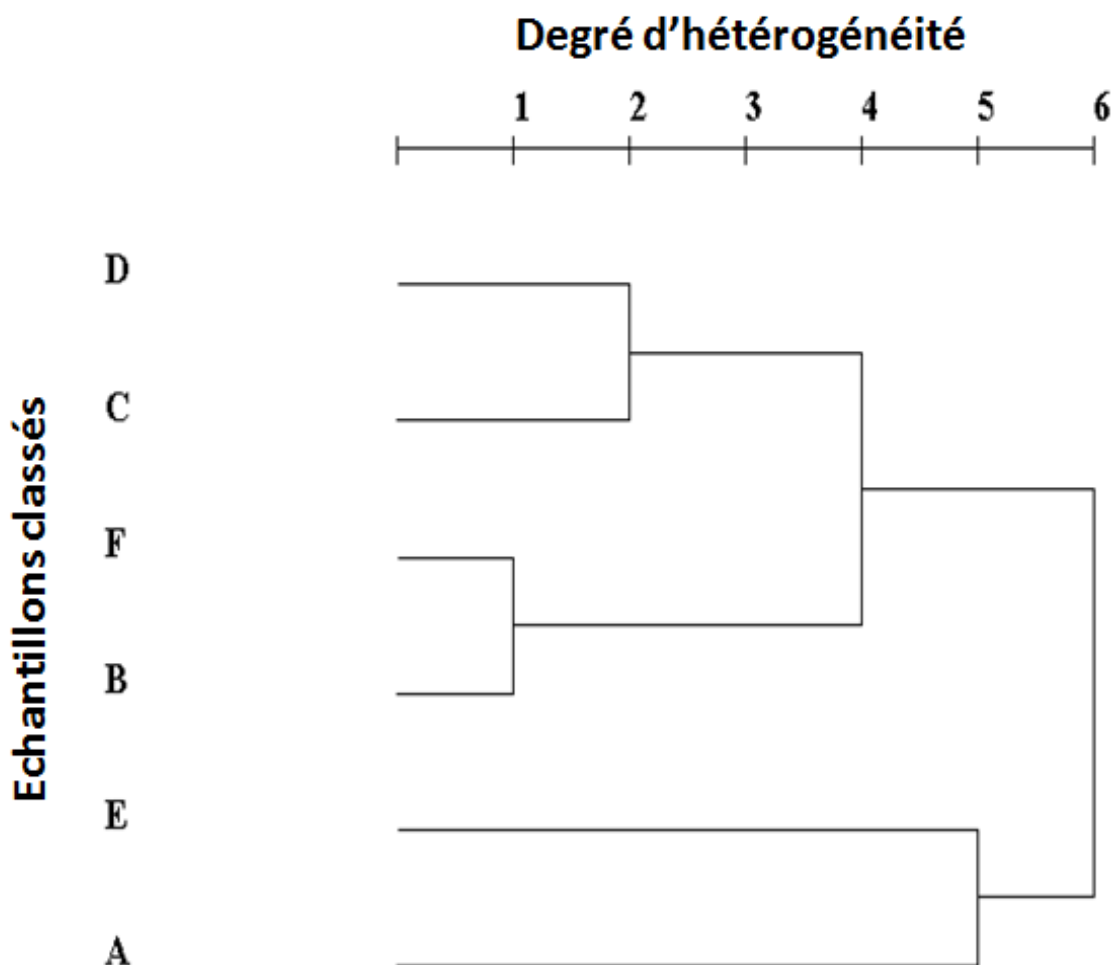


Figure n°19 : Représentation d'un dendrogramme.

3^{ème} chapitre : Simulation à base de système multi-agents (SMA) de la dynamique membranaire, modélisée en l'absence et en présence d'amphotéricine B

La thématique de recherche posée dans cette étude concerne la compréhension, la modélisation et la simulation des changements membranaires observés au cours des deux chapitres précédents.

L'impact de l'amphotéricine B sur la membrane plasmique de *Candida albicans* ATCC 10231 se traduit par des changements membranaires importants. Dans le but de comprendre par quels mécanismes membranaires ces changements évoluent au cours du temps et de dresser une stratégie de ciblage moléculaire, nous avons eu recours aux outils de la modélisation mathématique.

1- Fondements de la modélisation

1-1- Principe de la modélisation

Dans la modélisation, la représentation mathématique est une image simplifiée de la réalité qui permet de comprendre le fonctionnement d'un système en fonction d'une question. Tout modèle mathématique est constitué de la description de :

- La structure du système qui incorpore les spécifications sémantiques intégrées
- Des fonctionnements réguliers (ou non) qui modifient cette structure au cours du temps
- La structure du système (ou état) qui peut aller d'un ensemble de variables quantitatives (numériques) ou qualitatives (à valeurs discrètes) jusqu'à un ensemble d'entités munies de propriétés et de relations entre elles (**Figure n°20**).

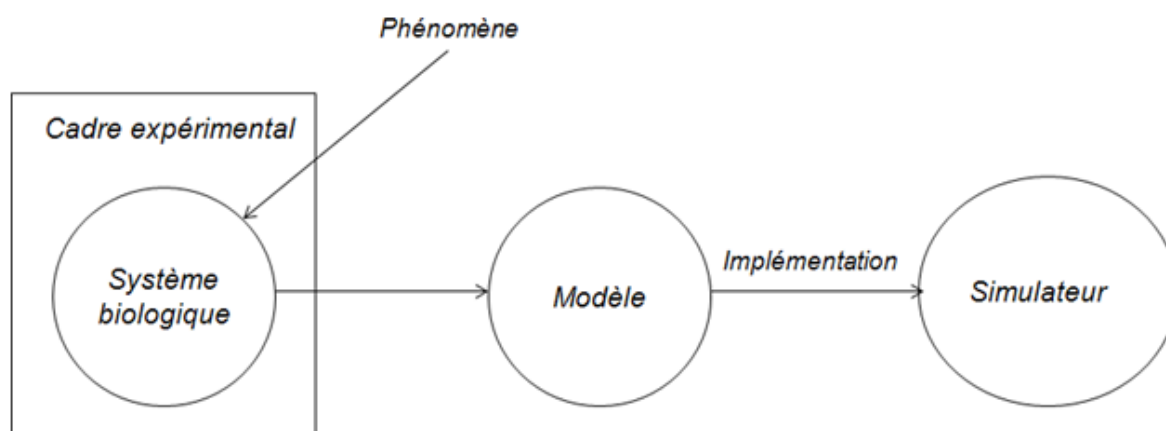


Figure n° 20 : Processus de modélisation et de simulation.

Dans le cadre de la modélisation d'une membrane biologique, deux paradigmes peuvent être envisagés. L'un est à base d'équations différentielles (EDP), l'autre à base de la modélisation logique.

Bien qu'ayant permis de nombreuses avancées sur le plan théorique et pratique, le paradigme à base d'équations différentielles (EDP) représente certains problèmes parmi lesquels : L'étanchéité du niveau d'analyse, le réalisme des paramètres et l'incapacité à modéliser l'action. Alors que le paradigme à base de modélisation logique représente le concept le plus proche des systèmes moléculaires, tels que les réseaux de Pétri, les automates cellulaires ou encore les systèmes multi-agents que nous avons utilisé.

1-2- Principe de la simulation multi-agents à gros grains

Les systèmes multi-agents (SMA) ont été définis en **1995** par **Ferber** comme étant «constitué d'un ensemble d'agents autonomes et indépendants en interaction et qui coordonnent leurs actions dans un environnement artificielle». Ils relèvent de l'intelligence artificielle distribuée (IAD) et apportent une solution radicalement nouvelle au concept de simulation dans les sciences des systèmes dynamiques tels que les membranes biologiques.

En offrant la possibilité de représenter directement les composants membranaires, leurs comportements et leurs interactions, cette simulation propose une décomposition en quatre dimensions : Agents, Environnement, Interactions et Organisation (**Figure n° 21**).

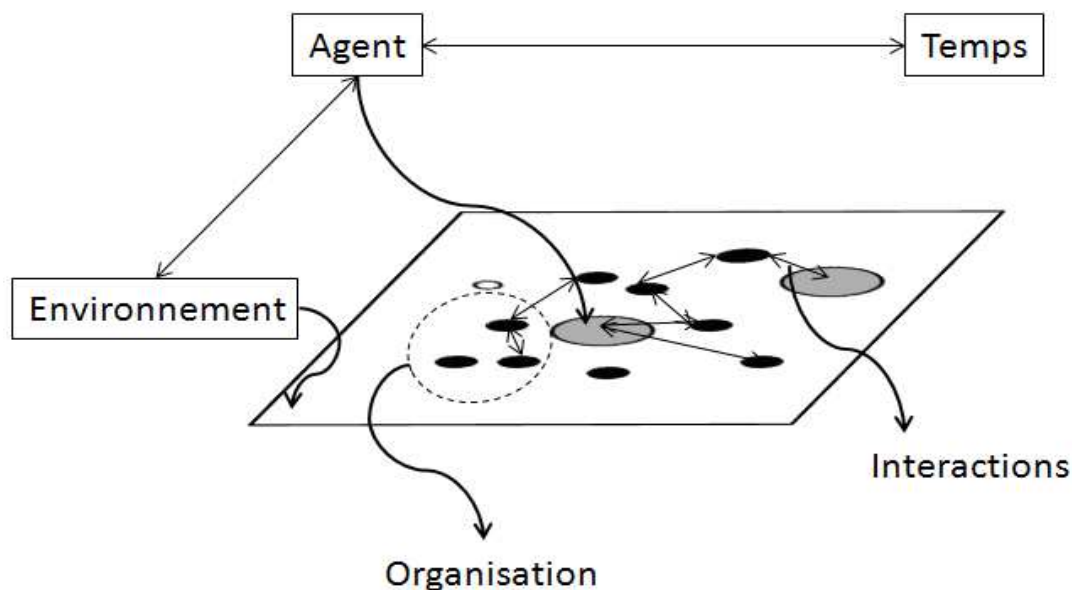


Figure n° 21 : Principe de la simulation multi-agents.

Un système multi-agents en fonctionnement évolue au cours du temps sous l'influence des comportements individuels des agents et de la dynamique propre à l'environnement. Dans ce modèle, l'état dynamique d'un SMA est défini par un couple « σ , γ », dont les membres appartiennent respectivement à un ensemble d'états « Σ » de l'environnement et à un ensemble d'influences « Γ ». Une fonction opérateur $op: \Sigma \rightarrow \Gamma$ génère cette influence tandis qu'une fonction $Laws: \Sigma \times \Gamma \rightarrow \Sigma$ traduit les lois des réactions de l'état. Des fonctions d'exécution et de réaction prennent en compte ces données pour mettre à jour le système. La dynamique du SMA se traduit par la fonction $Cycle: \Sigma \times \Gamma \rightarrow \Sigma \times \Gamma$ qui met à jour son état dynamique « σ , γ » de façon régulière. À tout instant, le SMA se trouve dans un état et son évolution est l'ensemble des états successifs (**Ferber J., 1995**).

La modélisation des membranes biologiques et de leurs comportements au niveau moléculaire permet de mieux comprendre les différents phénomènes observés au niveau macroscopique. Depuis quelques années, les modèles à grain d'atomes offrent la possibilité d'étudier les phénomènes membranaires à une échelle de temps et d'espace très grande et permet de moyenniser une portion de la molécule en représentant cette dernière par un ensemble d'atomes. Ce modèle permet de simuler des temps, des volumes ou des aires en accord avec ceux requis pour l'observation expérimentale.

2- Expérimentation *in silico*

2-1- Conception et construction du modèle

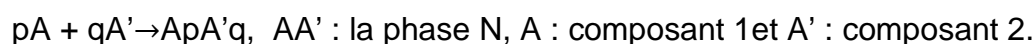
Lors des changements membranaires, les interactions sont réparties entre différents composants. Nous avons choisi pour cette modélisation les glycérophospholipides, les sphingophospholipides, l'ergostérol et l'amphotéricine B.

2-1-1- Équations mathématiques

Les différents composants interagissent par affinité selon des règles mathématiques et des diagrammes de phases établis dans la littérature et lors de nos précédentes recherches. Nous avons pris en considération les plus essentiels :

- Les interactions par affinité entre les têtes polaires des différentes molécules sont modélisées selon le modèle qui met en jeu le potentiel attractif et répulsif entre deux têtes polaires (T/T) de lipides.

- La transition de phase est modélisée au cours du temps selon l'équation suivante:



- La taille δ de la phase est modélisée en fonction du temps selon l'équation suivante : $\delta(t) = K_f \cdot t$
- Où K_f est une constante caractéristique (nm/ms), δ est la taille et le rayon des disques phasiques (nm) et t le temps en (ms)
- L'énergie libre du système phasique est modélisée à l'aide d'un paramètre localisé spatialement dont la minimisation globale est traduite sous la forme d'une fonction.
- La concentration des différents composants est décrite par un scalaire. Leur orientation est décrite par un vecteur.
- Les tailles des phases sont calculées en minimisant la fonction de l'énergie et en identifiant les paramètres variables qui indiquent que le système a tendance de s'organiser de façon ordonnée ou désordonnée.

2-1-2- Fondements de la simulation

L'évolution de la formation ou la déstabilisation de la phase lipidique a nécessité trois étapes : La création d'une interface d'interaction, l'interaction intermoléculaire et la formation du mélange intermédiaire.

En ce qui concerne la simulation, il nous a semblé raisonnable de débiter les expérimentations *in-silico* par une membrane simple puis de la complexer pour se rapprocher de l'effet engendré par l'amphotéricine B. Suivant une complexification graduelle, nous donnons ci-dessous le plan d'expérience *in-silico* :

- Simuler la formation de la phase liquide ordonnée (Lo) «rafts»
- Simuler la formation de cette phase en l'associant à l'amphotéricine B (L_{AmB}) «super-rafts»

2-2- Implémentation du modèle

La plateforme que nous avons utilisée est NetLogo version 3D 5.0.5. Cette plateforme est choisie sur la base de quelques exigences informatiques, à savoir, une prise en main rapide, une représentation graphique mettant rapidement en exergue les lacunes de la modélisation et une rapidité d'exécution.

Les proportions ainsi que les diamètres des composants utilisés dans cette modélisation sont issus des données de la littérature et des données expérimentales. Les différentes informations choisies traduisent les systèmes membranaires étudiés *in vivo* et *in vitro*.

Le choix de l'implémentation pour cette modélisation a porté sur l'utilisation de l'environnement du système comme support de la bicouche lipidique, simplifiée et mimée à l'extrême comme la membrane plasmique de *Candida albicans*.

Nous avons modélisé la membrane selon un diamètre de 2 μm (égale à celui de la partie cellulaire déformée) et reproduit qualitativement et quantitativement le diagramme de phase établi par **Vealth** et **Keller** en **2002**. Les composants sont utilisés à un rapport de (1/1) glycérophospholipides/sphingophospholipides.

Nous avons fixé la proportion en ergostérol à 20 % (paramètre variable) et la température à 31,1°C (paramètre constant) (**Dietrich C. et coll., 2002**).

Nous avons représenté les composants selon un modèle gros grain qui permet de conserver les caractéristiques moléculaires des différents composants membranaires dans lequel les diamètres des têtes polaires sont fixés en se référant au modèle proposé en **2010** par **Mongrand** et **ses collaborateurs**. Les diamètres des composants membranaires sont de 1nm pour le sphingophospholipide et l'ergostérol, 1,3 nm pour le glycérophospholipide et 10 nm pour la partie hydrophile d'une protéine transmembranaire en hélice α «alpha» (**Mongrand S. et coll., 2010**) (**Figure n° 22**).

Nous avons fixé la taille de la phase (Lo) «rafts» entre 90 et 200 nm et le temps nécessaire à la formation des rafts à 25 ms (**Kusumi A. et Suzuki K., 2005**). La pression d'exclusion est déterminée comme paramètre informant sur le pouvoir d'interaction d'une molécule (**Marsh D., 1996**).

La mobilité latérale en présence d'amphotéricine B est modélisée selon une équation à 3 paramètres :

- Séquestration amphotéricine B/ergostérol
- Affinité amphotéricine B/ergostérol
- Affinité amphotéricine B/phospholipides

L'addition d'une force de décompression engendrée par l'activité des porines est modélisée sur la base d'une stabilisation des phases liquide-ordonnées (Lo) et une déstabilisation des phases liquides-ordonnées associées à l'amphotéricine B (L_{AmB}).

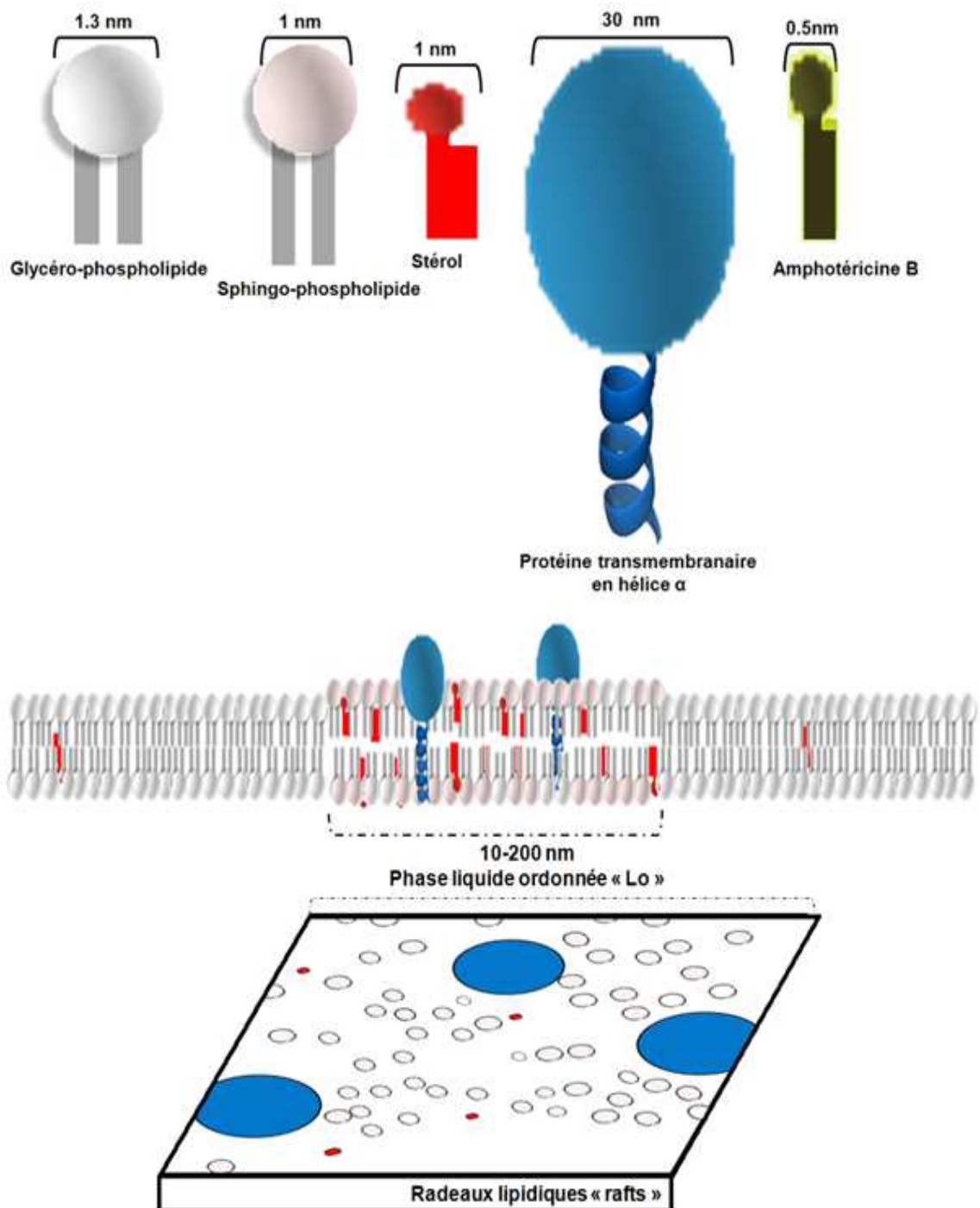


Figure n°22 : Représentation schématique de la composition et l'organisation des radeaux lipidiques (Mongrand S. et coll., 2010).

2-3- Simulation

Pour la modélisation des interactions, notre modèle traite les positions ponctuelles dans l'espace des différents agents en calculant les forces d'interactions intermoléculaires qui concernent la forme des potentiels, le choix des paramètres de répulsion et d'attraction ainsi que l'équation de déplacement des particules dans l'espace en fonction du temps :

- L'association de l'ergostérol et les sphingophospholipides conditionne la formation de la phase (Lo) qui apparait dans le système en coloration rouge.
- L'association de l'amphotéricine B aux lipides conditionne la formation de la phase (L_{AmB}) qui apparait en coloration jaune (**Figure n° 23**).
- L'interface utilisée pour la simulation reprend l'ensemble des paramètres modifiables. Il s'agit des interactions permettant la constitution de ces domaines lipidiques au cours des pas de temps successifs avec des indications sur la taille des radeaux lipidiques formés.
- Les tracés de graphes reprennent les informations obtenues dans la simulation
- Le temps nécessaire pour la formation des rafts à partir d'une membrane modèle correspond à 92 pas de temps et la différence des forces responsables des transitions de phases est indiquée par un jeu de couleur entre la formation des radeaux ordonnées et la formation des régions désordonnées

Notre modèle en NetLogo est composé de l'interface, du code source et de la visualisation du comportement de l'ensemble du modèle (**Figure n°24**).

L'évolution de la simulation est directement visible dans les onglets de commande en 2 et 3 dimensions.

Nous avons rapporté une analyse stratégique au modèle en fonction de l'environnement. L'analyse stratégique est effectuée via l'expérimentation « behaviourspace » qui étudie le modèle de façon systématique en faisant varier le comportement et la formation des différentes phases lipidiques.

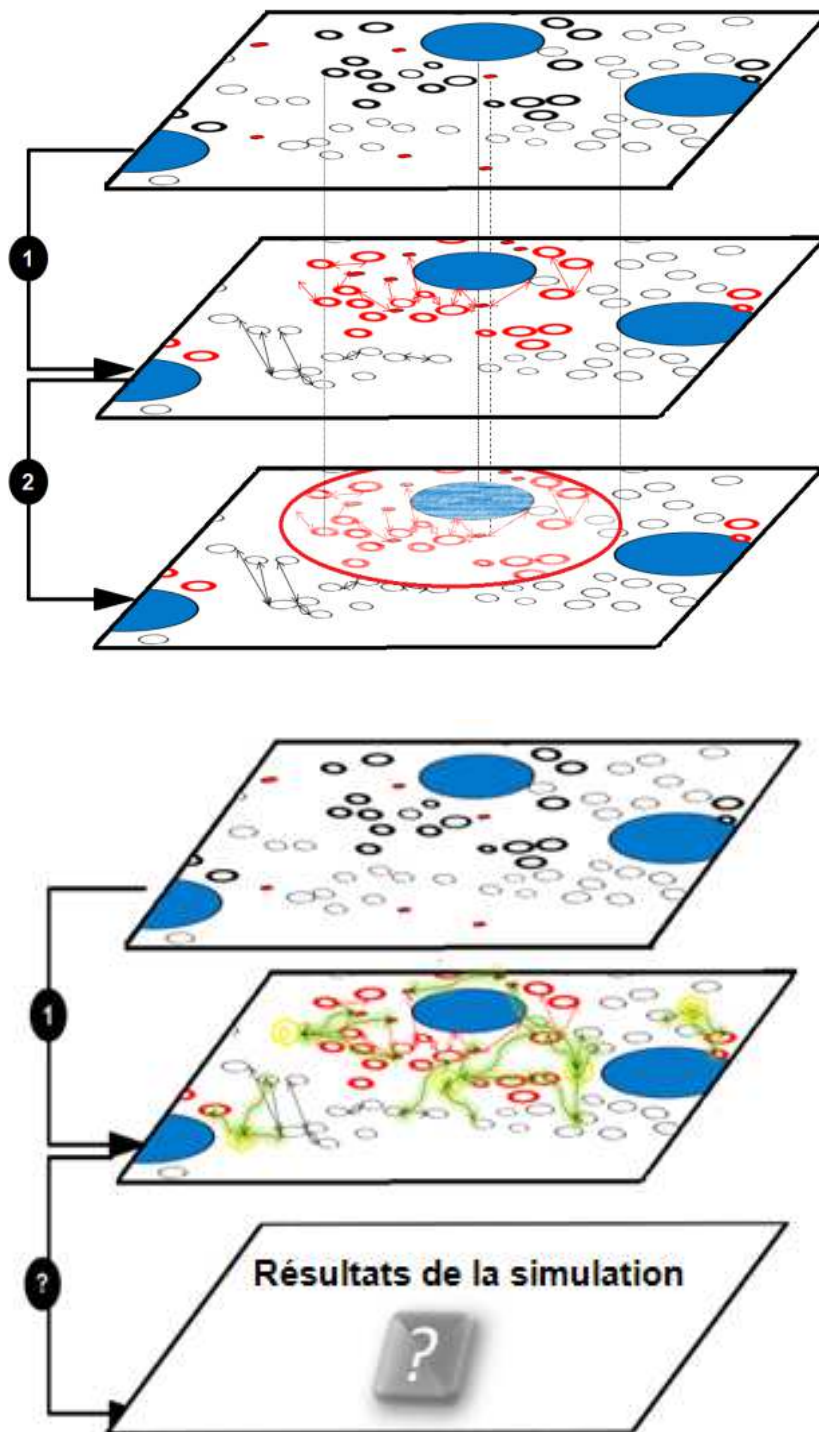


Figure n°23 : Structure algorithmique de la séparation des phases lipidiques.

The screenshot displays the NetLogo interface for a membrane model simulation. Key components include:

- « Interface »**: The top menu bar with options like File, Edit, Tools, Zoom, Tabs, and Help.
- Onglet de programmation « Algorithme de programmation »**: A tab for editing the simulation's code.
- Commande de simulation « Setup » « go »**: Buttons to initialize and start the simulation.
- Ajout de l'amphotéricine B**: A yellow box highlighting the addition of Amphotericin B to the model.
- Paramètres et variables:**
 - Mode d'insertion membranaire de l'amphotéricine B
 - Interactions Amphotéricine B/Ergostérol/Phospholipides
- Effet de l'amphotéricine B à 0.4µg/mL**: A panel with sliders for parameters like Perturbation-AmBis-%, coefficient-d?, séquestration-ergostérol-AmB, affinité-AmB/ergostérol, and AnBis/phospholipides.
- Transition de phases dans la membrane plasmique: Phase gel désordonnée/Phase liquide ordonnée "rafts"**: A graph showing the transition between different membrane states over time.
- Paramètres et variables Formation de la membrane plasmique (Formation des rafts)**: A yellow box pointing to the phase transition graph.
- Séparation de phases (Glycérophospholipides/Sphingophospholipides/Ergostérols)**: A panel with sliders for the number of glycerophospholipids, sphingophospholipids, ergosterols, and proteins.
- Stabilité membranaire**: A graph showing the stability of the membrane over time.
- Graphiques de simulation**: A label pointing to the various simulation graphs.
- Compteur de cycles (ticks)**: A control for the simulation's time step.
- Vitesse de simulation**: A slider to adjust the simulation speed.
- Tore en 3D**: A 3D visualization of the membrane topology as a torus.
- Paramètres et variables: réglage du modèle membranaire**: A yellow box pointing to the Model Settings panel.
- Panneau de prévisualisation: Visualisation de la topologie membranaire dans un tore en 3D. « enroulement des processus dans la membrane plasmique ».**: A text box describing the 3D visualization of the membrane topology.
- Model Settings**: A panel for configuring the simulation environment, including location of origin, patch size, frame rate, and tick counter.

Figure n°24 : Interface du logiciel NetLogo et paramètres du modèle.

Troisième partie
Résultats et discussion

1^{er} chapitre : Analyse morphologique des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B

Depuis de nombreuses années il est acquis que les cellules vivantes subissent différents types de stress au cours de leur cycle de vie. Chaque perturbation induit une réponse cellulaire bien spécifique. En effet, lorsque la cellule est stressée, elle passe par des altérations spatio-fonctionnelles importantes (**Privalov P. L. et Gill S. J., 1988**). L'intérêt porté sur la compréhension de ces modifications morphologiques, a vu le jour avec le développement et la mise au point d'outils sophistiqués et pointus capables d'explorer la cellule et ses comportements. Chez les levures, la membrane plasmique se sépare de la paroi mais reste liée à des points d'ancrage lors d'un déséquilibre ionique sublétale (**Simonin H. et coll., 2007**). Le changement du volume cellulaire associé au changement de la compressibilité latérale de la membrane entraîne la déformation de la surface membranaire (**Ragoonanan V. et coll., 2013**). Ce phénomène provoque la formation de bourgeons, d'invaginations et de plissements. Ces déformations ont été observées aussi bien sur des liposomes que sur des cellules biologiques (**Dimova R. et Lipowsky R., 2012**). Ces modifications morphologiques de la surface membranaire sont régis par l'évolution du rapport surface/volume, ainsi que par la minimisation de l'énergie due à la courbure et les contraintes mécaniques (**Laradji M. et Sunil Kumar P. B., 2006**).

L'augmentation du volume cytoplasmique entraîne une modification complète de la surface membranaire par formation de régions gonflées ou de déformations, ce qui pourrait conduire à la lyse suivie de la mort cellulaire (**Simonin H. et coll., 2007**).

Au niveau morphologique, *Candida albicans* est caractérisée par un polymorphisme que nous pouvons retrouver *in vitro* et *in vivo* lui permettant de s'adapter à son environnement. Ce phénomène dépend de plusieurs facteurs tels que le pH, la température ou encore les substances chimiques. Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés chez cette levure (**Annexe 1**) (**Whiteway M. et Bachewich C., 2007**) :

- Les blastospores qui sont des formes rondes ou ovalaires mesurant de 2 à 5 µm de longueur
- Les pseudomycéliums mesurant 20 µm de longueur

- Les mycéliums, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans* mesurant entre 500 et 600 μm (**Sudbery P. et coll., 2004**).

Ces transitions morphologiques sont une condition nécessaire à la vie des cellules et tous les phénomènes de la physiologie cellulaire impliquent une importante participation de la fluidité membranaire. Les perturbations de cette fluidité membranaire chez *Candida albicans*, dues à l'exposition des cellules à l'effet toxique de l'amphotéricine B, se traduisent par une perte des caractères normaux et l'acquisition de modifications de la surface cellulaire.

Le but de cette étude est de mettre en évidence les modifications qu'adopte *Candida albicans* en l'absence et en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Boucherit Z. et coll., 2007**). Dans un premier temps nous avons analysé qualitativement les cellules dormantes par microscopie électronique à balayage (MEB), l'aspect morphologique durant toutes les phases de croissance est déterminé par l'équation de **Merson-Davies** et **Odds** établie en **1989**. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux modifications surfaciques révélées avant, pendant et après la phase de latence «phase de dormance». Enfin, nous avons analysé qualitativement et quantitativement la composition en éléments surfaciques par une microanalyse SDE-X.

1- Croissance de *Candida albicans* ATCC10231 en présence d'amphotéricine B à 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Afin d'évaluer l'effet de l'amphotéricine B à une concentration de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur *Candida albicans* ATCC 10231, nous avons suivi la croissance de cette dernière sur milieu Sabouraud liquide. La croissance est menée dans un incubateur de paillasse à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minute.

Pour étudier le phénomène de dormance des levures en présence d'amphotéricine B, la croissance est suivie sur une période de 48 heures, avec des prélèvements réguliers toutes les 60 minutes par dénombrement des levures viables sur cellule de Thoma.

Les résultats que nous avons obtenus sont représentés sur la **figure n° 25**.

Nous constatons que :

En l'absence et en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, nous retrouvons les trois phases d'une courbe de croissance, à savoir :

- La phase de latence ou la phase facultative au cours de laquelle les levures s'adaptent au milieu.
- La phase exponentielle au cours de laquelle la vitesse de la croissance est constante et maximale et où les levures se divisent à leur rythme le plus élevé et doublent en nombre.
- La phase stationnaire au cours de laquelle les levures cessent de croître et restent stables.

La courbe témoin, qui correspond aux cellules incubées en l'absence d'amphotéricine B, montre qu'après incorporation de l'inoculum au temps zéro à la concentration de $2 \cdot 10^6$ cellules/mL, les levures passent par une phase de latence de 2 heures caractérisée par un nombre constant de cellules de départ, ensuite les cellules entrent dans une phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de cellules au bout de 10 heures d'incubation sous agitation continue à 130 tours/minute.

En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de $0,4 \mu\text{g/mL}$, nous remarquons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 21 heures, ensuite les cellules reprennent leur croissance d'une manière homologe au témoin avec un degré d'inhibition estimé à 21%. Les levures qui reprennent leur croissance lorsque le temps d'incubation est prolongée au-delà de 24 heures, sont appelées les cellules dormantes.

Les résultats de la croissance des levures de *Candida albicans* ATCC10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B, montrent que l'amphotéricine B utilisée à la dose de $0,4 \mu\text{g/mL}$ entraîne une inhibition de la croissance de 21%.

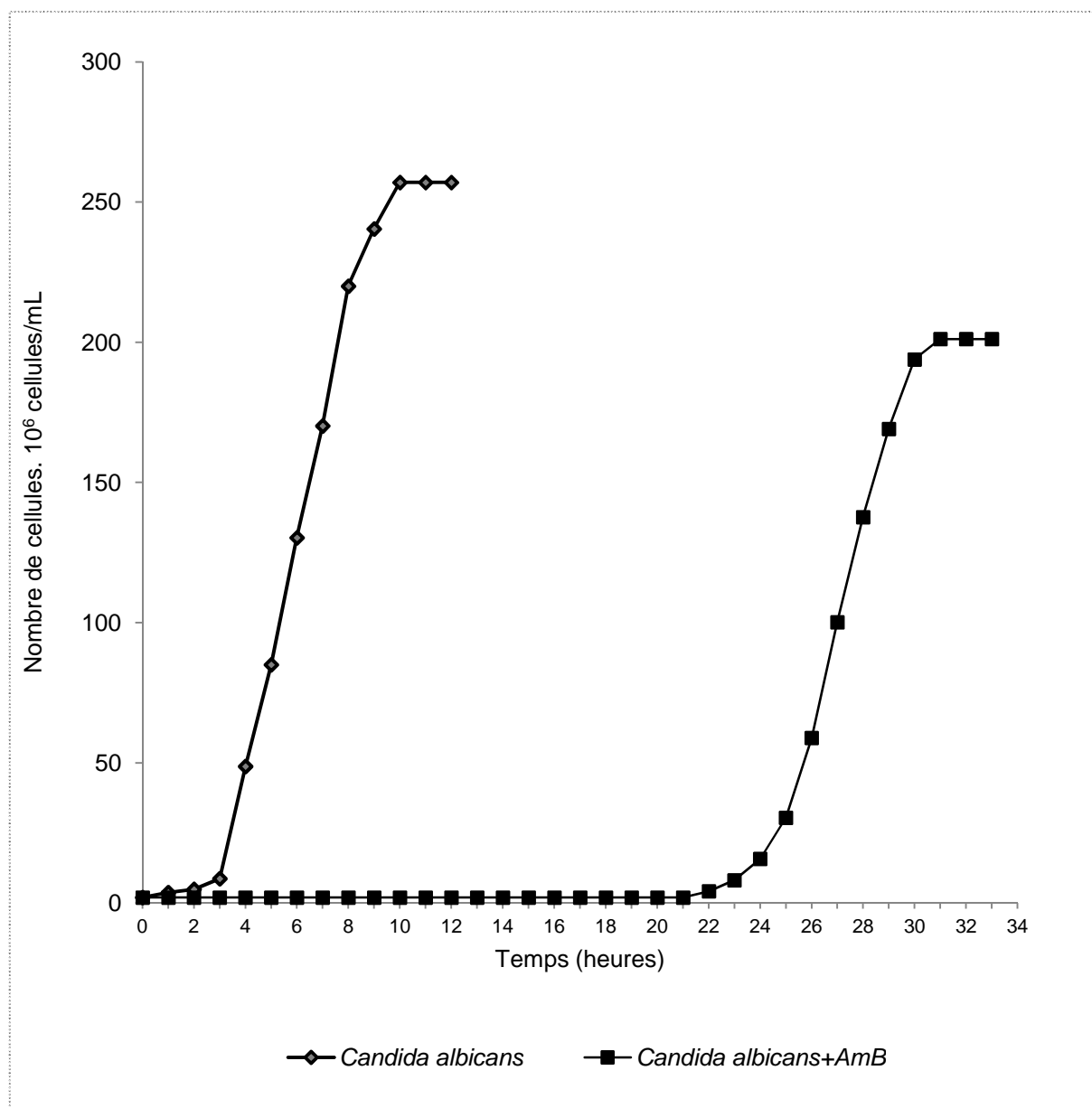


Figure n°25 : Croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4 μ g/mL. L'amphotéricine B est ajouté au temps zéro de la croissance au même moment que l'inoculum. La concentration cellulaire de départ est de 2.10⁶ cellules/mL. Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation continue (130 tours/minute).

2- Morphologie des cellules

2-1- Indice de morphologie (Mi)

La forme cellulaire est définie à partir de l'indice de morphologie qui est calculé en l'absence et en présence d'amphotéricine B.

Pendant la phase de latence, les cellules témoins traitées sont choisies au hasard et 10 cellules sont analysées pour chaque échantillon. La classification des formes tétramorphiques se fait selon les valeurs de l'indice morphologique. Pour des valeurs du Mi <1,5 blastoconidia, 1,6-2,4 tube-germinatif, 2,5–3,4 pseudo-hyphes et > 3,4 hyphes (Merson-Davies L. A. et Odds F., 1989).

Les résultats sont représentés dans le **tableau n°1**.

Nous remarquons que les cellules incubées en l'absence et en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B sont sous la forme levure.

Tableau n° 1: Indice de morphologie ($Mi=ls/d^2$) de *Candida albicans* ATCC10231 cultivées dans le milieu Sabouraud liquide à 30°C en l'absence et en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL.

	Indice de morphologie (Mi)		Nombre de cellules analysées	Forme pléomorphique
	Moyenne	Ecart type		
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	0,63	0,16	10	Forme levure (Mi<1,5)
<i>Candida albicans</i> ATCC10231+ AmB	0,603	0,18	10	Forme levure (Mi<1,5)

Les microphotographies représentées dans la **figure n° 26** sont obtenues grâce aux signaux séquentiels en balayant la surface des deux échantillons. Les reliefs des images en 3 dimensions (3D) correspondent à des différences d'émission d'électrons à partir de la surface cellulaire. Les électrons émis par des surfaces hautes sont plus facilement arrachés au niveau des pics de surfaces et donnent des zones lumineuses. Les creux moins exposés apparaissent plus sombres. La différence de contraste est exprimée par des niveaux de gris associant chaque niveau à une hauteur. L'intensité lumineuse des pixels est codée sur 8 bits avec une échelle de gris allant de 0 à 255 (0: noir /255 : blanc)

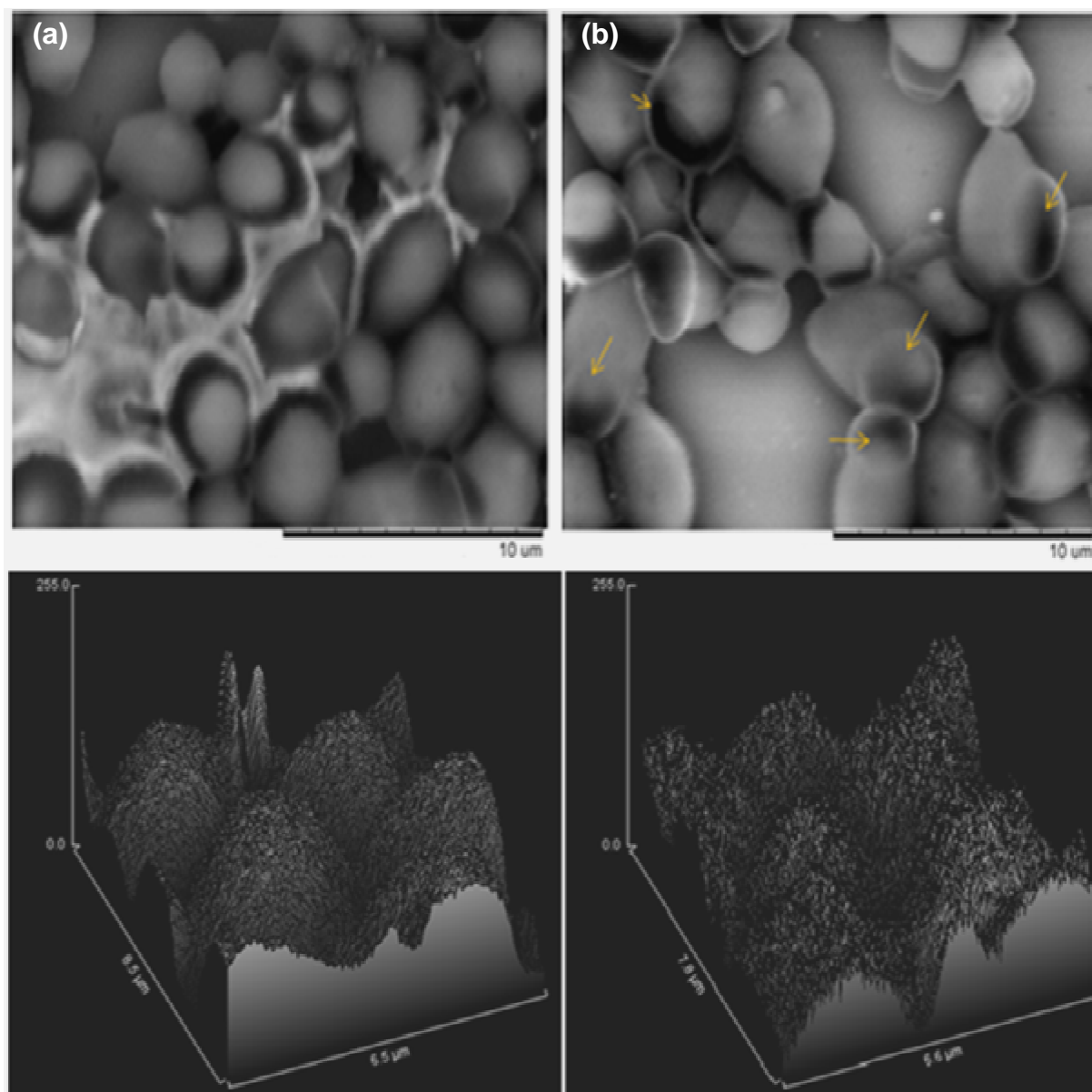


Figure n°26 : Microphotographies et tracés de la surface cellulaire en 3D
(a)- *Candida albicans* ATCC 10231 incubée en l'absence d'amphotéricine B
(b)- *Candida albicans* ATCC 10231 incubée en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. L'axe Z est une fonction à valeur unique définie sur une grille géométrique rectangulaire qui signifie l'intensité lumineuse ainsi que la hauteur de la surface (barre=10µm).

2-2- Analyse de la surface des cellules par microscopie électronique à balayage (MEB)

Une étape clé du traitement de l'image est le seuillage, c'est à dire le passage de l'image numérique à l'image binaire. Pour ce faire, différents traitements sont réalisés sur les images numériques et binaires. Une image dite « calibrée » du bruit de fond parasite et des variations d'intensité des pixels est alors obtenue.

Il est à noter que les traitements binaires permettent de définir le plus précisément possible les cellules à analyser.

Les résultats relatifs à l'analyse numérique par le logiciel ImageJ sont représentés sur la **figure n° 27**.

Nous remarquons la présence d'une déformation qui apparaît comme une "bosse" à l'interface des cellules incubées en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. Cette déformation s'étend en largeur sur 1 à 2µm et sur une longueur de 2 à 3µm.

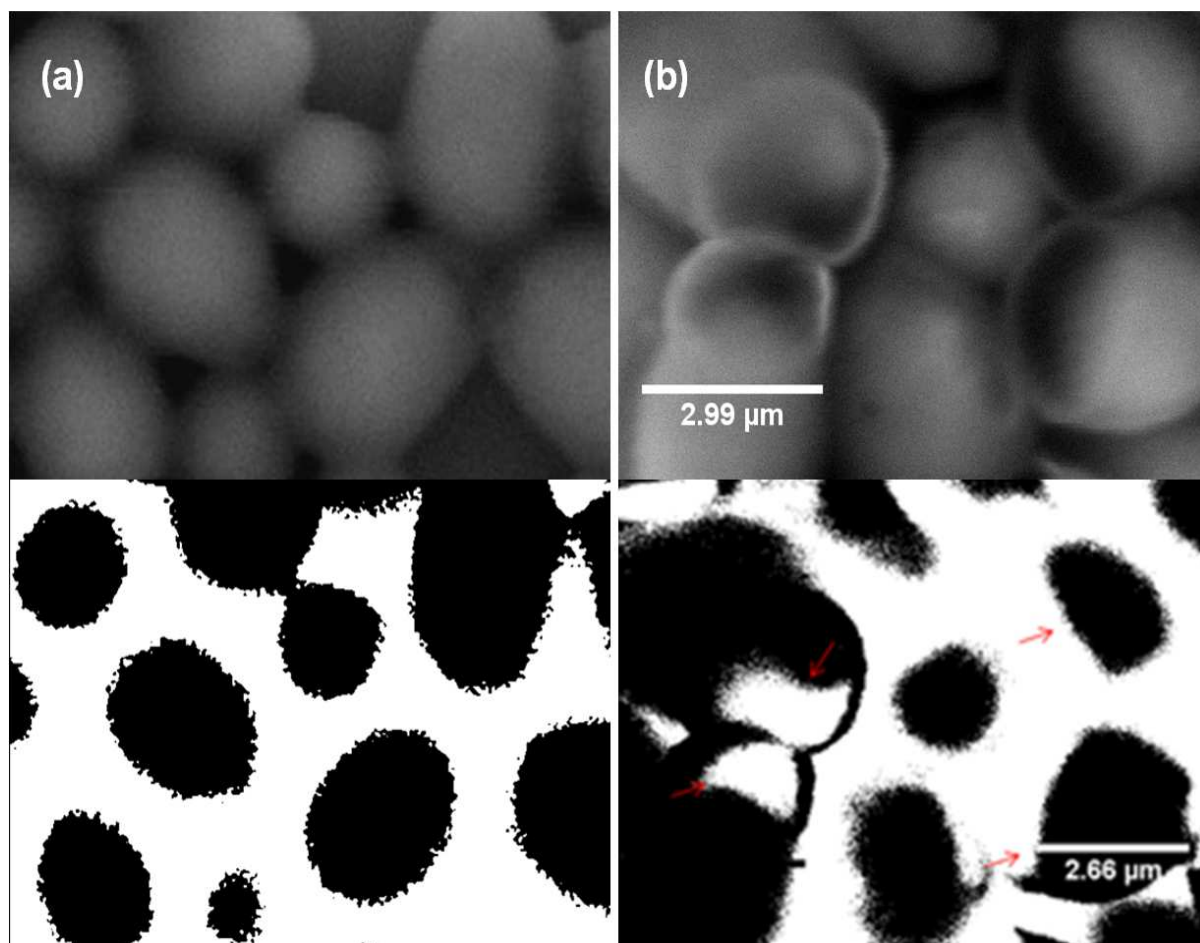


Figure n°27 : Déformations cellulaires observées par microscope électronique à balayage (MEB) chez *Candida albicans* ATCC10231. (a)- cellules témoins (b)- cellules exposées à 0,4µg/mL d'amphotéricine B.

2-3- Modélisation de la morphologie en 3 dimensions (3D)

Afin de mieux visualiser le changement de la morphologie cellulaire, deux cellules sont sélectionnées.

A l'échelle de la cellule individuelle la modélisation en 3 dimensions (3D fausses couleurs LUT Spectrum) (**Figure n°28**), nous renseigne sur la surface et nous donne une impression sur le volume cellulaire.

Les données en 3D indiquent que la déformation de la cellule en forme de bosse s'accompagne d'une importante modification de la dimension et de la rugosité. En effet, la surface de la partie déformée représente 33,25% de la cellule, calculée à partir de la surface.

La surface de chaque cellule est calculée et les résultats sont représentés dans le **tableau n°2**.

Tableau n° 2 : Surface et périmètre de la partie observée de *Candida albicans* ATCC10231. La surface est calculée en utilisant le logiciel ImageJ (Parcelle de surface).

	Surface (Area)	Périmètre de la partie mesurée
Cellule entière	10,668	13,117
Partie cellulaire déformée	3,548	7,825

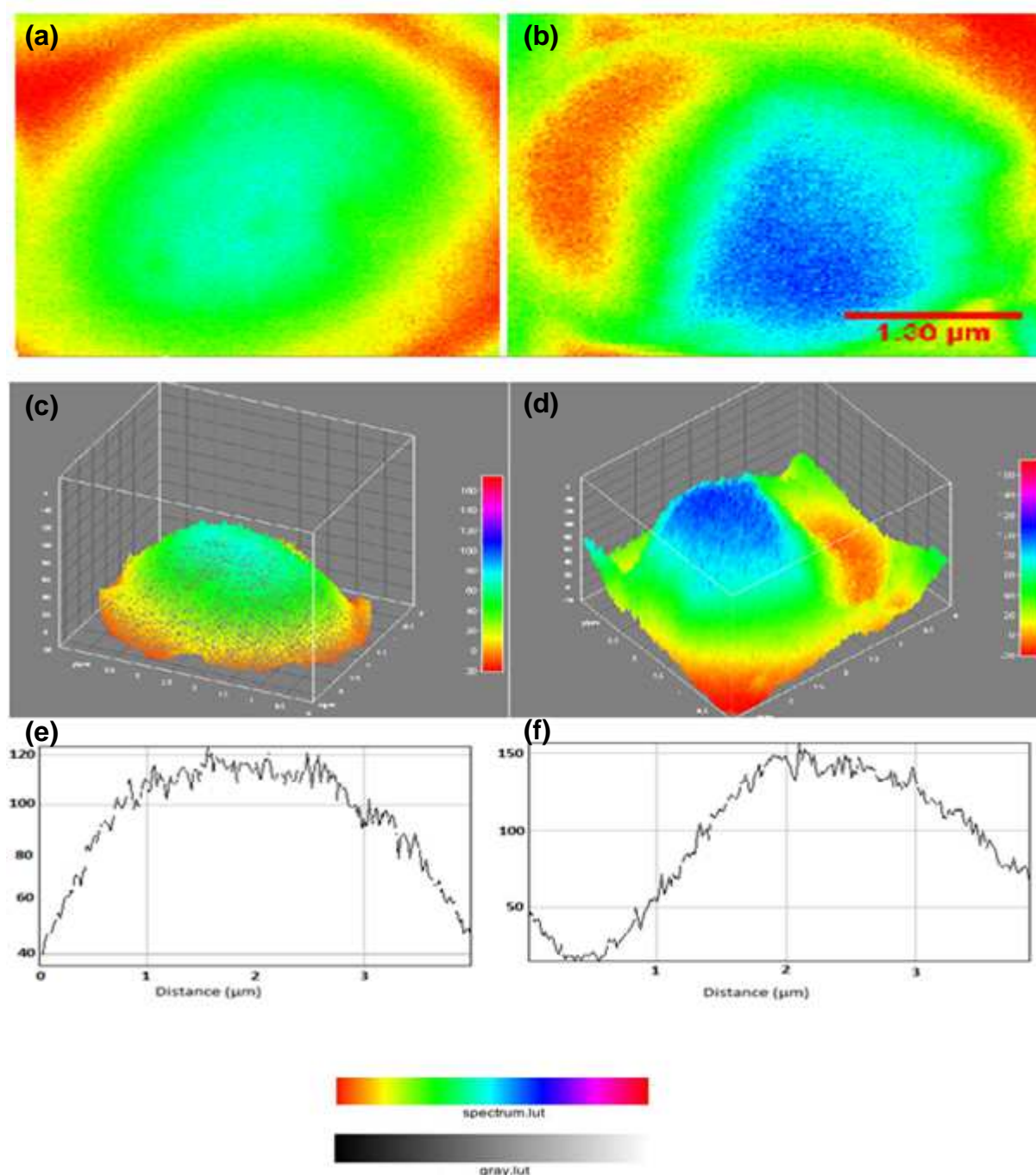


Figure n°28: Cartographie de l'intensité lumineuse (Fausses couleurs : LUT spectrum) de la cellule individuelle de *Candida albicans* ATCC 10231 (a)- cellule témoin (b)- cellule exposée à 0,4µg/mL d'amphotéricine B (c)- configuration en 3D (surface plot) de la cellule témoin et (d)- de la cellule exposée à l'amphotéricine B. (e)- Profil de l'intensité représenté en valeurs de gris de la cellule témoin et (f)- de la cellule exposée à l'amphotéricine B (Barre= 1,30 µm).

3- Eléments surfaciques détectés par spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X)

Dans cette étude nous avons procédé à une analyse qualitative et quantitative des éléments présents à la surface cellulaire de *Candida albicans* ATCC 10231. Les éléments surfaciques sont détectés par spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X). Tous les éléments sont normalisés, le temps d'acquisition des spectres est de 10.0 et la tension d'accélération est de 15.0 (keV). Il faut noter que la présence du Silicium (Si) dans les spectres est liée en grande partie à l'émission du monocristal de silicium dopé au Lithium Si (Li) (composant majeur du détecteur SDE-X).

Les microphotographies des échantillons analysés sont représentées par une configuration en 3D accompagnée d'un histogramme indiquant l'intensité lumineuse pour chaque région surfacique. La couleur blanche correspond aux zones où il n'y a pas d'intensité, la couleur grise aux zones moyennement intenses et la couleur noire aux zones très intenses. Nous remarquons que les zones où il n'y a pas d'intensité dans l'histogramme sont minoritaires et que les zones moyennement intense sont majoritaires. Les zones très intenses sont plutôt localisées puisque ce sont celles où apparaît la surface complète des cellules.

La **figure n° 29** représente les cellules témoins incubées en l'absence d'amphotéricine B. Les spectres SDE-X ont révélé la présence de deux pics. Un pic de Silicium (Si) et un pic de calcium (Ca^{++}).

La **figure n° 30** représente les cellules incubées en présence de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'amphotéricine B. Les spectres ont révélé qu'en plus du Silicium (Si) et du Calcium (Ca^{++}), il y'a la présence de deux autres éléments, le Sodium (Na^+) et le Chlore (Cl^-).

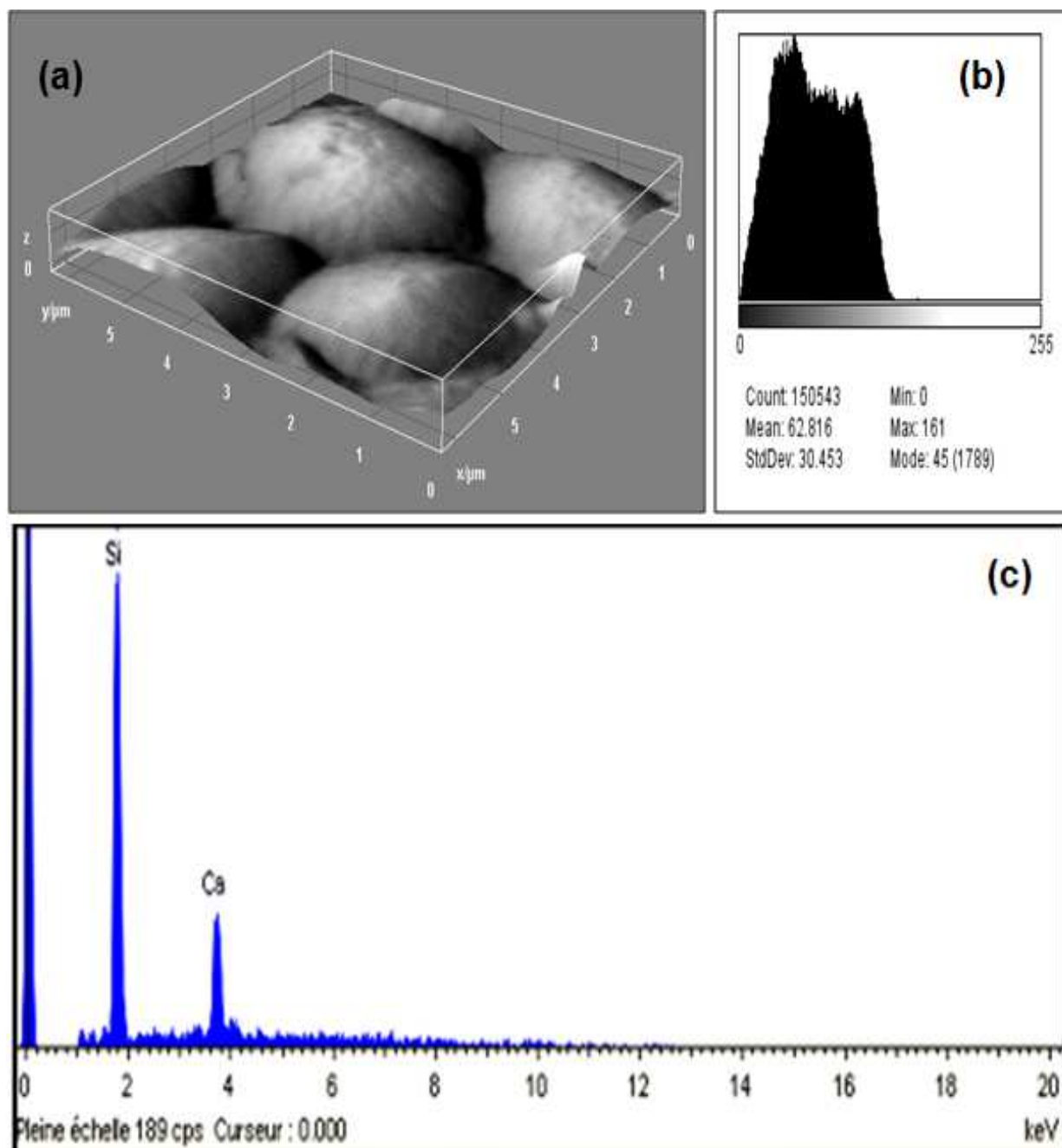


Figure n°29 : (a)- Configuration en 3D (surface plot) (b)- histogramme d'intensité lumineuse et (c)- spectre SDE-X des microéléments présents à la surface des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B (cellules témoins). Tous les éléments sont normalisés, le temps d'acquisition des spectres est de 10.0 et la tension d'accélération est de 15.0 (keV).

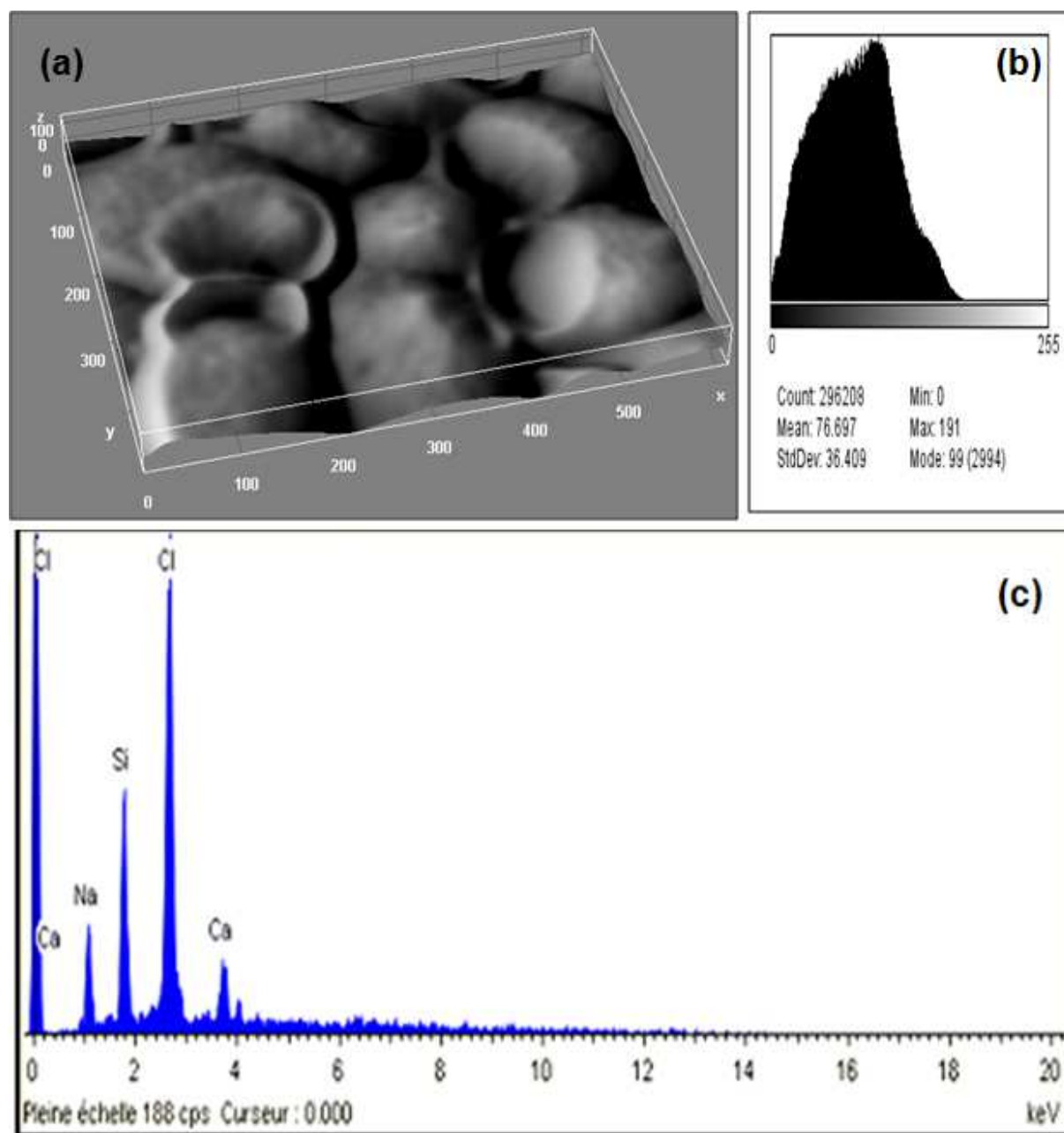


Figure n°30 : (a)- Configuration en 3D (surface plot) (b)- histogramme d'intensité lumineuse et (c)- spectre SDE-X des microéléments présents à la surface des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B. Tous les éléments sont normalisés, le temps d'acquisition des spectres est de 10.0 et la tension d'accélération est de 15.0 (keV).

La détection des éléments par l'analyse qualitative est accompagnée par une analyse quantitative des différents pourcentages massiques.

L'histogramme représenté dans la **figure n° 31** montre qu'il y'a une différence importante dans le pourcentage massique du calcium (élément retrouvé à la surface des cellules témoins et des cellules incubées en présence d'amphotéricine B). La concentration du calcium est différente. Elle est estimée à 33,3% chez les cellules témoins et seulement à 10,3% chez les cellules dormantes.

La présence du sodium et du chlore à 16,4% et 55,5%, respectivement est détectée seulement chez les cellules exposées à 0,4µg/mL d'amphotéricine B.

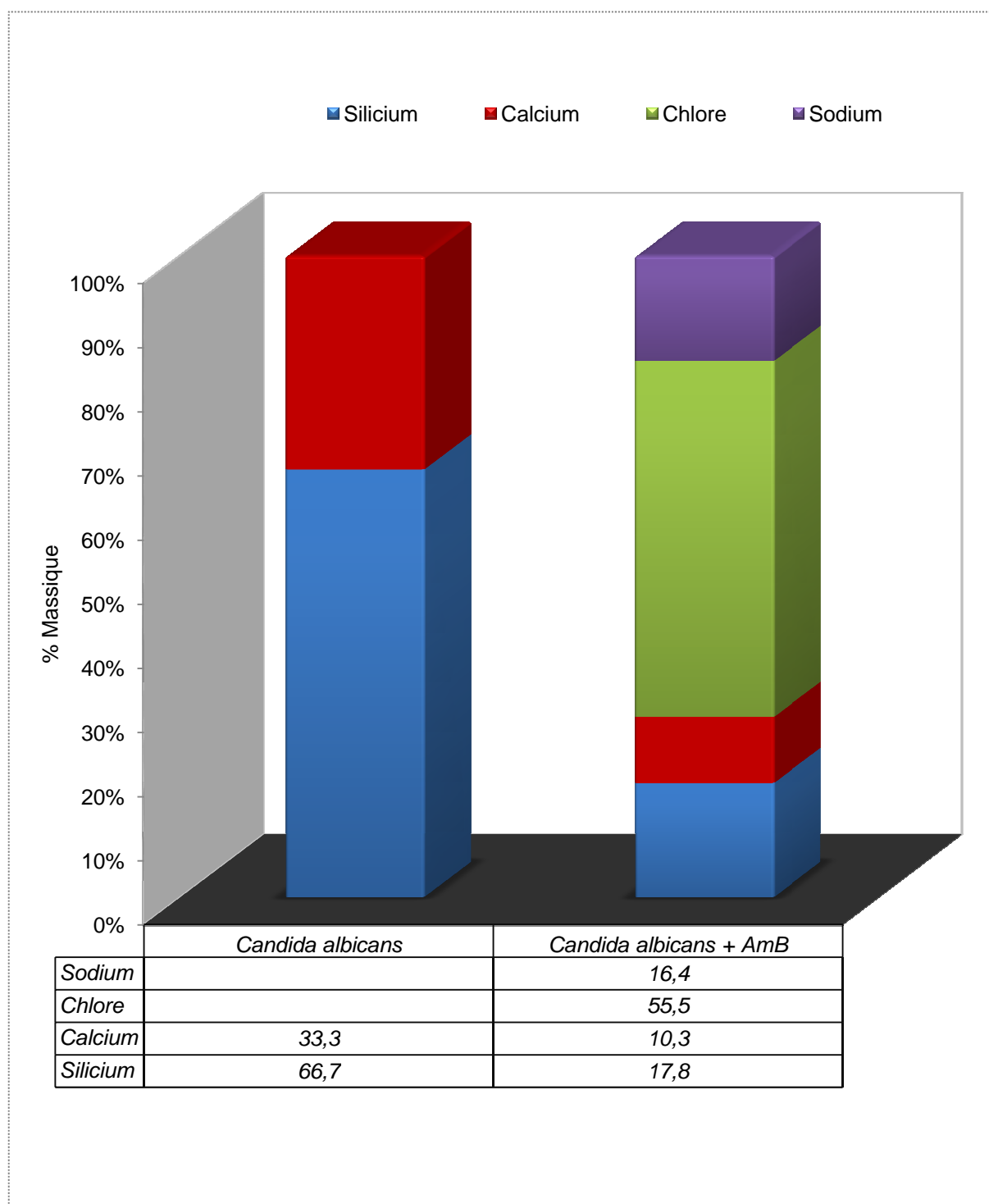


Figure n°31 : Histogramme représentant le dosage des éléments présents sur la surface cellulaire de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. Le pourcentage massique des éléments est obtenu par microanalyse SDE-X (Tous les éléments sont normalisés).

4- Discussion

Dans cette partie de l'étude, nous avons essayé de mieux comprendre le phénomène de dormance, d'explorer la morphologie globale des cellules dormantes et de suivre la cinétique de croissance. Pour ce faire, nous avons réalisé une étude cinétique, une étude microscopique et une analyse des éléments surfaciques.

Les études cinétiques des cultures de *Candida albicans* ATCC 10231 en l'absence et en présence d'amphotéricine B ont montré que :

- L'addition de l'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4µg/mL au milieu de culture induit un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 heures à 21 heures, avec un taux d'inhibition de 21% par rapport aux cellules témoins incubées sans antifongique. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Boucherit Z. et ses collaborateurs (2007)** qui ont montré que *Candia albicans* ATCC10231, incubées en présence d'amphotéricine B rentrent dans une phase de latence de 21 heures avant de reprendre leur croissance avec un taux d'inhibition de 45%. Rappelons que **Koutsoumanis et Sofos en 2005**, ont estimé que la phase de latence est une phase importante, dans laquelle les cellules accomplissent leur travail cellulaire avant d'entrer en division. En effet, lorsque les cellules subissent un stress comme l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices d'amphotéricine B, doivent réparer les dommages métaboliques et cellulaires avant d'entamer la division.

- Les résultats de l'étude microscopique ont montré que les cellules ont la même morphologie tout au long de la croissance avec un indice de morphologie (Mi) égale à 0,6 qui, selon la classification de **Merson-Davies et Odds établie en 1989**, correspond à la forme levure ($Mi < 1,5$). Cette classification dépend des conditions de culture et de l'état cellulaire, ce qui peut expliquer d'un autre côté, la forme pléomorphique que nous avons observé. En effet, les conditions de culture ont une influence majeure sur la transition morphologique que peut adopter la levure. L'apparition de la forme arrondie dans nos observations est due en grande partie à la température que nous avons fixée à 30° C et au pH du milieu Sabouraud qui est de 5,6. De plus, il n'y a pas de corrélation entre le Mi et le volume globale. Les cellules apparaissent plus ou moins séparées les unes des autres selon le milieu de culture et les conditions de croissance cellulaire. Ces observations vont dans le même sens que ceux de **Whiteway M. et Bachewich C. (2007)**.

- Les observations en MEB complexées à une analyse d'image par le logiciel ImageJ fournissent non seulement une image bidimensionnelle mais également un profil de surface en 3D. Les microphotographies que nous avons obtenues pendant la phase de latence montrent une déformation cellulaire chez les levures exposées à une concentration de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. Les cellules présentent un aspect de contour cellulaire bombé. Cette déformation est estimée à 33,25% du volume cellulaire globale. Ces altérations sont comparables à celles décrites par **Kyung et ses collaborateurs, en 2011** qui en utilisant l'AFM (*Atomic Force Microscopy*), ont montré qu'en présence d'amphotéricine B, les levures subissent de grands changements morphologiques avant de se détruire. Selon ces mêmes auteurs, la mort cellulaire chez *Candida albicans* induite par cet antifongique à une concentration de 1µg/mL passe par quatre phases principales (*Cell Death Phases*) (CDP₀, CDP₁, CDP₂, et CDP₃) qui sont déterminées en fonction des changements morphologiques dont le premier est observé au niveau membranaire.

Or, pour notre étude, nous avons utilisé l'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4µg/mL. A cette concentration, les cellules rentrent dans une phase de dormance mais ne sont pas détruites car, la déformation qu'elles ont subi (33,25%) ne représente que le 1/3 de la surface cellulaire.

Ces changements de la morphologie cellulaire se caractérisent par une séparation membranaire, une perforation de la surface et un rétrécissement du volume cellulaire. En effet, la microanalyse SDE-X des cellules incubées en présence d'amphotéricine B, met en évidence la présence du sodium (Na⁺) à 16,4%, et du chlore (Cl⁻) à 55,5% dans le milieu extracellulaire. Ces résultats confirment l'effet perturbateur de cet antifongique au niveau membranaire qui est à l'origine d'une fuite de diverses espèces ioniques suivie d'une dépolarisation de la membrane plasmique. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Hartsel S. C. et coll., 1994** qui ont établi un classement de la fuite des ions en présence d'amphotéricine B comme suit Na⁺ > K⁺ > Rb⁺ > Cs⁺ > Li⁺ > Cl⁻ (**Figure n°32**).

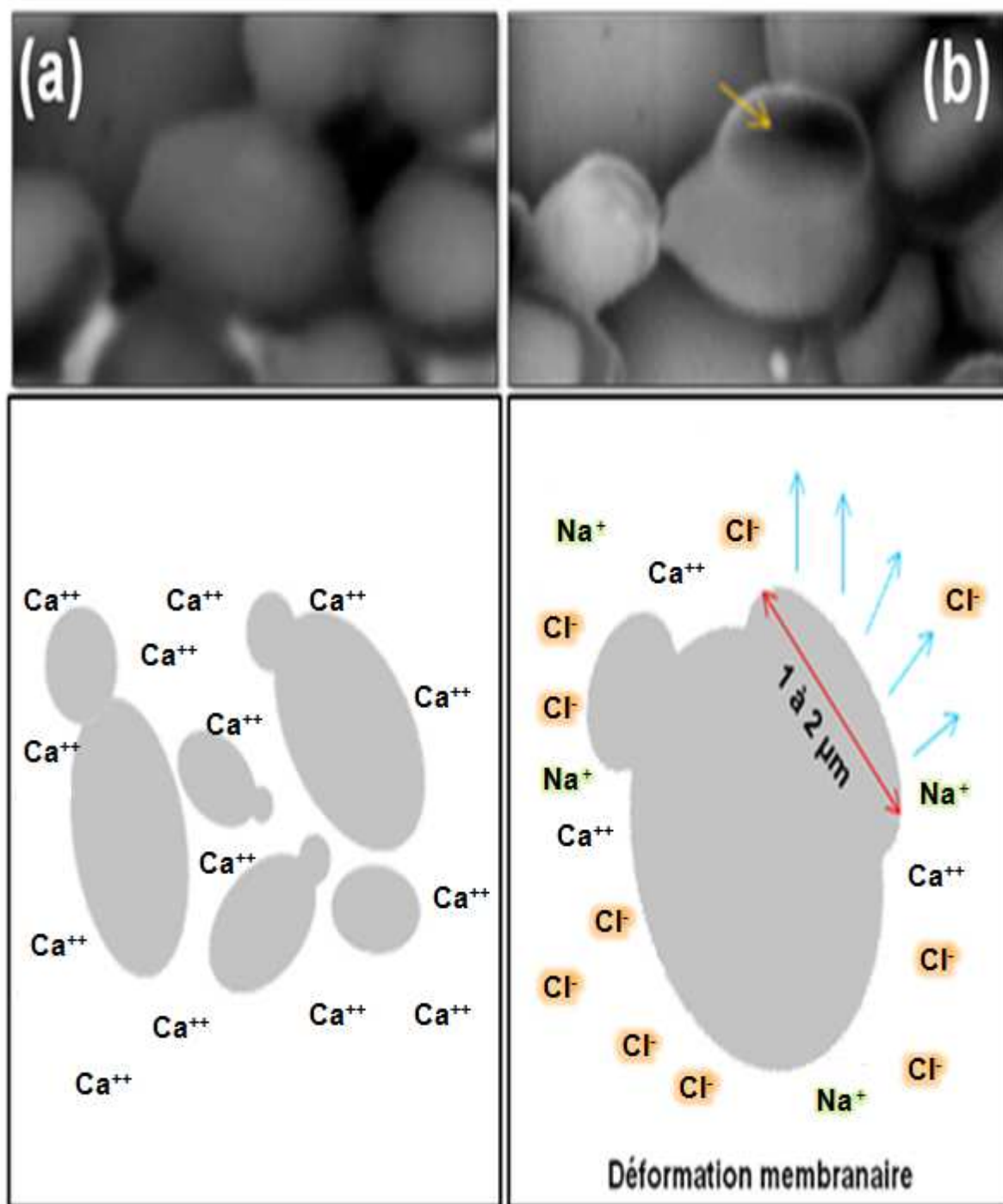


Figure n° 32 : Représentation schématique de la morphologie cellulaire de *Candida albicans* ATCC 10231

(a)- cellules témoins (b)- levures incubées en la présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B.

5- Conclusion

Au terme de ce chapitre, nous pouvons dire que la déformation membranaire partielle observée peut être expliquée par la théorie de **Pontier** établie en **1973** qui stipule que l'interaction des drogues avec les cellules hôtes est multi-cibles. En effet, les cellules de *Candida albicans* peuvent réparer leur membrane si le temps d'incubation est prolongé au delà de 24 heures. Le retour à une membrane tendue à partir de la membrane déformée se réalise de manière optimale lorsque le milieu osmotique est rééquilibré. La transition progressive entre ces deux états structuraux pourrait s'expliquer par une réorganisation latérale de l'ensemble des composants lipidiques. Ce qui suggère que la séparation de phase est la cause principale des déformations observées lors des traitements par l'amphotéricine B. La membrane plasmique n'étant que très peu compressible, il y a donc un excès de surface et une déformation de cette structure est nécessaire pour maintenir une forme sphérique (**Laroche C. et coll., 2005**).

Cette déformation pourrait être expliquée également par le rôle des stérols membranaires. Le diagramme de phase d'une bicouche à plusieurs composants montre qu'en absence des stérols aucune séparation n'est possible (**André E. P et coll., 2012**). L'hypothèse serait que l'amphotéricine B agit au niveau des radeaux lipidiques se trouvant au sein des membranes plasmiques des cellules sensibles. Il existe deux arguments majeurs en faveur de cette hypothèse: l'existence des radeaux au sein des membranes plasmiques de levures de *Candida albicans* d'une part. D'autre part, le mode d'action de l'amphotéricine B, qui implique l'interaction avec l'ergostérol (considéré comme composant clé de ces régions) [(**André E. P et coll., 2012**) ; (**Orsini F. et coll., 2012**)]. De plus, en **2010**, **Schaber J. et ses collaborateurs**, ont montré que les modifications morphologiques de la surface sont gouvernées par l'évolution d'un rapport surface/volume, par la minimisation de l'énergie due à la courbure et par la différence de surface entre les deux feuilletts de la bicouche. Par conséquent, les déformations peuvent conduire à la formation de domaines qui permettent de diminuer les contraintes au sein de la membrane. Ces derniers, sont associés à une diminution de la surface et à un changement du volume. Une contraction volumique importante a été corrélée à un taux de mortalité cellulaire plus important au cours d'un stress osmotique (**Vindelov J. et Arneborg N., 2002**).

2^{ème} chapitre : Analyse biochimique de la surface membranaire des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B

Dans le but de comprendre par quels moyens biochimiques les cellules dormantes récupèrent des dommages causés par l'action de l'amphotéricine B et reprennent une croissance normale après une phase de latence prolongée, nous avons procédé à une analyse par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA).

La croissance est menée dans un incubateur de paillasse, à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minute. La cinétique de croissance est suivie en parallèle aux analyses spectrales sur 48 heures avec des prélèvements périodiques toutes les 60 minutes. L'amphotéricine B est ajoutée au milieu de culture au même moment que l'inoculum à une concentration finale de 0,4µg/mL, ce qui correspond au temps zéro.

Les spectres IRTF-RTA sont acquis après séchage des échantillons à l'aide de l'azote gazeux N₂⁷. Les données sont ensuite analysées en attribuant les pics d'absorbance aux composés correspondants en employant différentes méthodes mathématiques.

Les spectres sont enregistrés dans les différentes phases de la croissance dans une gamme de fréquence allant de 3500 à 500 cm⁻¹. L'assignation des différentes bandes est réalisée en se référant à la base des données publiées dans la littérature (**Annexe 2**).

1-Spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B

Pour la cinétique de croissance, les résultats représentés sur la **figure n° 33a** montrent trois phases de croissance ; une phase de latence, une phase exponentielle et une phase stationnaire.

Les levures passent par une phase de latence ($0 < t < 3h$) de 2 heures caractérisée par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, elles rentrent dans une phase de croissance exponentielle ($3 < t < 10h$) pour atteindre la phase stationnaire au bout de 8 heures d'incubation sous agitation continue à 130 tours/ minute.

Les spectres IRTF-RTA sont enregistrés dans un intervalle allant de 3000 cm^{-1} à 900 cm^{-1} , les prélèvements sont effectués toutes les 60 minutes durant la phase de latence et la phase exponentielle.

Les résultats de l'analyse spectrale sont représentés dans la **figure n°33b**.

Nous remarquons que les spectres sont enregistrés dans quatre régions principales :

- Une région allant de 3000 à 2500 cm^{-1} dominée par une bande d'intensité faible apparaissant vers les 2900 et 2700 cm^{-1} et attribuée aux vibrations d'élongation des groupes CH_3 , CH_2 , et CH tertiaire, présents dans les liens d'acides gras de lipides et de certaines chaînes aliphatiques et latérales d'acides aminés.

- Une région comprise entre 2000 et 1500 cm^{-1} dominée par deux bandes très intenses correspondant aux vibrations d'élongation et de déformation des groupements $\text{C}=\text{O}$, CN et NH de l'amide I et l'amide II ; un premier pic apparaît vers 1650 cm^{-1} correspondant aux vibrations de la région amide I et un deuxième pic vers 1555 cm^{-1} correspondant aux vibrations de la région amide II. Ces résultats fournissent une information à la fois quantitative et qualitative sur le contenu protéique.

- Une région mixte entre 1500 et 1200 cm^{-1} dans laquelle des bandes d'intensité moyennes sont observées vers 1300 et 1250 cm^{-1} . Ces bandes attestent de la présence d'une superposition des phospholipides et des protéines par la vibration d'élongation et de déformation des deux groupements CN et NH de l'amide III et la vibration d'élongation du groupement $\text{P}=\text{O}$ des phospholipides.

- Une région allant de 1200 à 900 cm^{-1} dominée par les bandes d'absorption dues aux vibrations d'élongation des différentes liaisons polysaccharidiques, tels que les vibrations d'élongation C-O-C et C-O-P des polysaccharides et stérols.

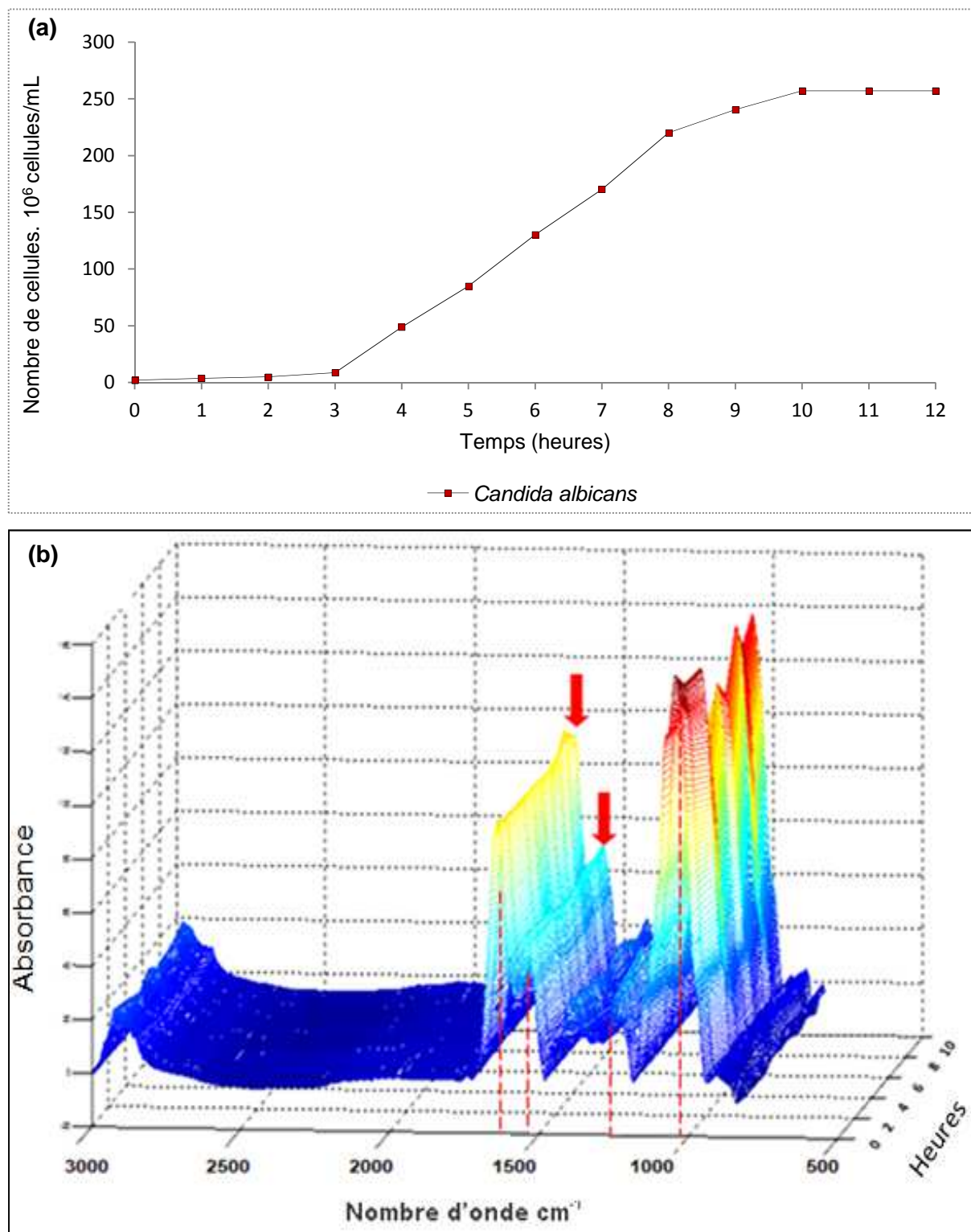


Figure n°33 : (a)- Courbe de croissance et (b)- représentation en 3D (temps, intensité d'absorbance, nombre d'ondes) de la signature spectrale IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B, pendant 10h de croissance ($0 < t < 3\text{h}$ =phase de latence) ($3 < t < 10\text{h}$ =phase exponentielle). Région spectrale allant de 3000 à 900 cm^{-1} .

2-Spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL

Les levures de *Candida albicans* ATCC 10231 sont incubées en présence de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B. L'antifongique est ajouté au milieu de culture au même moment que l'inoculum, ce qui correspond au temps zéro de la croissance. La concentration cellulaire de départ est fixée à $2 \cdot 10^6$ cellules/mL. La croissance des levures est suivie par dénombrement sur cellule de Thoma. Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minute pendant 48 heures. Pour la caractérisation biochimique et le suivi de l'effet de l'amphotéricine B sur les cellules en fonction du temps d'incubation, ces dernières sont lavées, centrifugées, et mises en suspension dans de l'eau distillée stérile avant d'être déposées sur le cristal de diamant et déshydratées à l'aide d'azote gazeux N₂.

Les culots de *Candida albicans* ATCC 10231 sont analysés par spectroscopie IRTF-RTA.

D'après la **figure n°34a** nous constatons qu'en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 µg/mL, la phase de latence se prolonge jusqu'à 24 heures. Les levures reprennent ensuite leur croissance d'une manière identique aux cellules témoins (levures incubées sans antifongique). Le profil global d'absorption représenté dans la **figure n°34b** est le même que celui des cellules témoins. Les spectres sont enregistrés dans les mêmes régions que celles retrouvées chez la culture témoin.

L'analyse statistique montre qu'il existe des différences importantes dans les spectres analysés en fonction du temps d'incubation. Les variations moléculaires au sein de la surface cellulaire sont suffisamment importantes pour provoquer des variations spectrales.

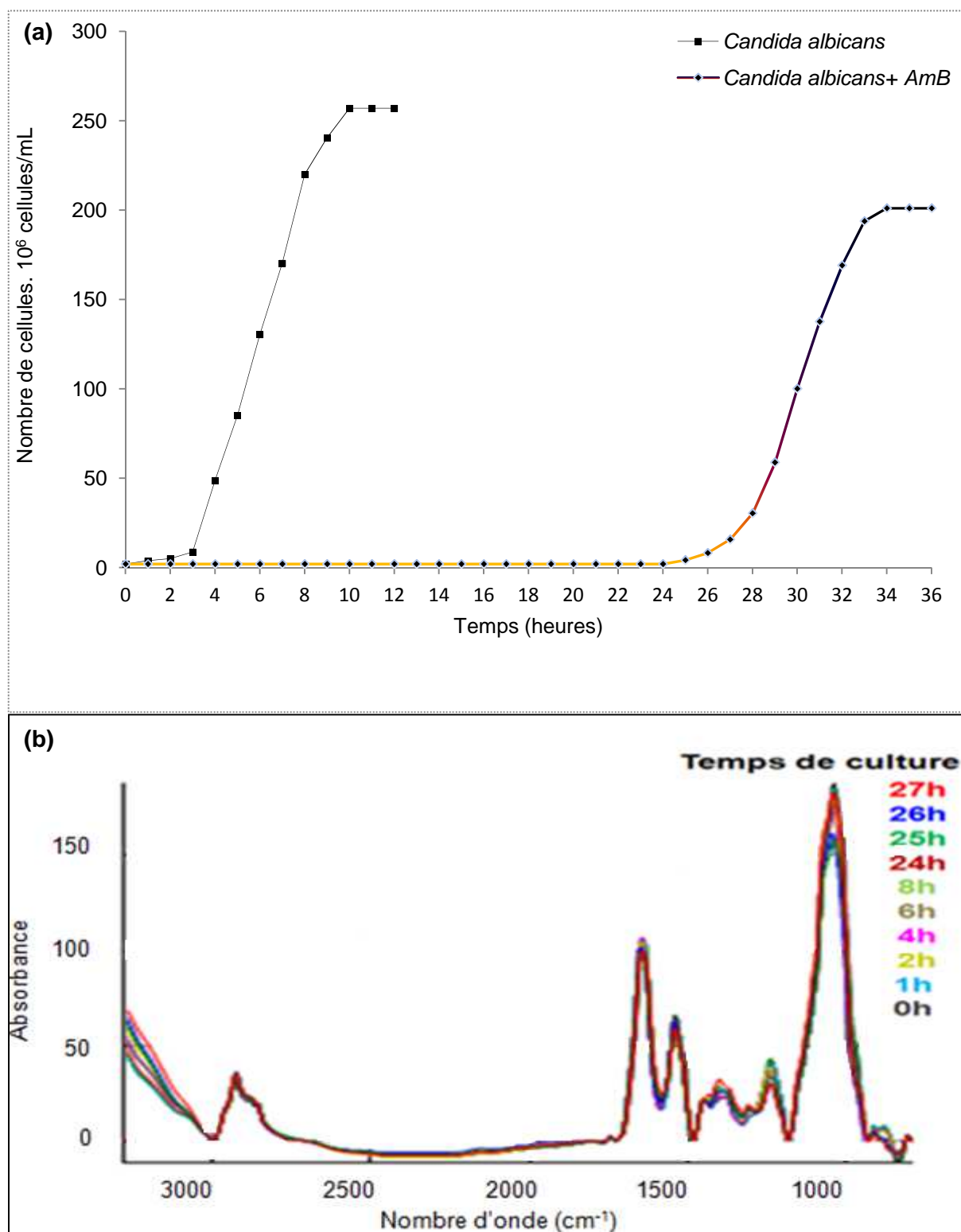


Figure n° 34 : (a)- Courbe de croissance des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 $\mu\text{g/mL}$ (b)- Spectres IR-RTA aux temps 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h pendant la phase de latence et aux temps 25h, 26h et 27h pendant la phase exponentielle. Région spectrale allant de 3000 à 900 cm^{-1} .

2-1- Analyse spectrale comparative entre cellules récupérées en phase de latence et en phase exponentielle

2-1-1- Analyse globale des spectres

Les analyses statistiques globales des différents spectres enregistrés en présence d'amphotéricine B ont révélé des changements biochimiques importants au niveau de la surface cellulaire, entre cellules récupérées en phase de latence et celles en phase exponentielle. En revanche, aucune différence qualitative et/ou quantitative dans les spectres n'est observée chez les cellules témoins et ce tout au long de la croissance.

Les résultats obtenus nous ont conduits à affiner les recherches dans les zones spectrales les plus marquées par la variabilité.

Les signatures IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 sont comparées en fonction de deux groupes :

- Groupe 1 : correspondant aux cellules analysées en phase de latence (phase de dormance) aux temps 0h, 1h, 2h, 4h, 6h, 8h et 24h.
- Groupe 2 : correspondant aux cellules analysées en phase exponentielle aux temps 25h, 26h et 27h.

a- Test de Student

Dans un premier temps, les changements sont analysés par des approches statistiques multi-variées. Le but que nous nous sommes fixé est de confirmer les variances entre les deux populations de cellules.

Les hypothèses testées sont :

- L'hypothèse nulle H_0 : $\mu_1 = \mu_2$ indiquant qu'il n'y a aucune différence entre les moyennes des deux populations (groupe 1 et groupe 2).
- L'hypothèse alternative H_1 : $\mu_1 \neq \mu_2$ signifiant que les moyennes entre les deux populations sont significativement différentes.

D'après les résultats représentés dans **la figure n° 35**, nous constatons que la valeur p (p -value) est estimée à 1% (t-Test 0.01), ce qui est statistiquement significative et rejette l'hypothèse nulle. Des variations biochimiques importantes sont relevées entre les cellules dormantes (phase de latence) et les cellules en phase exponentielle.

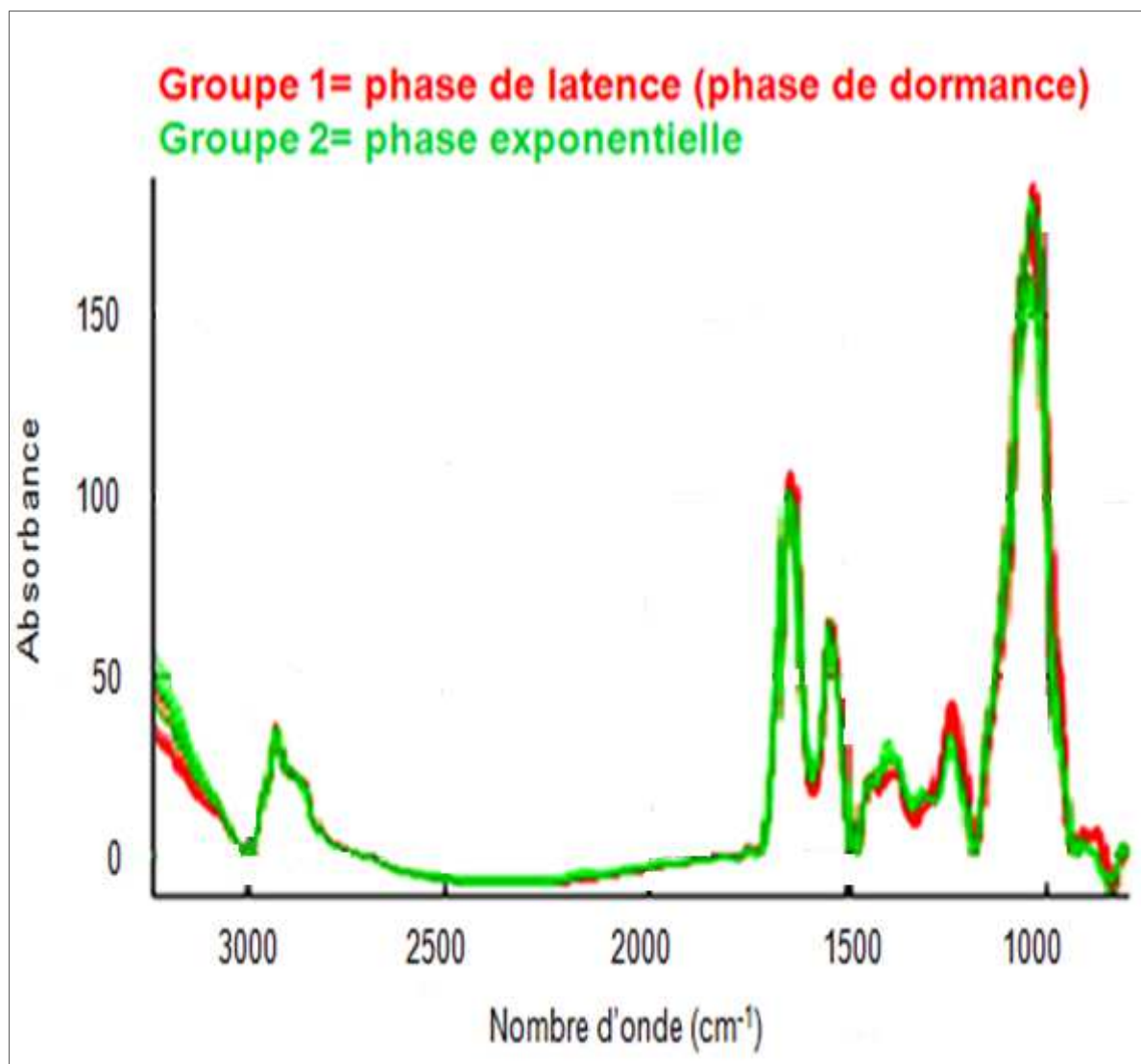


Figure n° 35 : Spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL. Variations spectrales (t-Test 0,01) entre la phase de dormance (rouge) et la phase exponentielle (vert). Région allant de 3000 à 900 cm⁻¹.

b- Analyse en composantes principales (ACP)

Dans un second temps, les spectres des cellules sont comparés par l'approche d'analyse basée sur les composantes principales (ACP) dans un intervalle de confiance de 95%. Les variables d'origine fortement redondantes (l'absorbance et les profils des spectres), sont remplacées par des variables synthétiques (variables latentes). Deux composantes principales (CP1 et CP2) sont sélectionnées pour résumer les informations dans les régions allant de 3000 à 900 cm^{-1} .

D'après les résultats représentés dans la **figure n°36**, nous remarquons une nette séparation entre les spectres. En effet, les points numérotés de 1 à 7 correspondent à la phase de dormance, alors que les points numérotés de 8 à 10 correspondent à la phase exponentielle.

Au sein de chaque groupe de spectres (groupe 1 et groupe 2), la représentation des points est asymétrique et non superposée, ce qui correspond à une variabilité spectrale dans la même phase et entre les différentes phases.

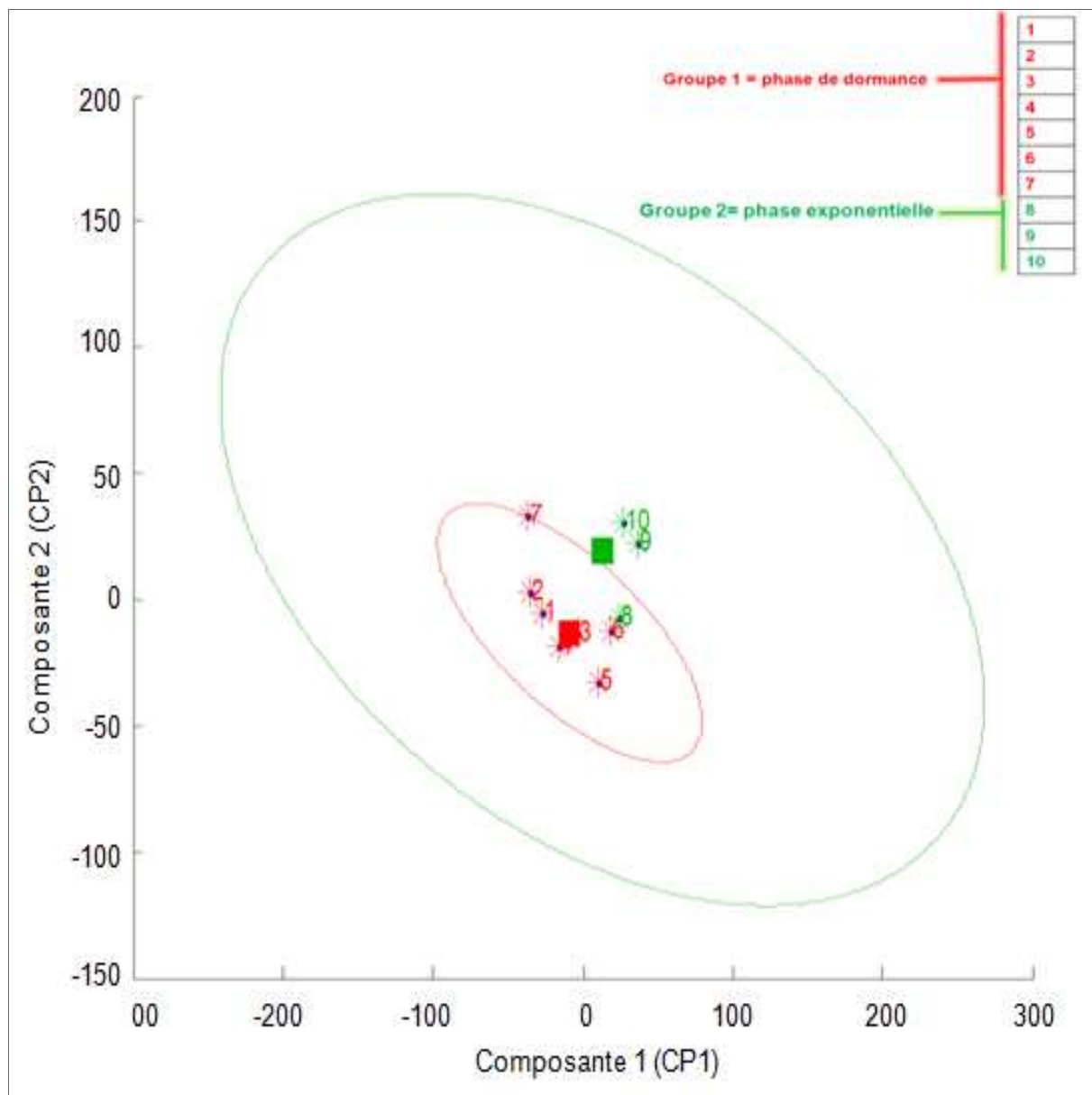


Figure n° 36 : Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les spectres des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 en phase de dormance, et en phase exponentielle. Les ellipses sont calculées dans un intervalle de confiance de 95%. (■ Barycentre des points)

Les différences spectrales sont enregistrées dans deux régions principales (**Figure n°37**) :

-La région située entre 1750 et 1500 cm^{-1} , dans laquelle nous distinguons deux bandes d'absorption principales, la bande amide I (entre 1650 et 1600 cm^{-1}) ou des variations significatives entre les cellules en phase de dormance et les cellules en phase exponentielle sont observées et la bande amide II (entre 1600 et 1500 cm^{-1}) ou aucune variation entre les deux phases de croissance n'est signalée.

-La région située entre 1500 et 900 cm^{-1} , où nous distinguons trois bandes principales, la bande des acides gras et acides aminées (1400 à 1300 cm^{-1}), la bande caractéristique des phospholipides et des vibrations de déformations des groupements CH_2 et CH_3 , le pic lié à la vibration d'élongation des groupements PO^{2-} des phosphodiesteres (1300 à 1200 cm^{-1}) et la bande des polysaccharides (1200 à 900 cm^{-1}).

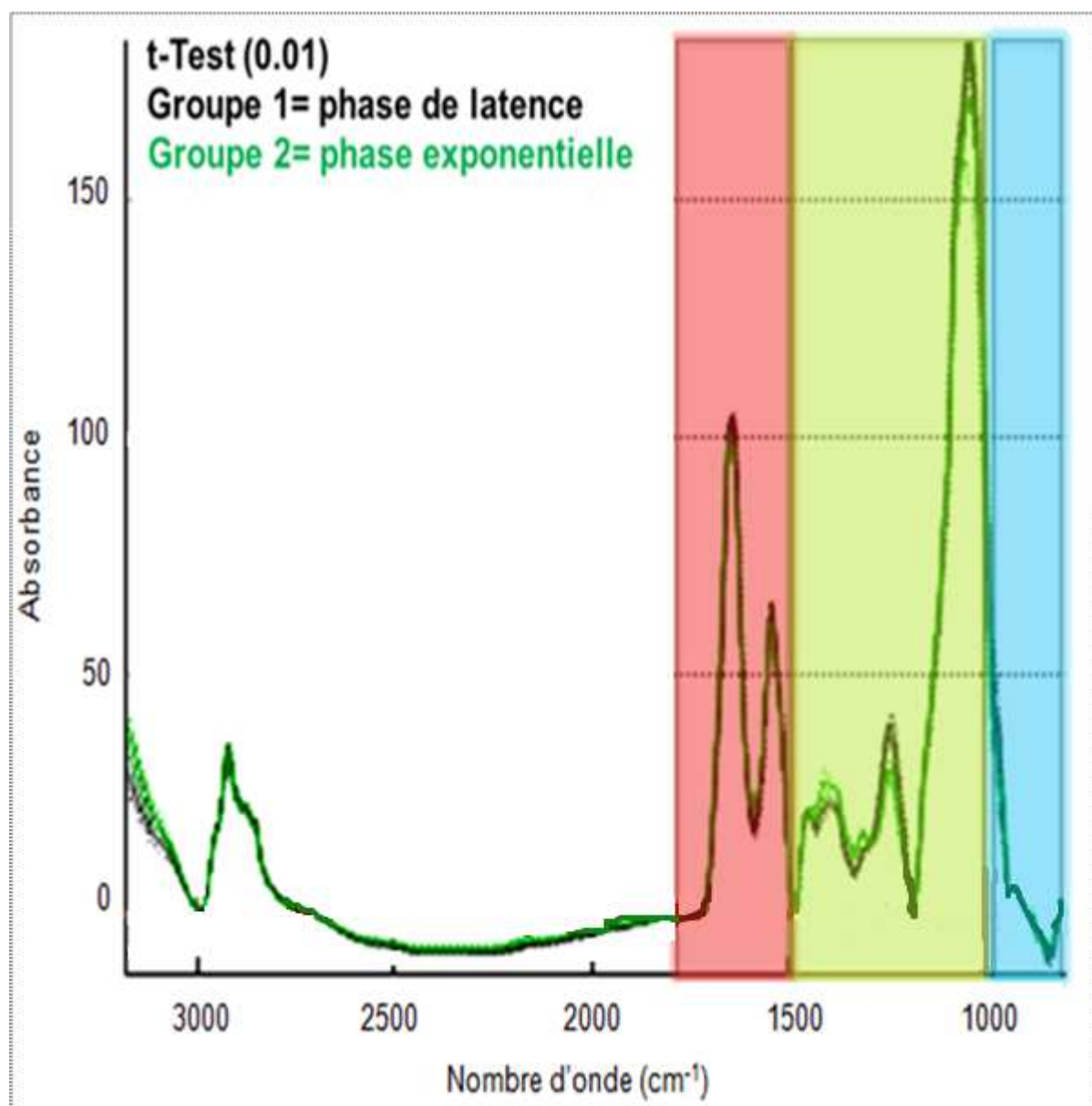


Figure n° 37 : Attributions des variations spectrales (t-Test 0,01) de 1750 à 1500 cm⁻¹ (rouge), de 1500 à 1000 cm⁻¹ (jaune) et de 1000 à 900 cm⁻¹ (bleu). Région spectrale globale comprise entre 3000 et 900 cm⁻¹.

2-1-2- Variation de la composition protéique dans la région allant de 1700 à 1500 cm^{-1}

a- Analyse des spectres

En comparant les deux populations de cellules (cellules dormantes et cellules en phase exponentielle), il apparaît clairement des différences importantes dans la région située entre 1700 et 1600 cm^{-1} . Les résultats obtenus de la décomposition des bandes sont représentés dans la **figure n° 38** et les principales attributions sont regroupées dans le **tableau n °3**.

Nous pouvons dire que les cellules de *Candida albicans* ATCC 10231, absorbent dans deux bandes distinctes :

- La bande amide I, dont le profil présente une signature avec une variance importante reflétant l'évolution biochimique des cellules dormantes. Les maxima des pics, sont situés exactement entre 1655 et 1630 cm^{-1} et la différence globale entre les deux groupes de cellules est estimée à un écart de 1 à 20 cm^{-1} au niveau des maxima.

Le profil et l'intensité de l'absorbance varie au fur et à mesure de la croissance cellulaire. De plus, l'absorption attribuée aux vibrations d'élongation des liens C=O et de déformation des liens NH diminue. Les spectres se déplacent vers les plus hauts nombres d'ondes de 1630 à 1655 cm^{-1} allant de la phase de dormance à la phase exponentielle.

- La bande amide II caractéristique des vibrations de torsion des liens NH et des vibrations d'élongation et de déformation des liens CN et NH respectivement. L'absorption se fait à 1520 cm^{-1} pour les chaînes latérales et à 1530 cm^{-1} pour les brins «beta». Les analyses statistiques ($p > 0.01$) ne représentent aucune présomption contre l'hypothèse nulle et donc aucune variabilité entre la phase de dormance (L1-L6) et la phase exponentielle (E8-E10).

Ces variations suggèrent une altération de la structure et/ou de la nature des protéines membranaires, qui se traduit par un changement du profil des bandes amide I et des différences de vibrations attribuées aux changements qu'adopte *Candida albicans* ATCC 10231 en présence de 0,4 μg d'AmB/mL.

Ces différences mettent en évidence non seulement un profil biochimique de l'évolution protéique des cellules dormantes mais contribuent à classer les populations de cellules en fonction de leur variabilité protéique de surface.

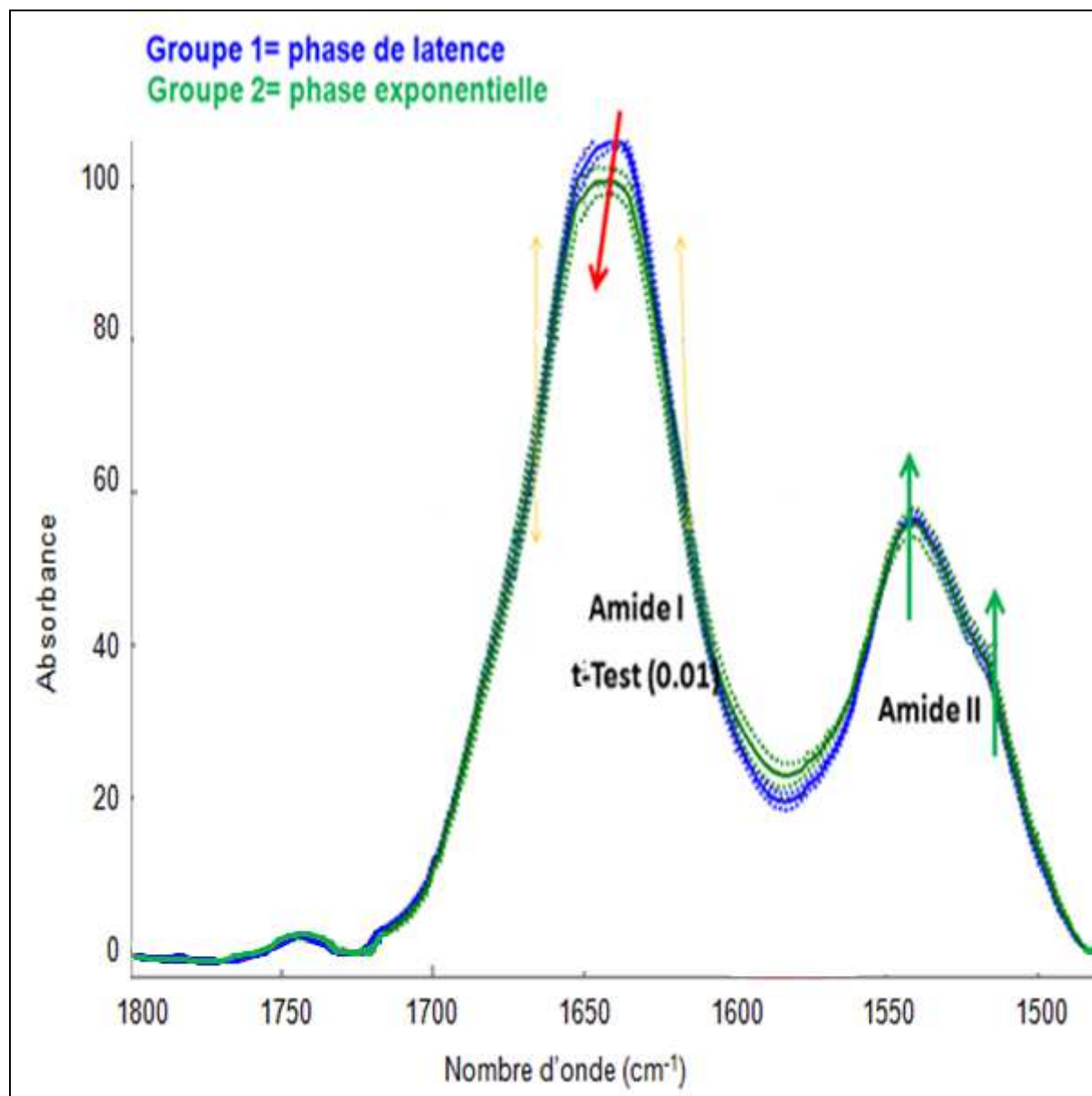


Figure n° 38 : Spectres IRTF-RTA de la bande amide I (1700 à 1600 cm⁻¹) et de la bande amide II (1600 à 1500 cm⁻¹) des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4µg d'AmB/mL. Indication des différences d'absorption au niveau de l'amide I (flèches rouges). Région spectrale allant de 1800 à 1500 cm⁻¹.

Tableau n° 3 : Attributions des principales bandes IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4µg d'AmB/mL dans la région allant de 1700 à 1600 cm⁻¹. (Les vibrations d'élongation sont notées ν , et les vibrations de déformation sont notées δ).

Phase de récupération des levures	Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Vibrations moléculaires
Phase de latence (L1-L6)	1630	ν C=O couplée à δ NH brins béta β Feuillets antiparallèles (b-sheet)
Phase exponentielle (E8-E10)	1640 1655	80% ν C=O couplée à 20% δ NH Hélice alpha (alpha-helix)

b- Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward

Afin de trier les populations cellulaires en fonction des altérations en protéines membranaires, nous nous sommes intéressés à la classification hiérarchique ascendante (HCA) dans la région spectrale d'intérêt comprise entre 1640 et 1620 cm^{-1} . Les résultats de cette classification sont rapportés dans le dendrogramme de la **figure n° 39**.

Nous constatons que :

Les cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 exposées à 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'amphotéricine B changent leur composition en protéines surfaciques en fonction du temps d'incubation avec un seuil maximum d'hétérogénéité fixé à 44.

En plaçant ce seuil de variance à 26, nous distinguons deux principaux groupes de cellules :

- Groupe 1 (G_1) pour *Candida albicans* ATCC 10231 incubées au temps $0 \leq t \leq 5\text{h}$ représentant la phase de latence (L1-L6).
- Groupe 2 (G_2) pour *Candida albicans* ATCC 10231 incubées au temps $25 \leq t < 27\text{h}$, représentant la phase exponentielle (E8-E10)

En diminuant le seuil d'hétérogénéité à un minimum estimé à 10, nous distinguons des changements protéiques croissants qui classent les cellules selon 3 profils protéiques:

- Un profil qui classe les cellules en sous-groupe (L1-L2)
- Un profil qui classe les cellules en sous-groupe (L3-L6)
- Un profil qui classe les cellules en sous-groupe (E8-E10)

En d'autres termes, ces résultats mettent en évidence l'importance de la composition surfacique en protéines dans le comportement biochimique des cellules dormantes et dans l'évolution de ces dernières en fonction du temps d'incubation.

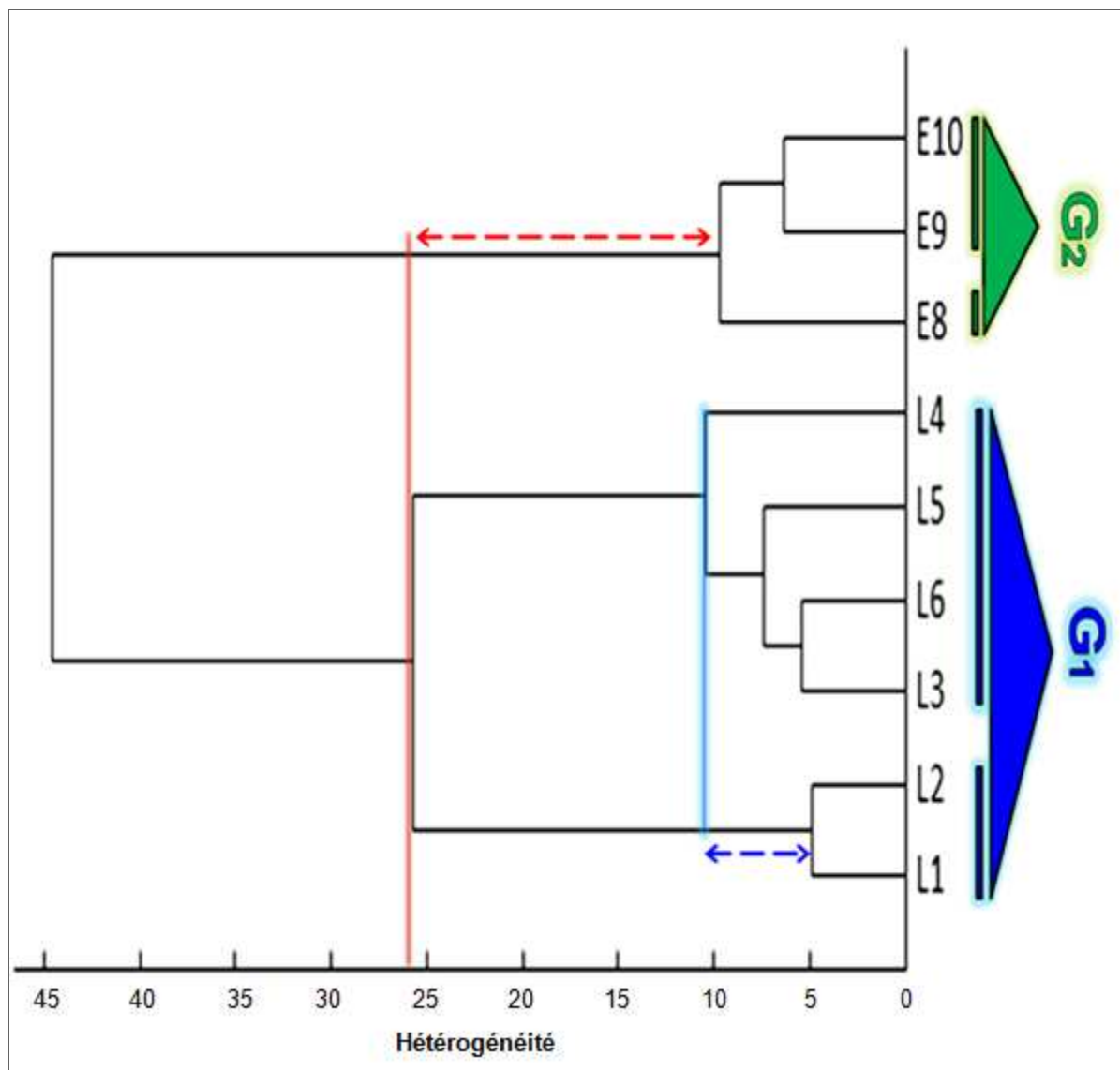


Figure n° 39 : Classification hiérarchique par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA de *Candida albicans* ATCC 10231 récupérée en phase de dormance (phase de latence) (G₁:L1-L6) et en phase exponentielle (G₂:E8-E10). Région des variations protéiques dans l'amide I allant de 1640 à 1620 cm⁻¹. Les lignes rouges et bleues représentent respectivement les seuils d'hétérogénéité à 26 et 10.

2-1-3- Variation de la composition lipidique dans la région allant de 1500 et 900 cm^{-1}

a- Analyse des spectres

Dans cette région nous distinguons trois bandes d'absorption principales représentées dans la **figure n° 40**. Les attributions les plus significatives sont représentées dans le **tableau n° 4**.

Nous pouvons déduire que les cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 absorbent dans trois bandes distinctes :

- La bande allant de 1400 à 1300 cm^{-1} caractérise les acides gras et les acides aminés. Nous distinguons 3 pics d'absorption à 1400, 1380 et 1310 cm^{-1} . Les vibrations dans cette région montrent une variance entre les cellules en phase de latence (L1-L6) et les cellules en phase exponentielle (E8-E10). L'écart de l'absorption est compris entre 5 et 10 cm^{-1} .

L'analyse statistique par le test de Student s'est avérée peu significative mais pas nulle. C'est pourquoi, nous n'avons pas réalisé la classification hiérarchique ascendante (HCA).

- Région allant de 1300 à 1200 cm^{-1} qui correspond à des vibrations liées aux liens des phospholipides. Les analyses statistiques ont révélées une différence majeure et spécifique entre les deux groupes de cellules récupérées en phase de latence (L1-L6) et en phase exponentielle (E8-E10) amenant à une classification et une analyse détaillée. En effet, dans le pic d'absorption vers 1240 cm^{-1} , l'intensité et le profil varient en fonction des phases et non en fonction du temps d'incubation. L'absorption des phospholipides par le biais du groupement P=O diminue en intensité en allant des plus petits vers les plus hauts nombres d'ondes jusqu'à 1245 cm^{-1} , et ce, de la phase de latence à la phase exponentielle.

- Région allant de 1200 à 900 cm^{-1} caractérise l'absorption des lipopolysaccharides et stérols. Nous remarquons que malgré le massif intense résultant dans cette région à 1044 cm^{-1} , l'absorbance ne varie que très peu au cours de la croissance. L'analyse statistique n'a révélé aucune variance liée au profil d'absorption. La signature dans cette région semble être a priori similaire pour les différentes populations prélevées tout au long de la croissance. Par contre, nous avons noté une variation au niveau de l'intensité qui est très forte au début de la phase de latence $0 \leq t \leq 5\text{h}$ (L1-L6) et diminue considérablement lorsque les cellules atteignent la phase exponentielle $25 \leq t < 27\text{h}$ (E8-E10).

Les résultats représentés sur la **figure n° 40** montrent que la composition en acides gras, en acide aminés et en phospholipides varie en fonction de la phase de croissance et de l'état cellulaire. Ainsi les attributions essentielles dans la région allant de 1500 à 900 cm^{-1} , montrent que malgré l'existence d'une différence dans le profil de composition en acides gras et en acides aminés entre les deux populations de cellules, la variation la plus importante reste celle représentée par les pics des phospholipides membranaires.

Sur la base de ces résultats, nous avons dressé le profil lipidique des populations cellulaires en fonction des variations en absorption des phospholipides dans la région allant de 1280 à 1240 cm^{-1} .

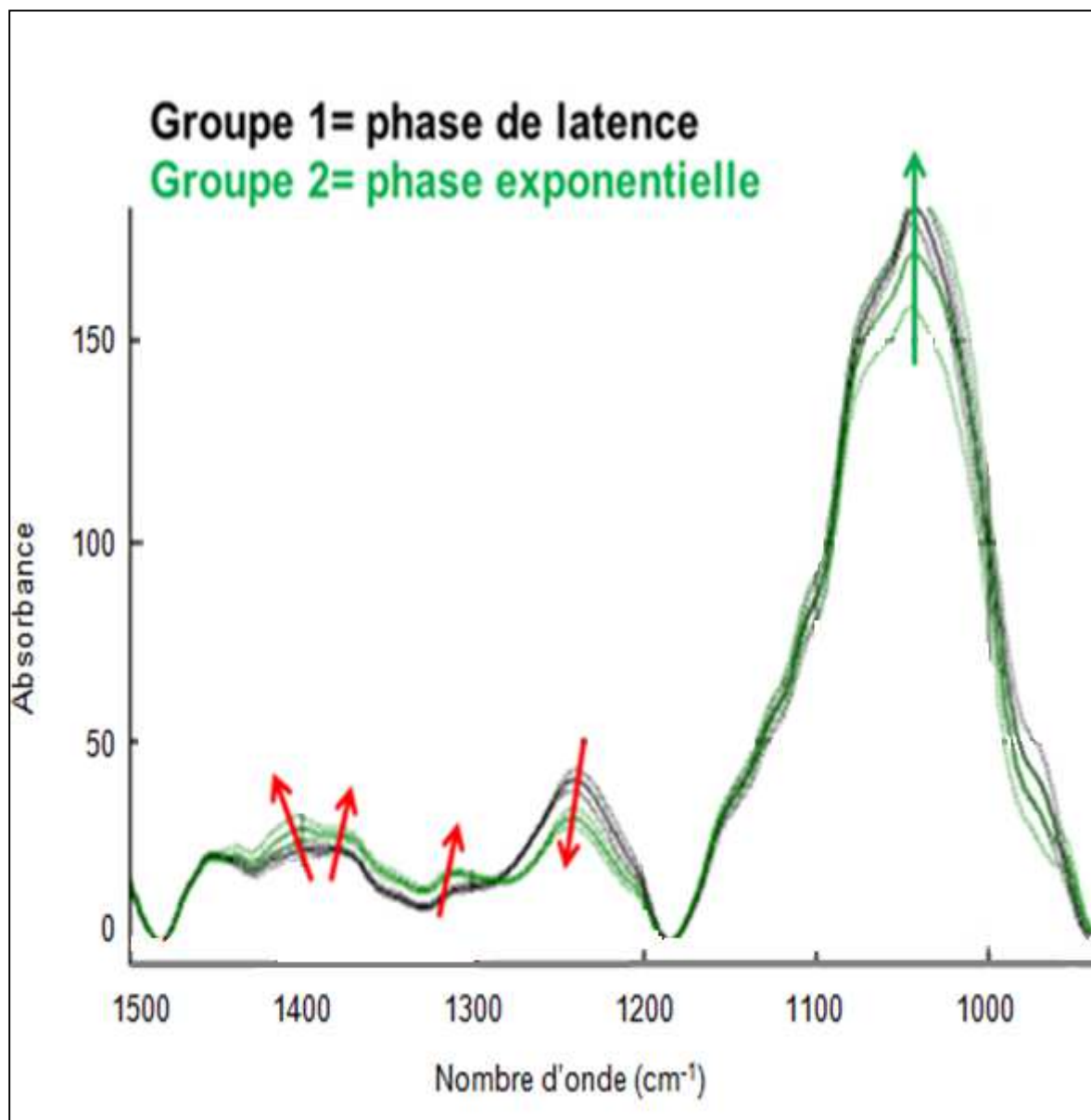


Figure n° 40 : Spectres IRTF-RTA de la région des faibles nombres d'onde de 1500 à 900 cm⁻¹ des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL. Indication des différences d'absorptions (flèches rouges).

Tableau n° 4 : Attributions des principales bandes IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL dans la région allant de 1500 à 900 cm⁻¹. (Les vibrations d'élongation sont notées ν et les vibrations de déformation sont notées δ).

Région spectrale (cm ⁻¹)	Phase de récupération des levures		Vibrations moléculaires
	Phase de latence (L1-L6)	Phase exponentielle (E8-E10)	
1400-1300	1400	1405	ν C=C, δ CH et δ COOH
	1380	1370	ν C-N couplée à δ N-H, δ CH ₃ , ν COOH
	1310	1305	δ CH, δ CH ₂ , et δ CH ₃
1300-1200	1240	1245	ν PO ₂ ⁻ , ν P=O, ν R-O-P-O-R
1200-900	1044		ν C-O-C, ν P-O-C, ν OH couplée à δ C-O, ν CH ₂ OH couplée à ν C-N

b- Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward

Le test de student ($p < 0,001$) montre que les différences restent significatives uniquement pour le pic situé à 1240 cm^{-1} mais pas pour toute la bande spectrale de 1300 à 1400 cm^{-1} . Sur cette constatation, les cellules sont classées par la méthode de Ward dans la région allant de 1280 à 1240 cm^{-1} . Les résultats obtenus sont représentés dans le dendrogramme de la **figure n ° 41**.

Nous remarquons que :

Les cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 exposées à $0,4 \mu\text{g/mL}$ d'amphotéricine B changent leur composition en phospholipides membranaires en fonction des différentes phases de croissance avec un seuil maximum d'hétérogénéité fixé à 148.

En plaçant ce seuil de variance à 54, nous distinguons deux principaux groupes de cellules:

- Groupe (G_1) : Cellules récupérées au temps $0 \leq t \leq 5\text{h}$ représentant la phase de latence (L1-L6)
- Groupe (G_2) : Cellules récupérées au temps $25 \leq t < 27\text{h}$ représentant la phase exponentielle (E8-E10)

En diminuant le seuil d'hétérogénéité à un minimum estimé à 5, des changements lipidiques stables qui classent les cellules selon 4 profils cette fois-ci sont observés:

- Trois sous-groupes (L1-L2), (L3-L4) et (L5-L6) représentant les mouvements des phospholipides en phase de dormance
- Un sous-groupe (E8-E10) représentant le profil des cellules en phase exponentielle.

L'hétérogénéité entre les cellules en phase de dormance est comprise entre 0 et 5, alors qu'entre les cellules en phase exponentielle, elle est comprise entre 0 et 2,5 ce qui laisse suggérer que les phospholipides au sein des membranes en phase de dormance effectuent des mouvements membranaires 2 fois plus que les cellules en phase exponentielle.

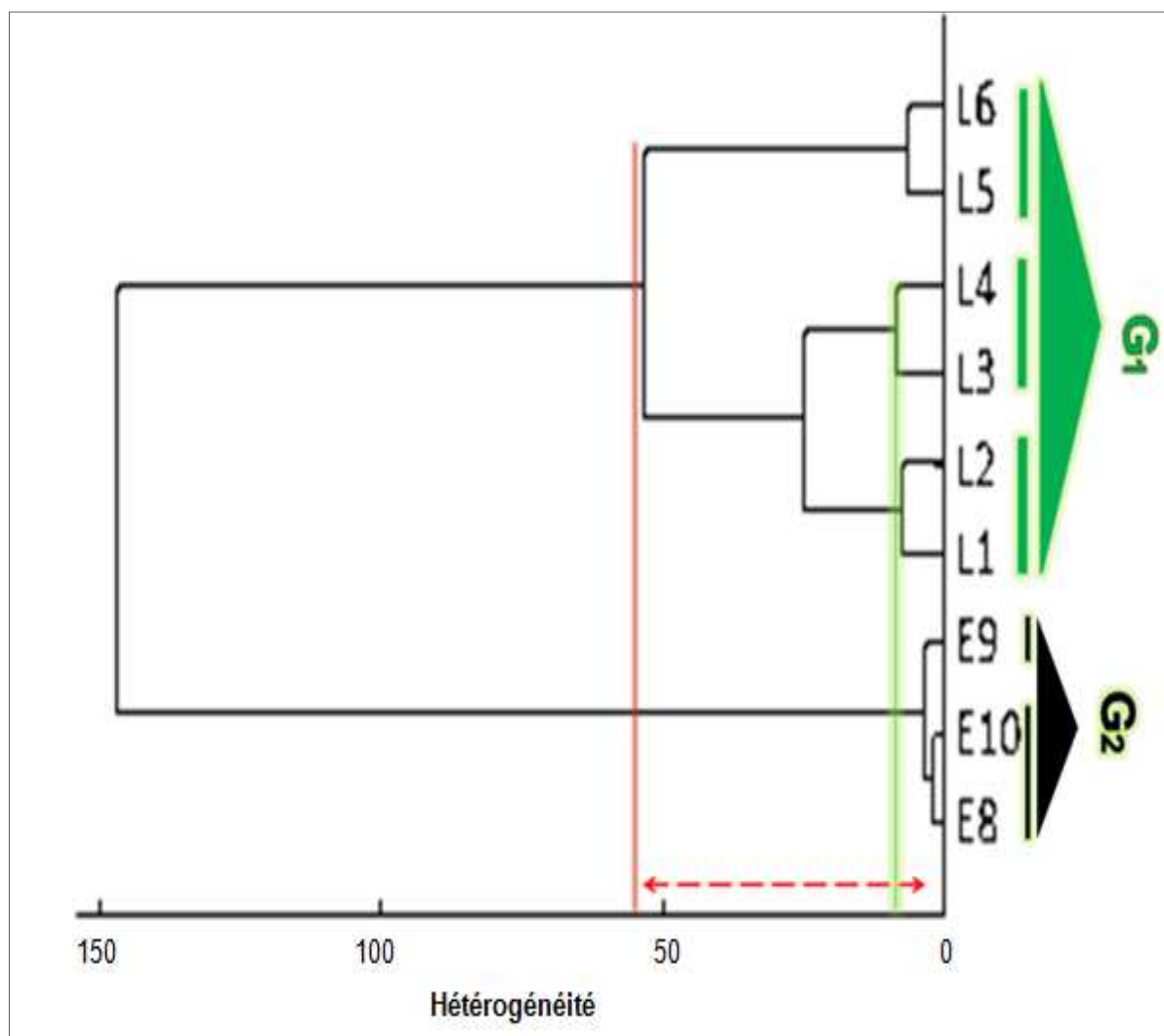


Figure n° 41 : Classification hiérarchique ascendante par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 récupérées en phase de dormance (G₁:L1-L6) et en phase exponentielle (G₂:E8-E10). Région des variations lipidiques allant de 1280 à 1240 cm⁻¹. Les lignes rouges et vertes représentent respectivement les seuils d'hétérogénéité à 54 et 5.

2-2- Profil évolutif des cellules dormantes en fonction du temps d'incubation

2-2-1- Analyse globale des spectres

Sur la base des résultats obtenus et rapportés dans le chapitre précédent, nous avons constaté que dans la phase de latence les signatures biochimiques des surfaces cellulaires varient non seulement entre les cellules issues des différentes phases mais aussi entre les cellules issues de la même phase de croissance. Pour ce faire, et dans le but d'avoir plus d'information sur les cellules dormantes, nous avons étudié les variations biochimiques pendant la phase de latence en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL. Huit (8) spectres IRTF-RTA ont été sélectionnés et analysés. Il s'agit des spectres correspondant aux cellules récupérées aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h.

Les résultats obtenus sont regroupés dans la **figure n°42**.

Nous constatons que :

- Quel que soit le temps d'incubation, toutes les populations cellulaires issues de la phase de dormance ont une signature globale similaire à celle des cellules témoins.

- Trois régions principales sont retrouvées :

Région allant de 3000 à 2500 cm^{-1} : présence de deux pics vers 2800 cm^{-1} dus aux vibrations d'élongation des groupements CH_3 , CH_2 et CH tertiaire, essentiellement retrouvés dans les acides gras et quelques acides aminés.

Région allant de 2000 à 1500 cm^{-1} : dominée par deux bandes moyennement intenses de 1650 à 1500 cm^{-1} qui correspondent à l'absorption des groupements amide I et amide II.

Région allant de 1500 à 900 cm^{-1} : présence de quatre pics à 1400, 1300, 1250 et 1050 cm^{-1} . La présence de ces derniers est corrélée à la présence des phospholipides, des polysaccharides et des stérols membranaires.

- L'analyse statistique par les moyens multivariés a montré qu'il existe des variations entre les spectres lorsqu'ils sont comparés dans toute la gamme spectrale. Cependant, des différences significatives sont mises en lumière lorsque les spectres sont comparés dans la bande allant de 1700 à 1500 cm^{-1} et dans la bande des plus petits nombres d'ondes allant de 1500 à 900 cm^{-1} .

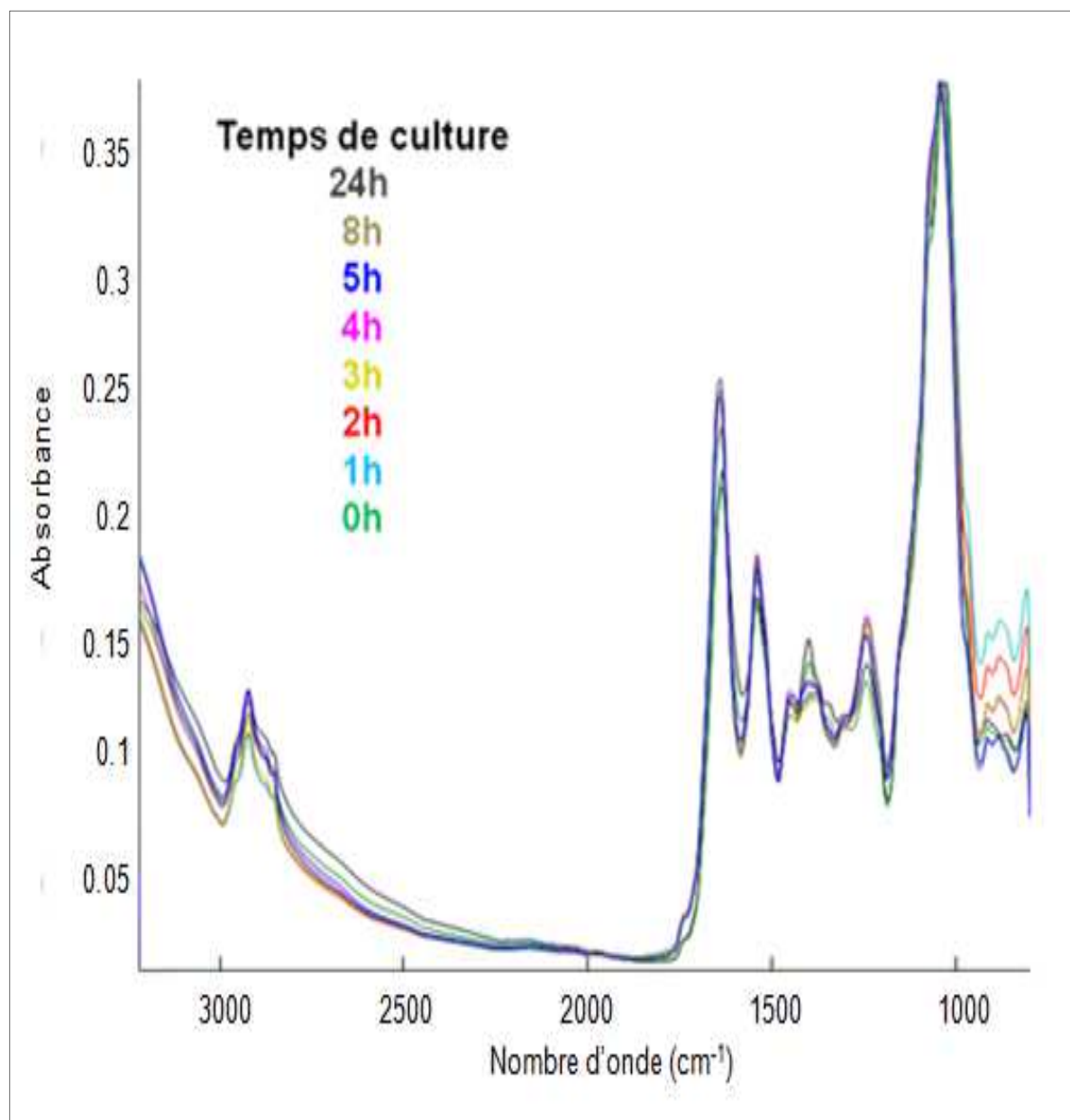


Figure n° 42 : Spectres IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL pendant la phase de dormance aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h. Région spectrale allant de 3000 à 900 cm⁻¹.

2-2-2- Variation de la composition protéique dans la région allant de 1700 à 1500 cm^{-1}

a- Analyse des spectres

Les analyses statistiques ont montré des différences significatives dans la région amide I et amide II. Les résultats de la décomposition des bandes sont représentés dans la **figure n ° 43** et les principales attributions des variations en fonction du temps sont regroupées dans le **tableau n ° 5**:

L'analyse des spectres a révélé que la bande amide I subit des variations importantes ainsi qu'un déplacement vers les plus basses fréquences d'environ 20 cm^{-1} . Quant à la bande amide II, elle présente une variance moins importante en fréquence mais plus importante en intensité.

- Les spectres dynamiques au niveau de l'amide I situés vers 1640 à 1650 cm^{-1} présentent un déplacement vers les plus hauts nombres d'ondes d'environ 5 à 20 cm^{-1} .
- Dans la région amide I, nous distinguons des différences dans l'absorption et non dans l'intensité.
- La même intensité est observée pour tous les temps d'incubation avec des fréquences différentes estimées à 1635 cm^{-1} pour les temps 0 et 24h et à 1655 cm^{-1} pour les temps 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 8h.
- Nous pouvons déduire que les cellules de *Candida albicans* ATCC 10231, absorbent dans trois bandes distinctes.
- Dans la bande amide II, les variations déplacent les pics liés aux vibrations de torsion du lien NH de 1540 à 1545 cm^{-1} .

Ces résultats mettent en évidence des fluctuations des spectres en fonction du temps d'incubation dans la région amide I et amide II qui reflètent une grande variation au niveau des structures protéiques membranaires des cellules dormantes.

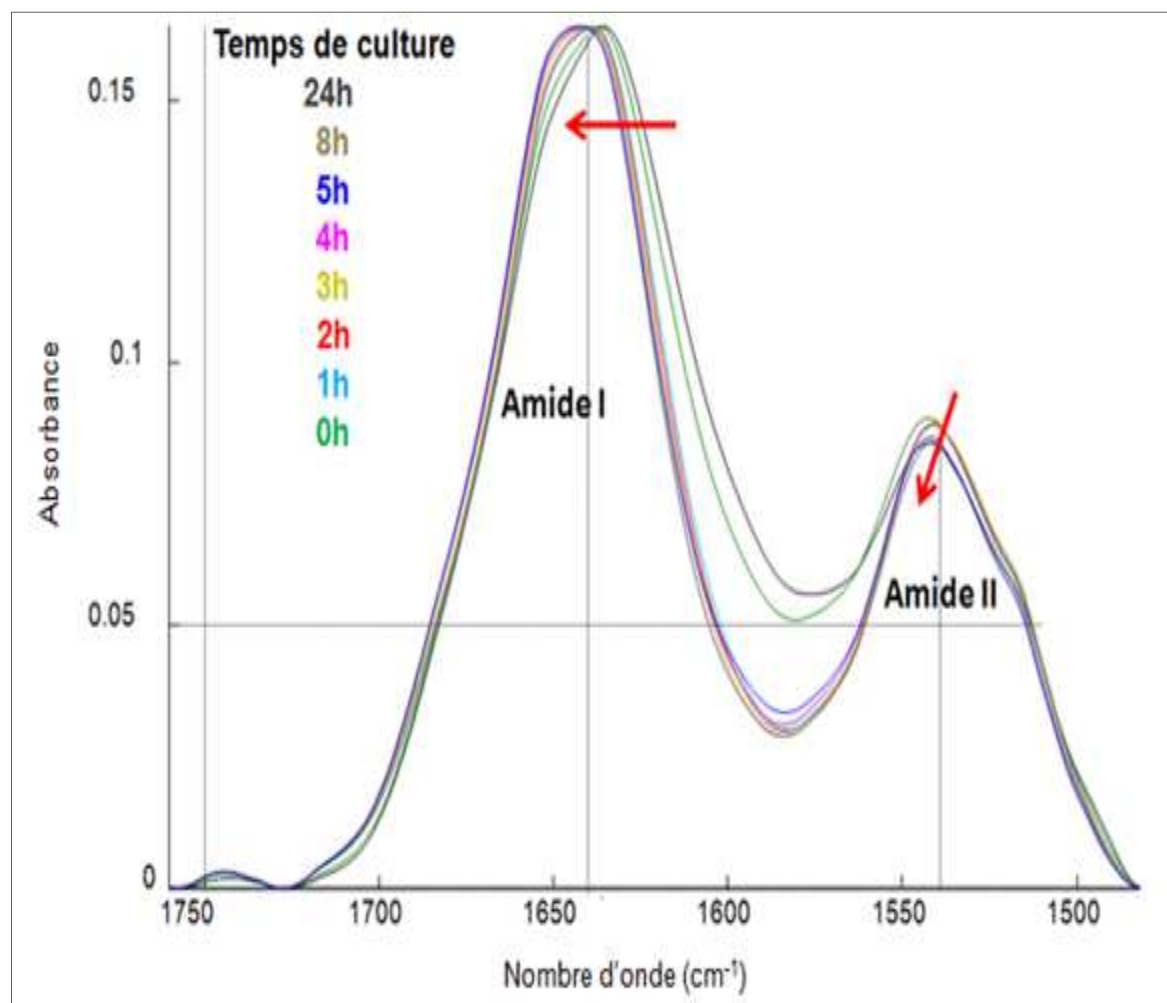


Figure n°43 : Spectres IRTF-RTA de la bande amide I (1700 à 1600 cm⁻¹) et de la bande Amide II (1600 à 1500 cm⁻¹) des cellules dormantes récupérées aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h. Indication des différences d'absorption (flèches rouges). Région spectrale allant de 1750 à 1460 cm⁻¹.

Tableau n° 5 : Attributions des principales bandes IRTF-RTA obtenues dans la phase de dormance des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4 µg/mL dans la bande amide I et amide II. (Les vibrations d'élongation sont notées ν et les vibrations de déformation sont notées δ).

Bande	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Vibrations moléculaires	Temps de latence avant la récupération des levures (h)
Amide I	1635	ν C=O couplée à δ NH des brins beta, Feuilletts antiparallèles (b-sheet)	0 et 24
	1645 -1655	80% ν C=O couplée à 20% δ NH Hélice alpha (alpha-helix)	1, 2, 3, 4, 5, et 8
Amide II	1540	60% ν NH, 30% δ CN, 10% ν C=C des chaines latérales	1 et 2
	1545	60% ν NH, 30% δ CN, 10% ν C=C des brins beta	0, 3, 4, 5, 8, et 24

b- Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward

Au vu de l'hétérogénéité liée aux changements de vibrations dans la bande amide I et amide II, nous avons soumis les résultats obtenus à une classification hiérarchique ascendante (HCA) dans la région allant de 1711 à 1485 cm^{-1} .

Le dendrogramme représenté dans la **figure n° 44** représente l'hétérogénéité du profil protéique des cellules dormantes en fonction du temps.

Nous remarquons que les cellules dormantes changent leur composition en protéines membranaires après avoir été exposées à 0,4 μg d'AmB/mL. Ce phénomène est observé avant la phase de réveil des cellules dormantes.

La classification obtenue présente trois types de populations cellulaires:

- La population des cellules dormantes (P1) : correspond aux cellules récupérées aux temps 0h et 24h de la phase de latence. Elle est caractérisée par les vibrations des brins bêta (β) dans les deux bandes amide I et amide II.
- La population des cellules dormantes (P2) : correspond aux cellules récupérées aux temps 3h, 4h, 5h, et 8h. Elle est caractérisée par des changements importants liés aux vibrations de l'hélice alpha (α) dans la région amide I et aux vibrations des brins bêta (β) dans la région amide II.
- La population des cellules dormantes (P3) : correspond aux cellules récupérées aux temps 1h et 2h et se caractérise par les vibrations des chaînes latérales dans les structures secondaires des protéines.

En plaçant le seuil de variance à un maximum de 115, nous distinguons deux classes de cellules rassemblant trois populations en deux groupes principaux:

- Groupe (G_1) : cellules récupérées aux temps 0h et 24h au début et à la fin de la phase de dormance.
- Groupe (G_2) : cellules récupérées au milieu de la phase de latence aux temps 1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 8h.

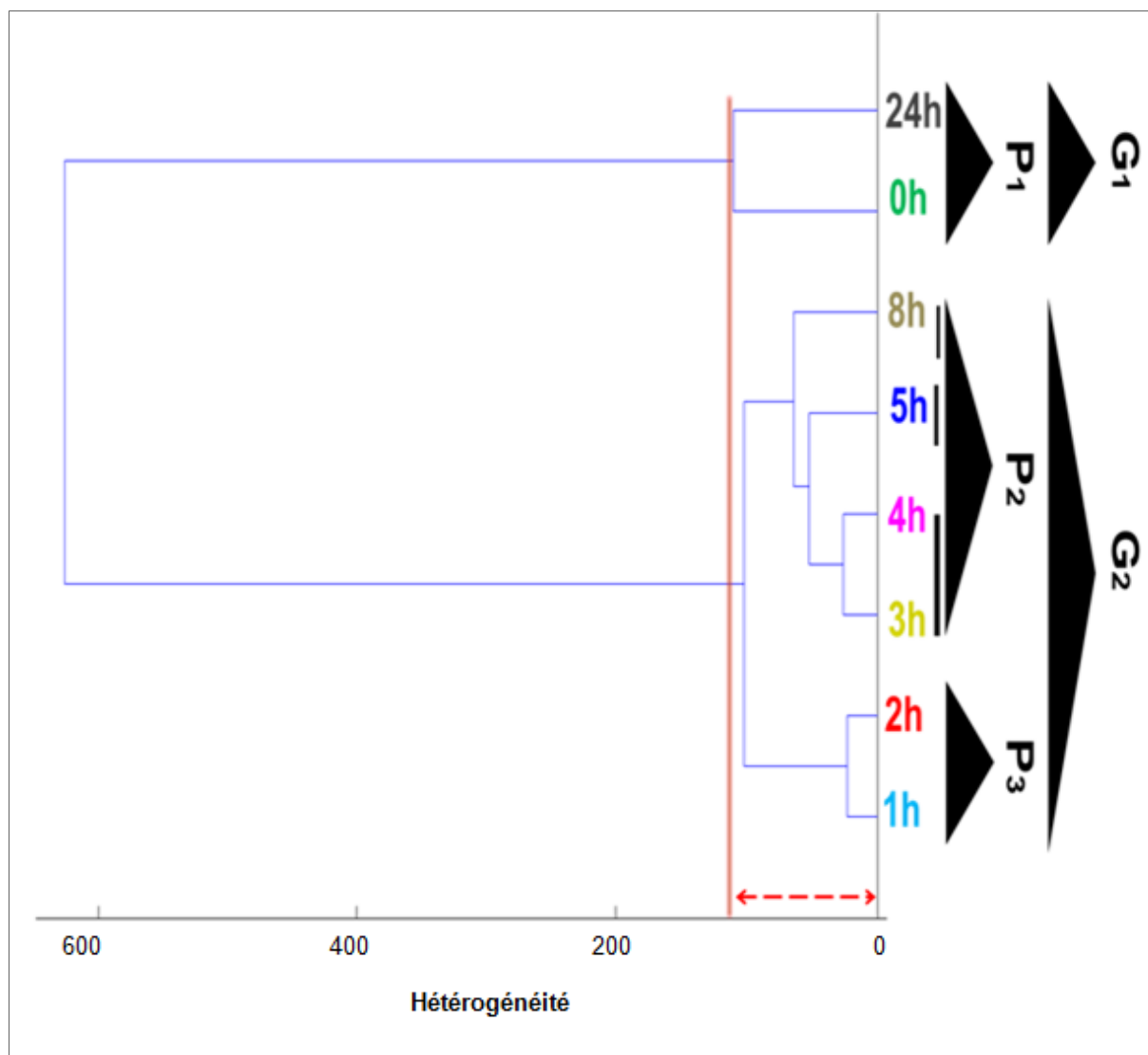


Figure n°44 : Classification hiérarchique ascendante par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA des cellules dormantes récupérées aux temps [0h et 24h (G_1 (P_1))] et aux temps [1h, 2h, 3h, 4h, 5h et 8h (G_2 (P_2 et P_3))]. Région des variations protéiques amide I et amide II allant de 1711 à 1485 cm^{-1} . La ligne rouge représente le seuil d'hétérogénéité à 115.

2-2-3- Variation de la composition lipidique dans la région allant de 1500 à 900 cm⁻¹**a- Analyse des spectres**

Dans cette région, trois bandes d'absorption principales sont retrouvées. Les résultats sont représentés dans la **figure n° 45** et leurs attributions dans le **tableau ° 6** :

Nous constatons que :

- La première et la deuxième bande correspondent aux vibrations liées aux acides gras, aux acides aminés et aux phospholipides. Nous distinguons 4 pics d'absorption à 1517, 1400, 1315 et 1240cm⁻¹. Les observations ainsi que les analyses statistiques n'ont montré aucune variation dans cette région, cependant, une variation importante d'intensité a été retrouvée entre les cellules récupérées aux temps 0h et 5h et celles récupérées aux temps 1h, 2h, 3h, 4h, 8h et 24h.

- La troisième bande est caractérisée par une restriction sous forme d'affinement de la bande liée aux vibrations des liaisons des phospholipides, des glycolipides et des stérols. Les analyses statistiques (P<0,001) ont rejeté l'hypothèse nulle. Des différences importantes sont retrouvées dans la zone allant de 1100 à 1000 cm⁻¹.

Aux temps 0h et 5h, nous observons des vibrations vers 1027 et 1075 cm⁻¹, reflétant la vibration d'élongation des groupements CH₂OH, PO²⁻ et R-O-P-O-R'. Alors qu'aux temps 1h, 2h, 3h, 4h, 8h et 24h, les vibrations se déplacent vers 1045 cm⁻¹ et correspondent aux vibrations d'élongation et de déformation des groupements C-O-C, P-O-C, C-OH couplées à la vibration de déformation du C-O et les vibrations d'élongation du CH₂OH couplée à CN.

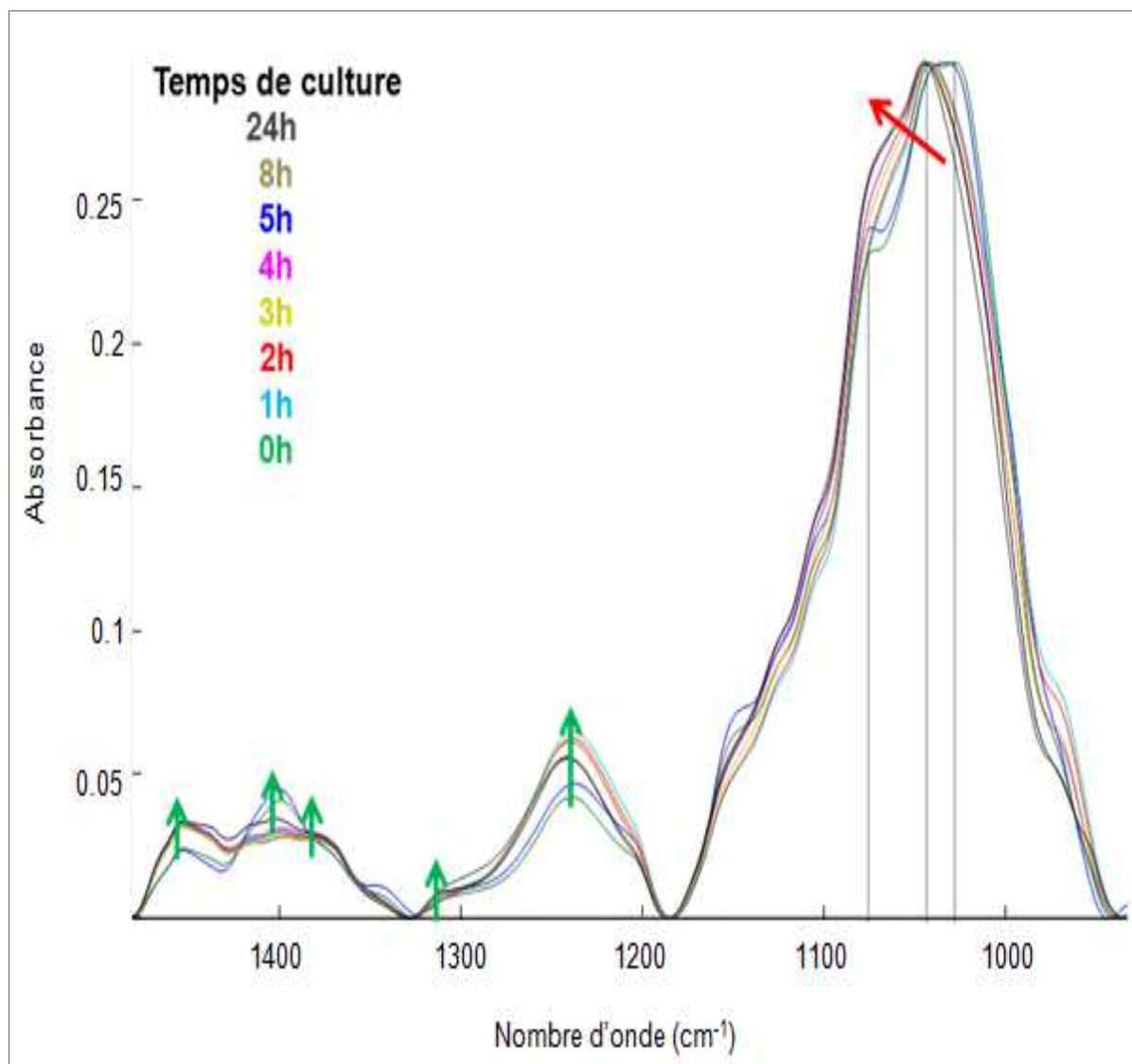


Figure n°45 : Spectres IRTF-RTA de la région des faibles nombres d'ondes de 1500 à 900 cm^{-1} des cellules dormantes récupérées aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h avec indication des différences d'absorption (flèches rouges)

Tableau n° 6 : Attributions des principales bandes IRTF-RTA des cellules dormantes de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL dans la région allant de 1500 à 900 cm⁻¹ (ν vibration d'élongation, δ vibration de déformation).

Région spectrale (cm ⁻¹)	Nombre d'ondes (cm ⁻¹)	Vibrations moléculaires	Temps de latence avant la récupération des levures (h)
1500-1300	1517	ν C=C	0,1, 2, 3, 4, 5, 8, et 24
	1400	νC=C, δ CH et δCOOH	
	1315	δCH, δCH ₂ , et δCH ₃	
1300-1200	1240	νPO ₂ ⁻ , ν P=O, νR-O-P-O-R	0,1, 2, 3, 4, 5, 8, et 24
1200-900	1045	νC-O-C, νP-O-C, νOH couplée à δC-O, νCH ₂ OH couplée à νCN	1, 2, 3, 4, 8, et 24
	1051-1075	νR-O-P-O-R', νPO ₂ ²⁻	
	1027	νCH ₂ OH	

b- Classification hiérarchique ascendante (HCA) par la méthode de Ward

Sur la base des analyses statistiques, nous avons pu montrer que les cellules récupérées à différents temps de la phase de dormance ont un profil lipidique variable dans la région allant de 1100 à 1000 cm^{-1} caractéristique des glycolipides et des stérols. Les cellules sont classées en fonction de ces variations par la méthode de Ward.

D'après les résultats représentés dans le dendrogramme de la **figure n° 46**, nous pouvons dire que :

Les cellules dormantes changent leur composition en glycolipides et en stérols membranaires en fonction du temps d'incubation.

En plaçant le seuil de variance à 760, nous distinguons deux principaux groupes de cellules:

- Groupe (G_1) : cellules incubées aux temps 0h et 5h.
- Groupe (G_2) : cellules incubées aux temps 1h, 2h, 3h, 4h, 8h et 24h.

En diminuant le seuil d'hétérogénéité à un minimum estimé à 310, nous remarquons des changements qui classent les cellules cette fois ci en trois types de populations cellulaires :

- La population des cellules dormantes (P1) : Cellules récupérées aux temps 0h et 5h de la phase de latence caractérisées par les vibrations des groupements -OH.
- La population des cellules dormantes (P2) : Cellules récupérées aux temps 1h et 2h de la dormance caractérisées par les vibrations des glycophospholipides.
- La population des cellules dormantes (P3) : Cellules récupérées aux temps 3h, 4h, 8h et 24h de la phase de dormance caractérisées par des changements importants liés aux vibrations des acides gras.

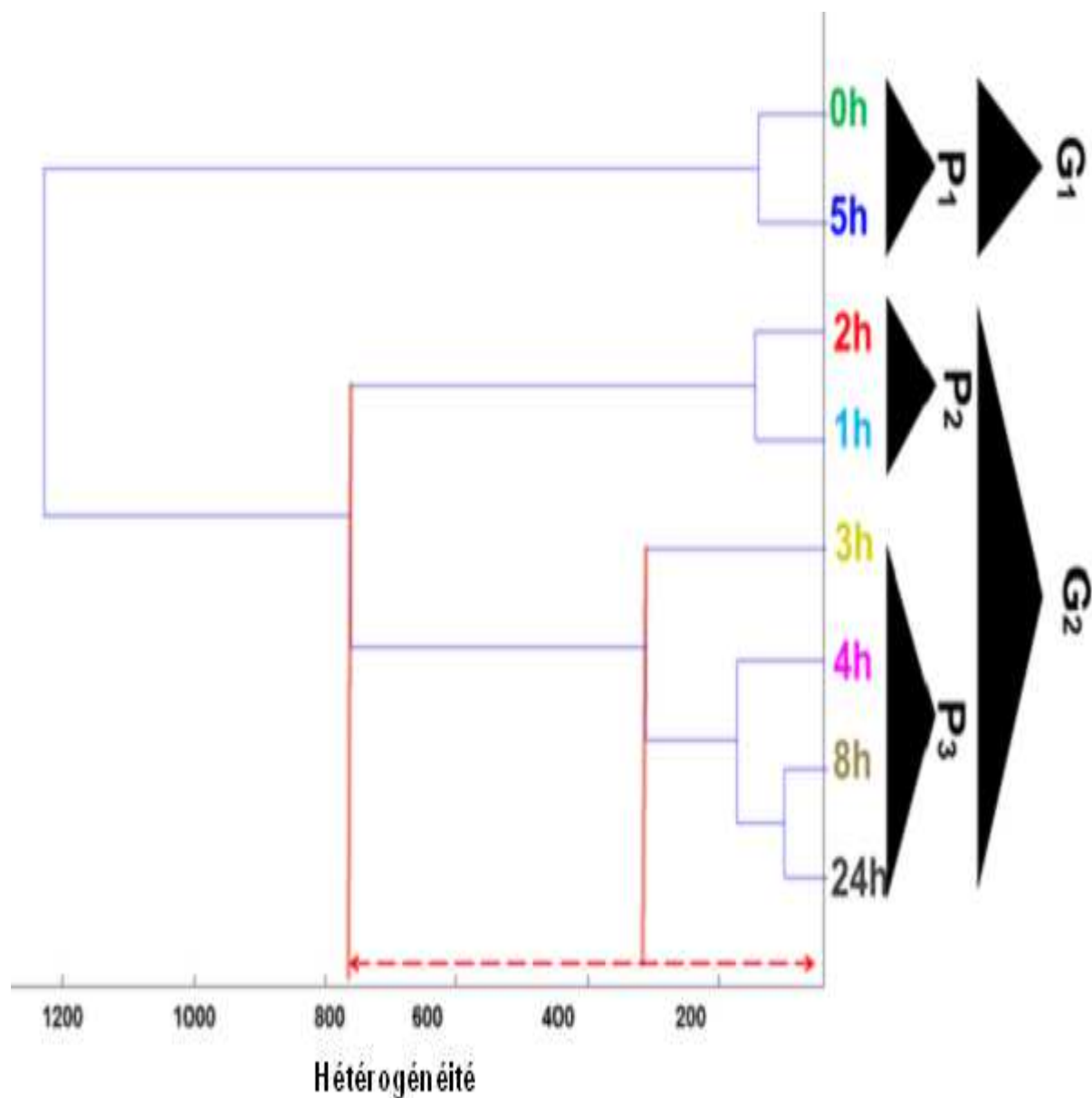


Figure n°46 : Classification hiérarchique ascendante par la méthode de Ward des spectres IRTF-RTA des cellules dormantes récupérées aux temps [0h et 5h (G₁ (P₁))] et aux temps [1h, 2h, 3h, 4h, 8h et 24h (G₂ (P₂ et P₃))] de la phase de dormance. Région spectrale allant de 1184 à 933 cm⁻¹. Les lignes rouges représentent les seuils d'hétérogénéité à 760 et 310 respectivement.

3- Discussion

Dans le chapitre précédent de notre étude, nous avons mis en évidence des modifications morphologiques importantes qui pourraient être induites par une transition de phases membranaires et une perturbation des microdomaines lipidiques. Afin de confirmer cette hypothèse, l'approche choisie consiste à analyser minutieusement les cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence et en présence de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier.

En l'absence d'amphotéricine B, l'analyse IRTF-RTA a révélé la présence des acides gras (3000-2500 cm⁻¹), des protéines (1700-1500 cm⁻¹), des phospholipides (1500-1200 cm⁻¹), des glycolipides et des stérois (1200-900cm⁻¹). Les différentes assignations obtenues sont répertoriées dans le **tableau n°7**. Cette composition est en accord avec celle de **Essendoubi et ses collaborateurs (2005)**. En effet, ces derniers après avoir réalisé un typage par spectroscopie IRTF-RTA de *Candida albicans* et *Candida glabrata* ont détecté la présence de phospholipides, de protéines en hélice α «alpha», de stérois et de glycolipides. Par ailleurs, les analyses statistiques de nos spectres IRTF-RTA, ont révélé une homogénéité dans la composition membranaire des levures de *Candida albicans* ATCC10231 tout au long de la croissance. Cette homogénéité de composition rapproche nos spectres à ceux obtenus en **2000** par **Quinteiro-Rodriguez** qui a réalisé un typage par spectroscopie IRTF-RTA pour les espèces de *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Candida parapsilosis* et a montré qu'au cours de la croissance dans des conditions normales, la composition membranaire reste stable, à l'exception de la région des polysaccharides (1200-900cm⁻¹).

Il ressort également de nos résultats que *Candida albicans* ATCC10231 garde la même morphologie tout au long de la culture cellulaire à savoir la forme levure contrairement aux travaux de **Essendoubi M. et coll., (2005)** qui ont mis en évidence que la variabilité localisée dans les régions des polysaccharides (1185- 950cm⁻¹), des protéines (1720-1480 cm⁻¹) et des acides gras (3000-2840 cm⁻¹) qui n'apparaît que lors d'une transition morphologique entre les formes hyphes et blastospores.

Tableau n° 7: Assignations des différentes bandes IRTF-RTA des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en l'absence d'amphotéricine B.

Région spectrale (cm ⁻¹)	
Phase de latence (2 heures) 0 < t < 3h	3000-2500 2900-2700
	vCH ₃ , vCH ₂ , vCH tertiaire Lipides, acides gras, et acides aminés
	2000-1500 1650
	Amide I : 80% vC=O couplée à 20% δNH Protéines en hélice α « alpha » Protéines en pelote statistique.
	1550
	Amide II : 60% vNH, 30% δCN 10% vC=C Peptide et protéine en feuillets β « bêta ». Random, Tournant, chaines latérales des résidus de tyrosine, et phénylalanine
Phase exponentielle (8 heures) 3 < t < 10h	1500-900 1500-1200
	δCOH, δCOOH, δCH, δCH ₃ , vCOOH, δCH ₂ , vCN couplée à δNH, , vC=O, vC=C, VP=O, vPO ²⁻ , vR-O-P-O-R, Amide III : vCN couplée à δNH Phospholipides, phosphodiester, Acides gras et acides aminés
	1200-900
	vC-O-C, vC-OH couplée à δC-O, vCH ₂ OH couplée à vCN Stérols, glycolipides

En présence d'amphotéricine B, l'analyse spectrale a mis en évidence une composition membranaire similaire à celle des cellules témoins avec des modifications dans le profil d'absorption. Les principaux résultats sont regroupés dans le **tableau n° 8**.

Les analyses statistiques ($P < 0,001$) que nous avons réalisés sur les cellules prélevées dans la phase de dormance aux temps 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 8h et 24h ont mis en évidence des variations membranaires importantes au début et à la fin de la phase de dormance. Ce qui peut être expliqué par les changements morphologiques qu'adoptent les levures de *Candida albicans* pour échapper à l'effet toxique de l'amphotéricine B.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de **Mpona-Minga et ses collaborateurs (1988)** qui ont montré que ces modifications sont dues à l'exposition des cellules à des concentrations d'amphotéricine B comprises entre 0,2 et 1 μ g/mL. De plus, l'amphotéricine B, par son interaction membranaire, induit des variations importantes dans la composition en protéines, en acides gras et en stéroïdes (**Adt I. et coll., 2006**).

Nous pouvons donc supposer qu'en présence d'un stress tel que la présence d'un antifongique, les levures utilisent les composants membranaires comme éléments importants à leur adaptation.

Tableau n° 8 : Assignations des différentes bandes IRTF-RTA, des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4 µg/mL d'amphotéricine B.

Région spectrale (cm ⁻¹)		
Phase de latence (24 heures) 0 < t < 5h (L1-L6)	3000-2500 2900-2700	
	vCH ₃ , vCH ₂ , vCH tertiaire	
	1700-1500 Amide I 1630 1640 1650	
	vC=O couplée à δNH Peptide et protéine en feuillets β « bêta ».	80% vC=O couplée à 20% δNH Protéines en hélice α « alpha »
	Amide II 1520 1530	
	Amide II : 60% vNH, 30% δCN 10% vC=C Peptide et protéine en feuillets β « bêta ».	
	1500-900 Amide III	
	1380 1370	
	Amide III : vCN couplée à δNH	
	Acides aminés 1310 1305 1400 1405	
Phase exponentielle (4 heures) 25 < t < 27h (E8-E10)	δCH, δCH ₂ , et δCH ₃ , vC=C, δ CH et δCOOH	
	Acides gras 1240 1245	
	VP=O, vPO ²⁻ , vR-O-P-O-R Phospholipides, phosphodiesters	
	1044	
vC-O-C, vC-OH couplée à δC-O, vCH ₂ OH couplée à vCN Glucosides, alcoolides		

Des changements importants dans la composition de la membrane plasmique durant la phase de dormance ont été également observés (**tableau n°9**). Ces derniers se traduisent par l'apparition de protéines spécifiques en conformation secondaire de type «béta». Cette structure est rencontrée essentiellement dans les porines (**Pagès J. M., 2004**), ce qui laisse suggérer que les cellules doivent avoir des conformations capables de rééquilibrer le milieu osmotique et de reconstituer la structure membranaire qui nécessite une décompression au niveau énergétique pour enfin reprendre une croissance normale.

Par ailleurs, la séparation des phases lipidiques explique de manière claire l'élasticité de la membrane avant et après la levée de la dormance cellulaire. En effet, des variations lipidiques sont observées dans des régions spécifiques à savoir, 1240 cm^{-1} pour les phospholipides, 1400 cm^{-1} et 1380 cm^{-1} pour les acides gras saturés et insaturés. Ceci confirme la séparation phasique subite par les levures lors du réveil.

Les résultats que nous avons obtenus ont montré également que les lipides étudiés vibrent dans deux régions spectrales et peuvent adopter deux phases lipidiques, dont la transition dépend d'une augmentation des mouvements et d'une décompression énergétique de la bicouche lipidique. Ce résultat est en accord avec les travaux de **Casai H. L. et Mantsch H. H. (1984)**.

La fréquence des mouvements de vibrations des phospholipides observée lors de nos analyses spectrales dépend probablement de la conformation et de la composition des liens chimiques. Ainsi, les mouvements d'élongation et de déformation des liaisons chimiques ont une fréquence d'absorption décalée du temps d'incubation. Le spectre infrarouge tel que nous l'avons analysé donne une caractérisation spécifique aux phospholipides en fonction de l'état dans lequel se trouve la membrane plasmique. Ces observations rejoignent ceux de **Moore D. J. et coll., (1996)** qui ont mené leurs expériences sur des phospholipides isolés (liposomes). De plus, selon **Lee D. C. et Chapman D. (1986)**, les fréquences d'absorption ou les nombres d'ondes de certains mouvements d'élongation observés à la surface cellulaire, peuvent être expliqués par l'influence de la température et/ou de la transition de phase.

Les variations de vibration des glycolipides et des stérols membranaires résultent de la vibration d'élongation des groupements CH_2OH , C-O-C , P-O-C et C-C vers 1027 et 1075 cm^{-1} . Aux temps 1h, 2h, 3h, 4h, 8h et 24h, les vibrations se déplacent

vers 1045 cm^{-1} , reflétant les vibrations d'élongation des groupements C-OH couplée à la vibration de déformation du groupement C-O et la vibration d'élongation du groupement CH_2OH couplée à la vibration d'élongation du groupement CN. Sur la base des travaux de **Nasir M. N. et coll., (2010)**, les stérols membranaires ont un rôle protecteur contre l'oxydation des lipides membranaires. En effet, ils ont montré que le cycle B des stérols contenant les doubles liaisons doit être ajusté de manière optimale avec les chaînes d'acide gras des phospholipides pour inhiber la peroxydation lipidique.

Tableau n° 9 : Assignations des différentes bandes IRTF-RTA des cellules dormantes.

Régions spectrales (cm ⁻¹)	Phase de latence « dormance » (24 heures) 0 < t < 24h							
	Temps de latence avant la récupération des levures (h)							
	0	1	2	3	4	5	8	24
3000-2500 2900-2700	vCH ₃ , vCH ₂ , vCH tertiaire Lipides, acides gras, et acides aminés							
1700-1500 Amide I								
1635	vC=O couplée à δNH Peptide et protéine en feuillets β « bêta ».					vC=O couplée à δNH Peptide et protéine en feuillets β « bêta ».		
1645, 1655	80% vC=O couplée à 20%δNH Protéines en hélice α « alpha »							
Amide II	60% vNH, 30% δCN 10% vC=C chaines latérales des résidus (tyrosine, phénylalanine)							
1540								
1545	60% vNH, 30% δCN 10% vC=C Brins β « bêta ».			60% vNH, 30% δCN 10% vC=C Brins β « bêta ».				
1500-1300 1517, 1400, 1315	δCH, δCH ₂ , et δCH ₃ , vC=C, δ CH et δCOOH Acides gras							
1300-1200 1240	VP=O, vPO ²⁻ , vR-O-P-O-R Phospholipides, phosphodiester							
1200-900 1027, 1051, 1075, 1045	vCH ₂ OH, vC-C, vPO ₃ ²⁻ , vC-O-P vC-O-C, vC-OH couplée à δC-O, vCH ₂ OH couplée à vCN Stérois, glycolipides, lipopolysaccharides							

4-Conclusion

La caractérisation biochimique des surfaces cellulaires a révélé des variations importantes chez *Candida albicans* ATCC 10231 incubées en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. Les variations observées et détectées par des analyses statistiques multivariées tout au long de la croissance et au cours de la phase de dormance nous ont permis de dresser un profil évolutif des différents composants membranaires et ce, pour les cellules incubées en l'absence et en présence d'amphotéricine B (**Figure n° 47**).

En l'absence d'amphotéricine B :

L'analyse IRTF-RTA montre une homogénéité biochimique dans la composition membranaire des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 au cours de la croissance (de la phase de latence $0 < t < 3h$ à la phase exponentielle $3 < t < 10h$). L'analyse biochimique a mis en évidence la présence des phospholipides, des acides gras, des lipoprotéines, des stérols et des glycophospholipides membranaires.

L'analyse statistique ($P > 0.001$) n'a révélé aucune variation spectrale au cours de la croissance des cellules de *candida albicans* ATCC 10231 en l'absence d'amphotéricine B.

En présence d'amphotéricine B :

Les cellules incubées en présence d'amphotéricine B présentent des variations importantes observées dans les spectres IRTF-RTA. Ces variations sont confirmées par l'analyse statistique multivariée, par la classification hiérarchique et par l'analyse en composantes principales.

Sur la base des analyses statistiques et la classification hiérarchique, deux profils évolutifs sont mis en évidence :

-Profil protéique : Au début de la phase de latence qui correspond à la phase de dormance, les surfaces cellulaires sont dominées par des protéines membranaires en structure «alpha» et «béta». Au milieu de la phase de dormance les cellules sont dominées par les protéines de structure en hélice α « alpha » et avant la levée de la dormance, elles sont dominées par des protéines en feuillet β « béta ».

-Profil lipidique : Le changement dans la composition en phospholipides, en stérols, et en glycolipides est observé au début et à la fin de la phase de dormance.

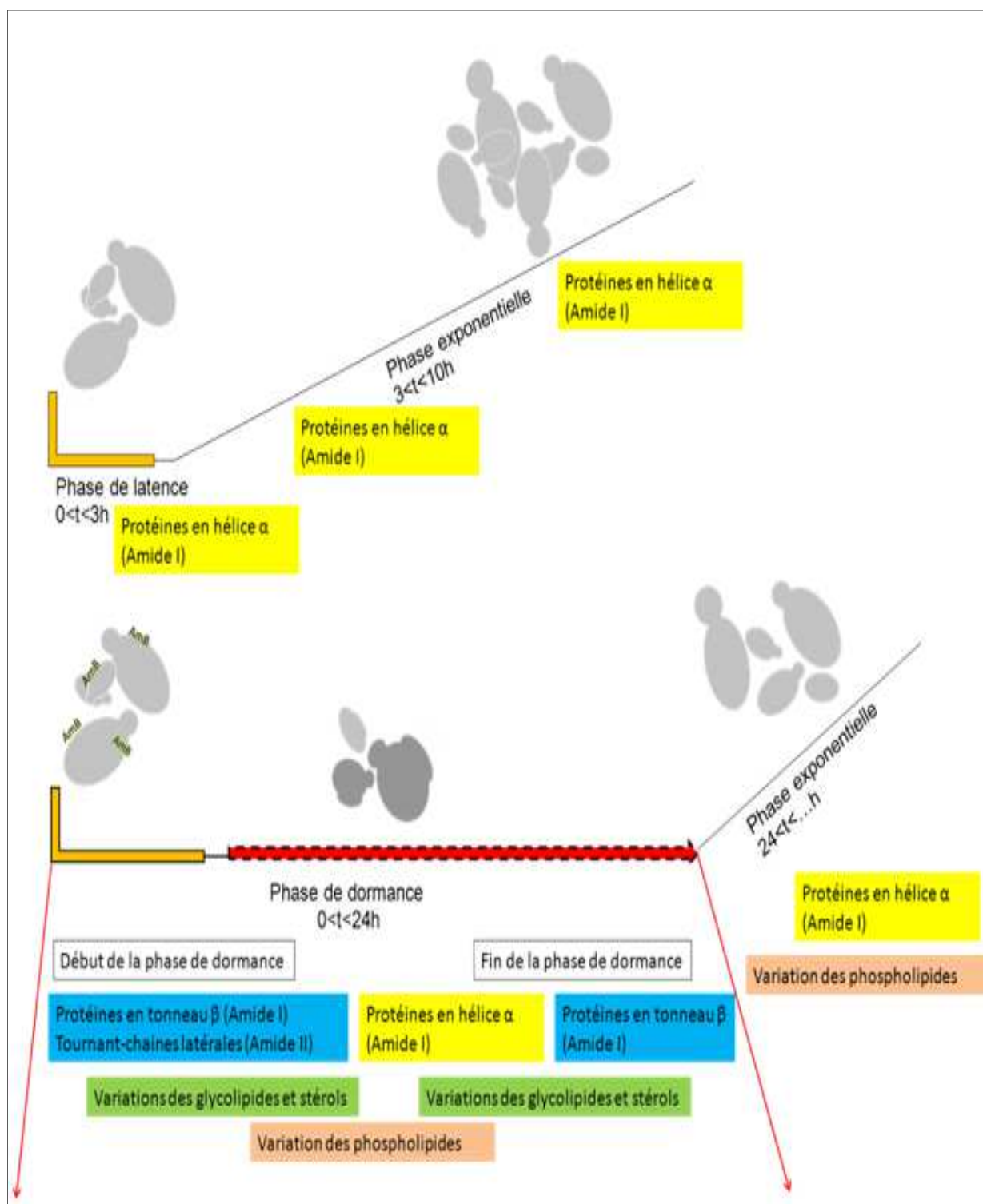


Figure n° 47 : Représentation schématique du profil évolutif des différents composants membranaires détectés chez *Candida albicans* ATCC 10231 en l'absence et en présence d'amphotéricine B à $0,4 \mu g/mL$.

3^{ème} chapitre : Simulation à base de système multi-agents (SMA) de la dynamique membranaire modélisée en l'absence et en présence d'amphotéricine B

Un grand défi de la biologie, que la physique devrait aider à relever, est d'établir les relations entre la subtile organisation dynamique des membranes et les fonctions biologiques qui y sont accomplies. Ici il s'agit de proposer une modélisation réaliste capable d'appréhender les caractéristiques pertinentes de la membrane. Sur la base des données extraites de la littérature et des résultats que nous avons obtenus dans le premier et le deuxième chapitre de notre travail, nous avons construit un modèle mathématique dont le principal objectif est de simuler la dynamique membranaire en l'absence et en présence d'amphotéricine B. Véritable barrière, ce manteau cellulaire qu'est la membrane, régule les échanges entre les milieux intra- et extracellulaires grâce à des systèmes moléculaires spécifiques et chaque modification apportée à cette charpente dynamique entraîne des altérations morphologiques très importantes qui peuvent nous renseigner sur la stratégie adoptée par chaque cellule lors de son exposition à un effet stressant. Le déséquilibre ionique ainsi que l'interaction de l'amphotéricine B au sein de la membrane plasmique augmente les forces de Van Der Waals, les rapports phospholipides/amphotéricine B et stérol/amphotéricine B, ce qui peut induire une modification de la dynamique latérale de la membrane. Ce phénomène appelé transition de phases membranaires est décrit dans le nouveau modèle des radeaux lipidiques par **Simons et Ikonen en 1997**.

Dans le cas d'un déséquilibre important, cette transition peut conduire à une modification de la perméabilité membranaire et pourrait être une des causes de la mort cellulaire (**Hays L. M. et coll., 2001**). Le changement de la fluidité membranaire peut également conduire à l'apparition de phase hexagonale correspondant un état non lamellaire des phospholipides. Cette modification d'organisation structurale a également été décrite comme pouvant conduire à une perte de l'intégrité de la membrane plasmique provoquant ainsi une déformation cellulaire [(**Leslie S. B. et coll., 1995**) ; (**Malinsky J. et coll., 2010**)].

Au cours de la réparation membranaire dans le cas des effets sub-létaux, les phospholipides subissent une transition de phase dans le sens inverse de celle provoquée lors d'un déséquilibre.

Le modèle que nous avons utilisé sous l'approche Multi-agents a pour objectif de modéliser les différentes interactions membranaires.

En effet, modifier l'intégrité de cette organisation par l'exposition de l'édifice membranaire à 0,4µg/mL d'amphotéricine B passe par la modification des interactions entre les différents constituants des domaines en phase liquide-ordonnée (Lo). L'amphotéricine B interagit avec le principal constituant de ces régions ce qui influe sur cette architecture complexe.

Ainsi pour évaluer le rôle de cette organisation dans le mode d'action de l'amphotéricine B, nous avons modélisé deux phénomènes différents :

- La formation des phases liquides-ordonnées (Lo)
- La formation des phases liquides-ordonnées associées à l'amphotéricine B (L_{AMB})

Les variations paramétriques que nous avons utilisées obéissent à des propriétés de diagrammes de phases modèles.

1- Formation et stabilité des domaines en phase (Lo)

Dans la première étape, nous avons créé un modèle où les éléments essentiels s'organisent sans aucun stress. Nous avons utilisé la composition correspondant à des conditions de formation de domaines en phase (Lo).

Les glycérophospholipides, les sphingophospholipides et l'ergostérol sont utilisés à un rapport de (1/1/20%). La taille et le temps nécessaires à la formation de la phase ordonnée (Lo) sont fixés selon des modèles de références.

Nous avons pris en compte une température du système de 31,1°C et une concentration d'ergostérol estimée à 20%. Nous avons fixé un pas de temps à 0,27 millisecondes.

Les résultats de la simulation sont représentés et visualisés dans la **figure n°48**.

Nous observons que :

- Pour les membranes simulées à une température de 31,1°C et des concentrations d'ergostérol de 20%, la séparation de phases se fait de manière aléatoire mais reste très stable. Le coefficient de variation de phase est estimé à 0.
- La phase liquide ordonnée (Lo) diffuse progressivement en se colorant en rouge en fonction de l'augmentation des degrés d'interactions au sein de la bicouche lipidique.
- Le nombre de radeaux ne change pas au cours de la simulation, mais la taille varie.

Nous remarquons que la taille moyenne des radeaux est de 20,23 nm, 42,5 nm et 104,567 nm, estimées respectivement dans des pas de temps de 18,443 - 55,321 et 92,2

-L'évolution de la formation phasique suivie à 5, 15 et 25 ms est linéaire et la taille de la phase liquide-ordonnée (Lo) augmente de façon stable.

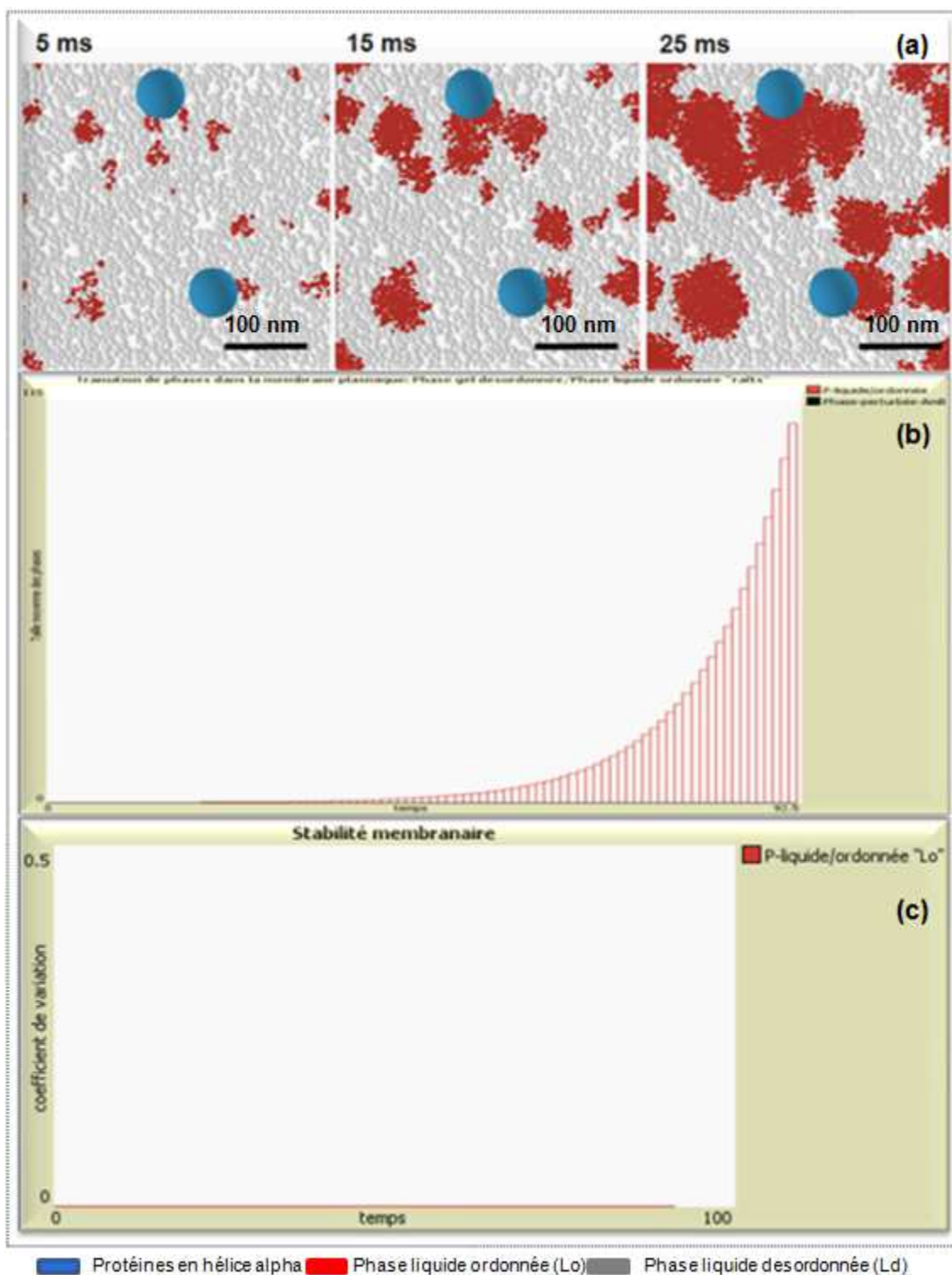


Figure n° 48 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en l'absence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/Sphingo/ergostérol (1/1/20%) (barre 100 nm).

(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)

(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo

(c)- Stabilité des phases ordonnées

2- Formation de la phase Lo en présence d'amphotéricine B

La suite de notre approche nous a conduit à exposer le modèle membranaire à des concentrations progressives d'amphotéricine B et ce dans le but d'évaluer la concentration minimale capable d'induire une agrégation sans aucune interaction intermoléculaire de l'antifongique avec les autres constituants. Les résultats les plus significatifs sont obtenus pour l'antifongique utilisé à 20%. Ce taux est équivalent à la concentration en ergostérol que nous avons fixée dans notre modèle à 20%.

2-1- Effet de l'amphotéricine B ajoutée à 20%

Pour cette modélisation nous avons utilisé les glycérophospholipides, les sphingophospholipides, l'ergostérol et l'amphotéricine B à un rapport de (1/1/20%/20%).

Les résultats représentés dans la **figure n° 49** montrent que :

- Aucune perturbation significative n'est observée au cours de la formation des phases. Le coefficient de variation est estimé à 0 et la stabilité membranaire ne change pas (effet d'agrégation).
- Apparition de plusieurs domaines en rouge foncé et de tailles différentes (un ou deux plus grands et plusieurs plus petits)
- La taille des phases liquides-ordonnées (Lo) varie légèrement avec une augmentation estimée à 18,43 nm par rapport aux radeaux mesurés dans les membranes témoins.
- La taille moyenne des radeaux augmente jusqu'à 123,959 nm au bout de 25 ms.
- Les membranes visualisées au temps 5 et 15 ms ne montrent aucun changement, contrairement à celles visualisées au bout de 25 ms qui montrent l'apparition d'une séparation de phase induite par l'effet d'agrégation de l'amphotéricine B.
- La coexistence des deux phases liquides (Lo et L_{AmB}) est observée au bout de 92,2 pas de temps.

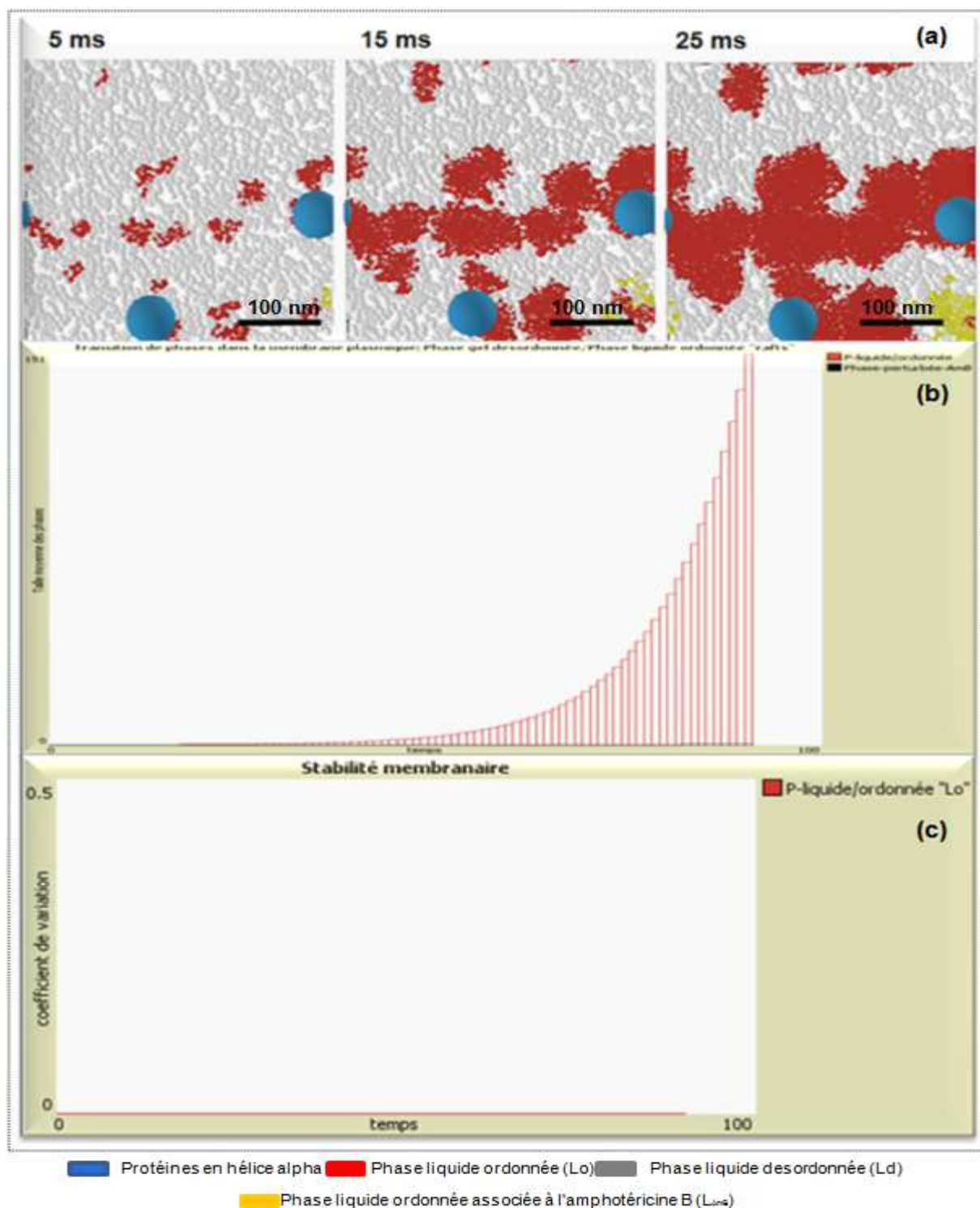


Figure n° 49 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%) (barre 100 nm).
(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)
(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo
(c)- Stabilité des phases ordonnées

2-2- Effet de la séquestration de l'ergostérol par l'amphotéricine B

Nous avons cité précédemment que le changement de la température et/ou de la composition en ergostérol induit à des répercussions sur le changement de la morphologie de phase : soit à la non miscibilité, soit à la miscibilité des phases liquides. Le même résultat est réalisé en changeant la composition de l'ergostérol par une séquestration à l'amphotéricine B.

La membrane est composée de glycérophospholipides, sphingophospholipides, ergostérol et amphotéricine B à un rapport de (1/1/20%/20%).

Les deux phases liquides ne peuvent se former que si une constante de liaison à l'ergostérol et aux phospholipides est appliquée.

L'affinité de l'amphotéricine B pour l'ergostérol est estimée à 1.00, alors que celle des phospholipides est estimée à 0.2, ce qui suggère que l'affinité pour l'ergostérol est 5 fois supérieure à celles des phospholipides.

Le pouvoir de séquestration est fixé à 80% du nombre globale d'ergostérol.

Les résultats représentés dans la **figure n° 50** montrent que :

- La membrane est déstabilisée dès le début de la simulation. Le coefficient de variation est estimé à un maximum de 0.6 à environ 60 pas de temps.
- L'apparition des deux phases (L_0 et L_{AmB}) est dépendante de la composition membranaire.
- La quantité d'ergostérol diminue, ce qui entraîne une diminution de la taille de la phase (L_0).
- L'effet séquestrant de l'amphotéricine B est corrélé à la formation des phases (L_{AmB}).
- Au bout de 25 ms la taille atteinte de la phase (L_{AmB}) est estimée à 8,25 nm.
- La taille de la phase (L_0) est estimée à 11,46 nm. Elle est presque similaire à celle des phases (L_{AmB}) au bout de 92,2 pas de temps.
- La taille des phases liquides-ordonnées (L_0) est réduite. Nous distinguons de petits radeaux avec un nombre important.
- L'évolution au cours du temps est marquée par une augmentation dans la formation de la phase (L_{AmB}) et une diminution de la formation de la phase (L_0).

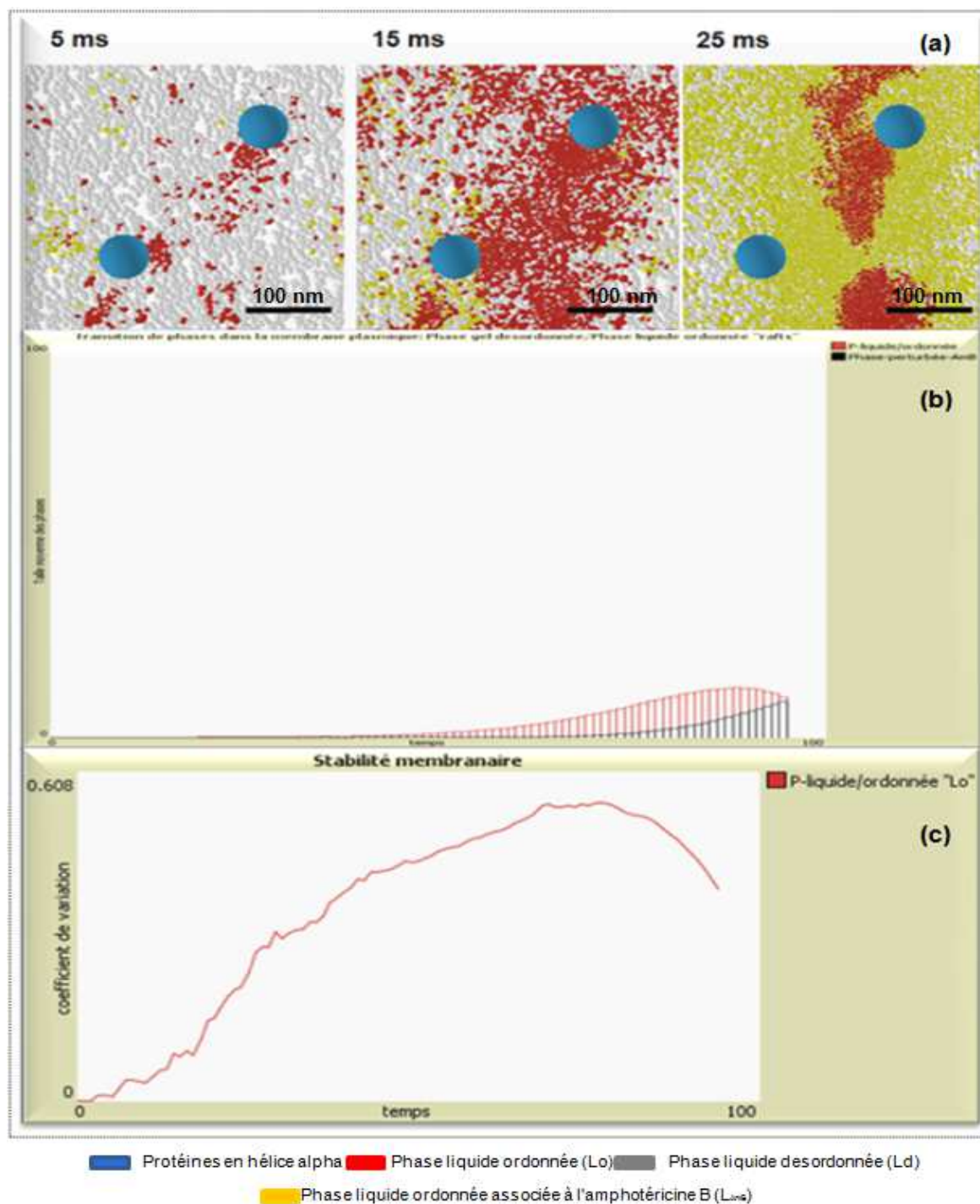


Figure n°50 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphing/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%) constante de liaison AmB/ergostérol =1.00, constante AmB/Phospholipides= 0.2 (barre 100 nm). (a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D) (b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo (c)- Stabilité des phases ordonnées

2-3- Reformation de la phase (Lo) en présence d'amphotéricine B

Les résultats de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier IRTF-RTA ont mis en évidence un phénomène de décompression énergétique. Ce dernier se traduit par l'action indirecte des protéines en structure secondaire « bêta » (porines), qui dégonflent la cellule et induisent une réorganisation lipidique. La force de décompression est appliquée à la membrane à un potentiel de 100%, ce qui est égale à la somme des forces exercées par l'amphotéricine B.

Les résultats représentés dans la **figure n° 51** montrent que :

- La coexistence d'une seule phase lipidique, qui est la phase liquide ordonnée, s'explique par l'application d'un potentiel de décompression qui déstabilise les différentes liaisons engendrées par l'amphotéricine B.
- L'évolution de la formation phasique est marquée par une augmentation dans la formation de la phase liquide-ordonnée (Lo).
- Au bout de 25 ms (92,2 pas de temps), la taille de la phase (Lo) atteint un maximum de 48,91 nm.
- La membrane est déstabilisée au début de la simulation, puis stabilisée par l'effet indirect de la décompression.
- La déstabilisation de la membrane diminue en fonction du temps de la simulation. Le facteur de déstabilisation est estimé à 9,57 à 2 pas de temps et à 1,75 au bout de 92,2 pas de temps.

Nous pouvons conclure que lorsque la tension latérale de la membrane est petite et le potentiel de décompression appliqué au maximum, la membrane reforme les phases (Lo) mais à des tailles plus petites.

La force de décompression énergétique représente une force motrice pour la reconstitution membranaire. Par conséquent, elle constitue une contribution directe au déclenchement de la réparation membranaire et à la reprise des fonctions vitales nécessaires à la survie cellulaire.

-Le rééquilibre engendré par le potentiel de décompression passe par une reformation des domaines et/ou une déstabilisation des différentes liaisons AmB/phospholipides/ergostérol.

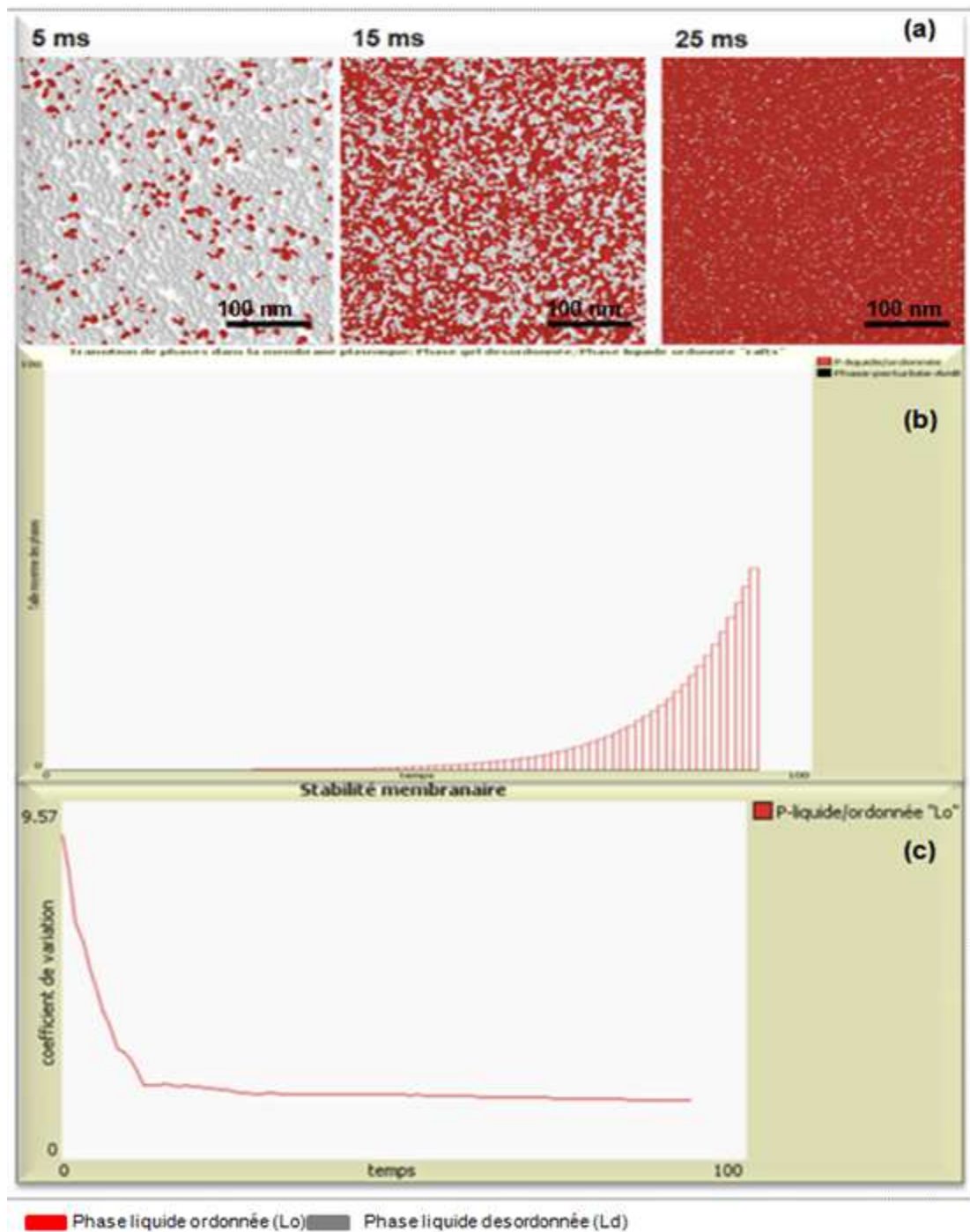


Figure n° 51 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%). Constante de liaison AmB/ergostérol = 1.00, constante AmB/phospholipides = 0.2, et le potentiel de décompression = 100% (barre 100 nm).

(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)

(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo

(c)- Stabilité des phases ordonnées

3- Stratégie de ciblage et formation des phases (L_{AmB})

Si l'on admet que l'apparition des phases (Lo) conditionne la forme stable et l'apparition des phases (L_{AmB}) conditionne la forme instable de la cellule, nous pouvons déduire que tous les processus cellulaires induit par l'amphotéricine B sont liés directement ou indirectement à l'état dynamique de la membrane. Chaque nouvelle stratégie thérapeutique élaborée doit prendre en considération ce concept.

Dans cette optique, nous avons dressé une stratégie de ciblage moléculaire dont le but principal est de stabiliser les phases (L_{AmB}) et d'augmenter par conséquent, la liaison de l'amphotéricine B avec les composants membranaires.

La stratégie consiste à augmenter l'affinité de l'amphotéricine B pour les phospholipides, ceci a pour conséquence de stabiliser les phases L_{AmB} , malgré la réorganisation induite par la décompression membranaire. La force de décompression est appliquée à la membrane à un potentiel de 100% ce qui est égale à la somme des forces exercées par l'amphotéricine B. L'affinité pour l'ergostérol est fixée à 1,00, et l'affinité AmB/phospholipides est augmentée à 0,5 et 0,75.

La visualisation de la formation progressive des domaines est représentée dans la **figure n°52** et la **figure n°53**.

Nous observons que pour une constante de 0,5 ou 0,75, les résultats sont presque similaires:

- La phase liquide-ordonnée (Lo) diffuse progressivement en se colorant en rouge en fonction du degré d'interaction au sein de la membrane.
- Le nombre de domaines de la phase (Lo) ne change pas au cours de la simulation, cependant, la taille diminue fortement.
- L'augmentation de l'affinité AmB/phospholipide à 0,5 a permis de stabiliser, de reformer les phases (L_{AmB}) et d'augmenter le pouvoir déstabilisant de l'amphotéricine B.
- La déstabilisation passe de 11 à 1,56, alors qu'en l'absence de cette affinité la déstabilisation est estimée à 9,745.
- De petits domaines de phase (Lo) se forment avec une taille de 10,26 en 92,2 pas de temps.
- Lorsque nous augmentons l'affinité pour les phospholipides à 0,75, nous remarquons le même pouvoir déstabilisant mais avec une diminution significative de la formation des phases (Lo). Leur taille est estimée à 4,74, avec un même pouvoir

déstabilisant que pour l'affinité augmentée à 0,5. Ceci laisse penser qu'en fonction de ce modèle l'augmentation de l'affinité pour les phospholipides empêche fortement la formation des phases Lo et augmente, par conséquent, l'effet déstabilisant de l'amphotéricine B.

- L'évolution de la formation phasique suivie aux temps 5, 15, et 25 ms est linéaire et la taille de la phase liquide-ordonnée (Lo) augmente de façon stable en fonction du temps.

- Ces résultats suggèrent que pour une affinité du complexe AmB/ergostérol 2 fois supérieure à celle du complexe AmB/phospholipides, la formation de la phase (L_{AmB}) est augmentée ainsi que la force d'interaction AmB/membrane.

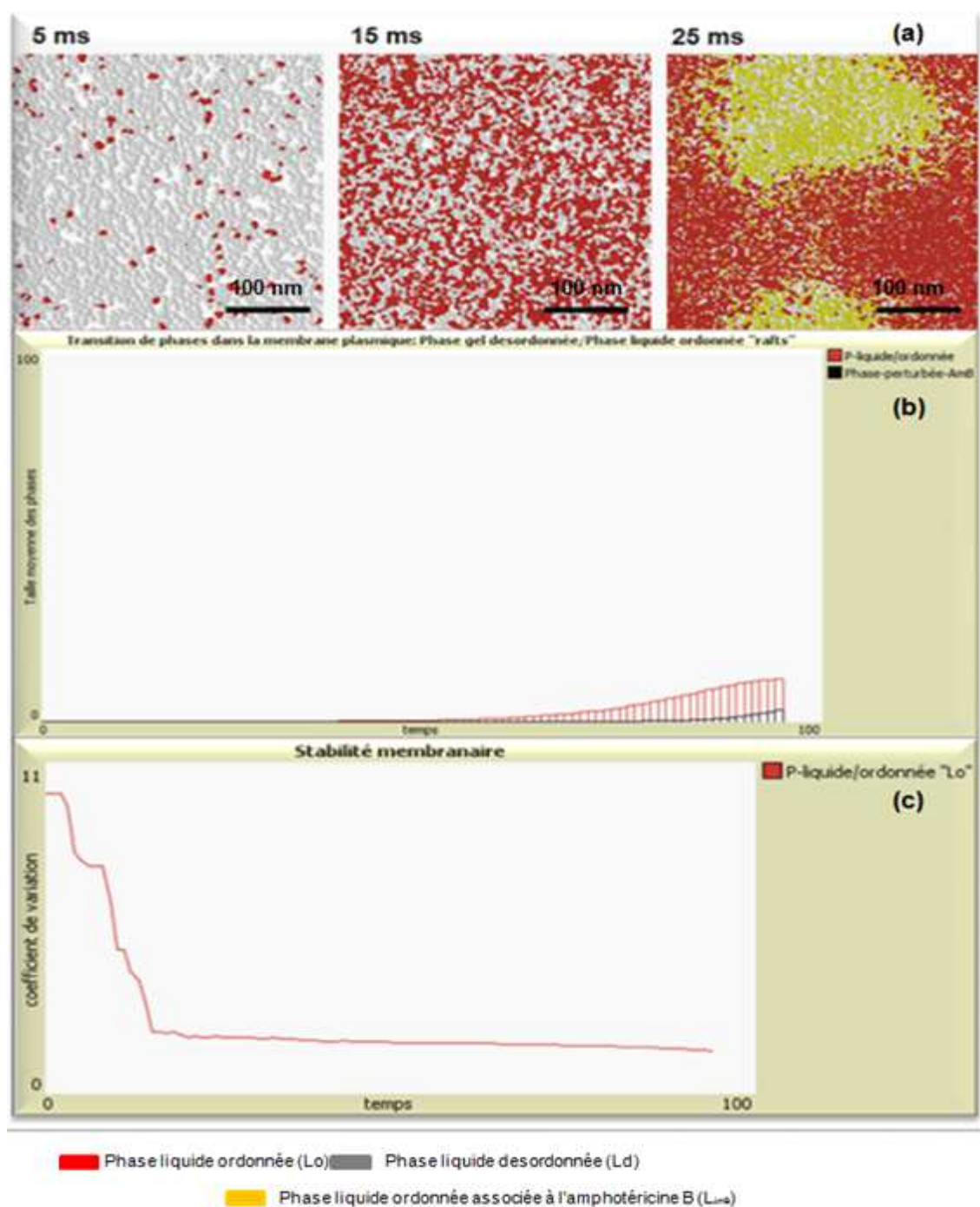


Figure n° 52 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphingo/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%). Constante de liaison AmB/ergostérol = 1.00, constante AmB/phospholipides = 0.5 et le potentiel de décompression = 100% (barre 100 nm).

(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)

(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo

(c)- Stabilité des phases ordonnées

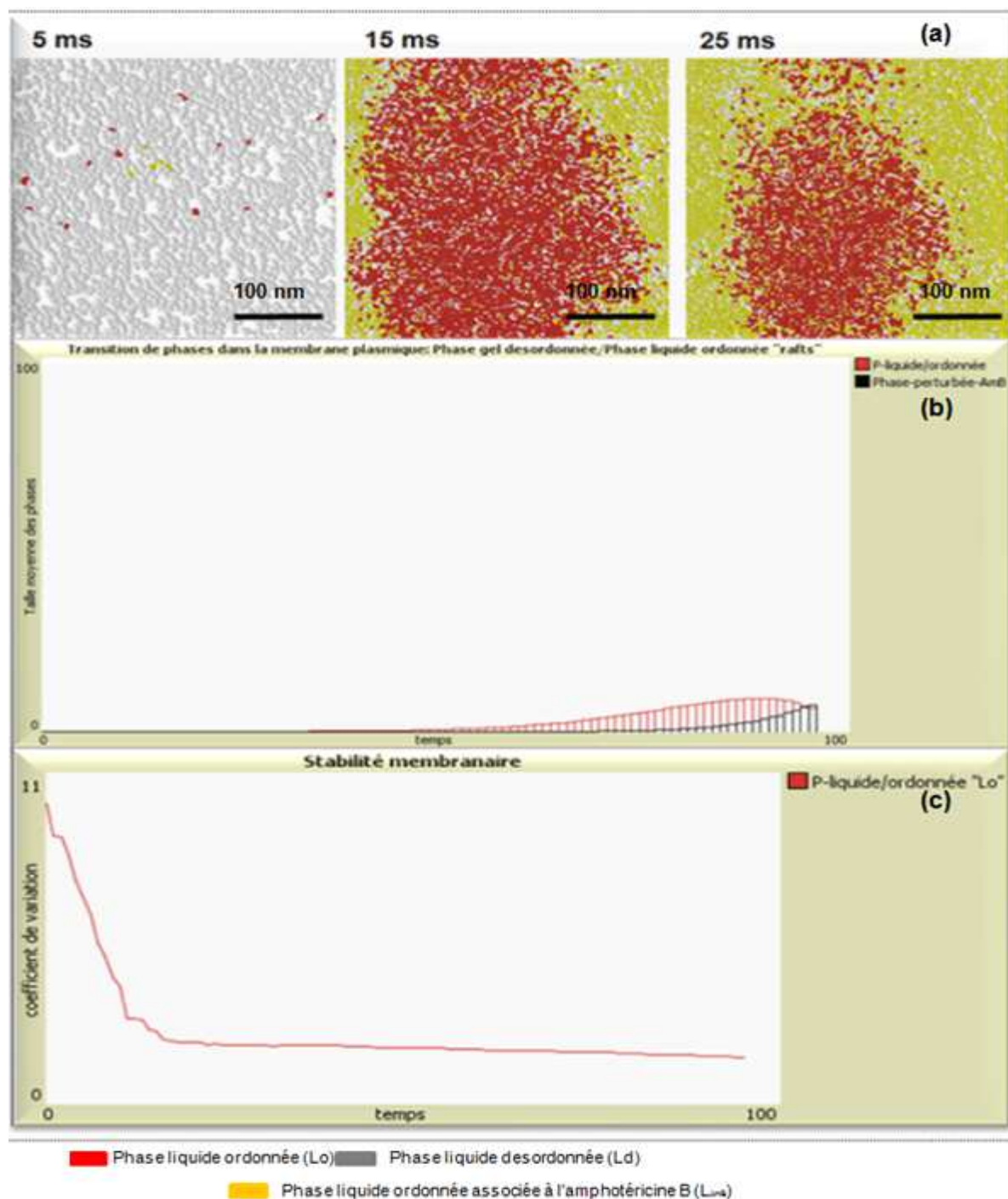


Figure n°53 : Visualisation et stabilité des domaines en phase ordonnée (Lo) formés en présence d'amphotéricine B à 5, 15 et 25 ms. Glycéro/sphing/ergostérol/AmB (1/1/20%/20%). Constante de liaison AmB/ergostérol = 1.00, constante AmB/phospholipides = 0.75 et le potentiel de décompression = 100% (barre 100 nm).

(a)- Visualisation de la membrane (tore en 2D)

(b)- Formation progressive de la phase ordonnée Lo

(c)- Stabilité des phases ordonnées

4- Conclusion

La modélisation et la simulation *in silico* sont très utiles pour comprendre et prédire la dynamique membranaire. L'approche mathématique a joué un rôle primordial dans la simulation des radeaux lipidiques. Le modèle repose sur une schématisation de la structure membranaire associée à un certain nombre d'hypothèses. L'approche multi-agents semble être une approche intéressante et un outil puissant pour traiter ce type de problème. Grâce à ces différentes caractéristiques, elle a permis d'élaborer un modèle mathématique, qui traite l'évolution de la structure dynamique en l'absence et en présence d'amphotéricine B.

L'application de ce modèle a concerné la reproduction du processus de formation de la phase liquide-ordonnée (Lo) « rafts » dans des conditions initiales stables, ensuite dans des conditions de stress, tout en se basant sur les résultats que nous avons obtenus.

Dans un premier temps, l'état de l'art sur la séparation de phases membranaires a montré l'importance de la prise en compte de l'effet perturbateur par les stimuli externes (**Fan J. et coll., 2010**). Dans une cellule où la membrane ne subit aucun stress, la formation des radeaux lipidiques « rafts » ne peut se produire, sauf si toutes les conditions biophysiques des lipides sont réunies. La modélisation de cette dynamique conduit à une prédiction de l'évolution du système à plusieurs niveaux. Le rôle fondamental des stérols dans la formation des phases liquides-ordonnées (Lo) a été également mis en évidence. Les méthodes expérimentales utilisées jusqu'ici, ne permettent pas de prédire l'évolution de ce système dans le cas où la cellule subit un stress. Dans ce contexte, les simulations numériques sont plus adaptées pour décrire l'évolution et apporter des précisions sur la formation des radeaux lipidiques en cas de stress membranaire.

Dans l'optique de la modélisation, le concept que nous avons utilisé est soumis principalement à deux abstractions physiques, la première correspond à la formation des phases liquides-ordonnées (Lo) et la deuxième à la formation des phases liquides-ordonnées associées à l'amphotéricine B (L_{AmB}).

Les résultats de la simulation obtenus avec un modèle constitué de glycérophospholipides, sphingophospholipides et ergostérol (1/1/20%), ont montré que la séparation de phases se fait de manière aléatoire mais elle est très stable avec un coefficient de variation estimé à 0. Ainsi, la phase liquide-ordonnée (Lo) diffuse progressivement et se colore en rouge en fonction des paramètres de

liaisons. Le nombre de radeaux ne change pas au cours de la simulation mais la taille varie.

Sur une membrane de 2 μ m, les tailles moyennes sont estimées respectivement à 20,23 ; 42,5 et 104,567 nm dans des temps de formation de 18,443 ; 55,321 et 92,2 pas de temps. Au bout de 25 ms de simulation l'évolution de la formation est linéaire et augmente de façon très stable.

Après la validation de ce modèle, nous avons réalisé tout d'abord une simulation sur l'effet de la séquestration d'ergostérol par l'amphotéricine B et nous avons ajouté 3 paramètres : la concentration d'amphotéricine B à 20%, le pouvoir de séquestration à 80% et les forces d'affinité à 1,00 et 0,2 pour l'ergostérol et les phospholipides respectivement. Les résultats obtenus ont permis de modéliser l'effet de l'amphotéricine B sur l'évolution de la formation phasique (L_o) au bout de 25 ms. En effet, une déstabilisation estimée à 0,6 est enregistrée au bout de 60 pas de temps, avec l'apparition de deux phases (L_o) et (L_{AmB}). De plus, la taille mesurée à 8,25 nm au bout de 92,2 pas de temps, correspond à une taille très réduite par rapport à une formation complète d'un domaine sans aucun stress.

Sur la base des résultats obtenus par l'analyse infrarouge à transformée de Fourier-mode-réflexion totale atténuée (IRTF-RTA), nous avons reconstitué la phase (L_o) en présence d'amphotéricine B. Les résultats de la simulation ont montré qu'en présence d'une force de décompression estimée à 100%, la phase (L_o) est reformée avec une taille de 48,91 nm au bout de 92,2 pas de temps. La déstabilisation de la membrane diminue en fonction du temps de la simulation. Elle est estimée à 9,57 au début de la simulation et à 1,75 au bout de 92,2 pas de temps. Nous pouvons dire que lorsque la tension latérale est réduite par l'action indirecte des porines, la membrane se répare et reconstitue les phases (L_o) avec des tailles plus petites. Dans un dernier subsidé et en prenant en considération le concept selon lequel la membrane passe par une réparation membranaire des phases (L_o), nous avons proposé une stratégie de ciblage moléculaire inspirée de la théorie de **Pontier**; établie **en 1973**. Cette dernière consiste à déstabiliser les radeaux lipidiques par une augmentation de l'affinité amphotéricine B/phospholipides. Les résultats obtenus de cette contribution se sont montrés très prometteurs et doivent être considéré parmi les stratégies à développer dans le futur. En effet, l'augmentation de l'affinité pour les phospholipides à 0,5 et 0,75, augmente la stabilité de la phase (L_{AmB}), avec un

coefficient de variation qui passe de 11 à 1,56. De plus, la taille de la phase liquide-ordonnée (Lo) est nettement réduite à 10,26 nm.

Ces résultats peuvent être expliqués par la séquestration de l'ergostérol membranaire qui est très affectée par les interactions que peut avoir l'amphotéricine B avec les phospholipides, notamment les liaisons de type Van Der Waals. En présence d'une affinité plus forte pour les phospholipides, l'ergostérol passe d'une conformation structurale de donneur de liaisons à une conformation structurale d'accepteur (**Bittman R. et coll., 1992**).

Quatrième partie
Conclusion générale

L'objectif principal de ce travail est de contribuer à la compréhension des mécanismes membranaires impliqués dans la dormance cellulaire de *Candida albicans* en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B.

Bien que les cellules de *Candida albicans* soient admises comme souches sensibles à l'effet toxique de l'amphotéricine B, des travaux antérieurs ont montré qu'un certain pourcentage de levures échappe à l'action de cet antifongique et rentre dans une phase de dormance, avant de se réveiller et reprendre la croissance induisant ainsi un échec thérapeutique (**Boucherit Z. et coll., 2007**).

La membrane plasmique, structure à l'interface cellulaire, est décrite dans la bibliographie comme la cible privilégiée de l'amphotéricine B. De ce fait, nous sommes intéressés à l'étude des modifications fonctionnelles et structurales de cet organe sur la survie de *Candida albicans* ATCC10231 après avoir été exposées à 0,4µg d'AmB/mL.

La première partie de ce travail est consacrée à la caractérisation des transitions morphologiques et membranaires qu'adoptent les cellules de *candida albicans* ATCC10231, dans un cycle de dormance et de réveil cellulaire par microscopie électronique à balayage (MEB) et spectroscopie des rayons-X à dispersion d'énergie (SDE-X).

Les résultats que nous avons obtenus ont montré que :

En présence d'amphotéricine B, les cellules rentrent dans une phase de latence de 21 heures, avant de reprendre leurs divisions avec un taux d'inhibition de 21%. Les microphotographies obtenues ont révélé des aspects pléomorphiques sous forme de levures avec un indice de morphologie (Mi) de 0,6 (Mi<1,5). Des analyses plus approfondies, par le logiciel ImageJ ont mis en évidence l'existence d'une déformation membranaire d'un diamètre de 2 µm, au niveau des surfaces cellulaires. Ces déformations représentent 33,25 % de la surface cellulaire globale et sont accompagnées d'une fuite accrue d'ions, notamment le sodium et le chlore, respectivement 16,4% et 55,5%.

L'interprétation la plus simple de cet état morphologique de déformation cellulaire, suit une hypothèse centrale selon laquelle l'amphotéricine B agit au niveau des radeaux lipidiques qui génèrent à leurs tours une élasticité membranaire pour s'adapter au déséquilibre osmotique créé par cette molécule.

Ce phénomène permet aux cellules dormantes de survivre, contrairement aux cellules exposées à de fortes concentrations en antifongique où l'étirement de la membrane par la réorganisation des radeaux « rafts » peut aboutir à sa rupture et à la mort cellulaire.

Pour confirmer cette hypothèse, dans la deuxième partie de ce travail, nous avons réalisé une caractérisation biochimique des surfaces membranaires par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF-RTA).

Il ressort que les spectres IRTF-RTA des levures de *Candida albicans* ATCC10231 incubées en présence d'amphotéricine B à 0,4µg/mL, présentent des variations importantes dans la composition membranaire en protéines et en phospholipides. Les analyses ont montré l'apparition de protéines spécifiques, en conformation secondaire de type β « bêta », avant la levée de la dormance. Ceci nous laisse penser que les cellules expriment des structures capables de rééquilibrer le milieu osmotique et de reconstituer la structure membranaire leur permettant ainsi de reprendre une croissance normale.

Une séparation de phase est mise en évidence par des variations d'absorption de phospholipides ($\sim 1240\text{ cm}^{-1}$), de glycolipides et de stérols membranaires ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$). La dynamique de ces constituants est importante dans le cadre des phénomènes de diffusion à travers les membranes plasmiques, puisqu'elle intervient également dans le conditionnement de la fluidité.

Sur le plan mécanique, cette transition lipidique est adoptée pour la survie des cellules lors d'un traitement à l'amphotéricine B. Cette deuxième hypothèse périphérique que ce soit sur le plan de l'altération ou de la réparation membranaire, demeure importante et suscite la mise en place d'un modèle membranaire et d'une stratégie de ciblage moléculaire.

La stratégie utilisée dans la troisième partie de notre travail fait intervenir la modélisation à base de système multi-agents (SMA).

Les résultats obtenus se sont avérés très prometteurs, dans le cadre d'une stabilisation des phases lipidiques associées à l'amphotéricine B, appelées dans notre étude phases (L_{AmB}). En effet, la stabilité de ces « super-phases » (L_{AmB}), en présence d'une affinité de 0,5 et 0,75 est 2 fois supérieure à celle mesurée en présence d'une affinité de 0,2.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant :

- D'approfondir les études sur la séparation de phases lipidiques chez les cellules dormantes.
- D'identifier les molécules responsables de la réparation membranaire lors d'un stress causé par l'effet de l'amphotéricine B.
- D'améliorer les modèles membranaires multi-agents dans le but de simuler d'autres interactions moléculaires.
- De déterminer d'autres paramètres qui peuvent influencer l'adaptation cellulaire dans la phase de dormance.

Cinquième partie
Références bibliographiques

Adt I., Toubas D., Pinon J.M., Manfait M. and Sockalingum G.D. (2006). "FTIR spectroscopy as a potential tool to analyse structural modifications during morphogenesis of *Candida albicans*." *Archives of Microbiology*.; 185: 277-285.

Alan Xu Q., Timothy L. and Madden L. (2011). "Analytical Methods for Therapeutic Drug Monitoring". (2^{ème} edition springer). New York.

Albert C. M., Campos H., Stampfer M. J., Ridker P. M., Manson J. E., Willett W.C. and Ma J. (2002). "Blood levels of long-chain n-3 fatty acids and the risk of sudden death." *N Engl J Med*.; 346:1113-1118.

Anderson R. G. and Jacobson K. (2002). "A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains." *Science*.; 296:1821–1825.

André E. P., Bastos E.P., Marinho S., Cordeiro A.M, Soure A. and de Almeida R. (2012). "Biophysical properties of ergosterol-enriched lipid rafts in yeast and tools for their study: characterization of ergosterol/phosphatidylcholine membranes with three fluorescent membrane probes" *Chemistry and Physics of Lipids*.; 165: 577-588.

Atkinson A. J. and Bennett J. (1978). "Amphotericin B Pharmacokinetics in Humans." *Antimicrob. Agents Chemother*.; 13: 2271-276.

Bagatolli L. and Sunil Kumar B. P. (2009). "Phase behavior of multicomponent membranes: Experimental and computational techniques." *Soft Matter*.; 5: 3234–3248.

Baginski M., Resat H. and Borowski E., (2002). "Comparative molecular dynamics of amphotericin B-cholesterol/ergosterol membrane channels." *Biochimica et Biophysica acta*.; 1567: 63-78.

Baran M., Borowski E. and Mazerski J. (2009). "Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water II." *Biophysical Chemistry*.; 141: 162-168.

Barenholz Y. (1984). "Sphingomyelin-lecithin balance in membranes : composition, structure, and function relationship." In *Physiology of Membrane Fluidity*, ed., CRC Press.;1:131-173.

Barth I. and Haris P. (2009). "FTIR Spectroscopy for Analysis of Protein Secondary Structure. In: A., eds. *Biological and Biomedical Infrared Spectroscopy*." Amsterdam: IOS Press:129-167.

Belkherroubi Sari L. (2009). "Effet de l'état physique des antifongiques polyéniques sur leur activité cellulaire : exemple de l'amphotéricine B." Thèse de Doctorat en Biologie, Université Aboubekr BelkaidTlemcen.

Bittman R., Fugler L., Clejan S., Lister M. D. and Hancock A. J. (1992) "Interaction of cholesterol with conformationally restricted phospholipids in vesicles." *Biochim Biophys Acta*.; 1106:40-44.

- Bodin S., Tronchère H. and Payrastré B. (2003).** "Lipid rafts are critical membrane domains in blood platelet activation processes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembrane.*; 1610: 247-257.
- Boucherit K., Belbraout S., Boucherit Z. and Belkherroubi Sari L. (2011).** "Effect of the ionic environment on the improvement of the therapeutic index of the Amphotericin B." *chemical technology, An Indian Journal. BMJ.*; 22:579-82.
- Boucherit Z., Seksek O. and Bolard J. (2007).** "Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry." *Med Mycol.*; 45 :525-33.
- Boucherit-Atmani Z. (2007).** "Mécanisme d'action des antifongiques polyéniques .Exemple de l'Amphotéricine B. thèse de Doctorat d'état. Département de biologie moléculaire et cellulaire. Faculté des sciences. Université Aboubekr Belkaïd - Tlemcen.
- Brajtburg J. and Bolard J. (1996).** "Carrier effects on biological activity of amphotericin B." *Clin Microbiol Rev.*; 9: 512-531.
- Brown A. D. (2006).** "Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals." *Physiology (Bethesda).*; 21: 430-9.
- Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S. and Oliynyk M., (2001).** "Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes." *Chem. Biol.*; 8:713–723.
- Casai H. L. and Mantsch H. H. (1984).** "Polymorphie phase behaviour of phospholipid membranes studied by infrared spectroscopy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes.*; 779:381-401.
- Catalá A. (2012).** "Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the " Fluid mosaic Model" to the "Lipid Whisker Model" *Biochimie.*; 94:101-109
- Chamberlain H. L. (2004).** "Detergents as tools for the purification and classification of lipid rafts" *FEBS Letters .*; 559: 1-5.
- Chavanet P., Duong M., Buisson M., Hamel H., Dubois C., Bonnin A. and Portier H. (1997).** "In-vivo activity and tolerance of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in experimental disseminated candidiasis in neutropenic rabbits." *J Antimicrob Chemother.*; 39: 427-430.
- Clejan S. and Bittman R. (1985).** "Rates of amphotéricine B and filipin association with sterols: a study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles." *The journal of biological chemistry.*; 260: 2884-2889.
- Cohen B. E. (1992).** "A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition." *Biochim. Biophys. Acta.*; 1108: 49–58.

- Darnell J., Lodish H. and Baltimore, D. (1993).** "Biologie moléculaire de la cellule," Bruxelles, De Boeck.
- Dietrich C., Yang B., Fujiwara T., Kusumi A. and Jacobson K. (2002).** "Relationship of lipid rafts to transient confinement zones detected by single particle tracking." *Biophys. J.*; 82:274–284.
- Dimova R. and Lipowsky R. (2012).** "Lipid membranes in contact with aqueous phases of polymer solutions." *Soft Matter.*; 8: 6409-6415.
- Dupont S., Beney L., Ferreira T. and Gervais P. (2011).** "Nature of stérols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration." *Biochimica biophysica acta.*; 1808: 1520-1528.
- Eddidin M. (2003).** "Lipids on the frontier: a quarter century of cell-membrane bilayers." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*; 4: 414–418
- Eriksson U., Seifert B. and Schaffner A. (2001).** Comparison of effects of amphotericin B deoxycholate infused over 4 or 24 hours: randomised controlled trial. *BMJ* 322: 579.
- Espada R., Valdespina S., Alfonso C., Rivas G., Ballesteros Paloma M. and Torrado J. J. (2008).** "Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations." *International Journal of Pharmaceutics.*; 361 : 64-69.
- Essendoubi M., Toubas D., Lepouse C., Leon A., Bourgeade F., Pinon J. M., Manfait M. and Sockalingum G. D. (2007).** "Epidemiological investigation and typing of *Candida glabrata* clinical isolates by FTIR spectroscopy." *J Microbiol Methods.*; 71: 325-331.
- Fahmy K. (2013).** "Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Biophysical Applications: Technical Aspects" *Encyclopedia of Biophysics.* 844-852.
- Fan J., Sammalkorpi M. and Haataja M. (2010).** "Formation and Regulation of Lipid Microdomains in Cell Membranes: Theory, Modeling, and speculation" *FEBS Letters.*; 584: 1678.
- Feigenson G. W. (2007).** "Phase boundaries and biological membranes." *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*; 36 : 63–77.
- Ferber J. (1995).** "Systèmes multi-agents." Inter-Edition. CA. USA.
- Fernow I., Icking A. and Tikkanen R. (2007).** "Reggie-1 and reggie-2 localize in non-caveolar rafts in epithelial cells: Cellular localization is not dependent on the expression of caveolin proteins" *European Journal of Cell Biology.*;86: 345-352.
- Filatov A., Shmigol I., Kuzin I., Sharonov G. and Feofanov A. (2003).** "Resistance of cellular membrane antigens to solubilization with triton X100 as a marker of their association with lipid raft—analysis by flow cytometry" *Journal of Immunological Methods.*; 278: 211-219.

Fortunatti C., Sarmoria C., Brandolin A. and Asteasuain M. (2014). "Prediction of the full molecular weight distribution in raft polymerization using probability generating functions." *Computers & Chemical Engineering*.;66: 214-220.

Frost A., Unger V. M. and De Camilli P. (2009). "The BAR domain superfamily: membrane-molding macromolecules." *Cell*.; 137:191–196.

Gagos M. and Arczewska M. (2010). "Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*.; 1798: 2124-2130.

Gaigneaux A., Ruyschaert J. M. and Goormaghtigh E. (2006). "Cell discrimination by attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy: the impact of preprocessing of spectra." *Appl Spectrosc*.; 60: 1022-1028.

Gasper R., Dewelle J. and Goormaghtigh E. (2009). "IR spectroscopy as a new tool for evidencing antitumor drug signatures." *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* .;1788: 1263-1270.

Gautier J., Passot S., Pénicaud C., Guillemin H., Cenard S., Lieben P. and Fonseca F. (2013). "Low membrane lipid phase transition temperature is associated with a high cryotolerance of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* CFL1." *Journal of Dairy Science*.; 96: 5591-5602.

Gold W., Stout H. A. and Pagano J. F. (1956). "Antibiotics Annual 1955–1956". In Welch H, Marti-Ibanez F. (eds). *Medical Encyclopedia*. New York.; 579–86.

Goormaghtigh E., Gasper R., Benard A., Goldsztein A. and Raussens V. (2009). "Protein secondary structure content in solution, films and tissues: redundancy and complementarity of the information content in circular dichroism, transmission and ATR FTIR spectra." *Biochim Biophys Acta*.; 1794: 1332-1343.

Goormaghtigh E. (2012). "Data analysis in Infrared Spectroscopy." *Encyclopedia of Biophysics*.; 1049-1057

Goormaghtigh E., Cabiaux V. and Ruyschaert J. M. (1994a). "Determination of soluble and Membrane Protein structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy : I. Assignments and Model Compounds in Physicochemical methods in the study of biomembranes - Plenum Press P.329-362.

Goormaghtigh E., Cabiaux V. and Ruyschaert J. M. (1994b). "Determination of soluble and Membrane Protein structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy II. Experimental aspects, Side chain structure and H/D exchange" in *Physicochemical methods in the study of biomembranes - Plenum Press P.363-403*

Goormaghtigh E., Cabiaux V. and Ruyschaert J. M. (1994c). "Determination of soluble and Membrane Protein structure by Fourier Transform Infrared Spectroscopy III. Secondary structures" in *Physicochemical methods in the study of biomembranes – Plenum Press P405-450*

- Gray K. C., Palacios D. S., Dailey I., Endo M. M., Uno B. E., Wilcock B. C. and Burke M. D. (2012).** "Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 109:2234–2239.
- Gruszecki W. I., Luchowski R., Wasko P., Gryczynski Z. and Gryczynski I. (2012).** "Molecular organization of polyene antibiotic amphotericin B studied by means of fluorescence technique." *Methods Mol Biol.*; 875:57-65.
- Gulati S., Liu Y., Munkacs., Wilcox L. and Sturley S.L. (2010).** "Sterols and sphingolipids: dynamic duo or partners in crime?" *Progress in Lipid Research.*; 49: 353-365.
- Hac-Wydro K., atka D., Grzybowska J. and Borowski E. (2005).** "N-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME)— a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity." *Journal of Colloid and Interface Science.*; 287 : 476–484.
- Hall G. A. (2012).** "Interactions of Yeasts, Moulds, and Antifungal Agents." Ed. XIV, A product of Humana Press, Springer.;170.
- Hartsel S. C., Benz S. K., Ayenew W. and Bolard J. (1994).** "Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics." *Eur Biophys J.*; 23:125-132.
- Hays L. M., Crowe J. H., Wolkers W. and Rudenko S. (2001).** "Factors Affecting Leakage of Trapped Solutes from Phospholipid Vesicles during Thermotropic Phase Transitions." *Cryobiology.*; 42: 88-102.
- Hazen E. L. and Brown R. (1951).** "Fungicidin and antibiotic produced by a soil actinomycete." *Proc. Soc. Exp Biol Med.*; 76: 93.
- Kleinberg M. E. (2010).** "Managing infections in patients with hematological malignancies." Springer Edition.;115-121.
- Koutsoumanis K. and Sofos J. N. (2005).** "Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*." *Int. J. Food Microbiol.*; 104: 83–91.
- Kusumi A. and Suzuki K. (2005).** "Toward understanding the dynamics of membrane-raft-based molecular interactions." *Biochim Biophys Acta.*; 1746:234–251.
- Kyung S. K., Young-Sun K., Ihn H., Mi-Hyun K., Min Hyung J. and Hun-Kuk P. (2011).** "Quantitative and Qualitative Analyses of the Cell Death Process in *Candida albicans* Treated by Antifungal Agents. PLoS ONE; 6:12.
- Labilloy A., Youker R.T., Bruns J., Kukic I., Kiselyov K., Halfter W., Finegold W., Hadad J., do Monte S., and Weisz O. (2014).** "Altered dynamics of a lipid raft associated protein in a kidney model of Fabry disease." *Molecular Genetics and Metabolism.*; 111: 184-192.

Laradji M. and Sunil Kumar P. B. (2006). "Anomalously slow domain growth in fluid membranes with asymmetric transbilayer lipid distribution" *Phys. Rev.*; 73.

Laroche C., Simonin H., Beney L. and Gervai, P. (2005). "Phase transitions as a function of osmotic pressure in *Saccharomyces cerevisiae* whole cells, membrane extracts and phospholipid mixtures." *Biochim Biophys Acta.*; 1669: 8-16.

Lee D. C. and Chapman D. (1986). "Infrared spectroscopy studies of biomembranes and model membranes." *Bioscience reports.*; 6: 235-256.

Legrand P., Romero E. A., Cohen B. E. and Bolard J. (1992). "Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes." *Antimicrob Agents Chemother.*; 36: 2518-2522.

Leslie S. B., Israeli E., Lighthart B., Crowe J.H. and Crowe L.M., (1995). "Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying." *Applied Environ. Microbiol.*; 61: 3592-3597.

Li B., Li S., Tan Y., Stolz D.B. and Watkins C. S. (2000). "Lyophilization of cationic lipid–protamine–DNA (LPD) complexes" *Journal of Pharmaceutical Sciences.*; 89 : 355–364.

Liao R. S., Rennie R. P. and Talbot J. A. (1999). "Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*." *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 43: 1034-1041.

Liao R.S., Rennie R.P. and Talbot J.A. (2003). "Sublethal injury and resuscitation of *Candida albicans* after amphotericin B treatment." *Antimicrob. Ag. Chemother* ; 47: 1200-1206.

Lipowsky R. (1993). "Budding of membranes induced by intramembrane domains." *J. Phys. II France.*; 2 :1825–1840.

London E. (2002). "Insights into lipid rafts structure and formation from experiments in model membranes" *Current Opinion in Structural Biology.*; 12: 480-486.

Lortholary O. and Duvivier C. (2012). "Processus infectieux et inflammatoire." Elsevier Health Sciences.;135.

Lyman C. E., Goldstein J. I., Roming J. R., Echelin P., Joy D. C., Newbury D. E. and Williams D. B. (1990). "Basic SEM Imaging. Scanning Electron Microscopy, X-Ray Microanalysis, and Analytical Electron Microscopy." *Springer.*; 3-7.

Malinsky J., Opekarova M. and Tanner W. (2010). "The lateral compartmentation of the yeast plasma membrane." *Yeast.*; 27: 473-478.

Mangiarotti A., Caruso B. and Wilke N. (2014). "Phase coexistence in films composed of DLPC and DPPC: A comparison between different model membrane systems" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.*; 1838:1823-1831.

- Mannock D. A., Lewis R. N. A. H. and McElhancy R.N. (2010).** "A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes." *Biochimica et biophysica acta* .; 1798: 376-388.
- Marsh D. (1996).** "Lateral pressure in membranes." *Biochim Biophys Acta.*;1286:183-223.
- Matsumori N., Eiraku N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M., Aoki T. and Ide T. (2004).** "An Amphotericin B-Ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity." *Chimistry and Biology*. Elsevier Ed.; 11: 673-679.
- Matsuoka S., Matsumori N. and Murata M. (2003).** "Amphotericin B—phospholipid covalent conjugates: dependence of membrane—permeabilizing activity on acyl—chin length." *Org. Biomol.Chem.*;1: 3882-3884.
- Merson-Davies L. A. and Odds F. C. (1989).** "Colony Variations in *Candida* Species." *Mycoses.*; 32: 275–282.
- Mesa-Arango A.C., Scorzoni L. and Zaragoza O. (2012).** "It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug." *Front Microbiol.*; 8;3:286.
- Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M. and Michels B. (2002).** "Interactions of the drug amphotericin b with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insights into the role of ergosterol." *Biochim Biophys Acta.*; 1558:95–108.
- Mongrand S., Stanislas T., Bayer E. M., Lherminier J. and Simon-Plas F. (2010).** "Membrane rafts in plant cells." *Trends Plant Sci.*; 15: 656-663.
- Moore D.J., Sills R.H., Patel N. and Mendelsohn R. (1996).** "Conformational order of phospholipids incorporated into human erythrocytes: an FTIR spectroscopy study." *Biochemistry* .;35: 229-235.
- Morales-Nava R., Amaya G., and Ortega-Blake I. (2013).** "Activity of AmB along a Phase Diagram Presenting Micro and Nanodomains." *Biophysics journal.*; 102 : 524.
- Mouri R., Konoki K., Matsumori N., Oishi T. and Murata M. (2008).** "Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance." *Biochemistry.*;47: 7807–7815.
- Mowat E., Lang S., Williams C., Mcculloch E., Jones B. and Ramage G. (2008).** "Phase-dependent antifungal activity against *Aspergillus fumigatus* developing multicellular filamentous biofilms." *J. Antimicrob. Chemother.*; 62: 1281–1284
- Mpona-Minga M., Hakkou A., Coulon J. and Bonaly R. (1988).** "Influence d'une dose sub-inhibitrice d'amphotéricine B sur la composition en acide gras et stéroïls cellulaire de *Candida albicans*." *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* . ; 139 : 547-555.

- Naka T., Fujiwara T., Yano I., Maeda S., Doe M., Minamino M., Ikeda N., Kato Y., Watabe K., Kumazawa Y., Tomiyasu I. and Kobayashi K. (2003).** "Structural analysis of sphingophospholipids derived from *Sphingobacterium spiritivorum*, the type species of genus *Sphingobacterium*" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids.*; 1635: 83-92.
- Nasir M.N., Thawani A., Kouzayha A. and Besson F. (2010).** "Interactions of the natural antimicrobial mycosubtilin with phospholipid membrane models." *Colloids Surf. B.*; 78: 17-23.
- Naumann D., Helm D. and Labischinski H. (1991a).** "Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy." *Nature.*; 351: 81-2.
- Naumann D., Helm D., Labischinski H. and Giesbrecht P. (1991b).** "The characterization of microorganisms by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in Modern techniques for rapid microbiological analysis." Nelson, W. H. (ed). New York, USA; 43-92.
- Neumann A., Baginski M., Winczewski S. and Czub J. (2013).** "The Effect of Sterols on Amphotericin B Self-Aggregation in a Lipid Bilayer as Revealed by Free Energy Simulations." *Biophysical Journal.*; 104: 1485-1494.
- Norman A. W., Demel R. A., De Kruijff B. and Van Deenen L. L. M. (1972).** "Studies on the biological properties of polyene antibiotics: Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol." *The journal of biological chemistry .*; 247:1918-1929.
- Onodera R., Motoyama K., Okamoto A., Higashi T., Kariya R., Okada S. and Arima H. (2013).** "Involvement of cholesterol depletion from lipid raft in apoptosis induced by methyl- β -Cyclodextrin." *International Journal of Pharmaceutics.*; 452: 116-123.
- Orsini F., Cremona A., Arosio P., Corsetto P.A., Montorfano G., Lascialfari G. and Rizzo A.M (2012).** "Atomic force microscopy imaging of lipid rafts of human breast cancer cells" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.*;1818: 2943-2949
- Pagès J. M. (2004).** "Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques" *Médecine/Sciences.*; 20 : 346-351.
- Palacios D. S., Dailey I., Siebert D. M., Wilcock B. C. and Burke M. D. (2011).** "Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; 108, 6733–6738.
- Pontier J. (1973).** "Théorie de la cible : un modèle markovien pour l'évolution génétique d'une mutation latente." *Acta Biotheoretica.*; 22: 120-141.
- Privalov P.L. and Gill S.J. (1988).** "Stability of protein structure and hydrophobic interaction." *Adv Protein Chem.*; 39: 191-235.
- Quinteiro Rodriguez M. P. (2000).** "Fourier transform infrared (FTIR) technology for the identification of organisms." *Clin Microbiol Newsletts.*; 22: 57-61.

- Ragoonanan V., Less R. and Aksan A. (2013).** "Response of the cell membrane-cytoskeleton complex to osmotic and freeze/thaw stresses Part 2: The link between the structure of the membrane-cytoskeleton complex and cellular damage" *Cryobiology.*; 66: 96–104.
- Ramstedt B. and Slotte J.P. (2002).** "Membrane Properties of Sphingomyelins." *FEBS Letters* 531: 33-37.
- Reshetenko T.V., Pierre J. and Rocheleau R. (2013).** "Effects of local gas diffusion layer gas permeability variations on spatial proton exchange membrane fuel cell performance." *Journal of Power Sources.*; 241: 597-607.
- Rogers P.D., Kramer R. E., Chapman S. W. and Cleary J.D. (1999).** "Calcium-mediated signal-mediated of amphotericin B induced interleukin-1 β expression in human monocytic cells." *J Infect Dis.*; 180: 1259-1266.
- Romero E. A., Valdivieso E. and Cohen B. E. (2009).** "Formation of two different types of ion channels by amphotericin B in human erythrocyte membranes." *J. Membr. Biol.*; 230: 69–81.
- Sanchez D. A., Schairer A., Tuckman-Vernon C., Chouake J., Kutner A., Makdisi J., Friedman J. M., and Friedman J. (2014).** "Amphotericin B releasing nanoparticle topical treatment of *Candida* spp. In the setting of a burn wound." *Nanomedicine. Nanotechnology, Biology and Medicine.*;10: 269-277.
- Sangalli-Leite F., Scorzoni L., Mesa-Arango A. C., Casas C., Herrero E., Gianinni M. J., Rodriguez-Tudela J. L., Cuenca-Estrella M. and Zaragoza O. (2011).** "Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst." *Microbes Infect.*; 13: 457–467.
- Sarroukh R., Goormaghtigh E., Ruyschaert J. M. and Raussens V. (2013).** "ATR-FTIR: a 'rejuvenated' tool to investigate amyloid proteins." *Biochim. Biophys. Acta.*; 1828: 2328-38.
- Schaber J., Adrover M.A., Eriksson E., Pelet S., Petelenz-Kurdziel E. and Klein D. (2010).** "Biophysical properties of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship with HOG pathway activation." *Eur Biophys J.*; 39: 1547-1556.
- Schmitt S. (2002).** "Parenterale O/W Emulsionen: Plasmaproteininteraktion und Interaktion von Arzneistoffen." Thèse de doctorat, Freie Universität Berlin, Berlin
- Schneider R., Brügger R., Sandhoff G., Zellnig A., Leber M., Lampl K., Athenstaedt C., Hrastnik S. and Eder G. (1999).** "Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane." *J Cell Biol.*; 146:741-54.
- Schulz E. (2000).** "β-Barrel membrane proteins." *Current Opinion in Structural Biology.*; 10:443–447.

- Sharon L., Ruff-Dirksen S., Heitkemper M. M. and Bucher L. (2013).** "Medical-Surgical Nursing: Assessment and Management of Clinical Problems" 9^{ème} edition.Ninth édition; Elsevier.
- Simonin H., Beney L. and Gervais P. (2007).** "Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration mechanism of cell death." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.*;1768: 1600-1610.
- Simons K. and Ikonen E. (1997).** "Functional rafts in cell membranes." *Nature* 387: 569-572.
- Simons K. and Van Meer G. (1988).** "Lipid sorting in epithelial cells." *Biochemistry.* ; 27 :6197–6202.
- Singer S. J. and Nicolson G. L. (1972).** "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes." *Science.*;175: 720-731.
- Sonnino S., Mauri L., Chigorno V. and Prinetti A. (2007).** "Gangliosides as components of lipid membrane domains." *Glycobiology.* ;17:1–13.
- Stillwell W. (2013).** "Basic membrane Properties of the Fluid Mosaic Model." An Introduction to Biological membrane. Elsevier edition.; 131-174.
- Sudbery P., Gow N. and Berman J. (2004).** "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends in microbiology.*;12: 317-324.
- Szlinder-Richert J., Cybulska B., Grzybowska J., Bolard J. and Borowski E. (2004).** "Interaction of amphotericin B and its low toxic derivative, -methyl-N-D-fructosylamphotericin B methyl ster, with fungal, mammalian and bacterial cells measured by the energy transfer method" *Il Farmaco.*;59: 289-296.
- Tasset C., Prétat V. and Roland M. (1992).** "Comparison of the in vivo antifungal activity of amphotericinB -Solulan C24, amphotericin6 myrj 59 andamphotericin B -Synperonic A50 with fungizone" *International Journal of Pharmaceutics.*; 81: 5-9.
- Toroser D. and Huber R. (1997).** "Protein Phosphorylation as a Mechanism for Osmotic-Stress Activation of Sucrose-Phosphate Synthase in Spinach heaves." *Plant Physiol.*; 114: 947-955.
- Valitova J.N., Minibayeva F., Kotlova E.R., Novikov N.V., Shavarda A., Murtazina L.I. and Ryzhkina I.S. (2011).** "Effects of sterol binding agent nystatin on wheat roots: The changes in membrane permeability, sterols and glycoceramides." *Phytochemistry.*; 72:1751-1759.
- Valsecchi M., Mauri L., Casellato R., Prioni S., Loberto N., Prinetti A., Chigorno V., and Sonnino S. (2007).** "Ceramide and sphingomyelin species of fibroblasts and neurons in culture." *J Lipid Res* 48:417-24

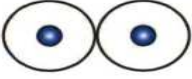
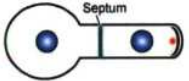
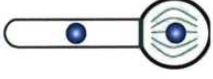
- Vandermeulen G., Rouxhet L., Arien A., Brewster M.A. and Prétat V.(2006).** "Encapsulation of amphotericin in poly(ethylene glycol)-block-poly(ecaprolactone-cotrimethylene)polymeric micelles." *International Journal of Pharmaceutics.*;309:234-240.
- Vealth S. and Keller S.L. (2002).** "Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol." *Biophys J.*; 85: 3074–3083.
- Vindelov J. and Arneborg N. (2002).** "Saccharomyces cerevisiae and Zygosaccharomyces mellis exhibit different hyperosmotic shock responses." *Yeast.*; 19: 429-439.
- Volmer A., Szpilman A. M. and Carreira E. M., (2010).** "Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives." *Nat. Prod. Rep.*;27: 1329-1349.
- Walsh P., Cross T.A. and Jap K. (2004).** "Structural genomics of membrane protein." *USA Genome Biology*, 5:215.
- Whiteway M. and Bachewich, C. (2007).** "Morphogenesis in *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol.*; 61:529-53.
- Wilcock B., Uno M., Uno B., and Burke M. (2013).** "C2'-OH of Amphotericin B Plays an Important Role in Binding the Primary Sterol of Human Cells but Not Yeast Cells" *J. Am. Chem. Soc.*; 135 : 8488–8491.
- Wilkes G., Barton-Burke M. and Phil D. R. N. (2010).** "2010 Oncology Nursing Drug Handbook", Jones and Bartlett Ed.; 1360: 1114-1116.
- Witkowski T., Backofen R. and Voigt A. (2012).** "The influence of membrane bound proteins on phase separation and coarsening in cell membranes." *Chem. Phys.*; 14: 14509-14515.
- Wójtowicz K., Gruszecki k., Walicka M. and Barwicz Z. (1998).** "Effect of amphotericin B on dipalmitoylphosphatidylcholine membranes: calorimetry, ultrasound absorption and monolayer technique studies." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.*; 1373 : 220–226.
- Yeagle P.L. (2014).** "Non-covalent binding of membrane lipids to membrane proteins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.*: 1838: 1548-1559.
- Zeng YX., Mjos S. A., Meier S., Lin C. C., and Vadla R. (2013).** "Least squares spectral resolution of liquid chromatography–mass spectrometry data of glycerophospholipids" *Journal of Chromatography A.*; 1280:23-34.

Sixième partie
Annexes

ANNEXE 1

L'interprétation des résultats obtenus, lors des analyses morphologiques des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 est réalisée en se référant à une classification de formes pléomorphiques, telle décrite dans le tableau ci-dessous.

Tableau 10 : Représentation schématique et classification des formes pléomorphiques de *Candida albicans* [(Merson-Davies L. A. et Odds F., 1989) ; (Sudbery P. et coll., 2004) ; (Whiteway M. et Bachewich C., 2007)]

Forme pléomorphique	Taille cellulaire	Conditions de culture	Indice de morphologie (Mi)	Représentation schématique
Levure	2 à 5 μm	pH <6.5-7.0 Température <30°C	<1,5	
Pseudo-hyphes	20 μm	pH 6.0 Température =35° C	2,5–3,4	
Hyphes	500 à 600 μm	pH >6.5-7.0 Température >35°C	> 3,4	

ANNEXE 2

L'interprétation des spectres infrarouges est faite en se référant au tableau IRTF-RTA ci-dessous. Ce dernier indique avec précision les assignations des différentes bandes, la liaison concernée, le type de vibration et le nombre d'onde. (Les vibrations d'élongation sont notées ν , les vibrations de cisaillements σ et les vibrations de déformation sont notées δ).

Tableau 11: Assignation des bandes IRTF-RTA [(Naumann D. *et coll.*, 1991a, b) ; (Goormaghtigh E. *et coll.*, 1994 a, b et c) ; (Gaigneaux A. *et coll.*, 2006) ; (Gasper R. *et coll.*, 2009) ; (Goormaghtigh E. *et coll.*, 2009) ; (Goormaghtigh E., 2012) ; (Sarroukh R. *et coll.*, 2013)]

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Vibrations moléculaires	Principaux groupements fonctionnels
Stretching des liaisons simples (AH, CH, NH, OH)		
3300 3400	ν OH associé ν NH libre	Alcool, et phénols
3300 3380 3190 3100	ν NH (Amide A et B)	Protéines, et peptides
3062	ν CH, ν CH ₂ , ν CH ₃	Groupements aromatiques, et alcènes
2961 2957 2925 2897 2874	ν CH ₃ ν CH ₂ ν CH tertiaire ν CH ₃	Lipides, acides gras, chaînes aliphatique et latérales.
Stretching des doubles liaisons (C=O, C=C, C=N)		
1740 1747 1714 1713	ν COOR, ν C=O	Phosphodiester, phospholipide esters, acide carboxylique
1696 1691 1693 1681 1679 1678 1670	ν C=O couplée à δ NH	Amide I : Protéines de conformation de type « bêta » β ou feuillet antiparallèles, tournant, chaînes latérales, interactions interchaines.

1658 1655 1640	80% $\nu\text{C}=\text{O}$ couplée à 20% δNH	Amide I : Protéines en hélice « alpha » α , protéines en pelote statistique.
1630 1629 1627	$\nu\text{C}=\text{O}$ couplée à δNH	Protéines de conformation de type « bêta » β et/ou feuillets antiparallèles
1580 1550 1553 1540 1545 1520 1518 1511 1512 1500 1497 1497	60% νNH , 30% δCN 10% $\nu\text{C}=\text{C}$ $\nu\text{C}=\text{C}$	Amide II : Peptide, protéine, brins bêta, random, Tournant, chaînes latérales des résidus de tyrosine Phénylalanine
1491 1469 1455 1441	σCH_2 σCH_3	Lipides, acides gras
1416 1420 1414 1400 1405 1385 1375 1307 1374 1353 1339	δCOH δCOOH δCH , δCH_3 , νCOOH , δCH_2 , νCN couplée à δNH δCH , δCH_2	Amide III Acides aminés, chaînes d'acides gras Et polysaccharides
1314 1317 1280 1281	δCH , δCH_2 , δCH_3 νCN couplée à δNH $\nu\text{C}=\text{O}$, $\nu\text{C}=\text{C}$	Acides gras et acides aminés Amide III Acides gras et acides aminés
1245 1240 1239 1220 1218	$\nu\text{P}=\text{O}$ νPO^{2-} $\nu\text{R-O-P-O-R}$	Phosphodiester, phospholipides, LPS, protéines phosphorylés

Stretching des liaisons ($\nu\text{C-O}$, $\nu\text{C-C}$, $\nu\text{C-OH}$, $\delta\text{C-O-C}$, C-O-P)		
1173 1172 1153 1117 1084 1086 1070	$\nu\text{C-OH}$, $\nu\text{R-COOR}$ νCOOH νPO^{2-}	Protéines, carbohydrates, Phospholipides, phosphodiester,
1057 1056 1044 1041	$\nu\text{R-O-P-O-R}$ $\nu\text{C-O-C}$, $\nu\text{P-O-C}$ $\nu\text{C-OH}$ couplée à $\delta\text{C-O}$ $\nu\text{CH}_2\text{OH}$ couplée à νCN	Polysaccharrides, stérols, et glycolipides
1028 1026 964 970 900	$\nu\text{CH}_2\text{OH}$ $\nu\text{C-C}$, νPO_3^{2-} , $\nu\text{C-O-P}$	Stérols, glycolipides Protéines phosphorylés

Publication
