

REPUBLICQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCCEN
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Master: 09/02

Inscrip. : 04/02
Date :
Cohort : 30 / M / 09



MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme Master en Biologie Moléculaire et Cellulaire
Option : Biochimie Appliquée

THEME

ETUDE DE L'EFFET DE L'AMPHOTERICINE B LIE A UN ESTER D'ACIDE
GRAS SUR LES CELLULES FONGIQUES
« *Candida albicans* »

Présentée par : M^{lle} BELARBI Awatif

Soutenu le 18/11/2009

Devant le Jury composé de



M ^r F. LAHFA	Chargé de cours- Université de Tlemcen	Président du jury
M ^r R. DJAZIRI	Maitre de conférences- Université de Tlemcen	Examineur
M ^r M. A BEDRANE	Chargé de cours- Université de Tlemcen	Encadreur

Année Universitaire : 2009-2010

Remerciment



Ce travail a été entrepris aux laboratoires : « Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique » du département de Biologie Moléculaire et Cellulaire sous la direction de Monsieur BOUCHERIT K., Maître assistant Chargé de cours au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen. Et au niveau du laboratoire de « Catalyse et chimie organique » sous la direction de Monsieur BACHIR R., professeur au département de Chimie, Université ABOU BEKR BELKAID Tlemcen.

Je tiens à témoigner ma profonde et respectueuse gratitude à Monsieur BEDRANE M. A., Chargée de cours au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen. Je le remercie vivement pour avoir accepté mon encadrement, pour son suivi régulier, pour ses encouragements et sa grande bienveillance, qu'il n'a cessé de prodiguer tout au long de ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur LAHFA F., Chargée de cours au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury, et qui à toujours su prendre le temps de m'écouter, de mon conseiller, je ne saurais trouver les mots justes pour lui exprimer toute ma gratitude, mais qu'il trouve dans ces quelques lignes une marque de respect et l'expression de mon admiration.

Je voudrais adresser mes remerciements à Monsieur DJIZIRI R., Maître de conférence au département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Tlemcen, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail, je tiens à remercier également pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée et je vous prie de trouver ici l'expression de mon profond respect.

Je n'oublierai sans doute pas de remercier Monsieur KARA-MOSTEFA. B Maître de conférences de classe A, au département de Chimie, Université de Tlemcen, qui m'a accueilli dans son laboratoire.

Je tiens à assurer ma profonde reconnaissance à Monsieur BENABDALLAH M. Doctorant en Chimie à l'université de Tlemcen, et Mademoiselle KIBOU Z., Magister en Chimie à l'université de Tlemcen pour leur aide précieuse.

Dédicaces

Avec l'aide de dieu le tout puissant, nous avons pu achever ce modeste travail que je dédie:

A mon cher père, à qui je ne saurais jamais comment remercier assez de m'avoir donné le meilleur de lui même. Que dieu nous le protégé et nous le garde.

A ma très chère mère, en témoignage de son amour, sa grande tendresse ainsi que l'aide qu'elle ma porté pour me facilité la tache ; elle est assurée de ma tendre reconnaissance. Que dieu nous la protège et nous la garde.

À mes sœurs et mes frères.

A toute mes amies.

A tous ceux qui un jour ont compté dans ma vie.



Awatif



Liste des Abréviations

AmB	: Amphotéricine B.
A	: Absorbance.
<i>C.albicans</i>	: <i>Candida albicans</i> .
C.C.M	: Chromatographie sur couche mince.
°C	: Degré Celsius.
DMF	: Diméthyle formamide.
DMSO	: Diméthyle sulfoxyde.
D.O	: Densité optique.
g/mol	: Gramme par mole.
HDL	: Lipoprotéines à haut densité.
K ⁺	: Potassium.
LDL	: Lipoprotéines à bas densité.
M	: Molaire.
mg/ml	: Milligrammes par millilitre.
ml	: Millilitre.
Na ⁺	: Sodium.
nm	: Nanomètres.
µg/ml	: Microgramme par millilitre.
λ	: Longueur d'onde.
pH	: Potentiel hydrogène.
%	: Pourcentage.
Rf	: Rapport frontale.
S.U.V	: Vésicules unilamellaires de petite taille.

Liste des Figures

Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1 : Structure de l'amphotéricine B	4
Figure 2 : Représentation schématique des pores transmembranaires formés par l'interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol des cellules animales.....	8
Figure 3 : Représentation schématique des pores transmembranaires formés par l'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol des membranes fongiques.....	8
Figure 4 : Structure de la capsorbine.....	15

Deuxième partie : MATERIEL & METHODES

Figure 5 : Schéma d'extraction sous reflux.....	19
Figure 6 : Dessin d'une chromatographie sur colonne	21
Figure 7 : Séparation des pigments par chromatographie sur colonne.....	22
Figure 8 : Culture et mesure de croissance de <i>C.albicans</i>	24

Troisième partie : RESULTATS & DISCUSSION

Figure 9 : Chromatogramme d'extrait brut du paprika.....	26
Figure 10 : Chromatogramme des extraits.....	28
Figure 11 : Spectre d'absorption l'extrait brut du paprika	29
Figure 12 : Spectre d'absorption de la capsorbine.....	29
Figure 13 : Effet d'ester d'acide gras de la capsorbine sur la croissance de <i>C.albicans</i>	31
Figure 14 : Effet de doses croissantes d'amphotéricine B complexée à l'ester d'acide gras de la capsorbine chez <i>C.albicans</i>	33
Figure 15 : Effet de la préincubation de l'amphotéricine B avec l'ester d'acide gras de la capsorbine sur son efficacité chez <i>C.albicans</i>	35



Liste des Tableaux

Première partie : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I : *Structure chimique de l'amphotéricine B et quelques de ses dérivés..... 9*

Deuxième partie : MATERIEL & METHODES

Tableau II : *Les rapports frontaux (Rf) des composés de l'extrait de paprika..... 27*

Tableau III : *Les rapports frontaux (Rf) des fractions récupérées de paprika..... 28*

Première partie : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....	2
I. MECANISMES D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B.....	5
I.1 Perméabilité transmembranaire aux ions	6
II. NOUVELLES FORMULATIONS DE L'AMPHOTERICINE B.....	9

Deuxième partie : MATERIEL & METHODES

I. MATERIEL.....	17
I.1 Matériel végétale.....	17
I.2 Les cellules de <i>Candida albicans</i>	17
I.3 Milieu sabouraud.....	18
I.4 Solution d'amphotéricine B.....	18
II. METHODES.....	18
II.1 Extraction et identification des pigments majoritaires du paprika.....	18
II.1.1 Extraction des pigments du paprika sous reflux.....	18
II.1.1.1 Principe.....	18
II.1.1.2 Mode opératoire.....	19
II.1.2 Identification d'extrait de paprika par CCM.....	20
II.1.2.1 Principe.....	19
II.1.2.2 Mode opératoire.....	20
II.2 Séparation et purification d'ester d'acide gras, la capsaïcine par chromatographie sur colonne.....	20
II.2.1 Principe.....	20
II.2.2 Réactifs utilisés.....	20
II.2.3 Mode opératoire.....	21
II.3 Balayage spectrale de l'extrait brut et de l'extrait purifié.....	22

II.3.1 Principe.....	22
II.4 Préparation de l'extrait purifié.....	22
II.5 Culture et mesure de la croissance.....	23
II.5.1 Culture en erlenmyer.....	23
II.5.2 Mesure de la croissance.....	23

Troisième partie : RESULTATS & DISCUSSION

I. Identification d'extrait brut du paprika par CCM.....	26
II. Séparation et purification d'ester d'acide gras de la capsorbine	27
III. Balayage spectrale de l'extrait brut et purifié.....	28
IV. Etude de l'effet de l'ester d'acide gras, capsorbine sur l'amélioration thérapeutique de l'amphotéricine B.....	30
IV.1 Effet d'ester d'acide gras, capsorbine sur la croissance sur la croissance de <i>C. albicans</i>	30
IV.2 Effet de dose croissantes d'amphotéricine B complexée à l'ester d'acide gras, capsorbine sur la croissance de <i>C.albicans</i>	32
IV.3 Effet de la préincubation de l'amphotéricine B avec l'ester d'acide gras, capsorbine sur son efficacité chez <i>C.albicans</i>	34

Quatrième partie : CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE.....	38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	39

Première partie :

Synthèse Bibliographique

Les infections dues aux levures et champignons sont diverses, restent jusqu'à présent des affections graves, leur fréquence a augmenté de façon considérable. Celles-ci sont classées maintenant au quatrième rang des infections nosocomiales (CARLE S., PHARM B. 2003 ; HULIN A. et coll. 2005).

Cette pathologie change d'aspect et d'importance : allant des formes superficielles (infections cutané-muqueuses) à des formes profondes, viscérales ou invasives nettement plus graves, responsable d'une importante morbidité et mortalité surtout chez les patients atteints des maladies sévères (cancéreux, immunodéprimés par le sida,.....). Leur prise en charge reste complexe, en particulier du fait des difficultés diagnostiques (ANTONIADOU A., DUPONT B. 2005 ; RAYMOND S. et coll. 2008).

Il n'existe pas beaucoup de médicaments antifongiques efficaces. Le traitement antifongique pose de sérieux problèmes dans la mesure où d'une part, l'on ne dispose pas de drogues tout à la fois efficaces et non toxiques, d'autre part, l'augmentation du nombre de résistance aux antifongiques quelles soient intrinsèques ou acquises (DUPONT B., DROUCHET E. 1988 ; NEAL M. 2003).

Ces médicaments antifongiques ont des structures moléculaires et des modes d'action différents et peuvent être classés en fonction de ces deux critères ; selon CLIVE P. et coll., il existe trois grandes classes principales sont les macrolides polyéniques, les azolés et les allylamines (CLIVE P. et coll. 1999 ; FREIMAN A. MD., SASSEVILLE D. 2006).

Depuis plus de trente ans le traitement des infections fongiques systémiques ou profondes reposaient sur l'utilisation des antifongiques polyéniques, et particulièrement l'amphotéricine B, le chef de file des antifongiques, cette molécule garde sa place, grâce à son excellente activité et son large spectre (BOLARD J. et coll. 1997; BINGEN É. et coll. 2000).

L'AmB est un polyène macrolide extrait en 1956 à partir d'une souche *Streptomyces nodosus*. Sur le plan structural l'AmB est une molécule cyclique fermée par une liaison ester interne (cycle lactone). Elle comprend deux parties : une partie apolaire rigide constituée de 7 doubles liaisons conjuguées responsables de la forte lipophilie de la molécule, et une partie polaire comportant un grand nombre de groupe hydroxyles et un sucre aminé (la mycosamine) (**figure 1**) (ANDRES E. et coll. 2000 ; CARINA A. et coll. 2001 ; BOUCHARD E. 2004).

Pour ces principales propriétés physico-chimiques : la présence de deux groupements chargés, un groupement carboxyle ($-\text{COO}^-$) et un groupement amine ($-\text{NH}^{3+}$), confère à la molécule un caractère amphotère. Son poids moléculaire est de 960g/mol.

L'AmB se présente sous la forme d'une poudre jaune, insoluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques; il n'est soluble que dans le Diméthylsulfoxyde DMSO jusqu'à 30-40 mg/ml et le propylèneglycol. Grâce à l'adjonction de sels biliaires (désoxycholate de sodium), elle peut être mise en suspension colloïdale dans l'eau à pH 2 ou 11; la constante d'association désoxycholate amphotéricine B étant faible, au dessous de 0,1mg/ml (ANDRES E. et coll. 2000; BOUCHARD E. 2004). Sa structure apolaire hydrophobe limite la solubilité de l'AmB en phase aqueuse : ainsi, à des concentrations inférieures à 10^{-7}M , elle existe sous forme monomérique, alors qu'à des concentrations supérieures à 10^{-7}M commencent à apparaître des oligomères et des agrégats. A de faibles concentrations (0,3 $\mu\text{g/ml}$), l'amphotéricine B est fongistatique. La lyse cellulaire, ou l'effet fongicide n'est obtenu qu'à des concentrations beaucoup plus élevée (2 $\mu\text{g/ml}$) (KOTLER BRAJTBURG J. et coll. 1979).

Son spectre d'activité s'étend sur la plupart des champignons saprophytes et pathogènes, dont la plupart des *Candida* et des *Aspergillus* et *Cryptococcus neoformans*, d'autant plus qu'elle est active aussi sur les agents responsables des mycoses tropicales (blastomycose, histoplasmosse, sporotrichose...) et les protozoaires (*Trichomonas*, *Leishmania*) (VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE., VANDENBROUCKE JP. 1991; ANDRES E. et coll. 2000).

Bien que l'amphotéricine B soit une molécule très active, mais son utilisation est limitée par des problèmes de solubilité, de stabilité et d'absorption, ce qui induit une toxicité élevée. La toxicité rénale est la complication majeure du traitement se traduisent sur le plan clinique par une diminution de la filtration glomérulaire, et de flux plasmatique rénal conduisant également à une perte de potassium et de magnésium, en plus d'une atteinte tubulaire (BOLARD J. et coll. 1997).

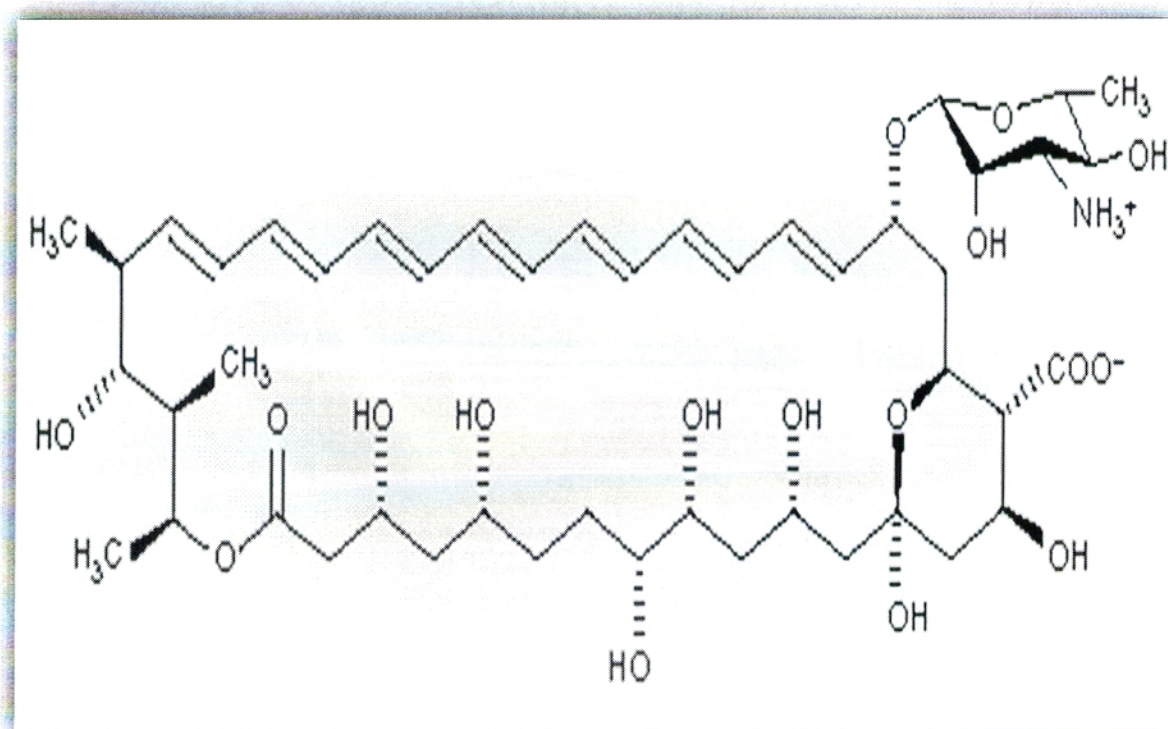


Figure 1. Structure de l'amphotéricine B (BOUCHARD E. 2004).

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

I. MECANISMES D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B

L'amphotéricine B exerce directement sur la cellule fongique, deux types d'effets sont décrits ci-dessous :

- ❖ Des effets membranaires par formation de complexes insolubles avec les stérols de la membrane fongique. La paroi des levures est constituée essentiellement par de l'ergostérol, alors que les cellules humaines contiennent essentiellement du cholestérol. L'amphotéricine B a une affinité supérieure pour l'ergostérol que pour le cholestérol. Il en résulte une altération de la perméabilité cellulaire et la fuite d'ions potassium, qui suivie par la mort de la cellule fongique (THOMAS X. et coll. 2000).
- ❖ Des effets métaboliques : les polymères provoquent une augmentation de la consommation d'oxygène, une altération de la transformation de l'ATP (Adénosine Tri Phosphate) en ADP (Adénosine Diphosphate). Ils diminuent la synthèse des composés azotés et glucidiques, et inhibent la respiration conduisant à la mort de la cellule fongique (VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE., VANDENBROUCKE JP. 1991).

Alors que l'accent avait été longtemps mis sur la formation de pores transmembranaires comme étant à l'origine de l'action de l'amphotéricine B au niveau cellulaire, au cours des années 80, on attribua un certain rôle à la peroxydation lipidique induite par le médicament. Actuellement, l'internalisation de l'antibiotique est apparue sur le devant de la scène alors que de nouveaux résultats d'études physico-chimiques conduisaient à reconsidérer les modèles des pores transmembranaires (BOLARD J. et coll. 1997).

I. 1. Perméabilité transmembranaire aux ions

Depuis l'observation, dans les années 70, de l'induction par l'amphotéricine B d'une perméabilité transmembranaire aux ions, de très nombreuses études ont été réalisées pour préciser la nature de cet effet (BOLARD J. 1986 ; KERRIDGE D. 1986). Cet effet a d'abord été démontré sur des membranes artificielles puis, rapidement, sur des cellules fongiques ou animales et on la relié à la formation de canaux transmembranaires. L'activité de ces canaux est apparue modulée par le fait que l'amphotéricine B inhibe des pompes membranaires comme la Na^+/K^+ ATPase dans les cellules de mammifères ou la H^+ ATPase dans les cellules fongiques. L'importance de la déplétion du potassium intracellulaire et d'autres éléments essentiels pour la vie de la cellule, induite par l'amphotéricine B, a conduit à rechercher, dans ces flux, l'origine de l'activité antifongique et de la toxicité.

Les nombreuses études physico-chimiques faites sur des membranes modèles ont montré le rôle déterminant du stérol membranaire dans la sélectivité de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules fongiques. Les bactéries, dépourvues de stérol, ne sont pas sensibles à l'action de l'amphotéricine B. Au début des années 80 un consensus semblait être établi pour considérer les canaux comme :

- ❖ Etant formés de complexes amphotéricine B-stérol, assemblés perpendiculairement à la surface de la membrane de manière à former des cylindres transperçant la moitié ou la totalité de la bicouche lipidique formant la membrane ;
- ❖ Etant sélectifs pour les cations monovalents si l'amphotéricine B était ajoutée d'un seul côté de la membrane, ce qui est d'ailleurs toujours le cas lorsqu'on effectue des études d'activité intracellulaire.

Ce modèle ne tenait pas compte du fait que l'interaction amphotéricine B-stérol dans les membranes avait été montrée pour l'ergostérol mais pas pour le cholestérol. Par ailleurs, il est apparu que l'amphotéricine B n'induisait de perméabilité aux ions potassium, au travers des membranes contenant du cholestérol, qu'à partir d'un certain seuil de concentration. Or, en solution aqueuse, elle se présente sous forme d'un mélange de monomères, d'espèces oligomériques solubles et d'agrégats insolubles (MAZERSKI J., BOROWSKI E. 1990). Ce seuil de concentration toxique vis-à-vis des membranes contenant du cholestérol correspond à l'apparition des espèces oligomériques solubles.

À l'inverse, l'affinité de l'amphotéricine B pour les stérols étant beaucoup plus forte pour l'ergostérol que pour le cholestérol, la toxicité vis-à-vis des membranes contenant de l'ergostérol est observée à des concentrations auxquelles l'amphotéricine B est entièrement sous forme monomérique. Elle serait alors capable de s'associer aux molécules d'ergostérol présentes dans la membrane (cellules fongiques), ce qui conduirait à la formation de canaux. En revanche, l'amphotéricine B ne s'associerait pas au cholestérol des membranes (cellules de mammifères), mais les canaux seraient alors formés d'oligomères d'amphotéricine B sans participation directe du cholestérol (BOLARD J. et coll. 1991). Alors que les monomères d'amphotéricine B sont trop courts pour être toxiques, ils peuvent, en s'associant tête-bêche, former des dimères ayant une plus grande longueur. L'organisation supramoléculaire de la molécule dans l'eau conditionnerait donc sa toxicité vis-à-vis de la membrane. Le rôle essentiel du cholestérol serait de favoriser l'insertion des dimères d'amphotéricine B dans la membrane en modifiant la structure physique des phospholipides. Le cholestérol participerait indirectement à la formation des pores (*figure 2*) (JOLY V. et coll. 1992).

La (*figure 3*) représente une version du modèle classique où l'amphotéricine B interagit avec l'ergostérol (membranes des cellules fongiques). Le complexe amphotéricine B - ergostérol s'assemble perpendiculairement à la surface de la membrane, de manière à former des pores hydrophiles transperçant la bicouche lipidique.

L'induction de la fuite de potassium est la seule manifestation bien analysée correspondant à la plus grande sensibilité des cellules fongiques à l'action de l'amphotéricine B que des cellules de mammifères (BOLARD J. et coll. 1997).

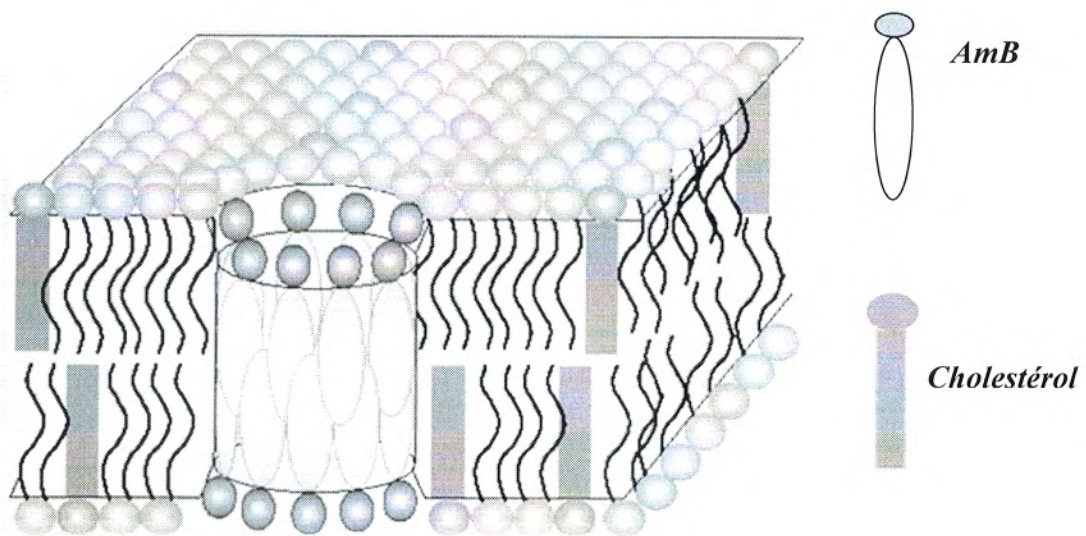


Figure 2. Représentation schématique des pores transmembranaires formés par l'interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol des cellules animales (BRAJTBURG J., BOLARD J. 1996).

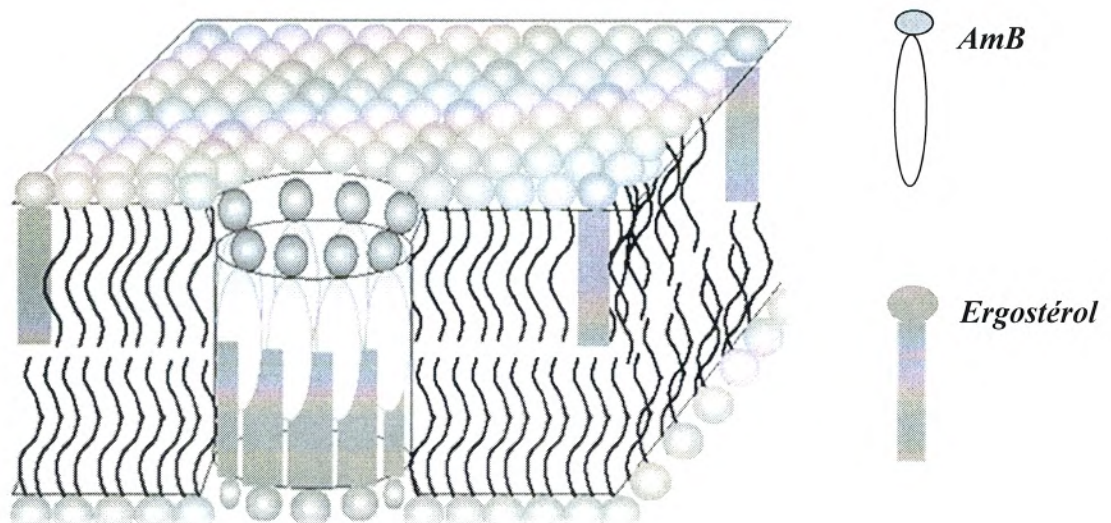


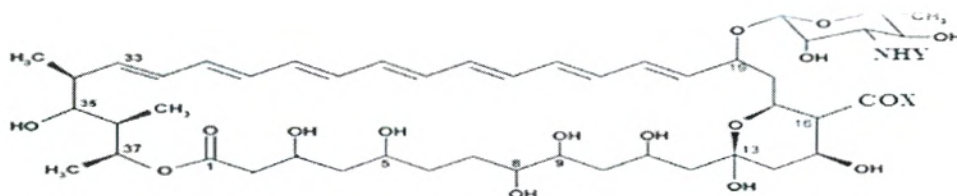
Figure 3. Représentation schématique des pores transmembranaires formés par l'interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol des membranes fongiques (BRAJTBURG J., BOLARD J. 1996).

II. NOUVELLES FORMULATIONS DE L'AMPHOTERICINE B

La toxicité de l'AmB a conduit, depuis plusieurs années, à rechercher une augmentation de son index thérapeutique soit en modifiant sa structure chimique, soit en modulant son environnement physico chimique, soit en l'associant à des détergents ou à des lipides.

En ce qui concerne les dérivés de l'AmB, plusieurs auteurs (SLISZ M. et coll. 2004) ont réalisé des recherches dont le but d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la molécule de l'AmB avec moins d'effets toxiques, ces dérivés ont été obtenus par modification chimique des groupes polaire ionisable de la molécule d'AmB comportant le groupe carboxylique (COO⁻) attaché à l'anneau de macrolide et le groupe amine (NH³⁺) de la mycosamine. Afin d'augmenter sa solubilité en milieu aqueux. Le (tableau I) représente quelques dérivés de l'AmB.

Tableau I. Structure chimique de l'amphotéricine B et quelques de ses dérivés (SLISZ M. et coll. 2004).



N°	Abréviations	Composition	X	Y
1	AMB	Amphotéricine B	OH	H
2	AME	Amphotéricine B méthylester	OCH ₃	H
3	AMA	Amphotéricine B 3-(N', N'-diméthyl-amino) propylamide	NH(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	H
4	Ac AMB	N-acetyl amphotéricine B	OH	COCH ₃
5	Ac AME	N-acetyl amphotéricine B méthylester	OCH ₃	COCH ₃

Les problèmes de solubilité, d'absorption et de toxicité limitent l'utilisation de l'AmB en milieu clinique, pour cette raison une des stratégies proposée est l'association de la molécule AmB à des détergents qui conduit à la constitution des micelles mixtes : détergents-AmB. Ce complexe, tel que l'amphotéricine B fungizone®, (nom commerciale de l'AmB injectable) devient moins toxique que l'amphotéricine B pure, qui correspond à ce type des formulations : mélange d'AmB et de désoxycholate (LASIC D. D. 1992).

D'autres auteurs (HAY RJ. 1994 ; DIX SP. et WINGARD JR. 1996 ; SWENSON CE. et coll. 1998 ; WONG-BERINGER A. et coll. 1998 ; BOSWELL GW. et coll. 1999), ont incorporé l'AmB dans des molécules lipidiques, pour aboutir à des formulations liposomales afin d'en améliorer la tolérance rénale : AmBisome®, Abelcet®, Amphocil®.

❖ Amphotéricine B incorporée dans des liposomes (AMBISOME®) :

L'Ambisome correspond à une formulation lipidique d'amphotéricine B incorporée dans des liposomes unilamellaires de petite taille (S.U.V). Ces liposomes sont constitués de phosphatidylcholine hydrogénée, de cholestérol et de distéaroyl phosphatidylglycérol. Ils forment des sphères de 80 nm de diamètre. Dans l'organisme, l'amphotéricine B liposomale se comporte différemment de l'amphotéricine B conventionnelle (HAY RJ. 1994 ; WONG-BERINGER A. et coll. 1998 ; BOSWELL GW. et coll. 1999).

❖ Amphotéricine B en complexe lipidique (Abelcet®) :

L'amphotéricine B en complexe lipidique (amphotericin B lipid complex [ABLC]), commercialisée sous le nom d'Abelcet®, est une suspension d'amphotéricine B et de phospholipides (dimyristoyl phosphatidylcholine et dimyristoyl phosphatidylglycérol) (DIX SP. et WINGARD JR. 1996). Ces particules forment des rubans de 1 600 à 6 000 nm de long. L'ABLC est dégradée par les phospholipases cellulaires des macrophages et par celles des agents fongiques, ce qui permet une libération progressive d'amphotéricine B (SWENSON CE. et coll. 1998) et donc les concentrations rénales d'amphotéricine B sont réduites avec l'ABLC par rapport à l'amphotéricine B conventionnelle.

❖ Amphotéricine B en dispersion colloïdale (Amphocil®) :

L'amphotéricine B en dispersion colloïdale (amphotericin B colloidal dispersion [ABCD]), commercialisée sous le nom d'Amphocil ® en Europe et d'Amphotec® aux États-Unis, est composée d'amphotéricine B liée à du sulfate de cholestérol, selon un mélange équimolaire

(STEVENS DA. 1994 ; HERBRECHT R. et coll. 1999). Ces particules ont une forme de disque de 120 à 140 nm de diamètre et de 4 nm d'épaisseur. Les effets secondaires immédiats de l'ABCD sont superposables à ceux de l'amphotéricine B aussi bien en termes de fréquence que de sévérité, il faut surtout insister sur la néphrotoxicité, qui est moindre (HERBRECHT R. et coll. 1999 ; GURWITH M. et coll. 1999).

Ces trois formulations lipidiques permettent une excellente diffusion tissulaire de l'AmB, et présentent un meilleur profil de tolérabilité c.-à-d. une meilleure tolérance clinique et biologique, avec la réduction des effets secondaires durant le traitement, et une toxicité rénale réduite par rapport à l'amphotéricine B conventionnelle (BRUNO P., JEAN-PAUL L. 2000). Bien qu'elle soit efficace, ces trois formulations lipidiques de l'AmB restent une alternative onéreuse, surtout dans les pays en voie de développement où les mycoses constituent un problème majeur par leur fréquence et leur gravité. De ce fait plusieurs solutions ont été proposées au niveau de laboratoire de recherches antibiotiques et antifongiques physico-chimiques : synthèse et activités biologiques, Faculté des sciences université ABOU BEKER BELKAID Tlemcen, toujours dont le but de garder l'efficacité de la molécule mère AmB et de diminuer sa toxicité. Pour ce faire, des modulations de certains paramètres physico-chimiques et/ou de vectorisation de l'AmB par des lipoprotéines sériques ont été réalisées.

1. La modification des paramètres physico-chimiques

❖ pH :

Des études réalisées par (BOUCHERIT O. Z. 1995) montrent qu'à pH acide l'effet protecteur des lipoprotéines envers les globules rouges augmente significativement, alors que l'utilisation de pH fortement alcalin entre 10 et 10,8 ne réduit pas significativement l'activité antifongique vis-à-vis du *Candida albicans* (BELKHERROUBI L. 2001).

Pour des solutions préparées à des pH croissant (de pH=3 à pH=10,8), la réduction de la toxicité de l'amphotéricine B n'est observé qu'à pH=5,4 et pH=10,8 (BENHAMOU F. ; BENMOSTEFA S. 2005). D'autres études (BELHACHEMI C.; BENABLEKADER H. 2008) montrent que la préparation de solution de l'AmB à concentration de 10^{-4} M dans le tampon acide acétique/acétate de sodium à concentration de 0,1M et à pH=5,4 est moins toxique que celle préparée dans le tampon carbonate/bicarbonate à pH= 10,8.

❖ Température :

SOULIMANE N. 2001, montre que le préchauffage de la solution mère d'amphotéricine B de concentration de 10^{-4} M à 70°C pendant 20 mn permet de réduire la toxicité de l'AmB vis-à-vis des cellules hôtes. Ceci concorde avec les résultats de (GABORIAU F. et coll. 1997 ; PETIT C. et BOLARD J. 1999).

❖ Concentration de la solution mère d'amphotéricine B :

L'augmentation de la concentration de la solution mère d'amphotéricine B ne réduit pas son activité vis-à-vis du *Candida albicans* (BELKHERROUBI L. 2001). Cependant, in vivo, (SOULIMANE N. 2001) montre que la concentration de la solution mère de l'AmB 10^{-3} M, est plus toxique que la concentration de la solution mère 10^{-4} M. Ceci est lié probablement à l'instabilité des formes insolubles de l'AmB dans l'organisme hôte ; (l'amphotéricine B à 10^{-3} M est plus riche en formes oligomériques toxiques pour les cellules animales, que la solution mère 10^{-4} M).

❖ La nature du solvant :

La nature du solvant joue un rôle important dans le degré de la toxicité de l'amphotéricine B. Les résultats des auteurs (BENYAKOUB F., HACHEMI N. 1998; BELKHERROUBI L. 2001) montrent que le solvant qui permet une bonne activité de l'amphotéricine B est le DMSO puisqu'il favorise la formation des formes solubles qui sont les formes actives contre *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans*. Le même effet est observé avec l'amphotéricine B désoxycholate préparé dans le sérum physiologique. Par contre l'AmB préparé dans l'éthanol à 30% s'avère plus toxique (SOULIMANE N. 2001). Et d'autre étude (BOUANANE S. 2001) montre que l'amphotéricine B désoxycholate solubilisée dans le DMSO est moins toxique que celui préparé dans le DMF.

2. La complexion de l'amphotéricine B aux lipoprotéines sériques

Les lipoprotéines sériques sont des macromolécules amphiphiles composées d'une partie protéique, apolipoprotéine, et d'une partie lipidique. L'association des lipoprotéines sériques à l'AmB montre une réduction de la toxicité vis à vis des globules rouge humains (BOUCHERIT O. Z. 1995) et sur les cellules rénales (WASAN et coll. 1994). En ce qui concerne l'effet de concentrations croissantes de lipoprotéines sériques sur l'amplitude de la toxicité d'amphotéricine B, les résultats (BEDRANE M. A. 1997) montrent que, lorsque les concentrations d'AmB sont de l'ordre de $1\mu\text{g/ml}$, l'addition de lipoprotéines sériques dans le

milieu d'essai contenant les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* induit un effet protecteur relatif (50% de fuite potassique par rapport au contrôle). Des les concentrations d'AmB de l'ordre de 2 µg/ml, les lipoprotéines sériques donne un effet protecteur transitoire. Les lipoprotéines légères, LDL montrent par ailleurs un effet protecteur significativement moins important que celui des lipoprotéines lourdes, HDL. Autres études (BEDRANE M. A. 1997) exposent que l'addition de l'amphotéricine B libre dans le milieu de cellules de *saccharomyces cerevisiae*, induit une fuite potassique significative, des les concentrations de l'ordre de 0,5µg/ml. Un maximum de fuite potassique (16% de K⁺ retenu par rapport au contrôle), n'est atteint qu'à partir de concentration d'amphotéricine B de l'ordre de 5µg/ml, des les cinq premières minutes d'incubation à 37°C. Quelque soit la concentration de la solution mère, la dose injectée et le solvant utilisé : l'addition des HDL a l'AmB préchauffée ou non, réduit sa toxicité en inhibant son interaction avec les cellules hôtes. Cependant l'addition des LDL induit une toxicité plus élevée que celle induite par l'AmB (présence des récepteur qui fixe le complexe AmB-LDL et l'internalise au niveau de la cellule) (SOULIMANE N. 2001).

En ce qui nous concerne, l'objectif principal de notre étude consiste en une estimation de la cytotoxicité de l'amphotéricine B sous sa forme libre et complexée a un ester d'acide gras vis-à-vis de *Candida albicans*, modèle de levures.

Dans le cadre prometteur d'incorporation de l'amphotéricine B dans des systèmes vecteurs, notre choix a été orienté vers l'utilisation d'un ester d'acide gras polaire pour des raisons, d'une part pratiques de moyens disponibles et d'autre part, vu l'hydrophobicité de l'AmB souvent incriminée de la cytotoxicité des cellules hôtes.

Dans cette optique, nous allons étudier les effets de cet ester d'acide gras sur la toxicité de l'AmB vis à vis du *Candida albicans*. L'ester d'acide gras en question est la capsorbine, caroténoïde naturel extrait du poivron rouge (paprika, *Capsicum annuum*), de structure chimique particulière (voir **figure 4**) (CAPON, COURILLEAU. 2007). Ces molécules peuvent faciliter l'incorporation de l'AmB, ce qui rend la molécule d'amphotéricine B plus soluble dans les milieux biologiques et permet aussi un changement dans sa distribution dans l'organisme, voire une réduction de sa concentration thérapeutique et par conséquent une efficacité sélective vis-à-vis des levures.

Pour ce faire, notre travail va comporter les points suivant :

- Extraction des composés majoritaires de paprika par systèmes de chauffage à reflux dans les solvants organiques.
- Purification de la molécule d'intérêt par des méthodes chromatographiques.
- Effet de l'AmB libre et complexée aux esters d'acides gras sur la croissance de *Candida albicans*.

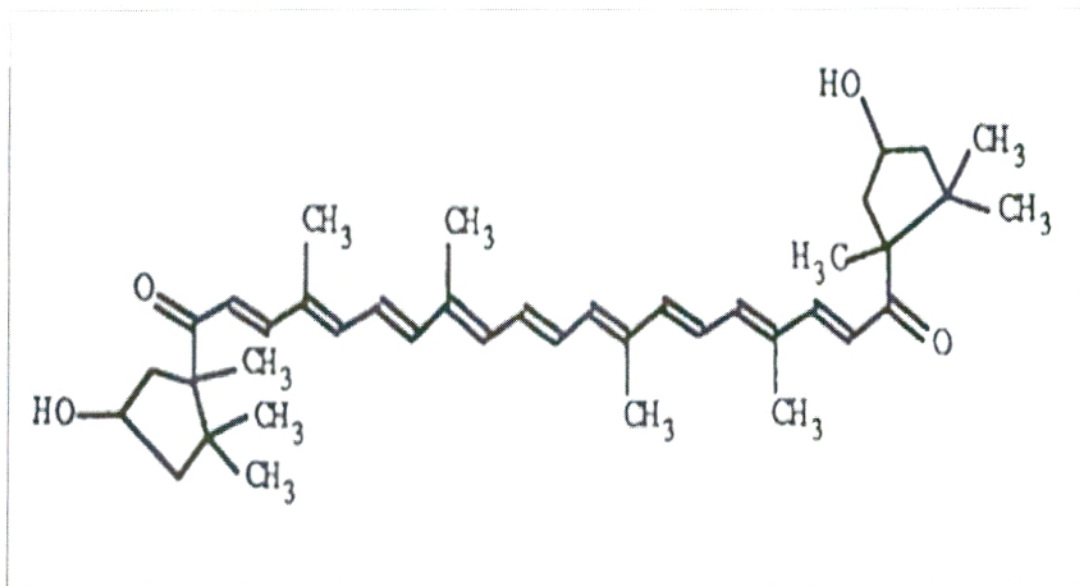


Figure 4. Structure de la capsorbine (CAPON, COURILLEAU. 2007).

Deuxième partie :

Matériel et Méthodes

Jusqu'à présent l'amphotéricine B, reste l'antifongique de choix dans le traitement des infections fongiques systémiques. Cependant, la néphrotoxicité et les effets secondaires limitent souvent son emploi (DERAY G. et coll. 2002), ce qui justifie les recherches visant à trouver des nouvelles formulations d'amphotéricine B aux performances améliorées son index thérapeutique par une réduction de la toxicité aiguë et une conservation de l'efficacité antifongique. Dans le même contexte, nous avons axé notre travail sur l'étude de l'effet d'un ester d'acide gras sur l'efficacité d'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*, modèle de levures.

MATERIEL ET METHODES

Le présent travail a été effectué au niveau de deux laboratoires : « Antibiotiques, Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique » et « Catalyse et Chimie organique » de la Faculté des Sciences, Université Abou Bekr BELKAID, Tlemcen.

I. MATERIEL

I.1 Matériel végétal

Il s'agit du paprika; une poudre de poivrons rouges déshydratés. Les poivrons sélectionnés à partir de l'espèce *Capsicum annuum* de la famille des *Solanaceae*, originaire de l'Amérique du sud et de l'Amérique centrale. En effet, la poudre du paprika renferme de nombreux composants chimiques. Les principaux constituants sont en général des esters de capsanthine et de capsorbine (GOFFART A. et coll. 2002).

Au cours de ce travail, nous avons utilisé l'ester d'acide gras de la capsorbine ($C_{40}H_{56}O_4$), polaire, caractérisé par une structure chimique particulière (**figure 4**) (CAPON, COURILLEAU. 2007).

I.2 Les cellules de *Candida albicans*

Pour notre étude, nous avons utilisé le *Candida albicans* ATCC 10231 (American Type Culture Collection) provenant de l'institut Pasteur de Paris. Cette souche est maintenue par repiquage successif dans la gélose sabouraud inclinée et conservée à 4°C.

I. 3 Milieu sabouraud

La culture est menée sur le milieu sabouraud liquide dont la composition est la suivante :

- Glucose (Riedel-de Haen)20g/l.
- Peptone (Fluka –Biochemika).....10g/l.
- Extrait de levure (Fluka –Biochemika).....3g/l.

Le pH du milieu est ajusté à 5,6. Le milieu est stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes (KOENIG H. 1995).

I.4 Solution d'amphotéricine B

Nous avons utilisé l'amphotéricine B pure provenant du laboratoire SIGMA pour la préparation de la solution mère d'amphotéricine B à une concentration finale de 5µg/ml dans le solvant organique DMSO.

II. METHODES

II.1 Extraction et identification des pigments majoritaires du paprika

Les colorants de la poudre du paprika sont extraits par un solvant organique. L'extrait est ensuite analysé par une chromatographie sur couche mince.

Le dichlorométhane ($\text{CH}_2\text{-Cl}_2$) est utilisé comme solvant pour l'extraction et comme éluant pour la chromatographie.

II.1.1 Extraction des pigments du paprika sous reflux

II.1.1.1 Principe d'extraction

L'extraction par reflux est une technique consistant à transférer une espèce chimique d'une première phase, liquide ou solide, vers une deuxième phase, généralement liquide constituée par un solvant. Ce montage permet de chauffer un mélange réactionnel en évitant de perdre une partie des réactifs lorsqu'ils entrent en ébullition. Le rôle du réfrigérant à boules est de recondenser les vapeurs qui se forment grâce à une circulation d'eau froide constante entrant par le bas du réfrigérant. Ainsi les réactifs qui s'évaporent sous l'action de la chaleur retournent dans le ballon (*figure 5*) (BAGARD S. et SIMON N. 2008).

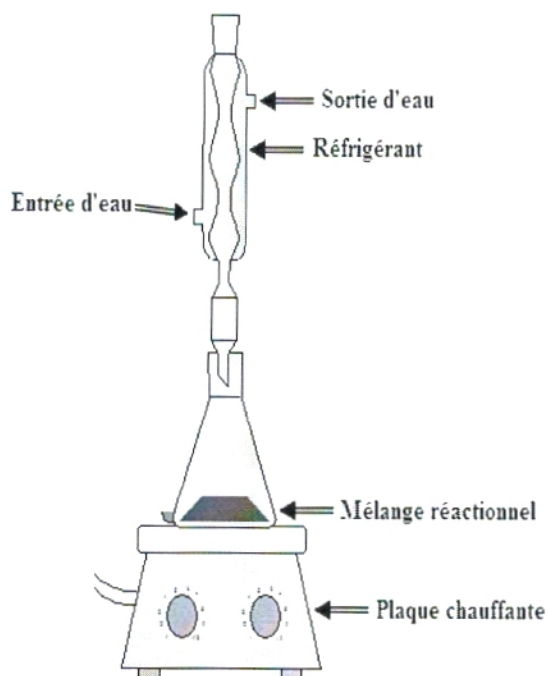


Figure 5. Schéma d'extraction sous reflux.

II.1.1.2 Mode opératoire

La démarche de l'extraction des composés majoritaires du paprika par le système de chauffage à reflux dans le solvant organique (dichlorométhane) est la suivante :

- Nous plaçons dans un ballon de 50ml, 1g du paprika commercial et 30 ml de dichlorométhane, puis nous chauffons à reflux pendant 30 minutes à une température de 41°C;
- L'extrait obtenu est filtré sous vide grâce à un filtre büchner. La solution obtenue renferme tout les pigments de paprika;
- Le filtrat est ensuite concentré et évaporé par un rotavapeur.

II.1.2 Identification de l'extrait du paprika par chromatographie sur couche mince

II.1.2.1 Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode physique de séparation basée principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant (le dichlorométhane), qui progresse le long d'une phase stationnaire (gel de silice fixée sur une feuille semi-rigide en plastique). Après avoir déposé l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant et leurs affinités vis-à-vis des deux phases (ANTONOT E. et MARCHAL R. 1998).

II.1.2.2 Mode opératoire

- Dépôt de l'extrait obtenu sur une plaque de chromatographie de gel de silice;
- Saturation de la cuve (éluant : dichlorométhane) ;
- Révélation et calcul de Rf.

$$R_f = \text{distance parcourue par le soluté} / \text{distance parcourue par le front du solvant}$$

II.2 Séparation et purification de l'ester d'acide gras de la capsorbine par la chromatographie sur colonne

II.2.1 Principe

La chromatographie sur colonne est une technique physique de séparation, elle permet en effet la séparation des constituants d'un mélange. Les constituants sont entraînés vers le bas de la colonne à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant (la phase stationnaire) et leur solubilité dans l'éluant (la phase mobile) (ANTONOT E. et MARCHAL R. 1998).

II.2.2 Réactifs utilisés

Les principaux éléments de la séparation chromatographique sur colonne sont:

- La colonne chromatographique : burette de 40cm de longueur et de 3cm de diamètre ;
- La phase stationnaire : le gel de silice 63-200 ;
- L'échantillon : l'extrait du paprika concentrée ;

➤ La phase mobile : l'éluant « dichlorométhane ».

II.2.3 Mode opératoire

Pour séparer la capsorbine des autres pigments contenus dans l'extrait brut du paprika par chromatographie sur colonne, nous avons préparé dans un premier temps une colonne à gel de silice, puis nous avons déposé notre échantillon en haut de la colonne (*figure 6*).

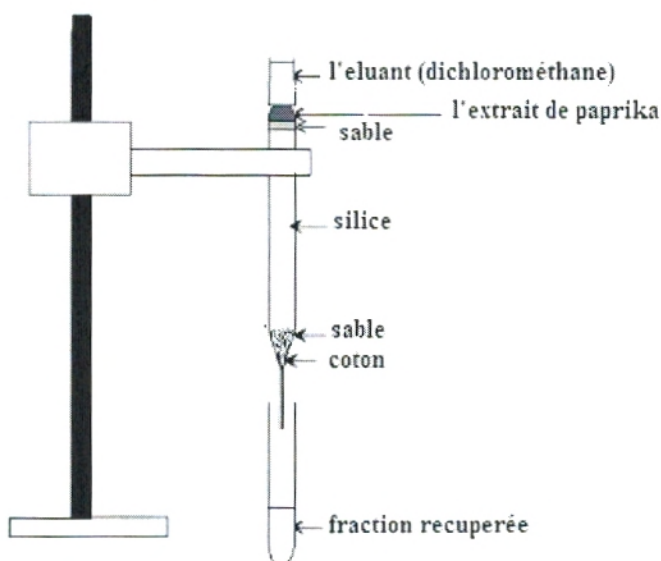


Figure 6. Schéma de la chromatographie sur colonne.

Nous avons laissé couler le dichlorométhane pour récupérer les fractions apolaires et les fractions moyennement polaires qui sont respectivement les caroténoïdes et la capsanthine. L'ajoute de solvant de polarité élevé qui est le méthanol permet de récupérer la fraction polaire (la capsorbine) qui a fait l'objet de notre étude (*figure 7*). Le solvant contenant la fraction d'intérêt est évaporé par un rotavapeur à une température de 55°C.

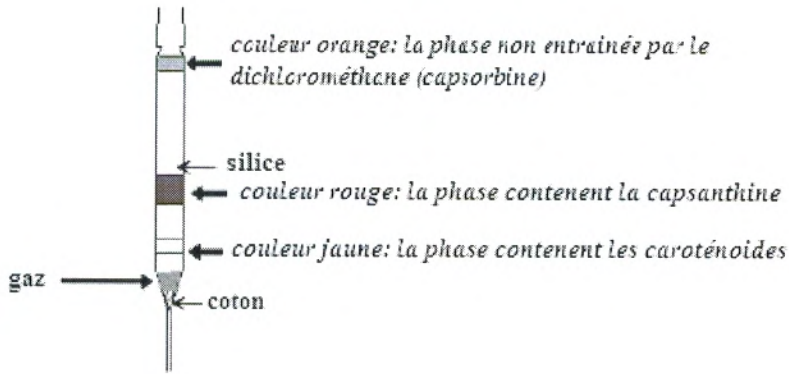


Figure 7. Séparation des pigments de paprika par chromatographie sur colonne (FGHIRE R. et coll. 2008).

Les fractions obtenues séparément par chromatographie sur colonne, sont ensuite identifiées par chromatographie sur couche mince.

II.3 Balayage spectrale de l'extrait brut et de l'extrait purifié (capsorbine)

Dans le but de vérifier la pureté d'ester d'acide gras, la capsorbine nous avons mesuré les absorbances par un spectrophotomètre UV/visible à des longueurs d'ondes allant de 350nm à 470nm des extraits bruts et purifiés.

II.3.1 Principe

Le principe est basé sur la recherche des absorbances correspondants à chaque valeur des longueurs d'ondes utilisées. Nous avons utilisé pour cela un système de type monochromateur pour fixer la longueur d'onde et un photomultiplicateur afin d'enregistrer l'absorbance correspondante. Il suffit de faire varier la longueur d'onde sur une plage adéquate pour obtenir un spectre (POLSTER et LADMANN 1989).

Remarque : Avant de mesurer l'absorbance de l'extrait brut ou purifié pour chaque longueur d'onde, il est nécessaire de faire un blanc qui est le dichlorométhane.

II.4 Préparation de l'extrait purifié ; l'ester de l'acide gras de la capsorbine

Après l'extraction et purification de la molécule d'intérêt, nous avons préparé une solution mère d'esters d'acide gras, la capsorbine à 5µg/ ml dans le solvant organique DMSO.

II.5 Culture et mesure de la croissance

II.5.1 Culture en erlenmeyer

Les cellules de *C.albican* sont incubées dans le milieu de culture sabouraud liquide dans un incubateur de paillasse (Orbital Shaker) à 37°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minutes pendant 6 heures (1^{ère} préculture). Deux à trois précultures sont généralement effectuées dans 10ml de sabouraud liquide et incubées dans l'étuve à 37°C pendant 18 heures.

Environ 1ml de la dernière préculture est introduite dans des erlens stériles, contenant 100ml du milieu de culture sabouraud liquide, en absence ou en présence de solutions antifongiques et ou de solutions d'ester d'acide gras de capsorbine. L'incubation des erlens est réalisée dans un incubateur de paillasse (Orbital Shaker) à 37°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minutes.

II.5.2 Mesure de la croissance

Le temps t_0 de la croissance cellulaire correspond au moment de l'addition de l'inoculum. Nous avons effectué des prélèvements toutes les 60 minutes. La mesure de la croissance de *C.albicans* se fait par des mesures de la densité optique à une longueur d'onde de 610 nm.

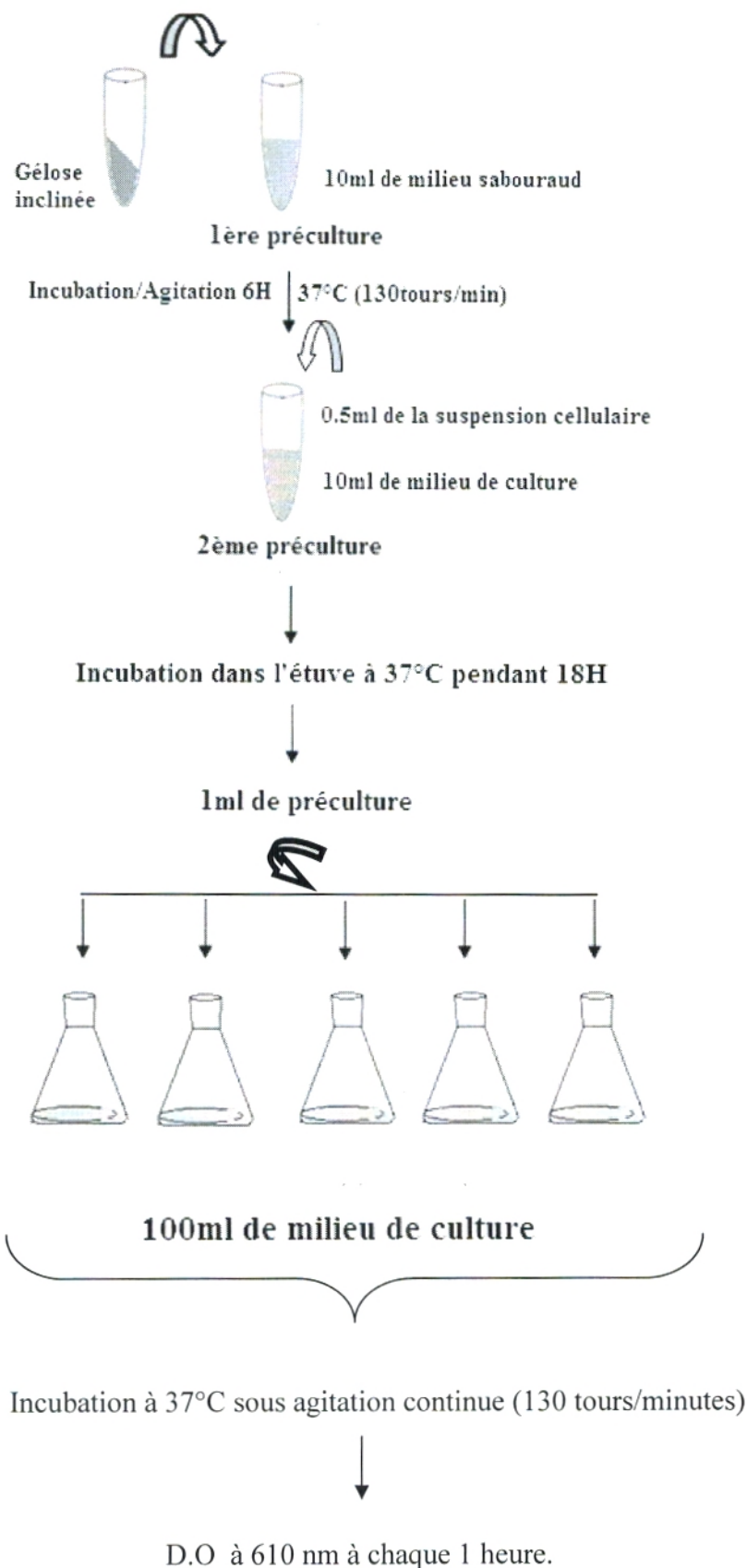


Figure 8. Culture et mesure de la croissance de *C.albicans*.

Troisième partie :

Résultats et Discussion

L'extraction des pigments majoritaires du paprika par le système de chauffage à reflux dans le dichlorométhane donne un extrait brut, liquide de couleur rouge brillant. Le rendement de l'extraction est égal à environ 17%.

I. Identification de l'extrait brut du paprika par chromatographie sur couche mince

Les résultats de la chromatographie sur couche mince de l'extrait brut a donné trois taches majoritaires de Rf différentes et de couleurs différentes que nous avons facilement pu identifier (*figure 9*).

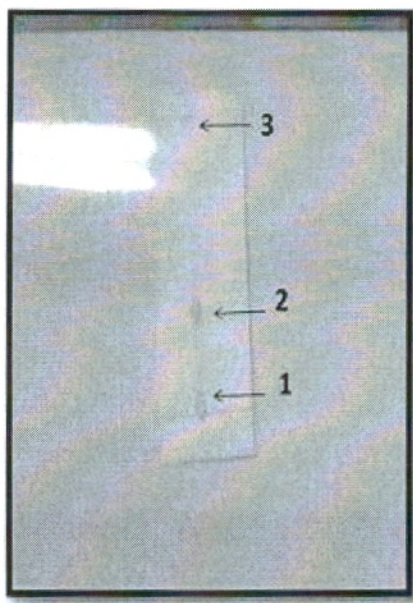


Figure 9. Chromatogramme de l'extrait brut du paprika.

- 1 → Une tache orange en bas de la plaque, plus polaires: « Esters gras de la capsorbine »;
- 2 → Une tache rouge intense moyennement polaire : « Esters gras de la capsanthine »;
- 3 → Une tache jaune en haut de la plaque le plus rapidement entraîné, très peu polaire: « Carotènes ».

D'après les résultats obtenus de la CCM, le **tableau II** résume le rapport frontal (Rf) de chaque tache.

Tableau II. Les rapports frontaux (Rf) des composés de l'extrait de paprika

<i>Taches (n°)</i>	<i>Rapports frontaux (Rf)</i>
<i>1</i>	<i>0,06</i>
<i>2</i>	<i>0,55</i>
<i>3</i>	<i>0,96</i>

Les mêmes résultats ont été obtenus par FGHIRE R. et coll. 2008 dans la caractérisation d'un colorant naturel (paprika).

II. Séparation et purification de l'ester d'acide gras de la capsorbine

La séparation des composés de l'extrait du paprika (pigments) a été réalisée par la chromatographie sur colonne. Selon leurs affinités avec la phase stationnaire et la phase mobile, les pigments ont été élués plus ou moins rapidement vers la sortie de la colonne. L'ordre d'éluion a été le suivant :

- 1 → les caroténoïdes, la bande jaune (pigment qui a le plus d'affinité avec la phase mobile)
- 2 → la capsanthine, la bande rouge de polarité moyenne ;
- 3 → la capsorbine, la bande orange s'est trouvée en haut de la colonne qui a fait l'objet de notre étude. Cette fraction a été récupérée sous forme visqueuse de couleur orange après une évaporation. Le calcul de son rendement est exprimé par rapport à la prise d'essai de départ 36 g de la poudre du paprika.

$$\text{Rendement de la capsorbine} = (m_{\text{ex}} / m_{\text{ech}}) \times 100\% = 0,22\%$$

m_{ex} : La masse de l'extrait purifié en (g).

m_{ech} : la masse de l'échantillon du départ en (g).

Les trois fractions obtenues séparément par chromatographie sur colonne, ont été ensuite identifiées par chromatographie sur couche mince (*figure 10*).

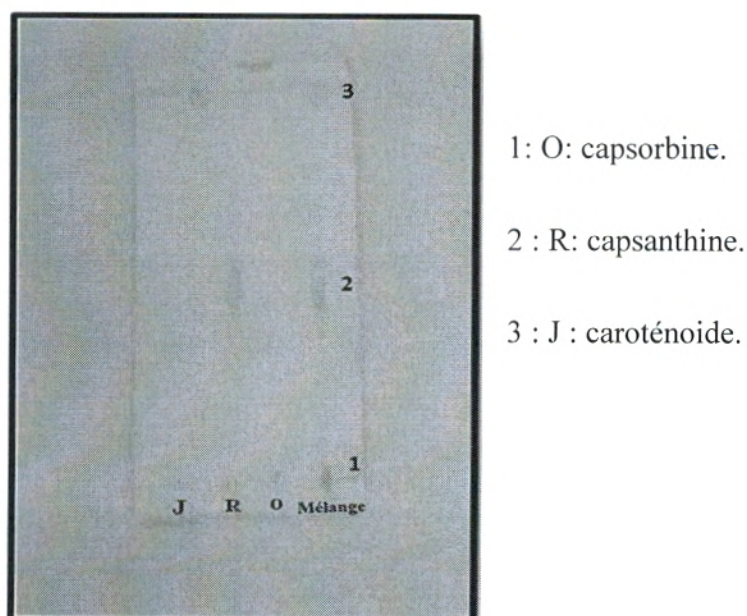


Figure 10. Chromatogramme des extraits purifiés.

Les rapports frontaux (Rf) de ces fractions sont consignés dans le *tableau III*.

Tableau III. Les rapports frontaux (Rf) des fractions récupérées de paprika

Couleurs	Rapports frontaux (Rf)
O : orange	0,05
R : rouge	0,53
J : jaune	0,96

Il ressort de ces résultats que le rapport frontale d'une espèce est le même qu'elle soit pure ou dans un mélange.

III. Balayage spectrale de l'extrait brut et de l'extrait purifié (capsorbine)

D'après les spectres obtenus (*figures 11, 12*), nous avons constaté que la capsorbine est une molécule pure. Elle donne un seul pic avec une absorbance maximale de 0,247 à une longueur d'onde complémentaire de 458nm.

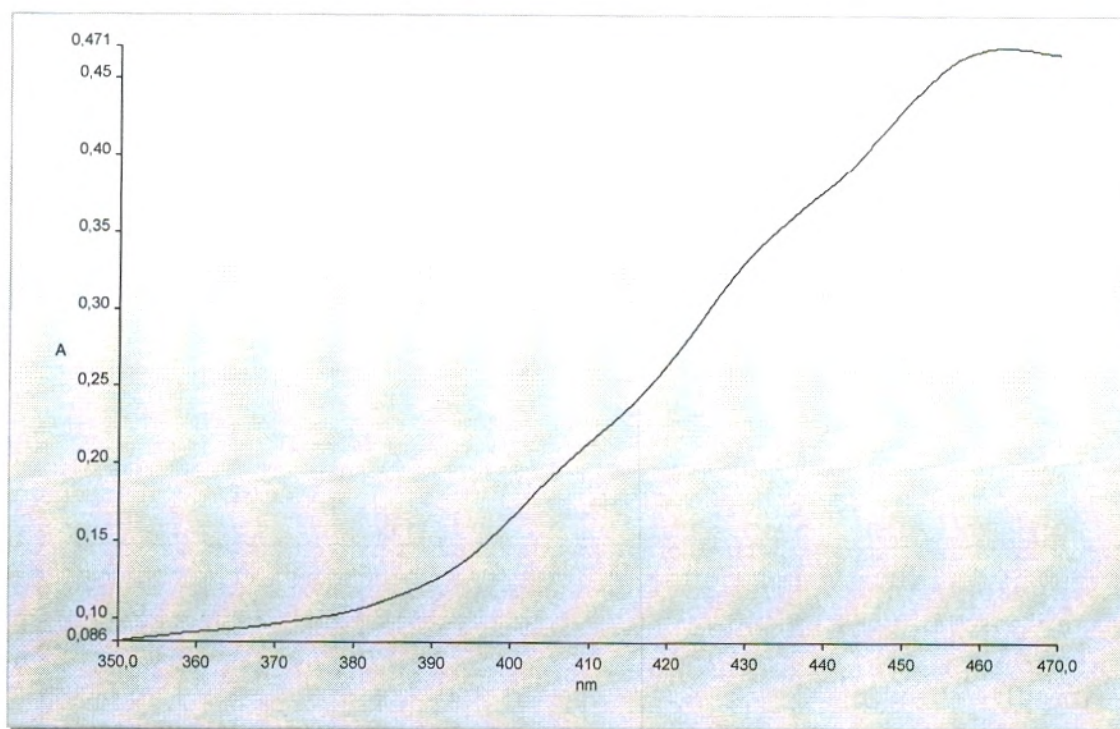


Figure 11. Spectre d'absorption de l'extrait brut du paprika.

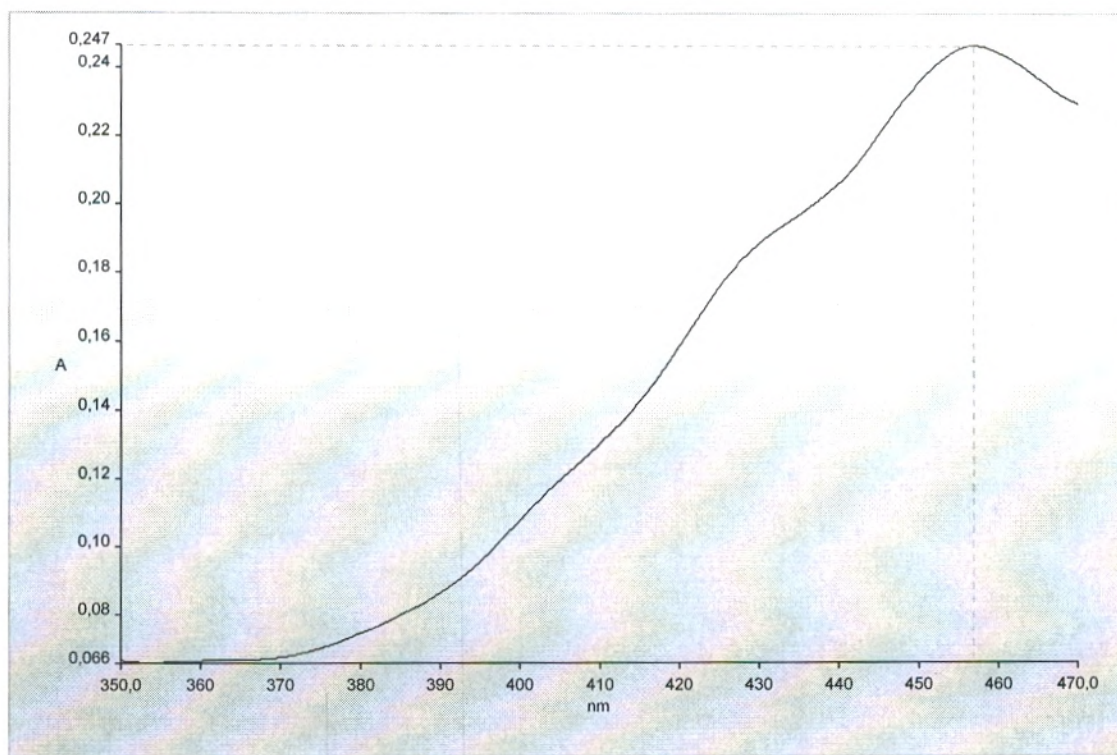


Figure 12. Spectre d'absorption de la capsorbine.

IV. Etude de l'effet de l'ester d'acide gras, capsorbine sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B

Notre travail a porté essentiellement sur l'évaluation de l'activité antifongique de l'amphotéricine B sous sa forme libre ou complexée aux esters d'acides gras, la capsorbine sur la croissance de *C.albicans*.

L'utilisation de ces esters d'acide gras présente en effet un certain nombre d'avantages :

- ❖ C'est un moyen pratique et disponible, facilitant ainsi l'incorporation de l'amphot B en raison de sa forte hydrophobicité, ce qui la rend plus soluble et moins toxique.
- ❖ Leur association avec l'amph B donne une efficacité sélective vis-à-vis des levures suite à un changement de leur distribution dans l'organisme.

La croissance des cellules de *C.albicans* sur milieu sabouraud liquide glucosé, en absence ou en présence d'amphotéricine B libre ou complexée à l'ester d'acide gras qui est la capsorbine est suivie par l'évolution de la densité optique à une longueur d'onde de 610 nm.

IV.1 Effet de l'ester d'acide gras de la capsorbine sur la croissance de *C.albicans*

La **figure 13**, représente la croissance de *C.albicans* en présence de l'ester d'acide gras, la capsorbine à une concentration finale de 5µg/ml.

Il faut noter que la croissance est suivie pendant 10 heures. Les résultats obtenus sont regroupés sur la **figure 13**, nous remarquons :

La courbe (1) : représente la culture témoin sans aucune addition. L'introduction de l'inoculum au temps zéro, dans le milieu de culture sabouraud liquide glucosé, montre un début de croissance cellulaire de *C.albicans* après une phase de latence de l'ordre de 2 heures qui se caractérise par une absorbance constante, suivie par une phase exponentielle pour atteindre un maximum de 100% de croissance après 8 heures et demi d'incubation à 37°C. Ce taux reste constant durant la phase stationnaire jusqu'à 9 heures d'incubation.

La courbe (2) : représente la croissance de *C.albicans* en présence de l'ester d'acide gras, la capsorbine. Nous avons constaté que l'ester d'acide gras en question inhibe partiellement la croissance de *C.albicans*. Ce taux d'inhibition est de 25% par rapport au

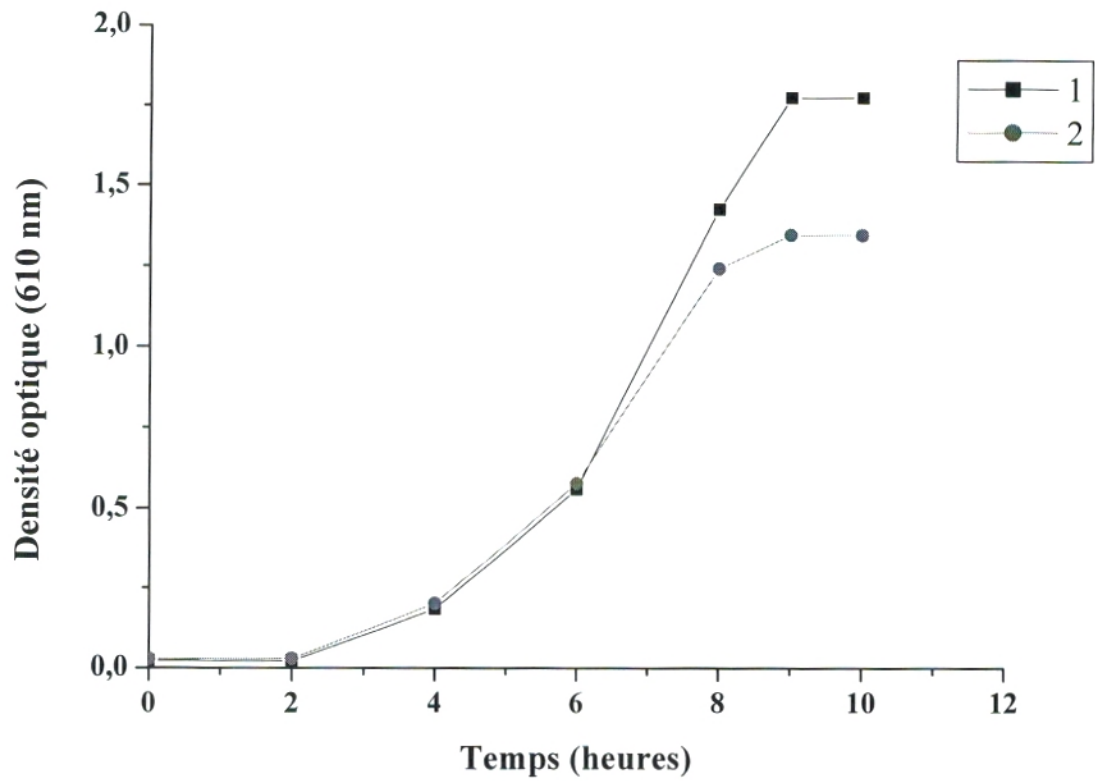


Figure 13. Effet de l'ester d'acide gras de la capsorbine sur la croissance de *C. albicans*.

1 : Témoin : *C. albicans* seule.

2 : *C. albicans* + l'ester d'acide gras de la capsorbine (5 µg/ml).

témoin (cellules sans traitement). Les mêmes résultats ont été obtenus par BEDRDINE H. et KHELKHALE S. 2003, sur l'effet de quelques acides gras libres sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *C.albicans*.

IV.1.1 Conclusion

L'ester d'acide gras, la capsorbine à une concentration de 5µg/ml, inhibe partiellement la croissance de *C.albicans*.

IV.2 Effet des doses croissantes d'amphotéricine B complexée à l'ester d'acide gras de la capsorbine chez *C.albicans*

La **figure 14** représente la croissance de *C.albicans* en présence de l'amphotéricine B libre ou complexée à l'ester d'acide gras, la capsorbine à des doses croissantes de 5µg/ml et de 10µg/ml d'amphotéricine B.

L'ester d'acide gras que nous avons étudié est préparé à une concentration finale de 5µg/ml.

L'amphotéricine B et l'ester d'acide gras de la capsorbine ont été ajoutés au milieu de culture au même moment que l'inoculum.

La courbe (1) de la **figure 14** représente la culture témoin sans d'amphotéricine B et d'ester d'acide gras. Elle correspond à 100% de la croissance cellulaire.

Les courbes (2), (3) représentent respectivement la croissance de *C.albicans* en présence de l'amphotéricine B seule à une concentration finale de 5µg/ml et la croissance de *C.albicans* en présence de l'amphotéricine B à une concentration finale de 5µg/ml complexé à un ester d'acide gras, la capsorbine. Nous avons constaté que les cellules passent par une phase de latence de 3 heures puis l'absorbance de cellules commence à augmenter légèrement jusqu'à atteindre un maximum au bout de 8 heures et demi d'incubation à 37°C. Enfin, les cellules passent en phase stationnaire où l'absorbance reste constant jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition est estimé à 85%.

La courbe (4) représente la croissance de *C.albicans* en présence de l'amphotéricine B à une concentration finale de 10µg/ml complexé à un ester d'acide gras, la capsorbine. Nous avons observé un prolongement de la phase de latence allant jusqu'à 6 heures et demi d'incubation.

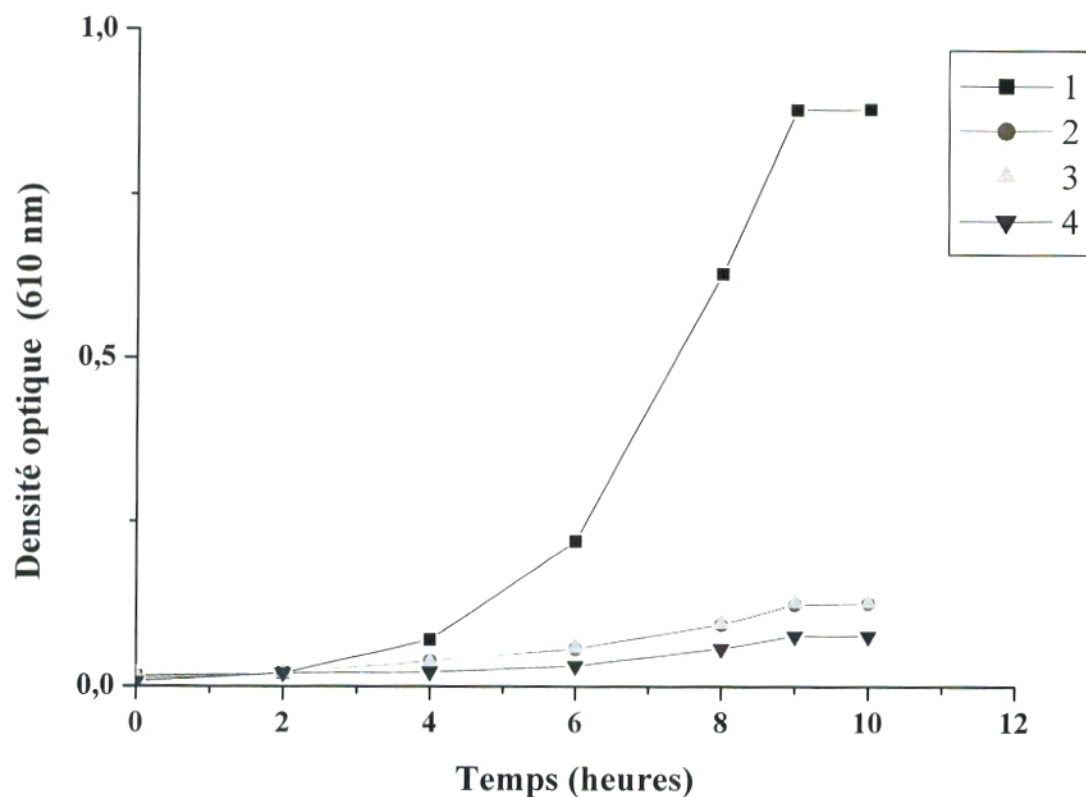


Figure 14. Effet des doses croissantes d'amphotéricine B complexées à l'ester d'acide gras, la capsorbine chez *C.albicans*.

1 : Témoin : *C.albicans* seule.

2 : *C.albicans* + AmB (5 μ g/ml).

3 : *C.albicans* + AmB (5 μ g/ml) + l'ester d'acide de capsorbine (5 μ g/ml).

4 : *C.albicans* + AmB (10 μ g/ml) + l'ester d'acide de capsorbine (5 μ g/ml).

Ensuite, l'absorbance des cellules augmente peu pour atteindre les 10% au bout de 8 heures et demi d'incubation à 37°C. La levure passe ensuite en phase stationnaire où l'absorbance de cellules devient constante, le taux d'inhibition est estimé à 90%

D'après les résultats obtenus, la concentration de 5µg/ml d'amphotéricine B est suffisante pour avoir une inhibition totale de *C.albicans*. Les mêmes résultats ont été rapportés par BEDRANE M. A. 1997, sur l'effet toxique de l'amphotéricine B à 5µg/ml vis-à-vis des levures *Saccharomyces cerevisiae*. Le même effet est obtenu avec l'amphotéricine B complexée à un ester d'acide gras. Donc la capsorbine n'affecte pas l'efficacité de l'amphotéricine B.

IV.2.1 Conclusion

L'amphotéricine B (à 5µg/ml ou 10µg/ml) seul ou bien liée à l'ester d'acide gras garde son efficacité vis-à-vis de *C.albicans*. Les résultats ont montré d'une part que la capsorbine seule inhibe partiellement la croissance du *C.albicans* d'autre part n'affecte pas l'effet toxique de l'amphotéricine B.

IV.3 Effet de la préincubation de l'amphotéricine B avec l'ester d'acide gras de la capsorbine sur son efficacité chez *C.albicans*

La **figure 15** représente l'effet de l'amphotéricine B à une concentration finale de 5µg/ml préincubée pendant 1 heure à 37°C en présence de l'ester d'acide gras, la capsorbine sur la croissance de *C.albicans*.

L'amphotéricine B a été préincubée en présence de l'ester d'acide gras de 5µg/ml avant d'être ajoutée dans le milieu de culture de *C.albicans*.

La courbe (1) montre une croissance type du *C.albicans* (témoin).

La courbe (2) représente la croissance de *C.albicans* en présence de l'amphotéricine B seule à une concentration finale de 5µg/ml. Nous avons constaté que les cellules passent par une phase de latence de 3 heures et demi puis l'absorbance de cellules commence à augmenter légèrement pour atteindre un maximum au bout de 8 heures d'incubation à 37°C. Enfin les cellules sont en phase stationnaire ou l'absorbance reste constante jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition a été estimé à environ 85%.



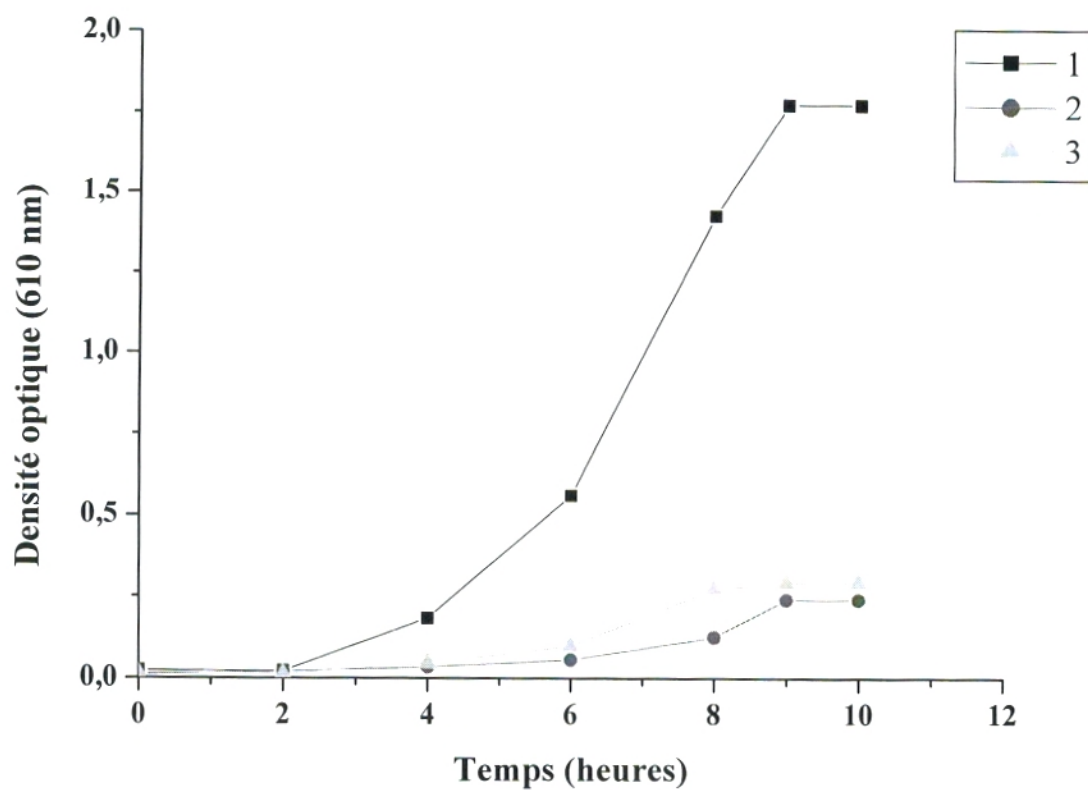


Figure 15. Effet de la préincubation de l'amphotéricine B avec l'ester d'acide gras de la capsorbine sur son efficacité chez *C.albicans*.

1 : Témoin : *C.albicans* seule.

2 : *C.albicans* + AmB (5 μ g/ml).

3 : *C.albicans* + [AmB (5 μ g/ml) + l'ester d'acide de capsorbine (5 μ g/ml)] préincubé à 37°C pendant 1 heure.

La courbe (3) représente l'effet de l'ester d'acide gras, la capsorbine sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B après une préincubation à 37°C pendant 1 heure. Nous avons constaté que les cellules passent par une phase de latence de 4 heures puis l'absorbance des cellules commence à augmenter pour atteindre un maximum au bout de 9 heures d'incubation. Enfin les cellules sont en phase stationnaire ou l'absorbance reste constant jusqu'à 10 heures d'incubation. Le taux d'inhibition a été estimé à environ 80 %.

IV.3.1 Conclusion

Il ressort de ces résultats que la préincubation de l'amphotéricine B avec l'ester d'acide gras, la capsorbine à 37°C pendant 1 heure garde l'efficacité vis-à-vis de *C.albicans*. La préincubation n'affecte pas l'effet toxique de l'amphotéricine B.

Quatrième partie :

Conclusion Générale

Le travail que nous avons entrepris avait pour but d'évaluer l'effet de l'ester d'acide gras, la capsorbine sur l'activité des antifongiques polyènes entre autres l'amphotéricine B.

Par ailleurs, les travaux sur les globules rouges humaines (CHIALI F. 2009) ont montré que lorsque nous associons l'amphotéricine B de l'ordre de 5µg/ml à l'ester d'acide gras, la capsorbine à une concentration finale de 5µg/ml, nous observons une réduction quasi totale de la toxicité. La question est de savoir si dans les mêmes conditions, l'amphotéricine B gardera toute son efficacité vis-à-vis des levures en vue d'une utilisation thérapeutique.

Les résultats que nous avons obtenus chez les levures, *Candida albicans* montrent que :

- ❖ L'ester d'acide gras, la capsorbine seul inhibe partiellement la croissance de *Candida albicans* pour une concentration de 5µg/ml. Ce taux d'inhibition est de 25%.
- ❖ En ce qui concerne l'effet de l'ester d'acide gras de la capsorbine de 5µg/ml sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B, nos résultats montrent que la capsorbine, n'affecte pas son activité qui reste inchangée (85% d'inhibition pour une concentration de 5µg/ml d'amphotéricine B).
- ❖ La préincubation de l'amphotéricine B avec l'ester d'acide gras garde l'efficacité de cette drogue.

Pour compléter ce travail il serait intéressant de :

- ❖ Etudier l'effet de l'AmB complexée à l'ester d'acide gras, la capsorbine sur la perméabilité membranaire de potassium des cellules de *Candida albicans*.
- ❖ Tester *in vivo* l'effet de l'ester d'acide gras, la capsorbine sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B chez l'animal.

Références Bibliographiques

A

1. ANDRES E., TIPHINE M., LETSCHER B. V. et HERBRECHT R. (2000)

Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. Revue de la littérature.

Service de médecine interne et nutrition, hôpital de Hautepierre, avenue Molière, 67098 Strasbourg cedex, France

2. ANTONIADOU A., DUPONT B. (2005)

Lipid formulations of amphotericin B: where are we today?

Formulations lipidiques d'amphotéricine B : où en sommes-nous aujourd'hui ?

4th Department Internal Medicine, Attikon University General Hospital, 1, Rimini Street, Haidari, 12462 Athens, Greece

3. ANTONOT E. et MARCHAL R. (1998)

Stage MAFPEN – Chromatographie.

B

4. BAGARD S. et SIMON N. (2008)

Physique-Chimie Tles Enseignement de spécialité.

5. BEDRANE M. A. (1997)

Effet des lipoprotéines sériques sur la cytotoxicité induite par les polyenes macrolides exemple de l'amphotéricine B, chez les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*.

Thèse de magister-Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

6. BEDRDINE H. et KHELKHALE S. (2003)

Effet de quelques acides gras libres sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*.

Mémoire de D.E.S en Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

7. BELHACHEMI C.; BENABLEKADER H. (2008)

Etude in vivo de la toxicité cellulaire de nouvelles formulations d'amphotéricine B chez les rats wistar.

Mémoire de D.E.S en Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

8. BELKHERROUBI L. (2001)

Amphotéricine B : l'environnement physico-chimique et activité chez *Candida albicans*

Thèse de magister-Microbiologie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen

9. BENHAMOU F. ; BENMOSTEFA S. (2005)

Etude in vitro de l'effet du pH sur la toxicité cellulaire de l'amphotéricine B chez les globules rouges humains.

Mémoire de D.E.S en Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

10. BENYAKOUB F., HACHEMI N. (1998)

Effet de solvants organiques sur la toxicité de la fungizone® chez *Saccharomyces cerevisiae*

Mémoire de D.E.S- Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

11. BINGEN É., MOUTON Y., DEBOSCKER Y. et DUBREUILN L. (2000)

Antibiotiques, antiviraux, anti-infectieux.

12. BOLARD J. (1986)

How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane permeability ?

Biochim Biophys Acta 864 : 257-304

13. BOLARD J., LEGRAND P., HEITZ F., CYBULSKA B. (1991)

One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self association in the medium.

Biochemistry 30 : 5707-5715

14. BOLARD J., JOLY V. et YENI P. (1997)

Amphotéricine B : ancien médicament, nouveaux concepts.

Médecine thérapeutique. Vol 3. N° 3 : 207-13

15. BOSWELL GW., BUELL D., BEKERSKY I. (1999)

Ambisome (liposomal amphotericin B) : a comparative review.

J Clin Pharmacol 39 : 583-92

16. BOUANANE S. (2001)

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

Thèse de magister en Biologie Moléculaire et Cellulaires. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

17. BOUCHARD E. (2004)

Préparations pharmaceutiques pour la décontamination digestive : Dosage et étude de stabilité des principes actifs des gélules administrées chez les adultes neutropéniques.

Thèse d'état de docteur en pharmacie. Université CLAUDE BERNARD-Lyon I

18. BOUCHERIT O. Z. (1995)

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

Thèse de magister-Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

19. BRAJTBURG J., BOLARD J. (1996)

Carrier effects on biological activity of amphotericin B.

Clin Microb Rev 9 512-531

20. BRUNO P., JEAN-PAUL L. (2000)

Aspergilloses chez les immunodéprimées

Médecine thérapeutique. Revue : Infection et poumon. Vol 6. N° 6 : 442-9

C

21. CAPON., COURILLEAU. (2007)

Chimie des couleurs et des odeurs.

Valette Editeur : Cultures et Techniques (Nantes)

22. CARINA A., RODRIGUEZ MD., CHRISTIAN C. et PATRICK MD. (2001)

New Therapeutic Options for Invasive Fungal Diseases.

23. CARLE S., PHARM B. (2003)

Les antifongiques dans le traitement des infections invasives.

Pharmacothérapie. Vol. 36 N° 1

24. CHIALI F. (2009)

Etude de l'effet de l'amphotéricine B liée aux esters d'acide gras chez des cellules de globules rouges humaines.

Mémoire de master-Biochimie appliquée. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

25. CLIVE P., MICHAEL J., MORLEY .C. S., BRIAN B. H., MICHAEL J. et WALKER M. (1999)

Pharmacologie intégrée. Vol. 616: 479 – 484

D

26. DERAY G., MERCADAL L. et BAGNIS C. (2002)

Néphrotoxicité de l'amphotéricine B.

Néphrologie Vol. 23 N° 3 : 119-122

27. DIX SP., WINGARD JR. (1996)

Amphotericin B lipid complex : review of safety, pharmacokinetics and efficacy.

Drug Today ; 32 Suppl G : 19-25

28. DUPONT B., DROUCHET E. (1988)

Pharmacologie clinique base de la thérapeutique.

2^e Ed. Expansion scientifique française : 1742 - 1743 - 1747

F

29. FGHIRE R., ELBOUHALI H., ESSHAIMI M., KHOUHADDU U. (2008)

Caractérisation d'un Colorant Naturel.

30. FREIMAN A. MD., SASSEVILLE D. (2006)

Conférences Scientifiques : Les médicaments antifongiques en dermatologie.

G

31. GABORIAU F., CHERON N., LEROY L. et BOLARDE J. (1997)

Physical-chemical properties of heat-induced « superaggregats » of amphotéricin B

Biophysique chimie. Vol. 66 : 1-12

32. GOFFART A., REMACLE M. S. et SCOUBEAU O. (2002)

Séparation des pigments du paprika par chromatographie sur colonne.

Université Catholique de Louvain-Festival des Sciences – UCL, LLN-

33. GURWITH M., MAMELOK R., PIETRELLI L. et DUMOND C. (1999)

Renal sparing by amphotericin B colloidal dispersion : clinical experience in 572 patients.

Chemotherapy 45 : 39-4

H

34. HAY RJ. (1994)

Liposomal amphotericin B, Ambisomet.

J Infect 28 Suppl 1 : 35-43

35. HERBRECHT R., LETSCHER V., ANDRES E. et CAVALIER A. (1999)
Safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion. An overview.
Chemotherapy 45 : 67-76

36. HULIN A., DEGUILLAUME AM., BRETAGNE S., BEZIE Y. (2005)
Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives.
Journal de Pharmacie Clinique. Vol 24. N° 3 : 125-38

J

37. JOLY V., SAINT-PIERRE-CHAZALET M., SAINT-JULIEN L., BOLARD J., CARBON C., YENI P. (1992)
Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against renal tubular cells in primary culture. *J Infect Dis* 165 : 337-343

K

38. KERRIDGE D. (1986)
Mode of action of clinically important antifungal drugs.
Adv Microb Physiol 27 : 1-28

39. KOTLER-BRAJTBURG J., MEDOFF G., KABAYASHI G. S., BOGGS S., SCHLESSINGER D., PANDEY R. C., et RINEHART K. L. JR. (1979)
Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects antiimicrob.
Agents and chemother. Vol 15. N°5 : 716-722

L

40. LASIC D. D. (1992)
Mixed micelles in drug delivery.
Nature 355 : 279-280

M

41. MAZERSKI J., BOROWSKI E. (1990)
Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media.
Eur Biophys J 18 : 1-6

N

42. NEAL M. (2003)
Pharmacologie médicale. *Vol 108. N°5 : 85 – 87*

P

43. PETIT C., BOLARD J. (1999)

Amphotéricine B (fungizone chauffée : amélioration de l'efficacité thérapeutique), étude de mécanisme d'action.

Thèse nouveau doctorat Note (s) 160 (bib : 134 réf)

44. POLSTER et LADMANN (1989)

Spectrometric Titrations - VCH.

R

45. RAYMOND S., HENON T., GRENOUILLET F., LEGRAND F., WORONOFF- LEMSI M. C., HOEN B., LIMAT S., LEROY J. (2008)

Audit clinique des prescriptions d'antifongiques systémiques couteux.

Centre hospitalier Universitaire de Besancon

S

46. SLISZ M., CYBULSKA B., MAZERSKI J., GRZYBOWSKA J. et BOROWSKI E. (2004)

Studies of the Effects of Antifungal Cationic Derivatives of Amphotericin B on Human Erythrocytes

Department of Pharmaceutical Technology and Biochemistry, Gdansk University of Technology, Poland

47. SOULIMANE N. (2001)

Activité de quelques formulations de l'amphotéricine B chez les souris wistar.

Thèse de magister-Biochimie. Université ABOU BEKER BELKAID-Tlemcen.

48. STEVENS DA. (1994)

Overview of amphotericin B colloidal dispersion (Amphocilt).

J Infect ; 28 Suppl 1 : 45-9

49. SWENSON CE., PERKINS WR., ROBERTS P., AHMAD I., STEVENS R. et STEVENS DA. (1998)

In vitro and in vivo antifungal activity of amphotericin B lipid complex : are phospholipases important ? *Antimicrob Agents Chemother 42 : 767-71*

T

50. THOMAS X., TRONCY J., BELHABRI A., THIEBAUT A., BOUHEDDOU N., MICHALLET M. (2000)

Intérêt d'associer la vancomycine à la péfloxacin en décontamination digestive pour la prévention des infections après chimiothérapie aplasante.

Press Medi 29:1745-51

V

51. VANDENBROUCKE-GRAULS CMJE., VANDENBROUCKE JP. (1991)

Effect of selective decontamination of the digestive tract on respiratory tract infections and mortality in the intensive care unit.

Lancet 338: 859-62

W

52. WASAN K., ROSENBLUM M. G., CHEUNG L. et BERESTEIN G. L. (1994)

Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotéricin B.

Antimicrobial agents and chemotherapy : 233-227

53. WONG-BERINGER A., JACOBS RA., GUGLIELMO BJ. (1998)

Lipid formulations of amphotericin B : clinical efficacy and toxicities.

Clin Infect Dis 27 : 603-18

المخلص

بن تواتر العدوى الفطرية قد ارتفع بشكل ملحوظ في السنوات الأخيرة نتيجة لزيادة عدد المرضى دوى نقص المناعة مما أدى إلى زيادة معدل الوفيات المرتبطة بهذا النوع من العدوى. الامفوتريسين ب هو العلاج الموصى به للمعالجة من العدوى الفطرية، ومع ذلك وبالرغم من فعاليته فإنه يشكل تسمم خصوصا على الكلى ولهذا أجريت العديد من البحوث لإيجاد صيغ جديدة من الامفوتريسين ب لتحسين فعاليته من خلال تقليل السمية الحادة والحفاظ على كفاءته. في هذا السياق ، ركزنا في عملنا على دراسة الأثر المترتب على استر من الأحماض الدهنية على فعالية الأمفوتريسيين ب اتجاه *C. albicans* . وقد أظهرت النتائج أن : استخدام الأحماض الدهنية استر كبسوربين جزئيا يمنع نمو *C. albicans* و إن كبسوربين ، لا يؤثر على نشاط الامفوتريسين ب ، حتى مع قبل الحضانة في وجود هذا استر ، الامفوتريسين ب يحافظ على فعاليته تجاه خلايا *C. albicans*.

الكلمات المفتاحية: العدوى الفطرية وفطريات ، الامفوتريسين ب ، الاحماض الدهنية استر،كبسوربين.

Résumé

La fréquence des infections fongiques a augmenté de façon considérable au cours des dernières années en raison du nombre accru des patients immunodéprimés. Le taux de mortalité associé aux infections invasives est très élevé. L'amphotéricine B est le traitement de référence des mycoses invasives. Néanmoins, en raison de son efficacité limitée et de sa mauvaise tolérance (en particulier rénale), des recherches visant à trouver de nouvelles formulations de l'amphotéricine B aux performances améliorées par une réduction de la toxicité aiguë et une conservation de l'efficacité antifongique ont été menées. Dans le même contexte, nous avons axé notre travail sur l'étude de l'effet d'un ester d'acide gras sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *C. albicans*. Les résultats obtenus ont montré que : l'utilisation de l'ester d'acide gras, capsorbine seul inhibe partiellement la croissance de *C. albicans* et que la capsorbine, n'affecte pas l'activité de l'amphotéricine B même avec une préincubation en présence de ce ester, l'amphotéricine B garde son efficacité vis-à-vis des cellules de *C. albicans*.

Mots clefs: Les infections fongiques, Mycoses invasives, Antifongiques, Amphotéricine B, néphrotoxicité, Ester d'acide gras, Capsorbine, *C. albicans*.

Abstract

The frequency of fungal infections has risen dramatically in recent years due to the increased number of immunocompromised patients. The mortality rate associated with invasive infections is very high. Amphotericin B is the benchmark treatment of invasive fungal infections. However, due to its limited effectiveness and their poor tolerability (especially renal), research to find new formulations of amphotericin B with improved performance by reducing the acute toxicity and preservation of the antifungal were conducted. In the same context, we focused our work on studying the effect of an ester of fatty acid on the efficacy of amphotericin B against *C. albicans*. The results obtained showed that: the use of fatty acid ester, capsorbine only partially inhibits the growth of *C. albicans* and that capsorbine, does not affect the activity of amphotericin B, even with preincubation in the presence of this ester, amphotericin B retains its effectiveness against the cells of *C. albicans*.

Key words: Fungal infections, Invasive fungal infections, Antifungal, Amphotericin B, nephrotoxicity, Fatty acid ester, Capsorbine, *C. albicans*.