



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

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Spécialité : Biochimie Appliquée

Présentée par

M^{me} BELHACHEMI-BELMIR Sarra

Thème

Modulation de la cytotoxicité sélective de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

Soutenue le :

Devant le jury composé de :

Président	Pr AZZI Rachid	Université de Tlemcen
Directrice de thèse	Pr BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Université de Tlemcen
Examineurs	Pr SARI-BELKHERRUBI Lamia	Université de Tlemcen
	Pr KAHLOULA Khaled	Université de Saida
	Dr BENKHERARA Salah	Université de Ghardaïa
	Dr HALLA Noureddine	Université de Saida

Année universitaire : 2024-2025

بسم الله الرحمن الرحيم
الحمد لله الذي هدانا لطريق العلم والمعرفة
اللهم استخدمنا ولا تستبدلنا
والصلاة والسلام على رسول الله وعلى آله وصحبه أجمعين

Dédicaces

À mes chers parents,

Merci pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux, votre patience et votre foi en moi. Vous êtes les racines solides de tout ce que j'ai pu accomplir.

À mon mari,

Merci pour ton soutien indéfectible, ta compréhension dans les moments difficiles, et pour avoir partagé chaque étape de ce long chemin avec moi. Ta présence a été ma force.

À mes enfants,

Nadjelaâ, Anes et Youcef. Vous êtes ma plus belle source d'inspiration et de motivation.

À mon frère et ma sœur

Merci pour votre présence constante, vos encouragements et votre affection discrète mais essentielle.

À ma belle-famille,

Merci pour votre soutien constant, vos encouragements bienveillants et vos prières qui m'ont accompagnée tout au long de ce parcours.

À mes amies fidèles et collègues,

Merci pour vos mots d'encouragement, vos écoutes patientes, et vos présences rassurantes, même à distance.

A la mémoire de deux âmes chères,

Ismahane, ingénieur de notre laboratoire, dont la bonne humeur, la générosité et l'entraide ont marqué le laboratoire.

Wafaâ, ma collègue de magistère, modèle de sérieux et de bonté.

Votre absence pèse, mais votre empreinte est durable dans mon cœur.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur BOUCHERIT Kebir, ancien Recteur de l'université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen et mon premier directeur de thèse, pour son accompagnement précieux durant les premières années de ce travail. Malgré ses responsabilités institutionnelles majeures, son expertise, ses conseils avisés ont été des piliers essentiels à l'avancement de mes recherches. Bien qu'il ait pris une retraite bien méritée, il a généreusement continué à me soutenir en relisant et en corrigeant mes écrits avec rigueur et bienveillance, je lui suis infiniment reconnaissante pour tout ce qu'il m'a apporté.

Toute ma gratitude va également à Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia Professeure à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen, qui a généreusement accepté de prendre le relais de la direction de cette thèse. Présente dès le début de mon travail, elle m'a guidé avec une constance et une rigueur tout au long de ce parcours. Son expertise méthodologique, son engagement sans faille dans la relecture et la correction ont été essentiels pour structurer ce travail et le mener à son terme. Ses conseils avisés ont non seulement clarifié le fond et la forme de ce travail, mais m'ont aussi appris une discipline d'écriture qui me servira bien au-delà de ce doctorat.

J'adresse mes vifs remerciements au Professeur AZZI Rachid Vice doyen chargé de la post graduation, la recherche scientifique et les relations extérieures à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen qui me fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance. Je suis très reconnaissante de l'attention qu'il porte à mon travail et de sa participation à cette étape décisive.

Je remercie chaleureusement Madame SARI-BELKHERROUBI Lamia, Professeure à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant d'examiner ma thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma haute considération.

Mes remerciements vont également à Monsieur BENKHERARA Salah Maître de conférences classe A, à l'université de Ghardaïa, d'avoir accepté de juger mon travail. Qu'il soit assuré de ma respectueuse et sincère gratitude.

Je suis également reconnaissante à Monsieur KAHLOULA Khaled, Professeur à l'université Moulay Tahar de Saida, pour l'honneur qu'il me fait en acceptant d'examiner ce travail. Votre participation est une opportunité précieuse d'amélioration pour mes recherches.

Je tiens également à remercier Monsieur HALLA Noureddine, Maître de conférences classe A à l'université Moulay Tahar de Saida, qui me fait l'honneur de faire partie de ce jury. Je suis particulièrement reconnaissante de pouvoir bénéficier de votre regard avisé sur mon travail.

ملخص

تعد هذه الدراسة مساهمة في تعديل السمية الخلوية الانتقائية لمركب الأمفوتريسين ب الممزوج بالمستخلص المائي والسكريات المعقدة القابلة للذوبان في الماء من تمر "العجوة". لقد تم تحضير المستخلص المائي عن طريق النقع البسيط. أما بالنسبة لاستخلاص السكريات المعقدة القابلة للذوبان في الماء فقمنا بإجراء دراسة لتحسين عوامل استخلاصها باستخدام منهجية سطح الاستجابة مستعملين برنامج *Design Expert 9*.

عند تطبيق معايير العوامل المحسنة تحصلنا على مردود استخلاص السكريات المعقدة القابلة للذوبان في الماء من تمر "العجوة" يصل الى $0,15 \pm 10,59\%$. أظهر تحليل التباين لنتائج التحسين الاستخلاص أن النموذج المصمم مناسب ويتوافق بين القيم التجريبية والقيم المتوقعة مع R^2 بقيمة 0,9763.

أظهرت معاينة النشاط المضاد للأكسدة للسكريات المعقدة القابلة للذوبان في الماء بطرق مختلفة نتائج جيدة فيما يتعلق باحتجاز الجذر $ABTS^{++}$ حيث أن قيمة التركيز المثبط 50% (CI_{50}) قدرت ب $0,14$ مل/مغ، ارجاع الحديد حيث أن قيمة التركيز المنشط 50% (CE_{50}) قدرت ب $0,23$ مل/مغ وتثبيط تبييض بيثا كاروتين ($CI_{50}=0,35$ مل/مغ) مقارنة باحتجاز الجذر $DPPH^*$ حيث أن قيمة التركيز المثبط 50% (CI_{50}) قدرت ب $0,13$ مل/مغ الذي أظهر نشاط مضاد للأكسدة ضعيف مقارنة ب BHT .

أظهر التحديد الجزيئي للسكريات البسيطة بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء عن وجود حمض الجلوكورونيك ($70,67$ مغ / 100 مغ) الجلوكوز ($7,7$ مغ / 100 مغ) الجلاكتوز ($3,5$ مغ / 100 مغ) و الفركتوز ($1,16$ مغ / 100 مغ).

أدى ادماج الأمفوتريسين ب مع المستخلص المائي والسكريات المعقدة الى تحسين فعاليته ضد الخميرة *Candida albicans* ATCC10231 بنسبة $27,2\%$ و $54,5\%$ وخفض سميته ضد كريات الدم الحمراء بنسبة 16% و 3% على التوالي.

كشفت النتائج المتعلقة باستقرار هذه التركيبة الجديدة (الأمفوتريسين ب/السكريات المتعددة الذائبة في الماء) عن زيادة في شدة الذروة الموافقة للشكل الأحادي للأمفوتريسين ب عند طول الموجة 408 نانومتر مقارنة بالأمفوتريسين ب وحده. زيادة على ذلك حافظت هذه التركيبة الجديدة على استقرارها بعيدة عن الضوء وفي درجة حرارة 4° مئوية على مدى 11 يوم.

الكلمات المفتاحية: الأمفوتريسين ب، تمر العجوة، المستخلص المائي، سكريات معقدة الذائبة في الماء، تعديل السمية الخلوية، ثبات التركيبة.

Résumé

Cette étude a porté sur la modulation de la cytotoxicité sélective de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa». Les extraits aqueux sont préparés par simple macération. Quant à la préparation des polysaccharides hydrosolubles, une optimisation des paramètres d'extraction est réalisée au préalable par la méthodologie des surfaces de réponse (MSR) en utilisant le logiciel *Design Expert 9*.

L'application des paramètres optimisés, a permis d'obtenir un rendement d'extraction expérimental des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» de $10,59 \pm 0,15\%$. L'analyse de la variance des résultats de l'optimisation montre que le modèle conçu est adéquat avec un R^2 de 0,9763 et une bonne compatibilité entre les valeurs expérimentales et prédites.

L'évaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles par différentes méthodes a révélé des résultats intéressants concernant le piégeage du radical $ABTS^{•+}$ ($CI_{50} = 0,14 \text{mg/mL}$), la réduction du fer ($CE_{50} = 0,23 \text{mg/mL}$) et l'inhibition du blanchiment du β -carotènes ($CI_{50} = 0,35 \text{mg/mL}$) par rapport au piégeage du radical $DPPH^{\bullet}$ avec $CI_{50} = 0,13 \text{mg/mL}$ qui a montré une faible activité antioxydante comparée à celle du BHT.

La caractérisation des monosaccharides libérés par CLHP a mis en évidence la présence de l'acide glucuronique ($70,67 \text{mg/100mg}$), du glucose ($7,7 \text{mg/100mg}$), du galactose ($3,5 \text{mg/100mg}$) et du fructose ($1,16 \text{mg/100mg}$).

La complexation de l'amphotéricine B aux extraits aqueux et polysaccharidiques induit une amélioration de son efficacité vis-à-vis *Candida albicans* ATCC 10231 de 27,2% et 54,5% et une réduction de sa cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges humains de 16% et 3% respectivement.

Les résultats relatifs à la stabilité de cette nouvelle formulation (AmB/polysaccharides hydrosolubles) ont révélé que l'intensité du pic lue à 408nm qui correspond à la forme monomérique de cet antifongique présente une intensité plus importante que celle de l'amphotéricine B seule. De plus, cette nouvelle formulation, conservée à 4°C et à l'abri de la lumière, est stable pendant 11 jours.

Mots clés : Amphotéricine B, datte «Ajwa», extrait aqueux, polysaccharides hydrosolubles, modulation de la cytotoxicité, stabilité de la formulation.

Abstract

This study contributes to the modulation of selective cytotoxicity of amphotericin B complexed with aqueous extract and water-soluble polysaccharides of «Ajwa» date. The aqueous extracts are prepared by simple maceration. Water-soluble polysaccharides were prepared by optimizing the extraction parameters using response surface methodology (RSM) with the *Design Expert 9* software .

The application of the optimized parameters led to an experimental extraction yield of water-soluble polysaccharides of date «Ajwa» at $10,59 \pm 0,15\%$. The analysis of variance of the optimization results indicates that the designed model is adequate, with an R^2 of 0,9763, demonstrating good agreement between experimental and predicted values.

The evaluation of the antioxidant activity of water-soluble polysaccharides by different methods revealed interesting results regarding ABTS^{•+} radical scavenging ($IC_{50}=0,14\text{mg/mL}$), iron reduction ($EC_{50}=0,23\text{mg/mL}$) and β -carotene bleaching inhibition ($IC_{50}=0,35\text{mg/mL}$) compared to DPPH[•] radical scavenging ($IC_{50}=0,13\text{mg/mL}$) showed low antioxidant activity when compared to BHT.

The characterization by HPLC of the monosaccharides revealed the presence of glucuronic acid (70,67mg/100mg), glucose (7,7mg/100mg), galactose (3,5mg/100mg) and fructose (1,16mg/100mg).

Complexation of amphotericin B with aqueous and polysaccharides extracts improved its efficacy against *Candida albicans* ATCC 10231 by 27,2% and 54,5% and reduced its cytotoxicity against human red blood cells by 16% and 3% respectively.

The results relating to the stability of this formulation (amphotericin B/ water-soluble polysaccharide) revealed that the intensity of the peak at 408nm which corresponds to the monomeric form of this antifungal was greater intensity than that of amphotericin B alone. In addition, this new formulation, stored at 4°C and away from light, is remained for 11 days.

Keywords : Amphotéricin B, «Ajwa» date, aqueous extract, water-soluble polysaccharides, modulation of cytotoxicity, formulation stability.

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	13
1. Matériel biologique.....	14
1.1. Datte «Ajwa».....	14
1.2. <i>Candida albicans</i>	15
1.3. Erythrocytes.....	15
1.4. Amphotéricine B.....	16
2. Méthodes	16
2.1. Préparation des extraits aqueux et polysaccharidiques de la datte «Ajwa».....	16
2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux.....	16
2.1.2. Extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» par la méthode des ultrasons	16
a. Optimisation de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» par ultrasons.....	16
b. Préparation de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles.....	19
2.2. Préparation des milieux de culture.....	20
2.3. Analyses spectroscopiques.....	21
2.3.1. Dosage de la fraction glucidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	21
2.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	21
a. Méthode de piégeage du 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH*)....	21
b. Méthode de piégeage de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS*+).....	22
c. Méthode de réduction du fer (<i>Ferric ion Reducing Antioxidant Power</i> : FRAP).....	23
d. Méthode de décoloration du β -carotène (Co-oxydation du β -carotène et l'acide linoléique).....	23
2.3.3. Evaluation de la stabilité de l'amphotéricine B complexée aux polysaccharides hydrosolubles.....	24

2.4. Caractérisation des monosaccharides de l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).....	25
2.5. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	25
2.6. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» vis-à-vis des globules rouges humains.....	26
2.7. Analyse statistique.....	27
Troisième partie : Résultats et discussion.....	28
A : Extraction, caractérisation et évaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	29
1. Extraction des polysaccharides hydrosolubles.....	29
1.1. Technique de criblage.....	29
1.1.1. Effet de la puissance des ultrasons.....	30
1.1.2. Effet de la température d'extraction.....	30
1.1.3. Effet du temps d'extraction.....	30
1.1.4. Effet du ratio eau/datte.....	31
1.2. Optimisation des paramètres d'extraction par la Méthode des Surfaces de Réponse (MSR).....	31
1.2.1. Modélisation et analyse statistique.....	31
1.2.2. Analyse graphique des surfaces de réponse.....	33
1.2.3. Vérification du modèle prédictif.....	36
2. Dosage de la fraction glucidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	37
3. Caractérisation des monosaccharides de l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).....	38
4. Evaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	39
B : Evaluation de l'activité fongitoxique de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»..	43

1. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	43
1.1. Effet de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	43
1.1.1. En l'absence d'amphotéricine B.....	43
1.1.2. En présence d'amphotéricine B.....	45
1.2. Effet des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	49
1.2.1. En l'absence d'amphotéricine B.....	49
1.2.2. En présence d'amphotéricine B.....	51
2. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	53
2.1. Effet de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» sur la toxicité induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains.....	53
2.2. Effet des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur la toxicité induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains.....	55
3. Evaluation de la stabilité de la nouvelle formulation amphotéricine B/ polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	57
Quatrième partie : Conclusion générale	59
Cinquième partie : Références bibliographiques	62

Liste des figures

Figure N°1	Structure chimique de l'amphotéricine B (Filip Ciesielski, 2016)....4
Figure N°2	Interaction amphotéricine B-ergostérol et formation de pores hydrophiles (Voncik <i>et al.</i> , 2016).....5
Figure N°3	Mécanisme d'action de l'amphotéricine B avec la formation de pores membranaires complets (A) ou de demi-pores (B) (Carolus <i>et al.</i> , 2020).....6
Figure N°4	Mécanisme d'action de l'amphotéricine B : modèle de l'éponge à stérols (A), modèle d'adsorption en surface (B) (Carolus <i>et al.</i> , 2020).....7
Figure N°5	Structures moléculaires du cholestérol et de l'ergostérol (Kamiński, 2014).....7
Figure N°6	Structures tridimensionnelles de l'amphotéricine B (A) de l'ergostérol (B) du cholestérol (C) et les trois types de liaisons entre l'amphotéricine B et l'ergostérol (Carolus <i>et al.</i> , 2020).....8
Figure N°7	Coupe longitudinale de la datte «Ajwa» (Belmir, 2015).....14
Figure N°8	Les différentes étapes de maturation des dattes (Ghnimi <i>et al.</i> , 2017a).....15
Figure N°9	Effet de la puissance des ultrasons (A), de la température d'extraction (B), du temps d'extraction (C) et du ratio eau/datte (D) sur le rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....29
Figure N°10	Surfaces de réponse 3D des différentes interactions entre les paramètres d'extraction : B et A (a), C et A (b), D et A (c), C et B (d), D et B (e), D et C (f) [la puissance des ultrasons (A), la température d'extraction (B), le temps d'extraction (C), le ratio eau/datte (D)].....35
Figure N°11	Courbe d'étalonnage du glucose.....37

Figure N°12	Chromatogramme de la composition en monosaccharides des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	38
Figure N°13	Variation du pouvoir antioxydant des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» testé par piégeage du radical libre DPPH [•] (A), piégeage du radical ABTS ^{•+} (B), réduction du fer (FRAP)(C) et inhibition du blanchiment du β -carotène (D)	40
Figure N°14	Croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC10231 sur milieu Sabouraud additionné de l'extrait aqueux (EA) de la datte « Ajwa » à 5%, 20% et 33% en l'absence d'amphotéricine B.....	44
Figure N°15	Croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en présence de l'amphotéricine B seule est complexée à 5%, 20% et 33% de l'extrait aqueux (EA) de la datte «Ajwa».....	46
Figure N°16	Croissance de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 en présence de différentes concentrations des polysaccharides hydrosolubles (PH) de la datte «Ajwa» en l'absence d'amphotéricine B.....	49
Figure N°17	Effet des polysaccharides hydrosolubles (PH) de la datte «Ajwa» à différentes concentrations sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	51
Figure N°18	Effet de l'extrait aqueux (EA) de la datte «Ajwa» (5%, 20% et 33%) sur la fuite d'hémoglobine induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains	54
Figure N°19	Effet des polysaccharides hydrosolubles (PH) de la datte «Ajwa» (0,1 ; 0,5 et 1mg/mL) sur la fuite d'hémoglobine induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains.....	56
Figure N°20	Stabilité de l'amphotéricine B seule et complexée aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» à des concentrations de 1 ; 0,5 et 0,1mg/mL à 4°C en fonction du temps	57

Liste des tableaux

Tableau N°1	Matrice de conception expérimentale.....	19
Tableau N° 2	Les domaines expérimentaux des paramètres étudiés pour l'optimisation de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	32
Tableau N° 3	Analyse de la variance du modèle postulé	33
Tableau N° 4	Valeurs prédites et expérimentales des paramètres d'extraction conditions optimales.....	36
Tableau N°5	Analyse de la composition monosaccharidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	38
Tableau N° 6	Valeurs des CI_{50} et CE_{50} des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».....	41

Liste des abréviations

ABTS	2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
AmB	Amphotéricine B
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BALB/c	Bagg Albino sous souche c
BHT	Butylhydroxytoluène
CI ₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
CE ₅₀	Concentration Efficace à 50%
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle
EA	Extrait Aqueux
FRAP	<i>Ferric ion Reducing Antioxidant Power</i>
JCC	Jordan Culture Collection
m/v	Masse/volume
MSR	Méthode des Surfaces de Réponse
p	Probabilité
PH	Polysaccharides hydrosolubles
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampon phosphate salin)
RPH	Rendement en polysaccharides hydrosolubles
TFA	Acide trifluoroacétique

UV	Ultraviolet
v/v	Volume/volume
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine

Première partie :

Synthèse bibliographique

Les infections fongiques appelées également mycoses sont des maladies infectieuses causées par la présence et le développement dans l'organisme de champignons levuriformes (**Chabasse and Pihet, 2008**).

Selon la localisation de l'atteinte qui dépend de la voie de pénétration et du mode de propagation de la levure ou du champignon, on distingue :

- les mycoses superficielles ou cutanées qui affectent l'épiderme, l'épithélium des muqueuses malpighiennes (cavité buccale, vagin, gland) et des phanères (cheveux, poils, ongles)

- les mycoses profondes, systémiques ou invasives sont caractérisées par des envahissements tissulaires viscéraux divers aboutissant à des tableaux cliniques sévères mettant souvent en jeu le pronostic vital des patients (**Lombardi et al., 2020**).

La fréquence des mycoses invasives a considérablement augmenté au cours des dernières décennies et leurs agents étiologiques se sont diversifiés en grande partie en raison du nombre croissant de patients aux défenses amoindries par une maladie ou son traitement (cancer, infection VIH, transplantation d'organes, traitement par corticoïdes ou immunosuppresseurs) (**Forsythe et al., 2020**).

En pathologie humaine, les espèces du genre *Candida* et particulièrement *Candida albicans* représentent la majorité des agents responsables des infections fongiques invasives suivies d'*Aspergillus* spp. et de *Cryptococcus neoformans* (**Nivoix et al., 2018; WHO, 2022**).

Par ailleurs, avec la pandémie de la Covid-19, une mycose rare et grave est apparue chez les patients diabétiques, il s'agit de la mucormycose causée par des mucoromycètes (**Nazir et al., 2021**).

Ces affections sont à l'origine d'une morbi-mortalité très lourde, estimée à plus d'un million et demi de décès chaque année. Cela est dû, en partie, à un diagnostic souvent tardif en raison des symptômes souvent aspécifiques et d'installation insidieuse et à une efficacité limitée et/ou à une toxicité des antifongiques disponibles (**Pathakumari et al., 2020; Tirado-Sánchez et al., 2020**).

A ce jour, la prise en charge des mycoses invasives repose sur l'utilisation d'antifongiques systémiques dont la toxicité et/ou l'émergence de résistances compliquent la décision thérapeutique. La toxicité de nombreux antifongiques vis-à-vis des cellules animales hôtes peut s'expliquer d'une part, par la structure évoluée des cellules fongiques qui les rapproche des cellules des mammifères. D'autre part, plusieurs levures font partie de la flore commensale de l'homme et c'est l'effondrement du système immunitaire qui favorise la prolifération de ces pathogènes opportunistes, ce qui explique les échecs thérapeutiques observés surtout chez les patients immunodéprimés (**Gangneux and Guiguena, 2007**).

Depuis les années 2000, l'arsenal thérapeutique des antifongiques systémiques s'est considérablement élargi, avec l'apparition de nouveaux dérivés azolés de troisième génération, les triazolés (voriconazole, posaconazole...) et d'une nouvelle classe thérapeutique, les échinocandines (**Faure, 2009**).

L'imperfection de ces traitements a conduit au développement d'antifongiques actifs et bien tolérés. C'est pourquoi, depuis son isolement et sa caractérisation en 1956 et jusqu'à nos jours, l'amphotéricine B, chef de file des antifongiques polyéniques, est considérée comme l'antifongique de choix pour la prise en charge des mycoses systémiques invasives causées par des pathogènes fongiques multi-résistants malgré sa toxicité substantielle vis-à-vis des cellules animales hôtes. Son spectre d'action est le plus large de tous les antifongiques actuellement disponibles (**Cavassin et al., 2021; Parvez et al., 2021**).

La molécule d'amphotéricine B, fut isolée, pour la première fois, en 1956 par Gold et ses collaborateurs à partir de *Streptomyces nodosus*, un actinomycète du sol Vénézuélien. Elle se présente sous forme d'une poudre jaune, insoluble dans l'eau et les solvants organiques apolaires, mais soluble dans les solvants organiques polaires tels que le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le diméthylformamide (DMF) (**Baginski and Czub, 2009**).

Sa structure chimique comporte :

-Une partie hydrophobe constituée d'un groupement chromophore composé de sept doubles liaisons conjuguées en configuration *trans* qui lui confèrent une absorbance significative dans la région des ultraviolets (UV) ce qui permet de l'étudier par les méthodes spectroscopiques.

-Une partie hydrophile, constituée de sept groupements hydroxyles et une fonction carboxylique sur le carbone n°16 (**figure N°1**).

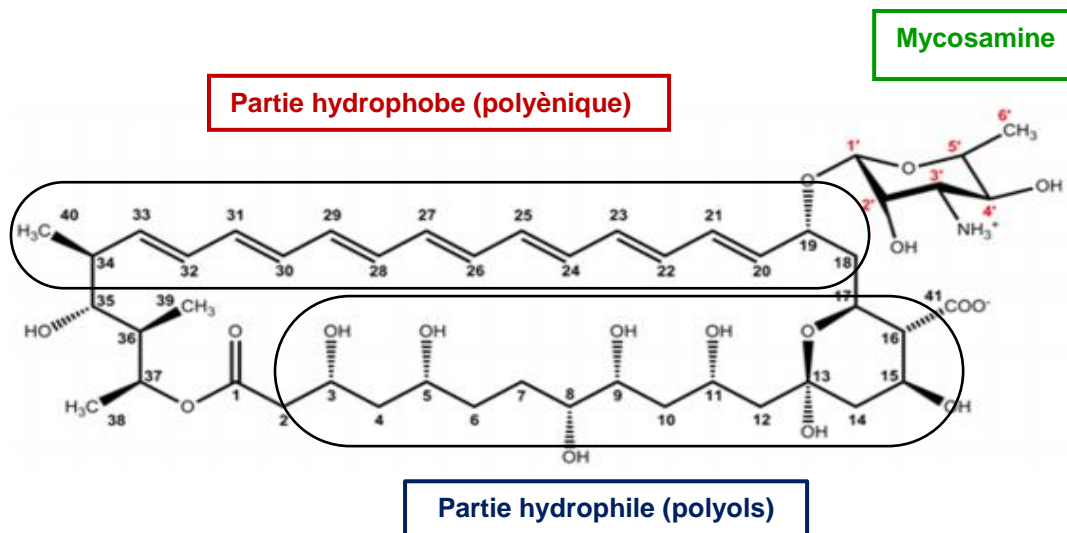


Figure N°1 : Structure chimique de l'amphotéricine B (**Filip Ciesielski, 2016**)

La présence d'une partie hydrophile et d'une partie lipophile donne à cet antifongique son caractère amphiphile.

L'amphotéricine B comporte également dans sa structure un cycle macrolactone lié à une mycosamine par une liaison β -glycosidique au carbone n°19 et un cycle hémiacétal entre le carbone n°13 et le carbone n°17 (**Dannaoui, 2013; Filip Ciesielski, 2016**).

Par ailleurs, la présence d'une fonction carboxylique et d'un amino-sucres lui confère un caractère amphotère.

Le spectre d'action de cet antifongique est très large et s'étend aux levures du genre *Candida* et *Cryptococcus*, des champignons filamenteux tels que l'*Aspergillus*. En plus de son utilisation comme antifongique, son spectre d'action pourrait même s'étendre à certains virus comme le HIV, des protozoaires comme *Leishmania* spp. et même aux infections causées par les prions. Elle est commercialisée sous le nom Fungizone®, une forme micellaire à base de désoxycholate de sodium qui permet l'administration intraveineuse de cet antifongique (**Bailly et al., 2015**).

Cependant, l'inconvénient majeure de cet antifongique est sa toxicité élevée vis-à-vis des cellules animales hôtes qui est due à son mécanisme d'action (**Borowski et al., 2020**).

Malgré que l'action thérapeutique de l'amphotéricine B, reste jusqu'à nos jours, mal élucidée et pas complètement comprise, son mécanisme d'action traditionnel est basé sur son interaction avec l'ergostérol, stérol dominant des membranes des cellules fongiques. Il en résulte la formation de canaux ioniques hydrophiles transmembranaires à l'intérieur de la bicouche lipidique de la membrane fongique à travers lesquels diffusent des ions (K^+ , Na^+ , H^+ , Cl^-) et des constituants cellulaires essentiels tels que le glucose, ce qui provoque un déséquilibre ionique et la mort cellulaire (**Voncik et al., 2016**) (**figure N°2**).

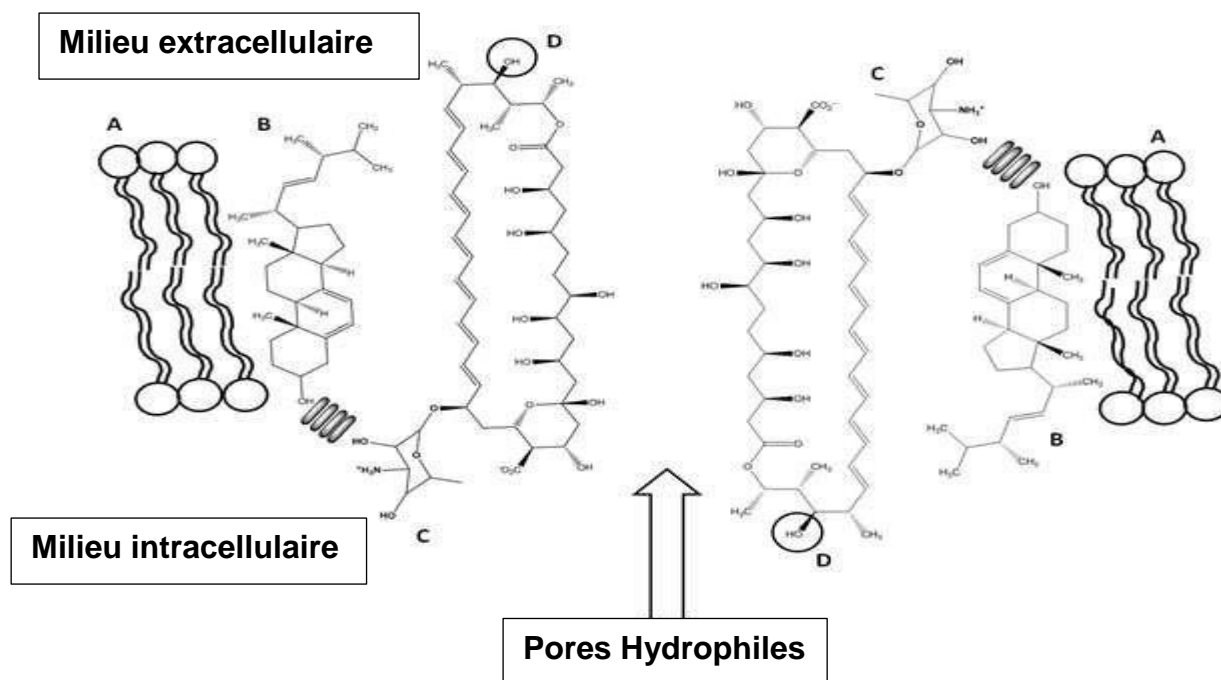


Figure N°2: Interaction amphotéricine B-ergostérol et formation de pores hydrophiles (**Voncik et al., 2016**)

Mise en évidence de la liaison électrostatique entre la mycosamine et les hydroxyles de l'ergostérol, ainsi que les groupes pharmacophores des phospholipides (A), de l'ergostérol (B), de la mycosamine (C) et de l'hydroxyle de l'amphotéricine B (D), impliqués dans cette interaction.

En fonction de la composition lipidique globale de la membrane plasmique cellulaire et la concentration en amphotéricine B, nous pouvons assister soit à la formation de canaux ou de pores complets qui traversent la bicouche lipidique, soit des demi-canaux ou des demi-pores (**Carolus et al., 2020; Zielińska et al., 2021**) (**figure N°3 A et B**).

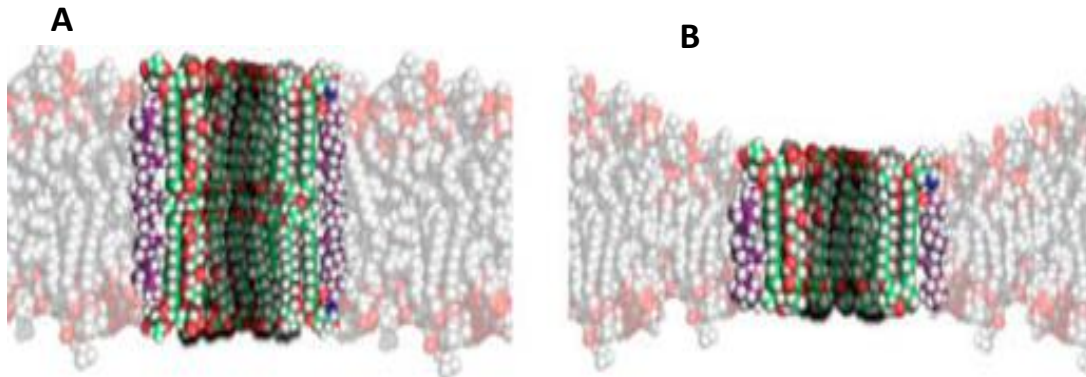


Figure N°3 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B avec la formation de pores membranaires complets (**A**) ou de demi-pores (**B**) (**Carolus et al., 2020**)

En **2014**, l'équipe d'**Anderson**, a proposé un autre mécanisme d'action de cette drogue, il s'agit du « modèle de l'éponge à stérols ». Ce dernier est basé sur l'organisation des molécules d'amphotéricine B à proximité de la membrane fongique en super-agrégats en vue d'extraire son ergostérol ce qui induit une augmentation de la fluidité membranaire suivie de la lyse cellulaire.

Par ailleurs, en **2019**, **Kristanc** et ses collaborateurs, ont proposé le « modèle d'adsorption en surface » dans lequel l'antifongique se trouve piégé par l'ergostérol membranaire ce qui entraîne une perturbation du processus d'endocytose et du fonctionnement des protéines membranaires (**Figure N°4 A et B**).

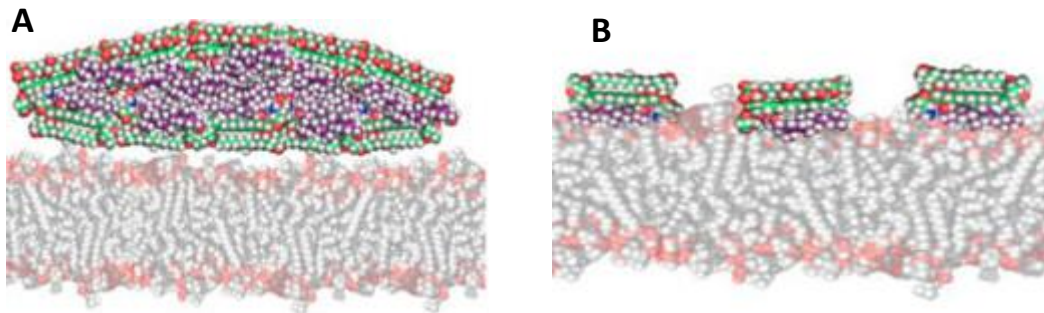


Figure N°4 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B : modèle de l'éponge à stérols (A), modèle d'adsorption en surface (B) (Carolus *et al.*, 2020)

L'amphotéricine B peut être également à l'origine d'une peroxydation lipidique, un processus au cours duquel cet antifongique réagit avec l'oxygène pour former des radicaux libres qui vont se lier aux lipides membranaires des cellules et déclencher une peroxydation lipidique (Mesa-Arango *et al.*, 2014).

Cet antifongique est capable d'interagir également avec le cholestérol, stérol majeur des membranes des cellules de mammifères hôtes, en raison de son analogie structurale avec l'ergostérol. La seule différence entre ces deux stérols réside dans les deux doubles liaisons supplémentaires caractéristiques de l'ergostérol (l'une au niveau du cycle B en position 7 et l'autre au niveau de la chaîne latérale) et d'un groupement méthyle sur le carbone 24 de sa chaîne latérale (Kamiński, 2014) (figure N°5).

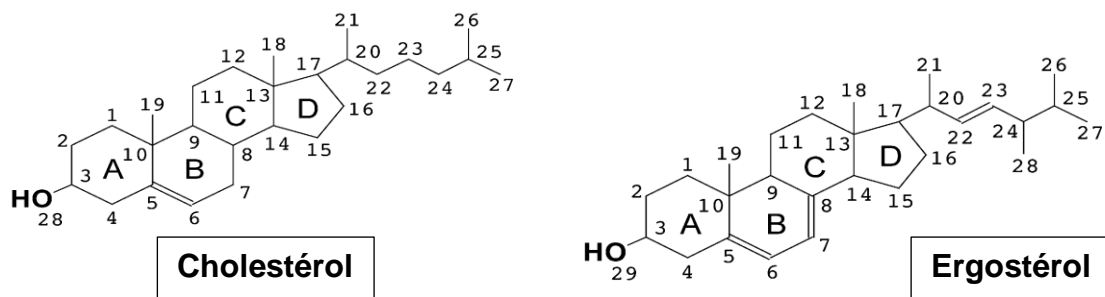


Figure N°5 : Structures moléculaires du cholestérol et de l'ergostérol (Kamiński, 2014)

Cependant, il est important de noter que l'amphotéricine B présente une affinité plus élevée et plus spécifique pour l'ergostérol que pour le cholestérol. Cette affinité est liée d'une part, à la présence d'une double liaison en C22, spécifique de l'ergostérol, capable d'établir des liaisons de Van Der Waals avec la partie hydrophobe de l'antifongique. D'autre part, à la structure tridimensionnelle cylindrique de l'ergostérol qui lui permet de se lier plus facilement à la partie polyénique hydrophobe de l'AmB, contrairement à celle du cholestérol qui est sigmoïdale. L'interaction AmB-ergostérol fait intervenir des liaisons d'hydrogènes, des liaisons de Van Der Waals et des liaisons π - π (Carolus *et al.*, 2020) (figure N°6).

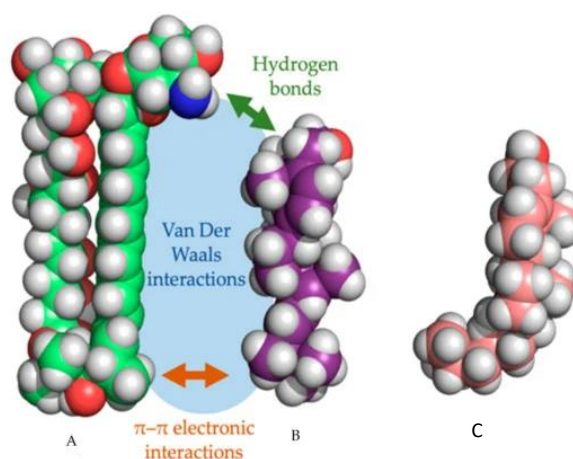


Figure N°6 : Structures tridimensionnelles de l'amphotéricine B (A) de l'ergostérol (B) du cholestérol (C) et les trois types de liaisons entre l'amphotéricine B et l'ergostérol (Carolus *et al.*, 2020)

L'interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol membranaire est à l'origine d'une toxicité importante chez la plupart des patients qui se manifeste par de nombreux effets secondaires. Dans une première phase, des réactions d'intolérance telles que des nausées, de la fièvre, une diarrhée, des douleurs articulaires et musculaires sont observées chez 70 à 90% des patients. Dans la deuxième phase, surviennent des complications viscérales, essentiellement rénales qui concernent jusqu'à 80% des patients, ainsi qu'une anémie, des lésions hépatiques et myocardiques, des troubles métaboliques tels qu'une hypokaliémie et une hypomagnésémie (Qu *et al.*, 2014; Falci *et al.*, 2015; Leriverend, 2016).

L'amphotéricine B est mal absorbé par voie orale avec une biodisponibilité de 0,2 à 0,9%, pour cela elle est administrée par voie intraveineuse. Après son injection, elle se lie fortement aux protéines sériques (plus de 95 %). Sa demi-vie plasmatique initiale varie de 24 à 48 heures. Sa distribution tissulaire varie de 2,4 à 4L/kg, avec une accumulation dans le foie, la rate, les reins et les poumons. Son élimination totale de l'organisme est longue (demi-vie >15 jours), principalement assurée par les reins, mais aussi par la bile (**Yeon Kang et al., 2016**).

Il est important de noter que l'action thérapeutique et la toxicité cellulaire de l'amphotéricine B sont dues essentiellement à son insolubilité en milieu aqueux. En effet, dans l'eau, l'amphotéricine B se répartit en trois états, une forme agrégée responsable de la toxicité, une forme oligomérique (essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité et une forme monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique. L'équilibre entre ces trois formes dépend de la concentration d'amphotéricine B et du solvant utilisé (**Joanna Zielińska and Czub, 2016**). C'est pourquoi, de nombreuses voies de recherche ont été développées ayant pour objectif principal d'améliorer la solubilité de cette drogue en milieu aqueux et par conséquent, son index thérapeutique, c'est-à-dire augmenter son efficacité vis-à-vis des cellules fongiques tout en réduisant sa toxicité vis-à-vis des cellules animales hôtes.

Rappelons que dans sa structure chimique, l'amphotéricine B présente deux groupements fonctionnels, un groupement amine chargé positivement et un groupement carboxylique avec une charge négative. Ces derniers constituent des sites pour la fixation de radicaux de différentes natures en vue de l'obtention de nouveaux dérivés hydrosolubles de cet antifongique avec moins d'effets indésirables.

Les premiers travaux dans ce contexte ont été initiés dans les années 80 par l'équipe de **Borowski**. Leur recherche a porté sur l'analyse de divers dérivés de l'AmB afin d'évaluer l'impact des modifications structurales sur leur interaction avec les stérols membranaires (**Chéron et al., 1988; Czerwinski et al., 1990**).

Aussi, en **2016**, **Antillón** et ses collaborateurs ont rapporté que l'addition d'un groupement méthyl ester de la L-histidine sur la fonction carboxylique de l'amphotéricine B augmente son efficacité *in vivo* chez des rats infectés par l'espèce *Candida albicans* 10231.

Récemment, plusieurs dérivés de l'AmB ont été produits par greffage du N-succinimidyl, 4 N-benzyl, 5 N-thiouréidyl et 9 N-aminoacyl et N-aminoacyl de l'ester méthylique sur la fonction amine. Les produits obtenus étaient moins toxiques vis-à-vis des globules rouges, mais moins efficaces envers les cellules fongiques type *Candida albicans* par rapport à la molécule conventionnelle (**Borowski et al., 2020; Zhang et al., 2021**).

Une autre voie de recherche basée sur la modulation de l'environnement physico-chimique de cet antifongique a été explorée. Les travaux menés *in vitro* et *in vivo* ont montré que l'amphotéricine B préparée dans le tampon acide acétique/acétate pH 5,4 ; 100mM préchauffée à 70°C présente une meilleure efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 avec une moindre toxicité vis-à-vis des globules rouges humains et des rats Wistar infectés par cette même souche (**Belkherroubi-Sari et al., 2008; Mezerai et al., 2017**).

Un autre axe de recherche a été également développé, basé sur la vectorisation de cet antifongique par des complexes lipidiques ce qui a abouti à la mise sur le marché de nouvelles formulations efficaces et moins toxiques pour les cellules animales hôtes telles que l'Ambisome®, l'Amphocil®, l'Intralipide® et l'Abelcet®. L'inconvénient majeure de ces formulations est leur coût exorbitant qui limite leur utilisation dans les pays en développement (**Andres et al., 2001**).

Un autre vecteur a été utilisé, il s'agit de la sérum albumine bovine (SAB). Les résultats obtenus ont montré que la complexation de l'amphotéricine B avec la SAB, améliore sa solubilité en milieu aqueux avec une libération prolongée et graduelle du médicament et réduit sa toxicité *in vitro* sur une lignée cellulaire HEK293T. Cependant, cette nouvelle formulation est moins efficace que l'amphotéricine B conventionnelle (**Gurudevan et al., 2018**).

Dans cette même stratégie, d'autres molécules organiques telles que les polysaccharides ont été utilisées en complexation avec cet antifongique. En effet, en 1999, l'équipe de **Domb** a révélé que la complexation de l'amphotéricine B avec l'arabinogalactane, un polysaccharide composé de D-galactose et de L-arabinose, augmente son efficacité vis-à-vis de *Leishmania major* et de *Candida albicans in vitro* et *in vivo* comparée à la Fungizone® et à l'amphotéricine B liposomale (**Golenser et al., 1999**).

Ce même complexe a été testé chez des souris BALB/c infectées par *Aspergillus*. Les résultats de cette étude ont montré qu'après son administration, les concentrations les plus élevées en amphotéricine B ont été détectées dans les poumons, suivis du foie, de la rate et des reins, avec un taux d'élimination cinq fois plus faible que celui de la fungizone®. Un prolongement de la survie des souris a été également observé avec une efficacité comparable à celle de la formulation liposomale (**Falk et al., 2004**).

De même, un oligosaccharide, la γ -cyclodextrine, a été testé en complexation avec la molécule d'amphotéricine B. Ces travaux ont conduit à l'élaboration d'une suspension γ -cyclodextrine/amphotéricine B, destinée à un usage par voie ophtalmique et cutanée. Ce complexe a permis d'améliorer la solubilité, la stabilité chimique et l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* et *Leishmania* spp. par rapport à la Fungizone® (**Serrano et al., 2012; Ruiz et al., 2014**).

Partant de toutes ces données et dans un souci d'augmenter l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, c'est-à-dire réduire sa toxicité vis-à-vis des cellules animales sans altérer son efficacité envers les cellules des levures et des fungi, nous nous sommes intéressés à l'élaboration de nouvelles formulations de cet antifongique basées sur sa complexation avec des polysaccharides naturels.

Notre choix a porté sur le fruit du palmier dattier *Phoenix dactylifera* L., variété «Ajwa» pour sa richesse en sucre, en fibres alimentaires, en acides aminés essentiels et d'autres éléments phytochimiques qui lui confèrent des propriétés nutritionnelles et médicinales intéressantes (**Assirey, 2015; Carolus et al., 2020**).

En effet, des études antérieures ont montré que l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» réduit la néphrotoxicité induite par l'ochratoxine, une mycotoxine, produite par plusieurs espèces fongiques appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus*, chez les rats Wistar (**Ali and Abdu, 2011**) et présente une activité antioxydante supérieure à d'autres variétés de dattes (**Mazerski et al., 1990; Pathakumari et al., 2020**). De plus, en **2012, Bokhari et Perveen** ont mis en évidence l'effet antifongique de l'extrait aqueux des noyaux de la datte «Ajwa» vis-à-vis d'espèces fongiques.

De ce fait, pour notre étude qui a porté sur la modulation de la toxicité sélective, *in vitro*, de la cytotoxicité sélective de l'amphotéricine B complexée aux extraits aqueux et polysaccharidiques de la datte «Ajwa», nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Optimiser l'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» en utilisant un modèle mathématique et caractérisation de la fraction glucidique par Chromatographie Liquide à Haute Performance.
- Etudier la stabilité moléculaire de l'amphotéricine B en présence des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» par un balayage spectral dans le domaine ultraviolet (UV).
- Evaluer l'efficacité de l'amphotéricine B complexée aux extraits aqueux et polysaccharidiques de la datte «Ajwa» vis-à-vis d'un modèle de levure, *Candida albicans* ATCC 10231. Etude du phénomène de dormance.
- Mettre en évidence l'effet anti-hémolytique de ces nouvelles formulations vis-à-vis des globules rouges humains.

Deuxième partie : Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique », faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers de l'université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen.

1. Matériel biologique

1.1. Dattes «Ajwa»

Notre choix a porté sur la variété de datte «Ajwa» ou *Phoenix dactylifera* qui provient de Médine (Arabie Saoudite) au stade mature (*Tamr*) et conservée à l'abri de la lumière à une température de 0°C pendant toute la durée de l'expérimentation. Seul le fruit (endocarpe, mésocarpe et épicarpe) est utilisé pour cette étude.

La littérature islamique met en avant les propriétés bénéfiques de cette variété (**Khalid et al., 2016**).

عن عائشة رضي الله عنها، قال رسول الله صلى الله عليه وسلم «إِنَّ فِي عَجْوَةِ الْعَالِيَةِ شِفَاءً، أَوْ إِنَّهَا تَزِيْقُ، أَوْلَ الْبُكْرَةِ» صحيح مسلم رقم 2048.

C'est une datte demi-molle avec une forme moyenne (3cm) de couleur sombre et un goût sucré. La partie comestible de la datte, appelée aussi chair ou pulpe, est constituée d'un épicarpe ou enveloppe cellulosique fine appelée peau, d'un mésocarpe généralement charnu, de consistance variable et d'un endocarpe de teinte plus claire et de texture fibreuse, parfois réduit à une membrane fine entourant le noyau (**Ghnimi et al., 2017b**) (figure N° 7).



Figure N°7 : Coupe longitudinale de la datte «Ajwa» (**Belmir, 2015**)

Son processus de maturation passe par plusieurs étapes qui sont représentées sur la figure N°8.

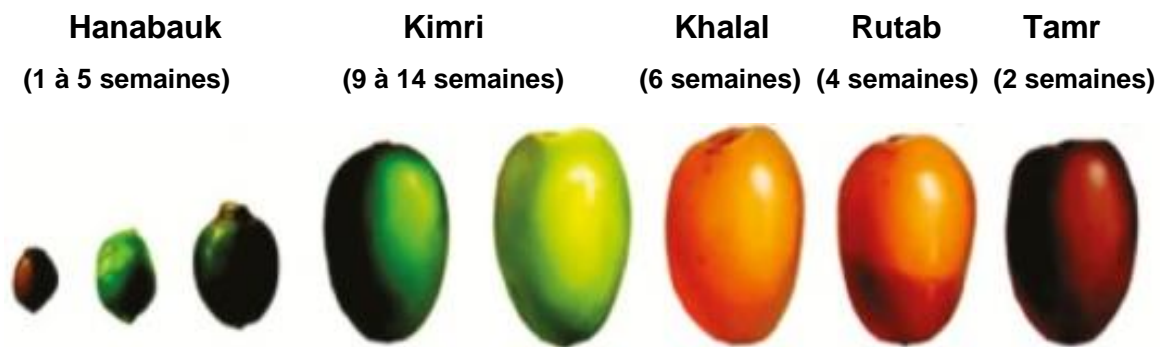


Figure N°8 : Les différentes étapes de maturation des dattes (**Ghnimi et al., 2017a**)

Au stade mature ou « Tamr », la datte «Ajwa» contient 80% de sucres réducteurs, des acides aminés essentiels tels que l'histidine 26mg/100g, la leucine 57mg/100g et la lysine 73mg/100g, des protéines et des lipides sous forme de traces (**Ali et al., 2014; Assirey, 2015; Hamad et al., 2015**).

La datte «Ajwa» représente une source importante en sucre, en fibres alimentaires (6,2 à 8,9%) et en minéraux comme le potassium, le zinc et le calcium. Elle contient aussi la provitamine A et la vitamine C (**Assirey, 2015; Alqarni et al., 2019**).

1.2. *Candida albicans*

Les tests d'efficacité sont menés sur une souche de levure de référence, *Candida albicans* ATCC 10231 (*American Type Culture Collection*) disponible au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique ». Cette souche est entretenue par repiquages réguliers sur milieu gélose Sabouraud et conservée à 4°C.

1.3. Erythrocytes

Pour l'évaluation de la cytotoxicité de la nouvelle formulation d'amphotéricine B, les globules rouges humains provenant d'un donneur unique sain, sont utilisés comme modèle de cellules animales.

1.4. Amphotéricine B

Nous avons utilisé l'amphotéricine B pure provenant des laboratoires Bristol-Meyers-Squibb (SIGMA) France. La solution mère d'amphotéricine B est préparée en extemporané par sa dissolution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10^{-3}M puis ajustée à 10^{-4}M au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 408nm selon la relation $A=\epsilon.C.l$ ($\epsilon_{408} = 160.000\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

2. Méthodes

2.1. Préparation des extraits aqueux et polysaccharidiques de la datte «Ajwa»

2.1.1. Préparation de l'extrait aqueux

Pour la préparation de l'extrait aqueux, nous avons utilisé la technique de macération. Pour cela, une quantité de dattes suffisante pour avoir une concentration finale égale à 5 ; 20 et 33% est placée dans 50mL d'eau distillée stérile, puis laissée macérer pendant 24 heures. Le mélange est ensuite broyé, puis filtré sur une double couche de bande de gaze (**Abu-Elteen, 2000**).

2.1.2. Extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» par la méthode des ultrasons

Les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sont extraits par ultrasons, une méthode largement utilisée en biotechnologie dont le principe est basé sur l'utilisation d'ondes ultrasonores pour fragmenter les matériaux végétaux ou microbiens. Cette technique présente plusieurs avantages, notamment une vitesse d'extraction élevée et une préservation des activités biologiques des polysaccharides extraits (**Maran and Priya, 2015a; Hu et al., 2016; Raza et al., 2017**).

a- Optimisation de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» par ultrasons

Cette partie consiste à mettre en évidence l'effet de certains paramètres sur le rendement de l'extraction des polysaccharides tels que, la puissance des ultrasons (W), la température d'extraction (°C), le temps d'extraction (min), le ratio eau/matière première (mL/g) (**Zheng et al., 2014; Maran and Priya, 2015a; Wang et al., 2015**).

Nous avons utilisé le logiciel *Design Expert 9*, qui offre des fonctionnalités pour l'analyse de données multivariées, des fonctions d'optimisation avancées et des outils de visualisation (3D).

- **Technique de criblage**

Cette technique permet de déterminer la gamme préliminaire des variables d'extraction à savoir X_1 (puissance des ultrasons), X_2 (température d'extraction), X_3 (temps d'extraction) et X_4 (ratio : eau/matière première). Les intervalles de variation pour chaque facteur sont les suivants :

- La puissance des ultrasons (20, 40, 60, 80 et 100W) ;
- La température d'extraction (30, 40, 50, 60 et 70°C);
- Le temps d'extraction (10, 20, 30, 40 et 50 minutes) ;
- Le ratio : eau/matière première (10, 20, 30, 40 et 50 mL/g).

Les résultats obtenus permettent de définir le domaine de variation des paramètres d'extraction et d'évaluer leur effet sur le rendement de l'extraction des polysaccharides.

- **Méthode des surfaces de réponse (MSR)**

la méthodologie des surfaces de réponse est un ensemble de méthodes mathématiques et statistiques basées sur la conception expérimentale, qui permet d'établir une relation approximative entre les variables d'entrée et la réponse de sortie dans le but d'optimiser le processus (**Kamoun et al., 2011; Tekindal et al., 2012**).

Pour la présente étude, nous avons définies comme variables aléatoires d'entrée, la puissance des ultrasons, la température d'extraction, le temps d'extraction et le ratio (eau/datte) et pour la réponse de sortie, le rendement en polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa».

La MSR passe par les phases suivantes (**Saporta, 2006; Manohar et al., 2013**):

* **Construction du plan expérimental** : notre choix a porté sur les plans Box-Behnken qui nécessitent moins d'essais avec plus d'efficacité.

* **Modélisation de la réponse** : Pour cette étape, nous avons utilisé une équation de régression polynomiale du second ordre, qui permet de relier une réponse

«Y» à un ensemble de facteurs «Xi». Le modèle des surfaces de réponse s'écrit de la manière suivante:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{i < j}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Y : la réponse (rendement en polysaccharides hydrosolubles),

X_i et X_j : les variables indépendantes (paramètres d'extraction) (i et j de 1 à k),

β₀: le coefficient d'interception du modèle,

β_i, β_{ii} et β_{ij} : les coefficients des effets linéaires, des effets quadratiques et des effets d'interactions entre les facteurs,

k : est le nombre des paramètres indépendants (k=4).

Afin d'obtenir un rendement optimale (réponse), plusieurs essais qui consistent à faire varier les paramètres d'extraction (facteurs), sont réalisés (**Tableau N°1**).

Les résultats obtenus sont soumis à une étude statistique qui nous permet de calculer la significativité du modèle de régression, le coefficient de détermination R² et le défaut d'ajustement (**Whitcomb and Anderson, 2004; Khuri, 2006**).

***Représentation graphique** : les courbes des surfaces de réponse sont représentées en 3D pour permettre de mettre en évidence l'effet des différents paramètres sur l'optimisation du système expérimental (**Khuri and Mukhopadhyay, 2010; Prakash Maran et al., 2013**).

Tableau N°1 : Matrice de conception expérimentale

Ordre d'exécution	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
1	80	50	20	40
2	40	50	20	40
3	40	50	10	30
4	60	50	20	30
5	80	50	10	30
6	60	50	20	30
7	60	40	30	30
8	60	50	30	40
9	60	40	20	20
10	60	60	10	30
11	60	50	30	20
12	60	50	20	30
13	80	50	30	30
14	80	40	20	30
15	60	60	30	30
16	80	60	20	30
17	60	50	10	40
18	60	40	10	30
19	60	60	20	20
20	40	50	30	30
21	60	60	20	40
22	40	50	20	20
23	60	50	20	30
24	80	50	20	20
25	60	50	20	30
26	40	40	20	30
27	60	40	20	40
28	60	50	10	20
29	40	60	20	30

b. Préparation de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles

L'extraction par ultrasons est réalisée à l'aide d'un sonicateur (*ultrasonic cleaner set*, modèle WUC-D06H, 40 kHz), avec un contrôle de la puissance des ultrasons, de la température et du temps requis.

10g de dattes sont mis en suspension dans 273mL d'eau distillée. Le mélange est soumis à une puissance ultrasonore de 70W, maintenue à 57°C pendant 30 minutes. Les expériences ont été effectuées en triplicata et les résultats obtenus représentent la moyenne de ces trois expériences.

L'extrait est ensuite filtré à l'aide du papier filtre Whatman N°1, puis concentré au rotavapeur sous vide R-200 à 45°C et centrifugé à 3000tours/min pendant 15 minutes à l'aide d'une centrifugeuse sigma 3-16PK et le surnageant contenant les polysaccharides est déprotéinisé par le réactif de Sevag (chloroforme : butanol, 4:1) **(Maran and Priya, 2015a; Yang et al., 2015)**.

Les polysaccharides sont ensuite précipités par de l'éthanol à 95% (1 : 4, v/v) pendant 48 heures à 4°C. Après une centrifugation à 3000trs/min pendant 15 minutes et lavage à l'éthanol à 95% puis à l'acétone, les polysaccharides sont séchés à l'étuve à 40°C.

Le rendement en polysaccharides est calculé selon l'équation suivante :

$$R (\%) = \frac{W}{W_0} \times 100$$

W (g) : poids en gramme de l'extrait brut des polysaccharides hydrosolubles

W₀ (g) : poids initial en gramme de la date «Ajwa»

2.2. Préparation des milieux de culture

La croissance des levures est réalisée sur milieu Sabouraud liquide additionné de 5 ; 20 et 33% de l'extrait aqueux et 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles. Les six milieux ainsi préparés sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 10 minutes.

La croissance témoin est menée sur milieu Sabouraud sans aucune addition.

2.3. Analyses spectroscopiques

2.3.1. Dosage de la fraction glucidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

C'est une méthode colorimétrique qui permet de quantifier les glucides totaux par une hydrolyse à chaud des liaisons glycosidiques en présence d'acide sulfurique concentré. Il en résulte la formation de composés furfuriques qui en présence de phénol produisent une couleur orange-jaune qui absorbe la lumière polarisée à une longueur d'onde de 490nm (DuBois *et al.*, 1956; Masuko *et al.*, 2005).

Un volume de 200µL de l'échantillon sont mélangés avec 200µL de phénol 5% et 1mL d'acide sulfurique concentré. Après une incubation de 5 minutes 90°C, les tubes sont laissés à température ambiante pendant 30 min à l'abri de la lumière. Une gamme étalon de glucose est réalisée avec des concentrations finales comprises entre 0,01 à 0,1g/L. L'absorbance est mesurée à 490nm au spectrophotomètre.

2.3.2. Evaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

a. Méthode de piégeage du 2,2'-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH')

Cette méthode est basée sur l'évaluation de la capacité des antioxydants à piéger le 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH').

Le DPPH' est un radical libre stable de couleur violette qui est réduit en présence de composés antiradicalaires produisant une couleur jaune qui absorbe la lumière à une longueur d'onde comprise entre 514 et 518nm.

Les absorbances mesurées permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH', qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon.

L'activité antiradicalaire des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur le DPPH' est mesurée selon le protocole décrit en 1998 par Sanchez Moreno et ses collaborateurs.

Un volume de 50µL de polysaccharides hydrosolubles à des concentrations finales allant de 0,025 à 0,25mg/mL, est ajouté à 1,95mL de la solution méthanolique du DPPH' ($6,34 \cdot 10^{-5}M$) fraîchement préparée. Le contrôle négatif est préparé en parallèle

en mélangeant 50 μ L de méthanol avec 1,95mL d'une solution méthanolique de DPPH \cdot .

Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, les absorbances sont lues à 515nm à l'aide d'un spectrophotomètre, contre un blanc qui contient 50 μ L de l'extrait et 1,95mL de méthanol.

Le butylhydroxytoluène (BTH) est utilisé comme contrôle positif. Son absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons.

Le pourcentage de piégeage du radical DPPH \cdot est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Activité antiradicalaire (\%)} = \frac{\text{Abs contrôle négatif} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs contrôle négatif}} \times 100$$

La Concentration Inhibitrice à 50% (CI₅₀) correspond à la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire de 50% la quantité des radicaux DPPH \cdot . Elle est déterminée graphiquement par une régression linéaire des courbes représentant les pourcentages d'inhibition en fonction des différentes concentrations de polysaccharides (**Sharma and Bhat, 2009**).

b. Méthode de de piégeage de l'acide 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS \cdot^+)

Le radical ABTS \cdot^+ est généré par l'oxydation de la molécule stable d'ABTS avec du persulfate de potassium. Le produit de cette réaction est de couleur bleu-vert intense qui en présence d'un agent antioxydant est réduit en un composé incolore dont l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 734nm (**Miller and Rice-Evans, 1997**).

Une solution aqueuse d'ABTS à 7mM est mélangée à un oxydant, le persulfate de potassium (K₂S₂O₈) à une concentration de 2,45mM. Après une incubation de 12 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, le mélange est dilué par addition de l'éthanol pour obtenir une absorbance 0,70 \pm 0,02 à une longueur d'onde de 734nm.

A partir de cette solution (ABTS \cdot^+), 2mL sont récupérés et mélangés à 0,2mL de polysaccharides hydrosolubles à des concentrations finales comprises entre 0,05 et 0,4mg/mL. Après 6 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance du

mélange est mesurée à 734nm contre un blanc (témoin négatif). Le BHT est utilisé comme témoin positif.

Les résultats obtenus permettent de déterminer le pourcentage d'inhibition et d'exprimer l'activité antiradicalaire sous forme de CI_{50} , selon la méthode décrite précédemment pour le radical DPPH[•] (Lee *et al.*, 2005).

c. Méthode de réduction du fer (*Ferric ion Reducing Antioxidant Power* : FRAP)

Cette méthode permet de mesurer la capacité des polysaccharides à réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) présent dans le ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ en ferrocyanure de potassium (Fe^{2+}).

100 μ L d'extrait de polysaccharides hydrosolubles à des concentrations finales comprises entre 0,075 et 1mg/mL sont mélangés avec 250 μ L d'une solution tampon phosphate pH 6,6 ; 0,2M et 250 μ L d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%.

Les tubes sont placés dans un bain-marie à 50°C pendant 20 minutes puis laissés à température ambiante jusqu'à leur refroidissement. La réaction est arrêtée par addition de 250 μ L d'acide trichloroacétique à 10%.

Après une centrifugation à 3000 tours/min pendant 10min, 500 μ L des surnageants sont prélevés et mélangés à 500 μ L d'eau distillée et 100 μ L d'une solution de chlorure de fer ($FeCl_3 \cdot 6 H_2O$) à 0,1% fraîchement préparée et les absorbances sont lues à 700nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le BHT est utilisé comme contrôle positif.

La Concentration Efficace à 50% (CE_{50}) représente la concentration de l'échantillon nécessaire pour réduire 50% de la quantité d'ions ferriques (Fe^{3+}). La CE_{50} représente la concentration de l'extrait nécessaire pour atteindre une absorbance de 0,5 (Karagözler *et al.*, 2008).

d. Méthode de décoloration du β -carotène (Co-oxydation du β -carotène et l'acide linoléique)

Cette technique est basée sur la mesure de la décoloration du β -carotène induite par sa dégradation oxydative par les produits d'oxydation de l'acide linoléique.

Selon le protocole d'**Ozsoy et al., (2008)**, 2mg de β -carotène sont dissouts dans 10mL de chloroforme. A partir de cette solution, 1mL est prélevé et mélangé avec 200mg de tween 40 et 20mg d'acide linoléique.

Après élimination du chloroforme au rota-vapeur à 40°C, le résidu obtenu est repris dans 50mL d'eau oxygénée ultra-pure. 5mL de de cette émulsion sont incorporés dans des tubes à essai contenant 200 μ L d'extrait de polysaccharides hydrosolubles à des concentrations finales allant de 0,015 à 0,5mg/mL. Deux lectures des absorbances sont effectuées à 470nm contre un blanc (émulsion dépourvu de β -carotène), l'une immédiatement et l'autre après 120 minutes d'incubation à 50°C.

Un contrôle négatif contenant 5mL de l'émulsion et 200 μ L d'eau distillée est réalisé en parallèle. Le BHT est utilisé comme témoin positif.

Le pourcentage d'inhibition de blanchiment de β -carotène est exprimé selon la formule suivante :

Pourcentage d'inhibition = $[1 - (A_0 - A_t) \text{ échantillon} / (A_0 - A_t) \text{ contrôle négatif}] \times 100$

A_0 : Absorbance à t_0

A_t : Absorbance après incubation à 120 min

2.3.3. Evaluation de la stabilité de l'amphotéricine B complexée aux polysaccharides hydrosolubles

Pour les tests de stabilité de la nouvelle formulation (AmB/polysaccharides), nous avons utilisé l'amphotéricine B à une concentration finale de 10⁻⁵mg/mL. A cette concentration, la structure vibrationnelle caractéristique des polyènes conjugués, qui présentent une série de bandes principales à 408, 385, 366 et 348 nm, peut être mise en évidence. Les solutions mères des polysaccharides sont préparées en extemporané dans un tampon phosphate pH7,4 ; 10mM puis ajoutées à des concentrations finales de 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL au milieu réactionnel contenant l'amphotéricine B puis incubées à 4°C.

Afin d'obtenir le spectre caractéristique de la forme monomérique de l'amphotéricine B à 408nm, les solutions préparées sont diluées dans le méthanol absolu (**Mohamed-Ahmed et al., 2013**).

L'étude spectroscopique est réalisée par un balayage spectral dans le domaine ultraviolet (UV) toutes les 24 heures pendant 11 jours à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption UV-Visible SPECORD® PLUS-Analytik Jena.

Les spectres caractéristiques des doubles liaisons conjuguées (groupement chromophore) sont enregistrés dans un intervalle allant de 300 à 450nm.

2.4. Caractérisation des monosaccharides de l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

Elle est réalisée au laboratoire de génétique moléculaire des eucaryotes, au centre de biotechnologie de Sfax (CBS), Tunisie.

L'analyse qualitative des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» est réalisée par chromatographie liquide à haute performance, à l'aide d'un système de la série 1100 d'Agilent Technologies, équipé d'une pompe capillaire (G1376A) fonctionnant à débit de 0,6mL/min, un micro-échantillonneur automatique thermostaté (micro-ALS) (G1387A), d'une colonne de type Aminex 87C et d'un détecteur disposé d'une cellule *Refractive Index Detector* (RID) selon le protocole d'**Amelung et al., (1996)**.

Une quantité de 12,5mg de polysaccharides hydrosolubles sont traités par l'acide trifluoroacétique (TFA) 4M, pendant 4 heures à 105°C, puis séchée à l'aide d'un concentrateur sous vide (*speed vacuum concentrator*). L'hydrolysate est dissout dans 1mL d'eau ultra-pure (phase mobile) puis filtré (diamètre des pores à 0,45µm). Un volume de 25µL est injecté à 80°C, l'élution est réalisée pendant 30 minutes. Une gamme d'étalon est préparée dans les mêmes conditions expérimentales.

2.5. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231

La solution mère d'amphotéricine B est préparée en extemporané par sa dissolution dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 10⁻³M puis ajustée à 10⁻⁴M au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 408nm selon la formule $A = \epsilon \cdot C \cdot l$ ($\epsilon_{408} = 160.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

L'antifongique est utilisé à une concentration finale de 0,4µg/mL qui correspond à sa Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) (**Boucherit et al., 2007**).

Les cultures de levures sont menées dans des tubes coniques stériles de 30mL contenant le milieu Sabouraud liquide additionné de l'extrait aqueux ou de l'extrait de polysaccharides hydrosolubles à des concentrations finales de 5 ; 10 et 33% et 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL respectivement. Les tubes sontensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 18 heures à une concentration de 2×10^6 cellules/mL puis placés dans un incubateur de paillasse (*Thermo Forma Orbital Shaker*) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute.

La croissance est suivie depuis le temps zéro, qui correspond à l'addition de l'antifongique et de l'inoculum, par dénombrement des levures viables sur cellule de Thoma toutes les heures sur une période de 40 heures.

2.6. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» vis-à-vis des globules rouges humains

Les tests de cytotoxicité sont réalisés sur un modèle de cellules animales, les globules rouges humains provenant d'un donneur unique sain.

L'amphotéricine B est utilisée à une concentration finale de 20µg/mL, afin d'obtenir un taux élevé d'hémolyse (**Jain et al., 2015**).

0,5mL d'une suspension érythrocytaire sont mélangés à 9,5mL de tampon phosphate salé de sodium (PBS) pH 7,4 ; 10mM puis placés dans une étuve à 37°C sous agitation continue à 130 tours par minute pendant 120 minutes.

Dès l'addition de l'amphotéricine B et les différents extraits [l'extrait aqueux à (5%, 20%, 33%), les polysaccharides à (0,1 ; 0,5 et 1mg/mL)] qui correspond au temps zéro de la réaction, 500µL sont prélevés à intervalles de temps irréguliers auxquels 2mL d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM) sont ajoutés. Après centrifugation à 4000 tours par minute pendant 5 minutes, le culot est éliminé et le surnageant est récupéré pour le dosage de l'hémoglobine par mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 548nm au spectrophotomètre (**Serrano et al., 2013**).

L'hémolyse totale est obtenue en mettant les globules rouges en suspension dans de l'eau distillée. Le témoin négatif correspond aux érythrocytes suspendus dans du PBS (**Alvarez et al., 2016**). Le taux d'hémolyse est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Taux d'hémolyse (\%)} = [A_E - A_0 / A_{100} - A_0] \times 100$$

Où: A_E : absorbance de l'échantillon à 548nm

A_0 : absorbance du témoin négatif à 548nm

A_{100} : absorbance du témoin positif à 548 nm

2.7. Analyse statistique

Des tests statistiques (test de Mann-Whitney, seuil de significativité $p < 0,05$) sont appliqués afin de déterminer s'il existe des différences significatives entre les différentes formulations d'amphotéricine B. Les analyses sont effectuées à l'aide du logiciel *XLSTAT* Version 2014.

Troisième partie : Résultats et discussion

A : Extraction, caractérisation et évaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

1. Extraction des polysaccharides hydrosolubles

1.1. Technique de criblage

Cette étape consiste optimiser les paramètres d'extraction à savoir, la puissance des ultrasons, la température d'extraction, le temps d'extraction, le ratio eau/datte, afin d'avoir le meilleur rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles (RPH) avec une consommation d'énergie minimale. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure N°9**.

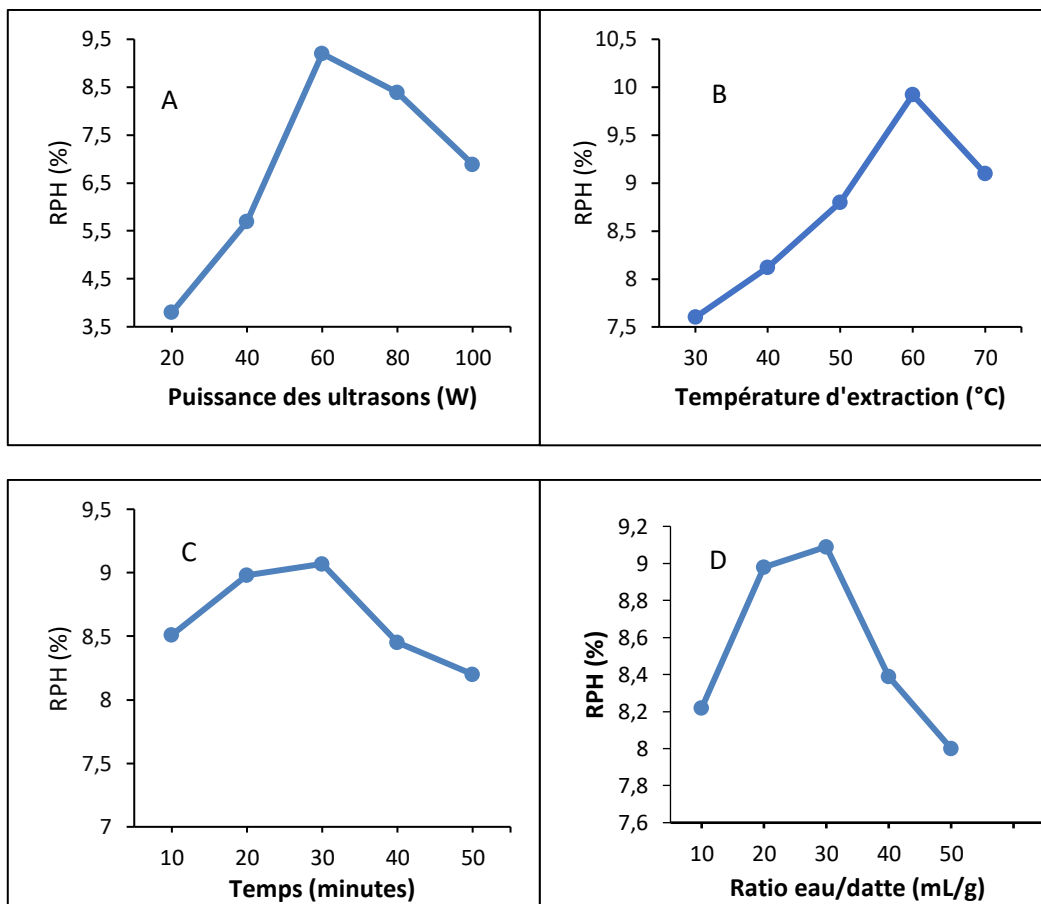


Figure N°9 : Effet de la puissance des ultrasons (A), de la température (B), du temps d'extraction (C) et du ratio eau/datte (D) sur le rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

1.1.1. Effet de la puissance des ultrasons

La **figure N°9A** représente l'effet de la puissance des ultrasons sur le rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles, RPH (%). Les expériences sont menées à 50°C pendant 30 minutes avec un ratio eau/datte de 30mL/g en présence de cinq puissances d'ultrasons, 20, 40, 60, 80 et 100 W.

Le rendement des polysaccharides hydrosolubles augmente d'une manière proportionnelle avec la puissance des ultrasons pour atteindre un maximum de $9,2\pm 0,02\%$ à 60W, ensuite il diminue à $6,89\pm 0,02\%$ pour 100W. Cet effet est dû principalement à une rupture des chaînes polysaccharidiques par la force des ultrasons générée par l'implosion des bulles de cavitation (**Wang et al., 2023**).

1.1.2. Effet de la température d'extraction

L'effet de la température sur l'optimisation de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles est évalué à 30, 40, 50, 60 et 70°C avec un ratio eau/datte 30mL/g, une puissance des ultrasons à 60W et un temps d'extraction de 30 minutes. Les résultats de cette expérience regroupés sur la **figure N°9B**, montrent que le meilleur rendement d'extraction est obtenu pour des températures comprises entre 30 et 60°C. Un rendement maximal estimé à $9,92\pm 0,03\%$ est atteint à une température égale à 60°C.

1.1.3. Effet du temps d'extraction

Les expériences sont suivies pendant 10, 20, 30, 40 et 50 minutes à 60°C, 60W avec un ratio eau/datte de 30mL/g. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure N°9C**.

Nous constatons que le rendement en polysaccharides hydrosolubles augmente avec le temps d'extraction pour atteindre une valeur maximale de $9,07\pm 0,01\%$ à 30 minutes.

La diminution du rendement observée pour des températures supérieures à 60°C et des temps d'extraction dépassant les 20 minutes, est probablement liée au fait que les polysaccharides sont des macromolécules qui peuvent être dégradées par la chaleur. En effet, le poids moléculaire et la viscosité des polysaccharides et par conséquent, leur rendement d'extraction, dépendent de la température et du temps de traitement (**Afshari et al., 2015; Zhao et al., 2020**).

1.1.4. Effet du ratio eau/datte

La **figure N°9D** regroupe les résultats relatifs à l'effet du ratio eau/datte (mL/g) sur le rendement d'extraction des polysaccharides de la datte «Ajwa». Les expériences sont menées à 60°C, une puissance d'ultrasons de 60W et un temps d'extraction de 30 minutes en présence de différents ratios eau/datte (10, 20, 30, 40 et 50mL/g).

Le rendement d'extraction des polysaccharides augmente d'une manière proportionnelle avec le volume d'eau pour atteindre une valeur maximale de $9,09\pm 0,02\%$ pour un ratio eau/dattes de 30mL/g. Selon **Samavati and Manoochehrizade (2013)**, l'eau améliore la diffusivité thermique du solvant dans les cellules ce qui induit une meilleure libération des polysaccharides hydrosolubles.

Au-delà de 30mL/g, le rendement diminue en raison de la faible répartition de l'énergie des ultrasons dans la solution d'extraction ce qui provoque une hydrolyse des polysaccharides (**Liu et al., 2024**).

1.2. Optimisation des paramètres d'extraction par la Méthode des Surfaces de Réponse (MSR)

1.2.1. Modélisation et analyse statistique

Pour la modélisation mathématique, 29 essais sont réalisés en présence de différentes combinaisons des paramètres étudiés, en l'occurrence, la puissance des ultrasons, la température d'extraction, le temps d'extraction et le ratio eau/datte.

Les résultats obtenus, analysés par une régression multiple des données expérimentales grâce au logiciel Design-Expert sont regroupées dans le **tableau N°2**.

Tableau N° 2 : Les domaines expérimentaux des paramètres étudiés pour l'optimisation de l'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

Facteurs	unité	symboles	niveaux des facteurs		
			-1	0	1
Puissance des ultrasons	W	X ₁	40	60	80
Température d'extraction	°C	X ₂	40	50	60
Temps d'extraction	min	X ₃	10	20	30
Ratio eau /datte	mL/g	X ₄	20	30	40

N° de l'essai	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Rendements %	
					Expérimental	Prédit
1	80	50	20	40	8,39	8,39
2	40	50	20	40	5,70	5,80
3	40	50	10	30	5,86	6,05
4	60	50	20	30	9,31	9,30
5	80	50	10	30	8,51	8,70
6	60	50	20	30	9,35	9,30
7	60	40	30	30	8,11	8,22
8	60	50	30	40	9,34	9,06
9	60	40	20	20	7,65	7,91
10	60	60	10	30	9,21	9,35
11	60	50	30	20	9,71	9,67
12	60	50	20	30	9,28	9,30
13	80	50	30	30	9,18	9,52
14	80	40	20	30	8,12	7,30
15	60	60	30	30	10,01	9,94
16	80	60	20	30	9,52	9,66
17	60	50	10	40	8,97	8,23
18	60	40	10	30	6,51	7,24
19	60	60	20	20	9,52	9,41
20	40	50	30	30	6,46	6,81
21	60	60	20	40	8,90	9,18
22	40	50	20	20	6,10	6,35
23	60	50	20	30	9,25	9,30
24	80	50	20	20	8,98	9,13
25	60	50	20	30	9,33	9,30
26	40	40	20	30	6,00	5,07
27	60	40	20	40	6,20	6,85
28	60	50	10	20	9,41	8,91
29	40	60	20	30	6,50	6,53

L'analyse de la variance du modèle de régression polynomiale quadratique postulé représentée sur le **tableau N°3** montre que l'effet principal de la régression est significatif ($p < 0,0001$). Par ailleurs, la probabilité de la signification du risque est supérieure à 0,05 ($p = 0,06$), de ce fait, le modèle utilisé ne présente pas de manque d'ajustement. De plus, le coefficient de détermination R^2 a une valeur proche de 1 ($R^2 = 0,9763$), par conséquent, ce modèle possède un excellent pouvoir prédictif.

Tableau N° 3 : Analyse de la variance du modèle postulé

Source de variance	Valeur p	Estimation du coefficient
Modèle (régression)	< 0,0001*	
Défaut d'ajustement	0,060	
R^2		0,9763

* significatif

1.2.2. Analyse graphique des surfaces de réponse

Les courbes des surfaces de réponse tridimensionnelles correspondent à une représentation graphique de l'équation de régression. Elles permettent de visualiser les interactions entre les différentes variables (**figures N°10**). La réponse maximale prédite est située sur le pic de la surface de réponse 3D.

La **figure N°10 (a)**, représente le rendement en polysaccharides hydrosolubles (RPH) de la datte «Ajwa» en fonction de la puissance des ultrasons et de la température d'extraction. Nous remarquons que le RPH (%) augmente avec la puissance des ultrasons et la température pour atteindre un maximum à 70W et 55°C.

Le tracé relatif à la surface de réponse 3D du RPH (%) en fonction de la puissance des ultrasons et du temps d'extraction est représenté sur la **figure N°10 (b)**. Nous constatons qu'un rendement maximal est obtenu à 70W avec un temps d'extraction de 30 minutes.

L'effet du ratio (eau/datte) et de la puissance des ultrasons sur le rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles est représenté sur la **figure N°10 (c)**. Le RPH (%) augmente rapidement et atteint un maximum entre 60 et 70W pour la puissance des ultrasons et entre 20 et 30mL/g pour le ratio (eau/datte).

La **figure N°10(d)**, représente le RPH (%) de la datte «Ajwa» en fonction du temps et la température d'extraction. Le rendement maximal est situé entre 50 à 60°C après un temps d'extraction de 25 à 30min.

La **figure N°10(e)** correspond au tracé de surface de réponse 3D relatif au RPH (%) en fonction du ratio (eau/datte) et de la température d'extraction. Nous remarquons que l'intervalle qui permet d'avoir le meilleur rendement se situe entre 25 et 30mL/g pour le ratio (eau/datte) et une température comprise entre 55 et 60°C.

En ce qui concerne l'effet du ratio (eau/datte) et le temps d'extraction, les résultats sont représentés sur la **figure N°10(f)**. Pour ces deux paramètres, le meilleur rendement est obtenu entre 25 à 30mL/g après 25 à 30 minutes.

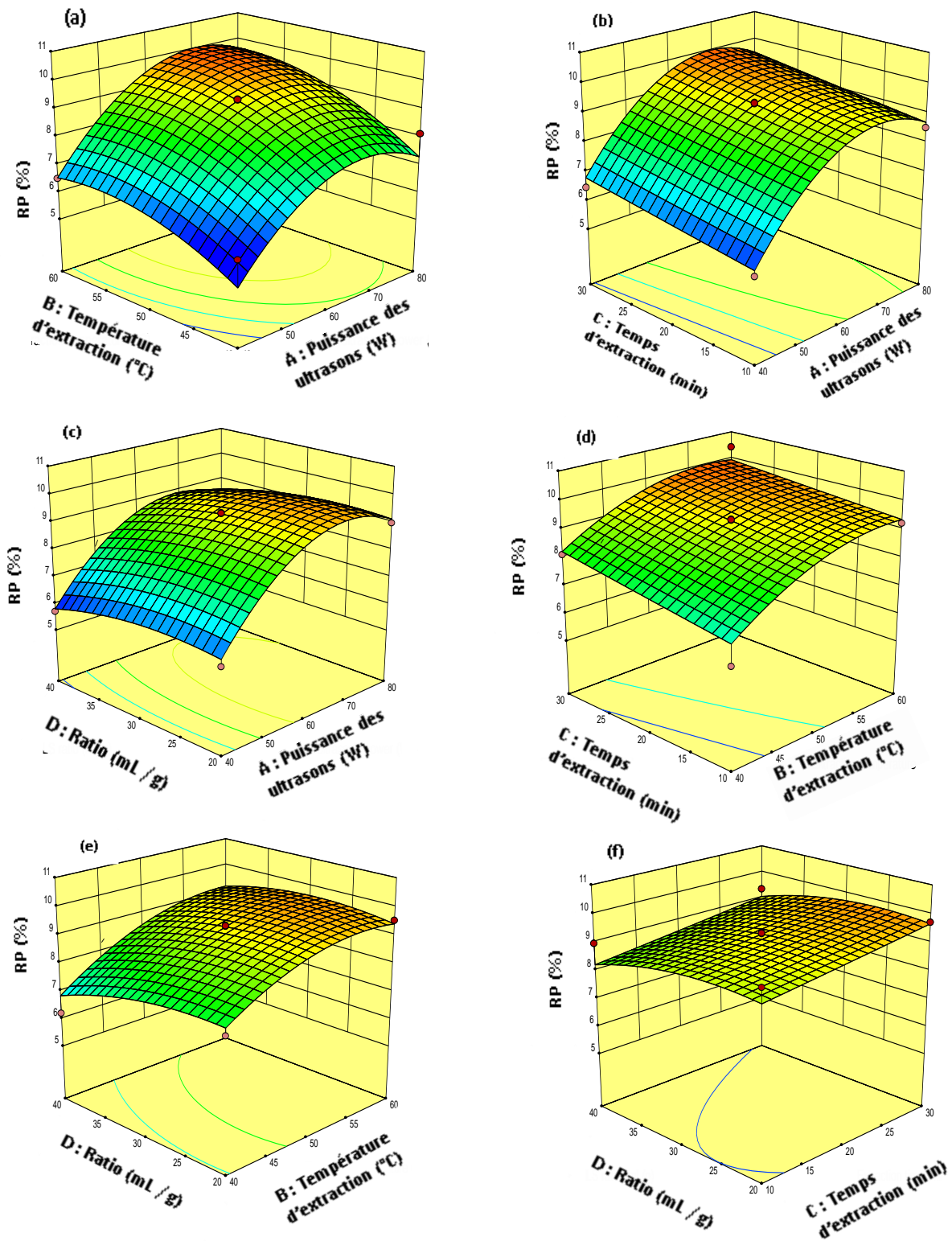


Figure N° 10 : Surfaces de réponse 3D des différentes interactions entre les paramètres d'extraction : B et A (a), C et A (b), D et A (c), C et B (d), D et B (e), D et C (f) [la puissance des ultrasons (A), la température d'extraction (B), le temps d'extraction (C), le ratio eau/datte (D)]

1.2.3. Vérification du modèle prédictif

Cette étape permet de vérifier la fiabilité des paramètres optimisés obtenus en comparant les rendements d'extraction des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa», prédits et expérimentaux. Pour cela, une expérience de vérification est réalisée dans des conditions optimales mentionnées dans le **tableau N°4**.

Tableau N° 4: Valeurs prédites et expérimentales des paramètres d'extraction dans les conditions optimales

Conditions optimales				Rendement en polysaccharides	
Puissance des ultrasons	Température d'extraction	Temps d'extraction	Ratio eau/datte	Expérimental	Prédit
70W	57,4°C	30min	27,3mL/g	10,59 ± 0,15%	10,4%

Dans ces conditions optimales (puissance des ultrasons 70W, température d'extraction 57,4°C, temps d'extraction 30min et ratio (eau/datte) 27,3mL/g), le rendement expérimental en polysaccharides est de 10,59±0,15%. La valeur expérimentale est jugée acceptable, car l'erreur relative est inférieure à 5%. Le rendement prédit est de 10,4%.

L'analyse de la variance des résultats de l'optimisation montrent que le modèle conçu est adéquat avec un R^2 de 0,9763 ce qui renseigne sur une bonne compatibilité entre les valeurs expérimentales et prédites.

Ces valeurs sont similaires à celles rapportées par **Maran and Priya, (2015b)** pour l'extraction des polysaccharides hydrosolubles à partir d'*Agave sisalana* (Sisal). En revanche, **Meng et al., (2021)**, ont obtenu un rendement maximal de 15,25% en polysaccharides hydrosolubles d'*Hemerocallis citrina* (Hémérocalle citron) à une puissance d'ultrasons de 694W, une température de 71°C, un temps d'extraction de 38 minutes avec un ratio eau/datte de 25mL/g.

Ces variations dans le rendement d'extraction entre ces différents travaux révèlent que l'optimisation des paramètres d'extraction des polysaccharides hydrosolubles est une étape clé dans ce processus.

2. Dosage de la fraction glucidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

La fraction glucidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» est calculée en utilisant l'équation de régression obtenue à partir de la courbe d'étalonnage du glucose représentée sur la **figure N°11**.

La courbe d'étalonnage est linéaire pour des concentrations en glucose comprises entre 0,01 et 0,08mg/mL avec un coefficient de corrélation de 0,978.

Le taux de glucides dans les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» est de 86%.

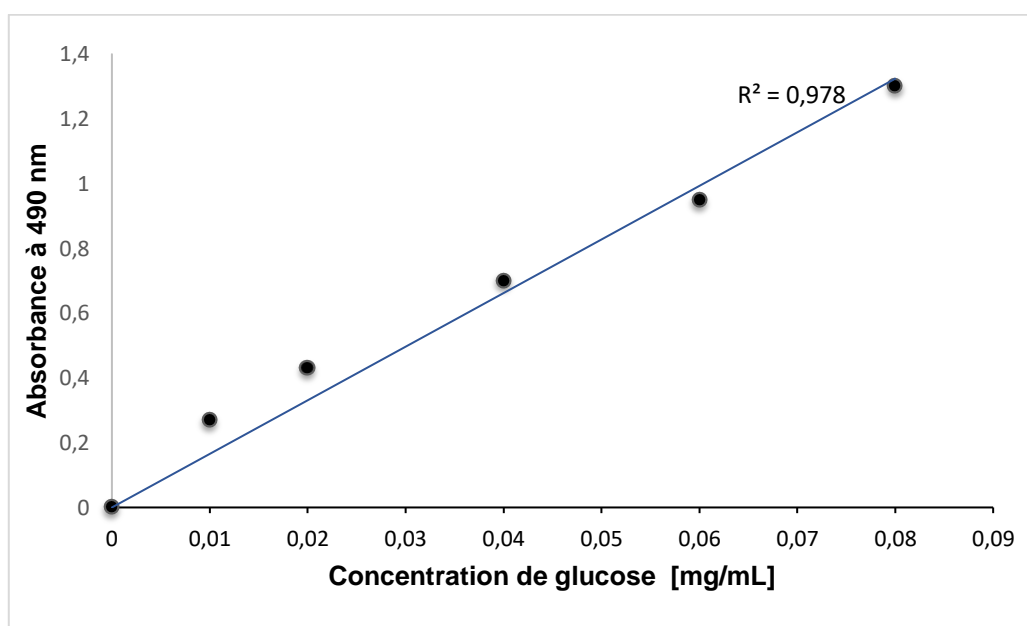


Figure N°11 : Courbe d'étalonnage du glucose

3. Caractérisation des monosaccharides de l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» par Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP)

La composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» déterminée par CLHP est représentée sur la **figure N°12** et le **Tableau N°5**. Nous constatons que l'acide glucuronique, un dérivé d'ose, est le produit majoritaire avec une concentration de 70,67mg/100mg suivi du glucose, du galactose et du fructose avec des taux respectifs de 7,7 ; 3,5 ; 1,16mg/100mg.

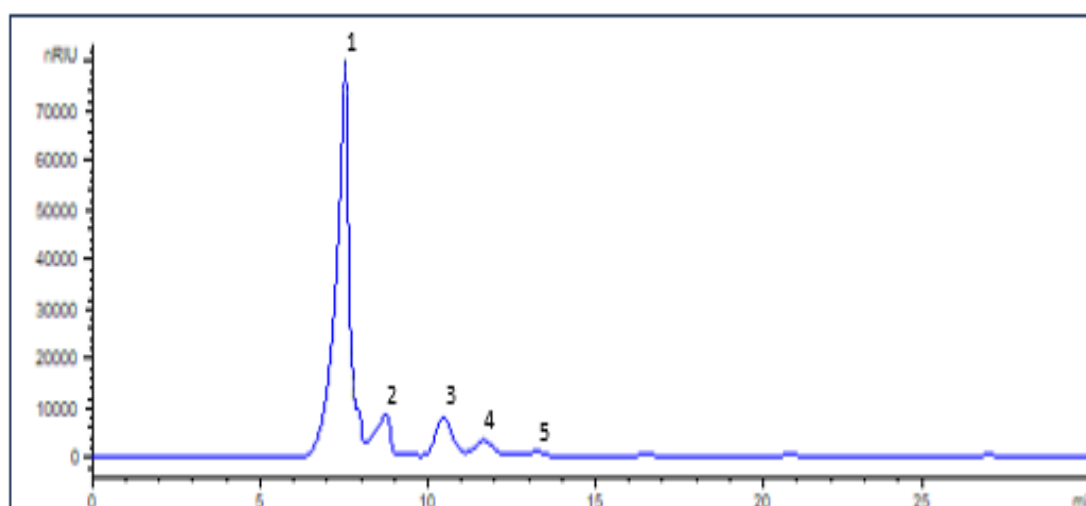


Figure N°12 : Chromatogramme de la composition en monosaccharides des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

Un disaccharide, le saccharose est également présent dans cet extrait avec un taux de 10,03mg/100mg.

Tableau N°5 : Analyse de la composition monosaccharidique des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

		Temps (min)	Surface (%)	Concentrations (mg/100mg)
Dérivé d'ose	Acide glucuronique	7,533	73,232	70,67
Disaccharide	Saccharose	8,74	9,925	10,03
Monosaccharides	Glucose	10,458	9,789	7,7
	Galactose	11,67	5,216	3,5
	Fructose	13,256	1,838	1,16

La caractérisation des monosaccharides constitutifs des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» par chromatographie liquide à haute performance a permis d'identifier la présence d'un dérivé de glucose, l'acide glucuronique avec un taux de 73,23% et de trois oses, le glucose, le galactose et le fructose avec des taux respectifs de 9,789%, 5,216% et 1,838%. Un disaccharide, le saccharose est également identifié avec un taux de 9,925%. Cette analyse met en évidence la dominance de l'acide glucuronique dans cet extrait. Cela est probablement lié à l'oxydation du D-glucose au niveau de son sixième carbone (**Solmi et al., 2017**).

De plus, l'hydrolyse des polysaccharides par l'acide trifluoracétique (TFA), bien qu'elle est largement employée, peut être à l'origine de modifications structurales telles que l'oxydation du glucose en acide glucuronique et la dégradation partielle du fructose (**Fatima, 2017**).

La caractérisation qualitative et quantitative de l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» par CLHP montre que le glucose est le principal monosaccharide de cet extrait. Ce résultat va dans le même sens que ceux d'**Ishurd et al., (2002) et Ishurd and Kennedy, (2005)** qui ont identifié les glucanes comme composés majoritaires avec une structure linéaire composée de liaisons (1→3) et (1→4) glycosidiques en configuration α et β dans des dattes libyennes. De même, **Noorbakhsh and Khorasgani, (2022)** ont mis en évidence un motif structural dominant constitué de résidus (1→3) β -D-glucopyranosyl dans les polysaccharides de la pulpe de différentes variétés de dattes.

4. Evaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

L'activité antioxydante est évaluée par quatre méthodes différentes, à savoir le piégeage du radical libre DPPH[•], le piégeage du radical cation d'ABTS^{•+} et du fer et l'inhibition du blanchiment du β -carotène. Ces méthodes reposent sur deux mécanismes soit un transfert d'électrons, soit un transfert d'atomes d'hydrogène, ou les deux à la fois.

La **figure N°13** représente les résultats relatifs à l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa». Le butylhydroxytoluène (BHT) est utilisé comme témoin positif. Les valeurs des Cl_{50} et de la CE_{50} déterminées graphiquement, sont présentés dans le **tableau N°6**.

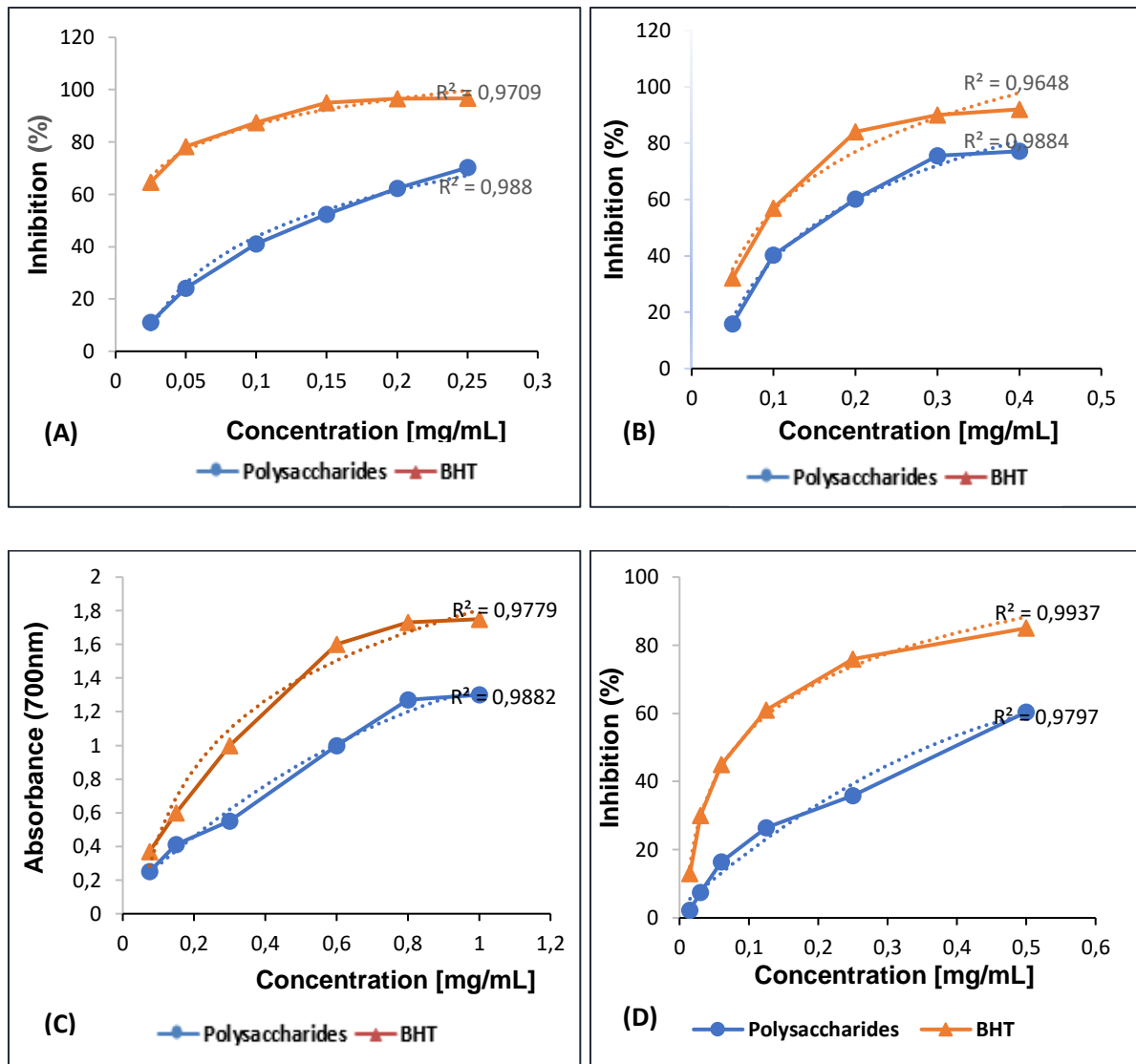


Figure N° 13: Variation du pouvoir antioxydant des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» testé par piégeage du radical libre DPPH• (A), piégeage du radical ABTS•• (B), réduction du fer (FRAP) (C) et inhibition du blanchiment du β -carotène (D)

La **figure N°13 (A)** montre que les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» présentent une activité antiradicalaire de piégeage du radical DPPH• significativement plus faible que celle du BHT (test de Mann-Whitney $p=0,0082$) avec des CI_{50} respectives de $0,13\pm 0,05\text{mg/mL}$ et $0,02\pm 0,002\text{mg/mL}$.

En ce qui concerne le piégeage du radical d'ABTS••, aucune différence significative n'est observée entre l'extrait polysaccharidiques et celle du BHT (test Mann-Whitney $p=0,296$). Les CI_{50} sont de $0,09\pm 0,003\text{mg/mL}$ pour l'extrait polysaccharidique et de

0,14±0,03mg/mL pour le BHT, ce qui suggère une activité antioxydante puissante des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» (**figure N°13(B)**).

Par ailleurs, la capacité de réduction du fer par l'extrait polysaccharidique (EC₅₀ de 0,23±0,07mg/mL) est inférieure à celle du BHT (0,12±0,03mg/mL). Selon le Test de Mann-Whitney la différence est non significative ($p=0,261$). De ce fait, l'extrait polysaccharidique de la datte «Ajwa» présente une bonne activité antioxydante (**figure N°13(C)**).

Quant à l'inhibition du blanchiment du β -carotène, les résultats présentés dans la **figure N°13(D)** révèlent que les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» (CI₅₀=0,35±0,04mg/mL) présentent une faible activité par rapport au BHT (CI₅₀ =0,07±0,002mg/mL). Cette différence est statistiquement non significative ($p=0,092$).

Tableau N° 6: Valeurs des CI₅₀ et CE₅₀ des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

	Piégeage du DPPH·	Piégeage d'ABTS ^{•+}	Inhibition du blanchiment de β -carotène	Réduction du Fer
	CI ₅₀ (mg/mL)			CE ₅₀ (mg/mL)
Polysaccharides hydrosolubles	0,13±0,05	0,14±0,03	0,35±0,04	0,23±0,07
BHT	0,02±0,002	0,09±0,003	0,07±0,002	0,12±0,03

L'analyse de l'activité antioxydante des polysaccharides de la datte «Ajwa», évaluée par le test de réduction du DPPH[•], a révélé que cet extrait présente une CI₅₀ de 0,13mg/mL. Cette valeur est environ quatre fois plus élevée que celle de la variété « Deglet nour » (CI₅₀=0,5mg/mL) (**Mansour et al., 2022**). De même, l'extrait polysaccharidique présente un potentiel de piégeage ABTS^{•+} (CI₅₀ : 0,14mg/mL) proche de celui du BHT (CI₅₀ 0,09mg/mL). Cette propriété est dû principalement à la complexité de leur composition en monosaccharides, leur poids moléculaire et leur conformation (**Wang et al., 2017; Zhu et al., 2017**).

Le potentiel de réduction du fer par les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» a montré une CE_{50} de 0,23mg/mL. Malgré que cette valeur soit supérieure à celle du BHT ($CE_{50}=0,12\text{mg/mL}$), les polysaccharides présentent un potentiel antioxydant non négligeable.

Selon les travaux de l'équipe de **Mansour** en **2022**, le potentiel de réduction du fer par les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» est nettement supérieur à celui de la variété « Deglet Nour » dont le CE_{50} est de 0,98mg/mL.

Cette différence peut s'expliquer par des variations de la teneur en polysaccharides, leur composition en monosaccharides et leur conformation moléculaire (**Zhang et al., 2013; Kan et al., 2015; Wang et al., 2015**). Les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» présentent également un potentiel d'inhibition du blanchiment du β -carotène inférieur à celui du BHT, antioxydant de référence avec des CI_{50} respectives de $0,35\pm 0,04\text{mg/mL}$ et $0,07\pm 0,002\text{mg/mL}$.

B: Evaluation de l'activité fongitoxique de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»**1. Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»**

Nous avons évalué l'effet de l'extrait aqueux et des polysaccharides hydrosolubles de datte «Ajwa» sur la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 en l'absence et en présence de 0,4µg/mL d'amphotéricine B. Les extraits aqueux et polysaccharidiques sont utilisés à différentes concentrations finales respectives de 5 ; 20 ; 33% et 0,1 ; 0,5 ; 1mg/mL.

Les cultures sont menées sur milieu Sabouraud liquide dans un incubateur de paillasse à 30°C sous agitation continue à 130 tours par minute. La concentration cellulaire de départ est fixée à 2×10^6 cellules/mL. Pour étudier le phénomène de dormance des levures en présence d'amphotéricine B, la croissance est suivie sur une période de 40 heures.

1.1. Effet de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231**1.1.1. En l'absence d'amphotéricine B**

La **figure N°14** représente les résultats relatifs à l'effet de l'addition de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» à 5% ; 20% et 33% sur la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231. Nous constatons que :

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Les levures passent par une phase de latence de 1 heure caractérisée par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de 100×10^6 cellules/mL au bout de 6 heures d'incubation. Ce taux reste inchangé durant la phase stationnaire allant jusqu'à 8 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours par minute.
- La courbe (b) représente la croissance de *Candida albicans* ATCC10231 en présence de 5% de l'extrait aqueux. Nous constatons qu'après une phase de latence de 2 heures, les levures entrent ensuite dans une phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de 135×10^6 cellules/mL au bout de 7 heures d'incubation à 30°C. Ce taux reste inchangé pendant la phase stationnaire.

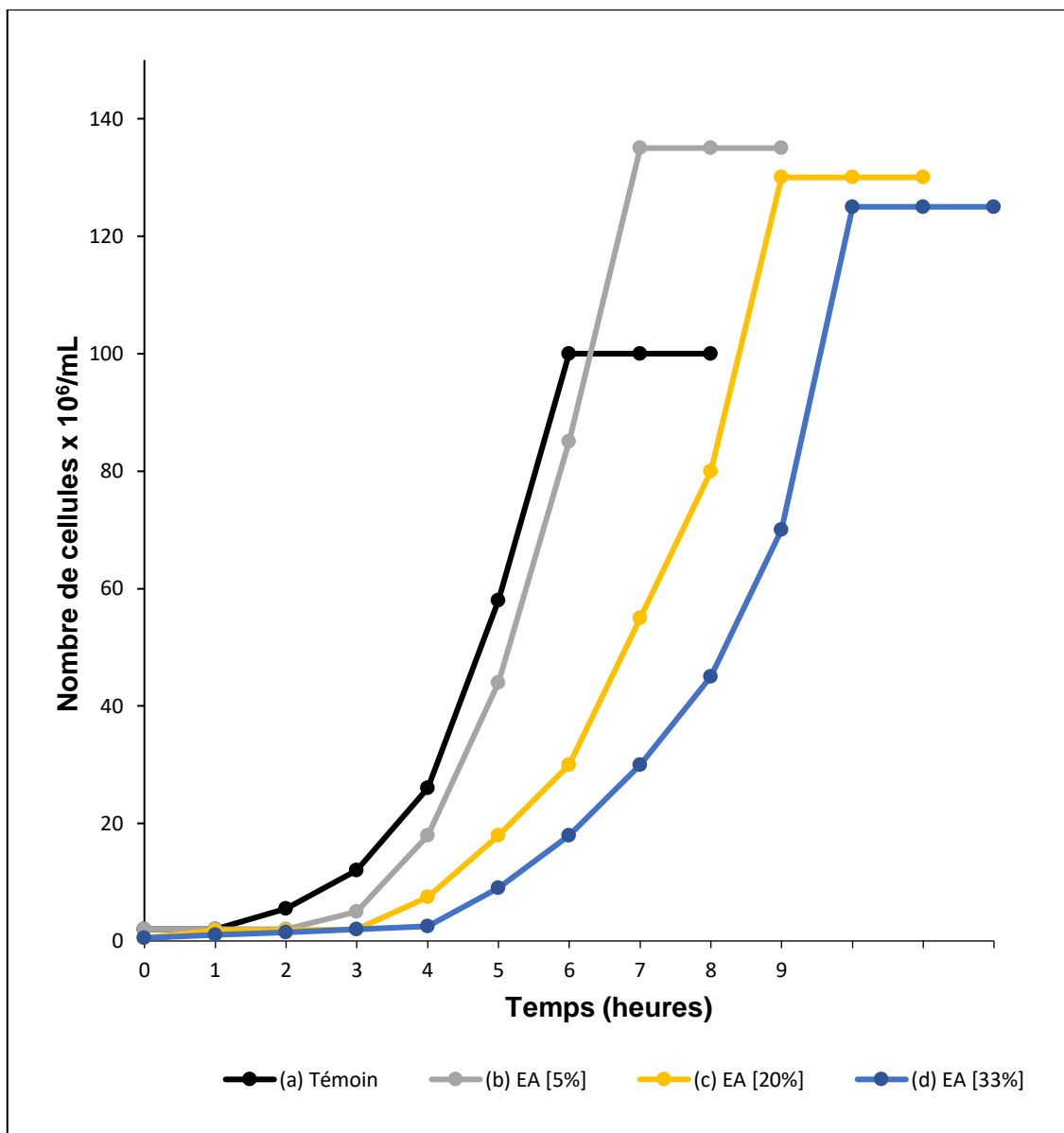


Figure N°14 : Croissance de *Candida albicans* ATCC10231 sur milieu Sabouraud additionné de l'extrait aqueux (EA) de la datte «Ajwa» à 5%; 20% et 33% en l'absence d'amphotéricine B

- Les courbes (c) et (d) représentent la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 sur milieu Sabouraud additionné de l'extrait aqueux à 20 et 33% respectivement. Nous remarquons que la phase de latence est de 3 et 4 heures en présence de l'extrait aqueux à 20% et 30% respectivement avec une diminution de la charge cellulaire qui passe de 2×10^6 cellules/mL à $0,5 \times 10^6$ cellules/mL. Cela est probablement due probablement à une lyse cellulaire. Des résultats similaires ont été rapportés par **Shraideh et al., (1998)** et **Abu-Elteen, (2000)** qui ont montré que l'extrait aqueux des dattes de la variété « Berhi » induit une destruction membranaire des levures de *Candida albicans* JCC 1482 suivie par une lyse cellulaire.

Les levures entament ensuite la phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de 130×10^6 cellules/mL au bout de 9 heures d'incubation en présence de 20% de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» et 125×10^6 cellules/mL après 10 heures d'incubation dans le milieu de culture additionnée de l'extrait aqueux à 33%. Ces taux restent inchangés pendant la phase stationnaire.

La croissance de *Candida albicans* ATCC10213 sur milieu Sabouraud additionné de différentes concentrations d'extraits aqueux de la datte «Ajwa» entraîne une augmentation importante de la charge cellulaire par rapport à la culture témoin. En effet, une amélioration de la charge cellulaire estimée à 26 ; 23 et 20% est enregistrée en présence d'une concentration de 5 ; 20 et 33% de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» respectivement. Cette amélioration peut être liée à la présence de sucres simples dans l'extrait aqueux qui constituent une source de carbone pour les levures (**Hamad et al., 2015; Ramchoun et al., 2017**).

1.1.2. En présence d'amphotéricine B

Les résultats relatifs à l'effet de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» (5% ; 20% et 33%) sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 sont représentés sur la **figure N°15**.

L'amphotéricine B est additionnée au milieu de culture au temps zéro de la croissance à une concentration finale de $0,4 \mu\text{g/mL}$ qui correspond à sa concentration minimale inhibitrice vis-à-vis de cette espèce de levure (**Boucherit et al., 2007**).

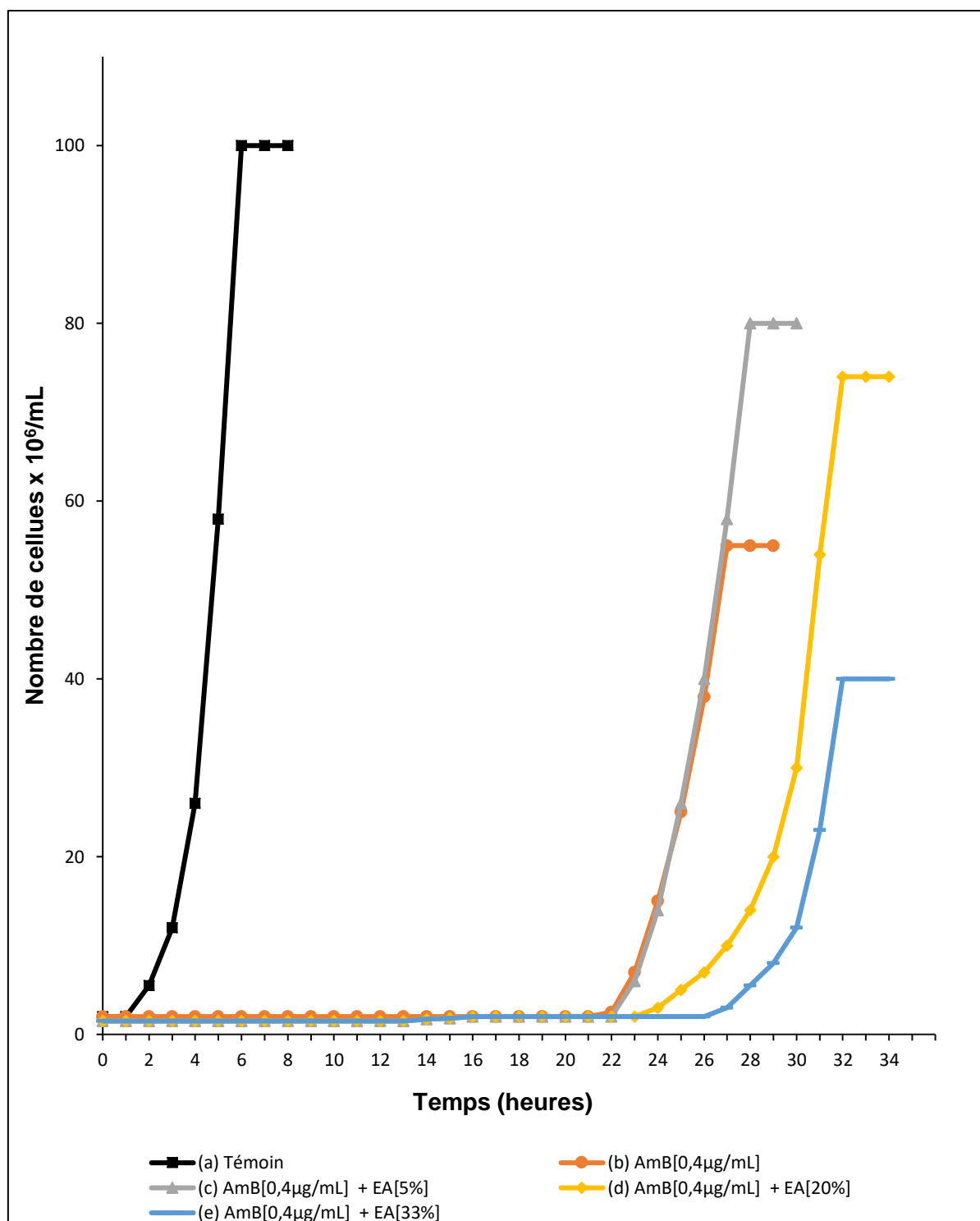


Figure N°15 : Croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 en présence de l'amphotéricine B seule est complexée à 5%; 20% et 33% de l'extrait aqueux (EA) de la datte «Ajwa»

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Après une phase de latence de 2 heures, les levures entrent en phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de 100×10^6 cellules/mL après 6 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours par minute. Ce taux reste inchangé pendant la phase stationnaire.
- La courbe (b) correspond à la croissance de *Candida albicans* ATCC10231 en présence de $0,4\mu\text{g/mL}$ d'amphotéricine B. Un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 heures (culture témoin) à 22 heures. Les levures reprennent ensuite leur croissance pour atteindre une charge cellulaire maximale de 55×10^6 cellules/mL après 27 heures d'incubation. Le taux d'inhibition par rapport à la culture témoin sans aucune addition est de 45%. Nous constatons que l'amphotéricine B seule provoque une inhibition de la croissance des levures qui se traduit par un prolongement de la phase de latence. Il est clairement admis que l'addition de l'amphotéricine B dans le milieu de culture induit une perméabilisation membranaire de *Candida albicans* ce qui est à l'origine d'une fuite des ions et des molécules de faible dimension dans le milieu extérieur. Ce phénomène est connu comme étant un très bon indicateur des premiers effets toxiques de l'amphotéricine B (**Carolus et al., 2020**).
- La courbe (c) représente la croissance de *Candida albicans* ATCC1023 en présence de l'amphotéricine B et de 5% d'extrait aqueux de la datte «Ajwa». Après une phase de latence de 22 heures, les levures reprennent leur croissance d'une manière identique à la culture témoin pour atteindre une charge cellulaire maximale de 80×10^6 cellules/mL après 28 heures d'incubation à 30°C .
- La croissance de *Candida albicans* ATCC1023 en présence de l'amphotéricine B et de 20% d'extrait aqueux de la datte «Ajwa» (courbe (d)) montre que la phase de latence se prolonge jusqu'à 23 heures. Au cours de la phase de croissance exponentielle, une charge cellulaire maximale de 74×10^6 cellules/mL est atteinte après 32 heures d'incubation à 30°C .
- La courbe (e) représente l'effet de l'amphotéricine B en présence de 33% d'extrait aqueux de la datte «Ajwa» sur la croissance de *Candida albicans* ATCC1023. La phase de latence est de 26 heures et la biomasse maximale des levures est 40×10^6 cellules/mL après 32 heures d'incubation.

L'addition de l'extrait aqueux à une concentration de 5% et 20% au milieu de culture en présence de 0,4µg d'AmB/mL, entraîne une perte de son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 de 31,25% et 25,6% respectivement. Par contre, à 33%, l'extrait aqueux induit une amélioration hautement significative de l'efficacité de l'amphotéricine B estimée à 27,2% (test de Mann-Whitney, $p=0,0002$).

Nous pouvons conclure qu'en présence d'amphotéricine B, les cellules perdent leurs constituants cellulaires et finissent par mourir, alors qu'un certain pourcentage de cellules échappe à l'effet toxique de cette drogue. Il s'agit du phénomène de dormance et les cellules capables de ressusciter si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 22 heures sont appelées les cellules dormantes (**Boucherit et al., 2007**).

Par ailleurs, l'amélioration de l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231, en présence de 33% de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» pourrait être liée à la concentration élevée en sucres et aussi en métabolites secondaires de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» (**Al-Alawi et al., 2017**). En effet, selon **Efimova et al., (2023)**, certains polyphénols telles que la phlorétine, la naringénine et la quercétine favorisent la formation des pores membranaires chez les cellules fongiques, ce qui augmente l'efficacité de l'amphotéricine B. De plus, **Francis et al., (2018)**, ont montré que certains polysaccharides, comme le poly-mannose a amélioré la solubilité de l'amphotéricine B et par conséquent son activité antifongique vis-à-vis *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* et *Cryptococcus neoformans*.

1.2. Effet des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231

1.2.1. En l'absence d'amphotéricine B

La figure N°16 regroupe les résultats de l'effet des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Les polysaccharides sont ajoutés au milieu de culture à 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL.

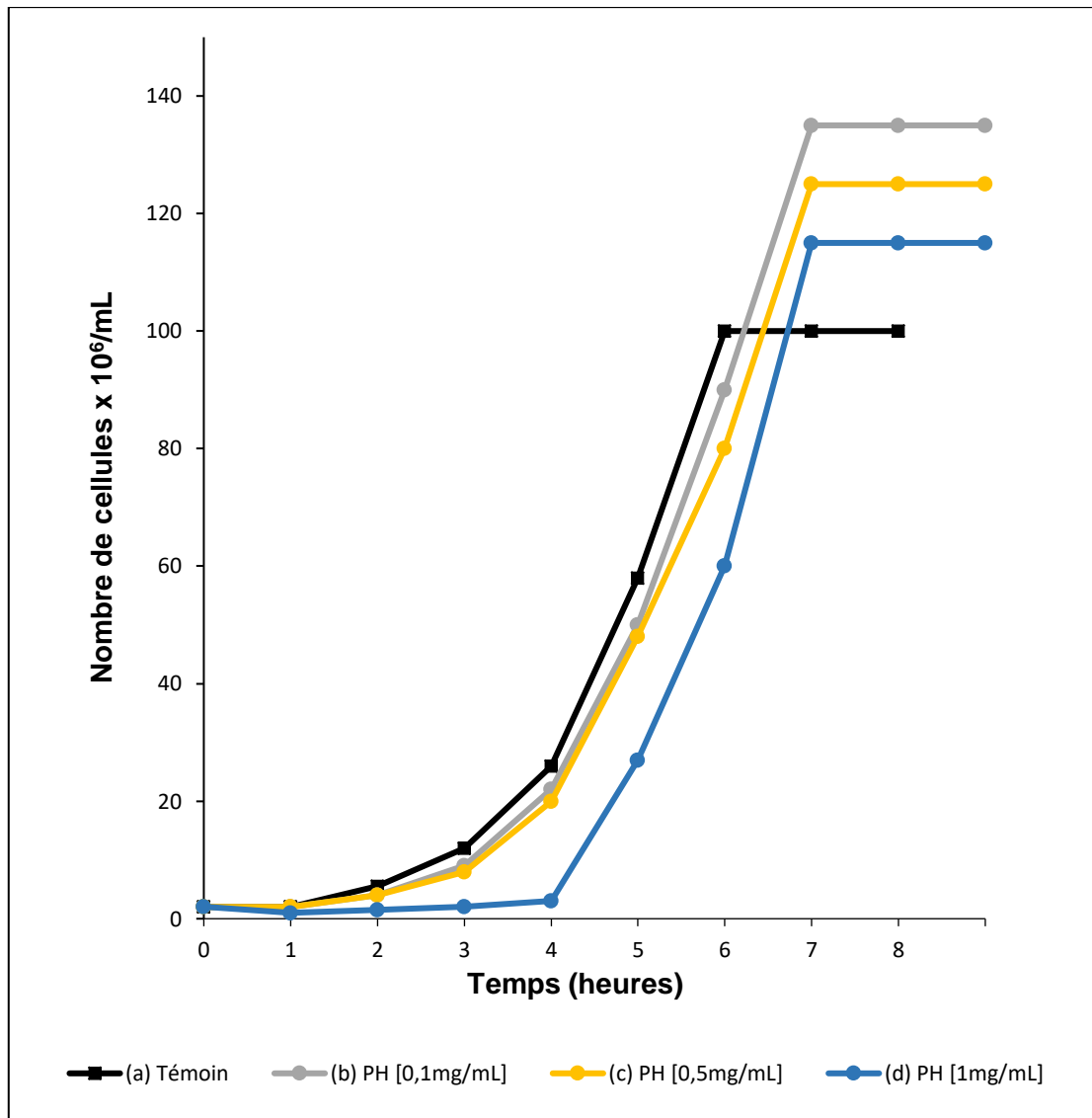


Figure N°16 : Croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 en présence de différentes concentrations de polysaccharides hydrosolubles (PH) de la datte «Ajwa» en l'absence d'amphotéricine B

- La courbe (a) représente la culture témoin sans aucune addition. Après une phase de latence d'une heure, caractérisée par un nombre constant de cellules de départ de 2×10^6 cellules/mL, les levures entament la phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de 100×10^6 cellules/mL, au bout de 6 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours par minute. Ce taux reste inchangé pendant la phase stationnaire.
- Les courbes (b) et (c) représentent la croissance de *Candida albicans* ATCC10231 sur milieu Sabouraud additionné de 0,1 et de 0,5mg/mL de polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa». Nous constatons que les levures passent par une phase de latence d'une heure avant d'entrer dans la phase de croissance exponentielle pour atteindre des biomasses maximales respectives de 135×10^6 et 125×10^6 cellules/mL. Ces valeurs restent constantes pendant la phase stationnaire.
- La courbe (d) correspond à la croissance de *Candida albicans* ATCC10231 en présence de 1mg/mL de polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa». Un prolongement de la phase de latence est observé (4 heures), avec une diminution de la charge cellulaire par rapport à la culture témoin. Cet effet antifongique observé peut être lié à la concentration et la nature des sucres présents dans le milieu de culture.

Ce résultat est en accord avec celui de **Fathy et al., (2021)** qui ont mis en évidence un effet antifongique d'un trisaccharide (D-Glucopyranosyl (1→2) β-D-fructofuranosyl (6→6) α-D-glucopyranoside), isolé à partir de l'extrait butanolique du palmier dattier vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 2091. Il est important de noter que de nombreuses études ont rapporté l'activité antifongique des polysaccharides extraits de différentes espèces végétales et animales (**Fiołka et al., 2013; Anusuya and Sathiyabama, 2014; Fernández-Ferreiro et al., 2014**).

La croissance des levures reprend ensuite et une charge cellulaire maximale de 115×10^6 cellules/mL est atteinte après 7 heures d'incubation à 30°C. Par ailleurs, quel que soit la concentration en polysaccharides hydrosolubles utilisée, la charge cellulaire est plus importante que la culture témoin. Cela pourrait s'expliquer par la présence de sucres simples dans le milieu de culture qui constituent une source de carbone supplémentaire pour les levures.

1.2.2. En présence d'amphotéricine B

La **figure N°17** représente les résultats relatifs à l'effet de la complexation de l'amphotéricine B aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231. L'amphotéricine B est utilisée à une concentration finale de 0,4µg/mL et les polysaccharides hydrosolubles à 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL.

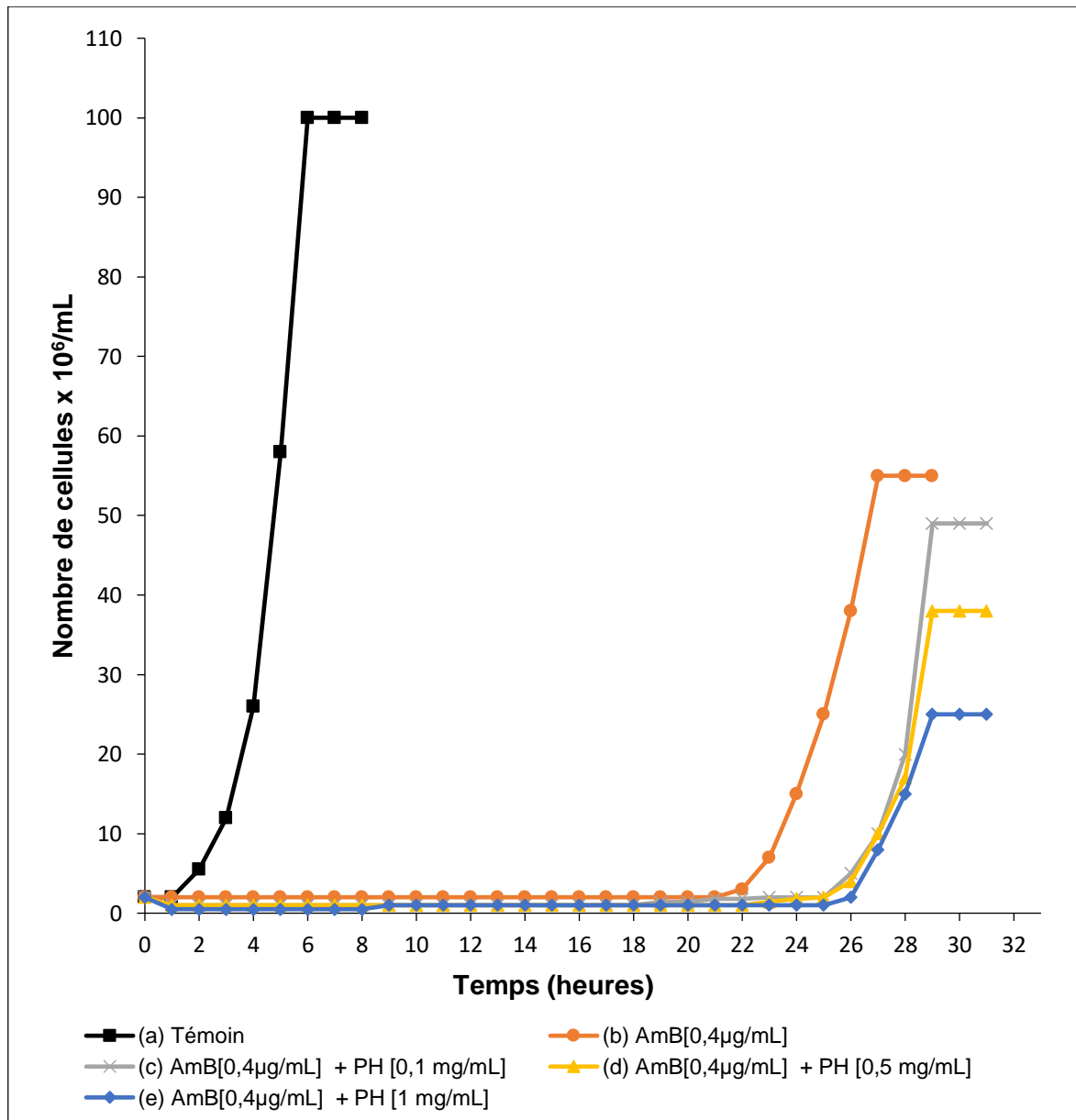


Figure N°17 : Effet des polysaccharides hydrosolubles (PH) de la datte «Ajwa» à différentes concentrations sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231

- La courbe (a) représente la culture témoin sur milieu Sabouraud sans aucune addition. Les cellules passent par les trois phases d'une croissance microbienne à savoir, une phase de latence d'une heure suivie d'une phase de croissance exponentielle et se termine par une phase stationnaire. La charge cellulaire maximale de 80×10^6 cellules/mL est obtenue après 5 heures de croissance à 30°C sous agitation continue à 130 tours par minute.
- La courbe (b) représente l'effet de l'amphotéricine B seule sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231. Nous remarquons un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 à 22 heures en présence de $0,4 \mu\text{g/mL}$ d'amphotéricine B. Ce décalage de la croissance des levures en présence de cet antifongique par rapport à la culture témoin (croissance sans aucune addition), met en évidence l'entrée temporaire des cellules en dormance. Un état au cours duquel un certain nombre de levures adoptent une stratégie de survie en limitant leur métabolisme qui leur permet de s'échapper temporairement à l'action de l'amphotéricine B (**Boucherit et al., 2007**). Les levures reprennent ensuite leur croissance pour atteindre un nombre maximum de 55×10^6 cellules/mL. Le taux d'inhibition par rapport à la culture témoin est de 31,2%.
- Les courbes (c), (d) et (e) représentent l'effet de la complexation de l'amphotéricine B aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» à des concentrations de 0,1 ; $0,5 \text{mg/mL}$ et 1mg/mL respectivement, sur son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC1023.

Nous remarquons qu'après une phase de latence de 25 heures, les cellules reprennent leur croissance en phase exponentielle pour atteindre des biomasses maximales de 49×10^6 ; 38×10^6 et 25×10^6 cellules/mL à des concentrations respectives en polysaccharides hydrosolubles de 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL . En effet, l'incorporation des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» à des concentrations de 0,1 ; $0,5 \text{mg/mL}$ et 1mg/mL dans le milieu de culture induit une amélioration significative ($p < 0,0001$) de l'efficacité de l'amphotéricine B estimée à 11%, 31% et 54,5% respectivement.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux d'**Elgart et al., (2010)** qui ont montré que la complexation de l'amphotéricine B à l'arabinogalactane améliore sa solubilité et son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* et de *Cryptococcus neoformans*.

L'efficacité de la formulation AmB/polysaccharides hydrosolubles vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231 pourrait s'expliquer également par le pouvoir antioxydant marqué des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» contre la réduction du fer et le piégeage d'ABTS^{•+}. Ce résultat est confirmé par les travaux de **Belhachemi et al., (2021)** qui ont révélé que la complexation de l'amphotéricine B avec des antioxydants, l'acide ascorbique et l' α -tocophérol est corrélée significativement à son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231.

2. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B complexée à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

2.1. Effet de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» sur la toxicité induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

Pour les tests de cytotoxicité de l'amphotéricine B, les expériences sont menées sur des globules rouges humains (modèle universel de cellules animales).

L'amphotéricine B est utilisée à une concentration finale de 20 μ g/mL et son effet cytotoxique vis-à-vis des globules rouges humains est suivi par mesure de la fuite de l'hémoglobine intracellulaire.

L'antifongique complexée à l'extrait aqueux est ajouté aux milieux réactionnels au même moment que les globules rouges au temps zéro des expériences.

La figure N°18 représente l'effet de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» (5%, 20% et 33%) sur la fuite d'hémoglobine induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

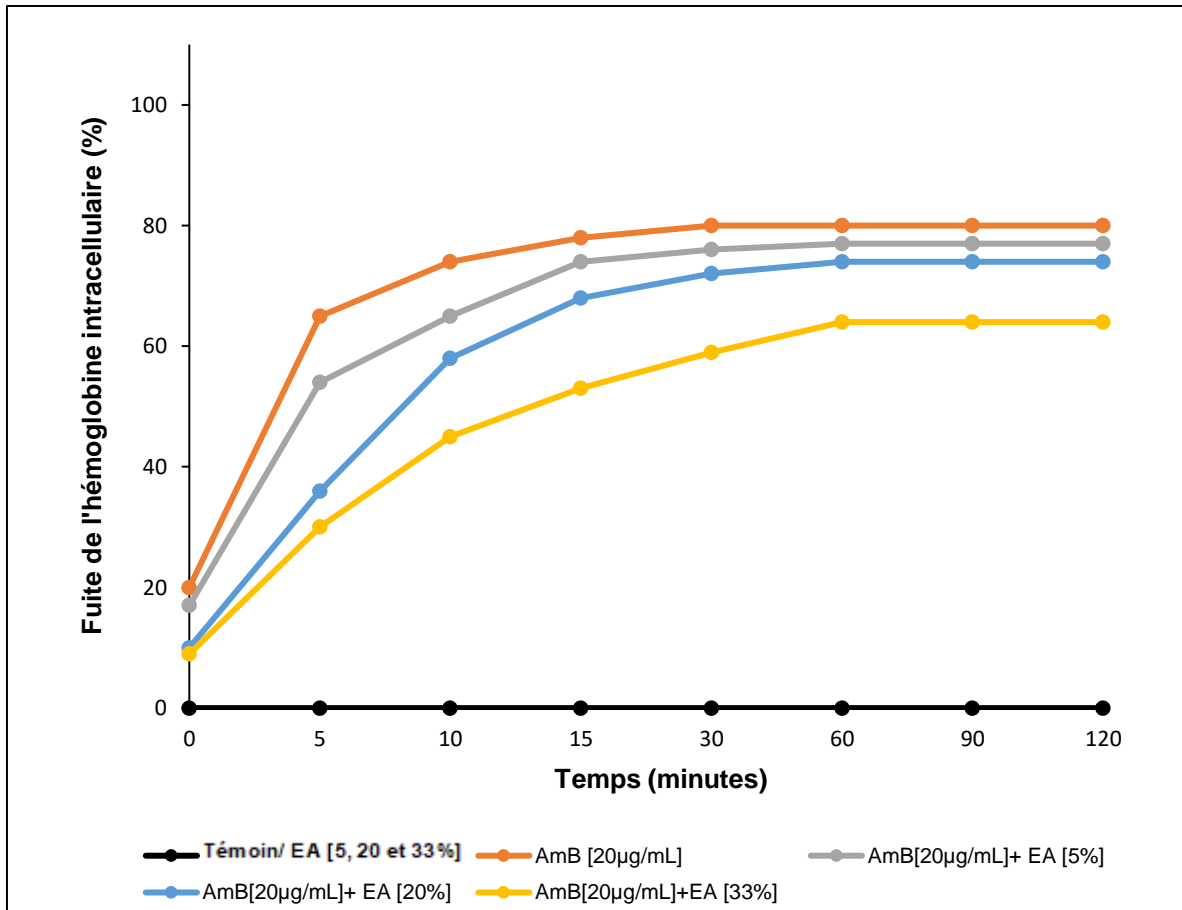


Figure N° 18 : Effet de l'extrait aqueux (EA) de la datte «Ajwa» (5%, 20% et 33%) sur la fuite d'hémoglobine induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

Nous constatons que :

- Les globules rouges humains incubés en l'absence d'amphotéricine B et en présence de l'extrait aqueux seul à 5% ; 20% et 33%, gardent la totalité de leur hémoglobine intracellulaire après 120 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue à 130 tours/minute (Témoin).
- L'addition de 20µg d'AmB/mL aux globules rouges induit une fuite de l'hémoglobine intracellulaire qui atteint un taux de 65% après seulement 5 minutes d'incubation. Ce taux se stabilise à 80% après 30 minutes d'incubation à 37°C.
- En présence des complexes AmB/extraits aqueux de la datte «Ajwa» à 5% ; 20% et 33%, la fuite d'hémoglobine augmente progressivement pour atteindre des taux respectifs de 77%, 74% et 64% après 60 minutes d'incubation à 37°C. Ces taux restent inchangés jusqu'à 120 minutes d'incubation.

Un effet protecteur des globules humains contre la cytotoxicité de l'amphotéricine B est observé en présence des différentes concentrations de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa». La réduction de la cytotoxicité des complexes AmB/extrait aqueux vis-à-vis des globules rouges humains est estimée à 3 ; 6 et 16% en présence de 5 ; 20 et 30% de l'extrait aqueux respectivement. Cette diminution n'est significative que pour l'extrait aqueux utilisé à 20 et 33% ($p < 0,05$).

Ces résultats sont en accord avec ceux d'**Ali et Abdu , (2011)** qui ont montré que l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» protège les cellules rénales contre les dommages induits par l'ochratoxine, une mycotoxine connue pour sa néphrotoxicité. De même, en **2016, Bouhlali and Zegzouti** ont révélé que l'extrait aqueux concentré des dattes, présente un effet protecteur des érythrocytes par inhibition de la fuite de l'hémoglobine induite par l'exotoxine streptococcique.

2.2. Effet des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur la toxicité induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

L'antifongique et les polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» à différentes concentrations sont ajoutés aux milieux réactionnels au même moment que les globules rouges ; ce qui correspond au temps zéro des expériences.

La figure N°19 représente l'effet de l'addition des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sur la fuite d'hémoglobine intracellulaire induite par l'amphotéricine B à une concentration finale de 20 μ g/mL chez le globule rouge humain. Nous constatons que :

- Aucune fuite de l'hémoglobine intracellulaire n'est observée chez les globules rouges incubés en l'absence d'amphotéricine B et en présence des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» à 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL jusqu'à 120 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue à 130 tours/minute (Témoin).
- En présence d'amphotéricine B seule, les érythrocytes perdent 80% de leur contenu en hémoglobine après 120 minutes d'incubation à 37°C.
- La complexation de l'amphotéricine B à 0,1 ; 0,5 et 1mg/mL de polysaccharides hydrosolubles, réduit la fuite de l'hémoglobine intracellulaire induite par l'amphotéricine B. Cette diminution est estimée à 3% pour 1mg/mL et à 2% pour 0,1 et 0,5mg/mL après 120 minutes d'incubation. Cette diminution de l'hémolyse est non significative ($p > 0,31$).

Bien que l'activité anti-hémolytique de l'amphotéricine B complexée aux polysaccharides hydrosolubles ne soit pas statistiquement significative, elle pourrait être attribuée au pouvoir antioxydant des polysaccharides hydrosolubles, conformément aux mécanismes décrits pour plusieurs polysaccharides d'origine végétale (Cheng *et al.*, 2013; Dore *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2016). De plus, des travaux menés sur le complexe AmB/arabinogalactane ont mis en évidence une activité anti-hémolytique intéressante vis-à-vis des érythrocytes. Ce complexe s'est révélé capable d'empêcher la perforation de la membrane plasmique des cellules mammifères (Kagan *et al.*, 2012).

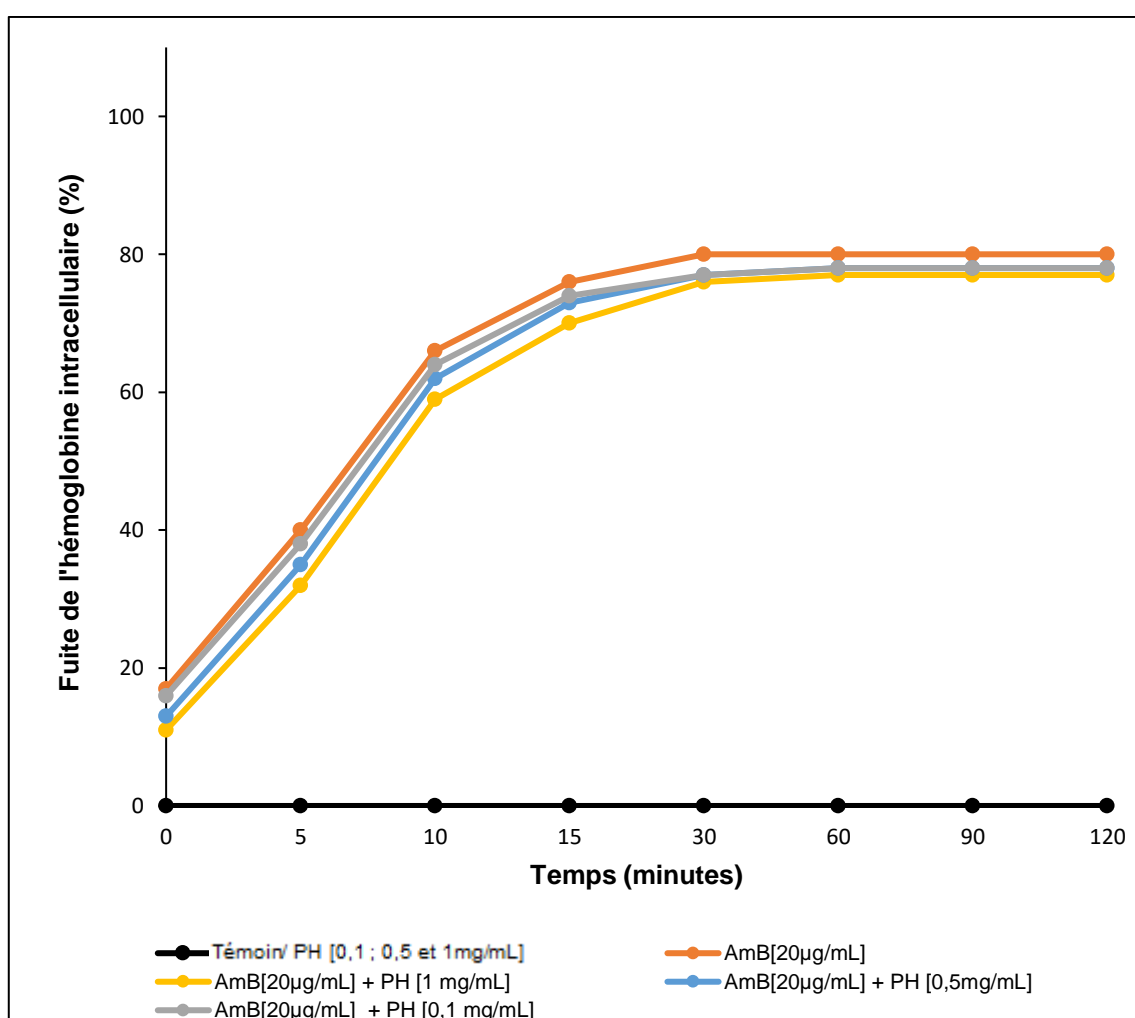


Figure N°19 : Effet des polysaccharides hydrosolubles (PH) de la datte «Ajwa» (0,1 ; 0,5 et 1mg/mL) sur la fuite d'hémoglobine induite par l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges humains

3. Evaluation de la stabilité de la nouvelle formulation amphotéricine B/ polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa»

Nous avons évalué la stabilité de la nouvelle formulation de l'amphotéricine B que nous avons élaboré au sein du laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique ». Pour cela, nous avons suivi l'évolution du spectre de l'amphotéricine B à 408nm qui correspond à la forme monomérique de cet antifongique, responsable de son efficacité. Les solutions réactionnelles de l'amphotéricine B seule et complexée aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» sont incubées à 4°C à l'abri de la lumière pendant onze jours. L'amphotéricine B est utilisée à une concentration finale de 10^{-5} mg/mL. Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure N°20**.

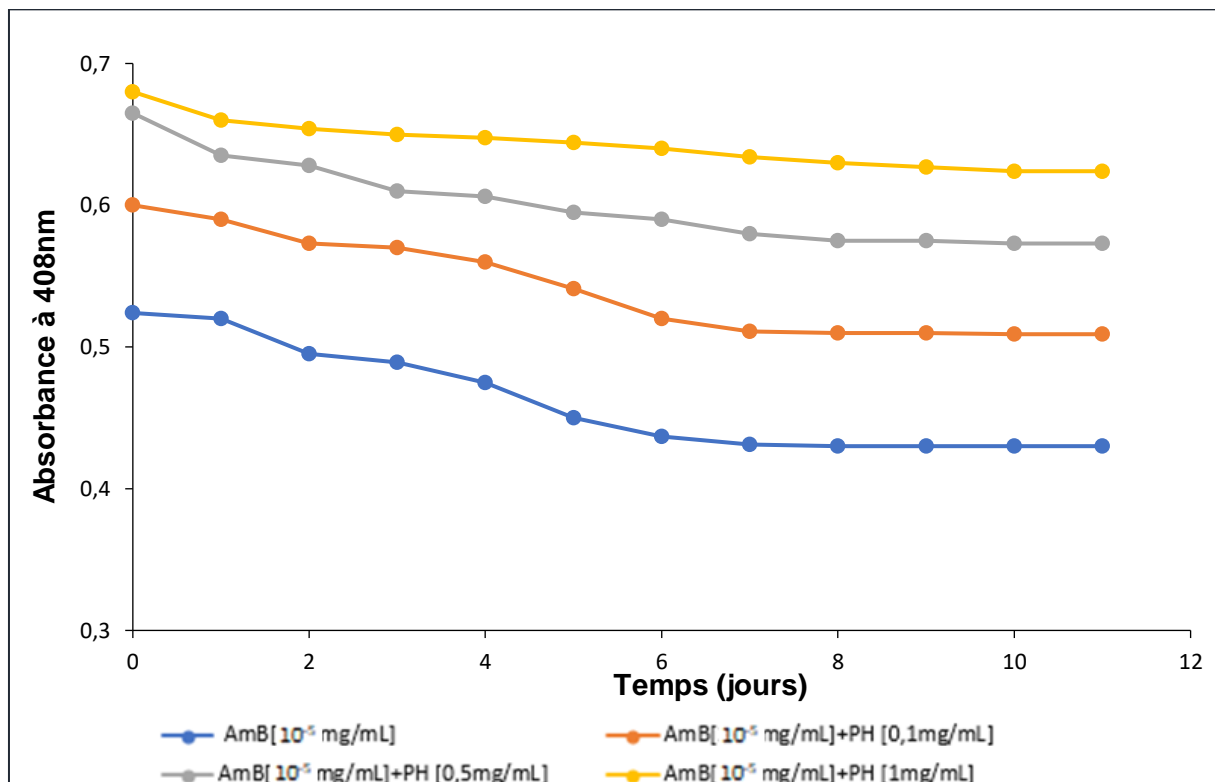


Figure N°20 : Stabilité de l'amphotéricine B seule et complexée aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» à des concentrations de 1 ; 0,5 et 0,1mg/mL à 4°C en fonction du temps

Nous remarquons que :

- Quelle que soit la forme de l'amphotéricine B utilisée, seule ou complexée aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa», le pic caractéristique de sa forme monomérique reste inchangé et apparaît à 408nm. Cependant, son intensité varie en fonction de la concentration des polysaccharides hydrosolubles évalués.
- Durant la période d'incubation de 11 jours, l'intensité des pics des absorbances obtenues à 408nm pour l'AmB complexée aux polysaccharides hydrosolubles à différentes concentrations s'est avérée nettement supérieure à celle observée pour l'amphotéricine B seule. Cependant, toutes les formulations de l'amphotéricine B ont présenté une diminution progressive de l'intensité de leur absorbance au cours du temps.
- Au temps zéro, le pic d'absorbance à 408nm de l'amphotéricine B seule est de 0,52, après le sixième jour, il s'est stabilisé à 0,43. En revanche, une augmentation de l'intensité des pics à 408nm est observée. Cette augmentation de la forme monomérique de l'amphotéricine B est hautement significative ($p < 0,0001$), il s'agit d'un effet hyperchrome. La formulation AmB/PH (1mg/mL) semble être la plus stable avec une absorbance à 0,68 au temps zéro qui atteint un maximum de 0,63 après 7 jours d'incubation à 4°C et à l'abri de la lumière. Cette valeur reste stable jusqu'à 11 jours.
- Les pics des absorbances mesurés pour les formulations AmB/PH (0,1mg/mL) et (0,5mg/mL) présentent des intensités plus faibles que celles observées en présence de 1mg/mL de polysaccharides hydrosolubles. Les valeurs initiales (temps zéro) sont respectivement de 0,66 et 0,60. Elles se stabilisent à 0,58 et 0,51 respectivement après 7 jours d'incubation.

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Kothandaraman** et ses collaborateurs (2017), qui ont mis en évidence la stabilité de la forme monomérique de l'AmB après sa complexation avec la pectine.

Quatrième partie :

Conclusion générale

Ce travail rentre dans le cadre de l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, traitement de première ligne des mycoses systémiques et profondes qui posent un réel problème de santé publique de par le monde.

Pour ce faire, nous avons évalué la cytotoxicité sélective de nouvelles formulations de l'amphotéricine B par sa complexation à l'extrait aqueux et aux polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» vis-à-vis d'un modèle de levures, *Candida albicans* ATCC10231 et des globules rouges humains, modèle universel de cellules animales.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

- L'extrait aqueux de la datte «Ajwa» est préparé par macération pendant 24 heures. En revanche, pour les polysaccharides hydrosolubles, les paramètres d'extraction, à savoir, la puissance des ultrasons, la température d'extraction, le temps d'extraction et le ratio eau/datte, sont d'abord optimisés par la méthode des surfaces de réponse (MSR) en utilisant le logiciel *Design Expert 9*. Le rendement d'extraction prédit est de 10,4%.

Les paramètres optimisés (Puissance des ultrasons 70W, température d'extraction 57,4°C, temps d'extraction 30min et ratio (eau/datte) 27,3mL/g) nous ont permis d'obtenir un rendement d'extraction expérimental des polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» de 10,59±0,15%. Ce taux est jugé acceptable, car l'erreur relative est inférieure à 5%. De plus, l'analyse de la variance des résultats de l'optimisation montrent que le modèle conçu est adéquat avec un R^2 de 0,9763 ce qui renseigne sur une bonne compatibilité entre les valeurs expérimentales et prédites.

- L'évaluation de l'activité antioxydante des polysaccharides hydrosolubles par les différentes méthodes a révélé que le test de piégeage du radical DPPH[•] présente une CI_{50} ($CI_{50}=0,13\pm 0,05$ mg/mL), inférieure à celle du BHT ($CI_{50}=0,02\pm 0,002$ mg/mL). En outre, la méthode de piégeage d'ABTS^{•+} des polysaccharides hydrosolubles ($CI_{50}=0,14\pm 0,03$ mg/mL) a montré une activité antioxydante fortement significative par rapport au témoin positif le BHT ($0,09\pm 0,003$ mg/mL). L'inhibition du blanchiment du β -carotène ($CI_{50}= 0,35\pm 0,04$ mg/mL) et la réduction du Fer ($CE_{50}=0,23\pm 0,07$ mg/mL) ont révélé une activité intéressante vis-à-vis du BHT ($CI_{50}=0,07\pm 0,002$ mg/mL ; $EC_{50}=0,12\pm 0,03$ mg/mL).

- La caractérisation des monosaccharides libérés après hydrolyse des polysaccharides hydrosolubles par chromatographie liquide à haute performance a mis en évidence la présence de l'acide glucuronique avec une concentration de 70,67mg/100mg suivi du glucose, du galactose et du fructose avec des taux respectifs de 7,7 ; 3,5 ; 1,16mg/100mg. Le saccharose est également présent dans cet extrait avec un taux de 10,03mg/100mg.

- La complexation de l'amphotéricine B avec l'extrait aqueux de la datte «Ajwa» à 33%, a amélioré son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 de 27,2%. Cependant l'évaluation de l'activité antifongique de l'amphotéricine B complexée aux polysaccharides hydrosolubles à différentes concentrations (0,1 ; 0,5 et 1mg/mL) a montré une amélioration de son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231 de 11%, 31% et 54,5% respectivement.

Ces formulations ont réduit d'une manière significative la fuite de l'hémoglobine intracellulaire des globules rouges humains. Cette diminution a atteint environ 16% en présence de l'amphotéricine B complexée à 33% de l'extrait aqueux de la datte «Ajwa». De plus, la complexation de l'amphotéricine B avec les polysaccharides hydrosolubles est à l'origine d'une légère diminution non significative de l'activité hémolytique.

- La stabilité du complexe amphotéricine B/ polysaccharides hydrosolubles évaluée par spectrophotométrie UV-visible, a montré que le complexe AmB/polysaccharides hydrosolubles génère un effet hyperchrome dont le plus important correspond à la concentration de 1mg/mL en polysaccharides hydrosolubles. Cet effet se traduit par une augmentation de la concentration des formes monomériques de l'amphotéricine B responsables de son activité antifongique.

Pour continuer ce travail, il serait intéressant de :

- Caractériser et isoler les différents polysaccharides hydrosolubles de la datte «Ajwa» ;
- Evaluer de la forme monomérique et agrégée de l'amphotéricine B conjuguée aux polysaccharides hydrosolubles;
- Etudier le mécanisme d'action de l'amphotéricine B conjuguée *in vitro* et *in vivo*.

Cinquième partie : Références bibliographiques

- Abu-Elteen, K.H., 2000. Effects of date extract on adhesion of *Candida* species to human buccal epithelial cells *in vitro*. *Journal of oral pathology & medicine* 29, 200-205.
- Afshari, K., Samavati, V., Shahidi, S.-A., 2015. Ultrasonic-assisted extraction and *in vitro* antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. *International journal of biological macromolecules* 74, 558-567.
- Al-Alawi, R.A., Al-Mashiqri, J.H., Al-Nadabi, J.S., Al-Shihi, B.I., Baqi, Y., 2017. Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): natural products and therapeutic options. *Frontiers in plant science* 8, 845.
- Ali, A., Abdu, S., 2011. Antioxidant protection against pathological mycotoxins alterations on proximal tubules in rat kidney. *Functional Foods in Health and Disease* 1, 118-134.
- Ali, H.S.M., Alhaj, O.A., Al-Khalifa, A.S., Brückner, H., 2014. Determination and stereochemistry of proteinogenic and non-proteinogenic amino acids in Saudi Arabian date fruits. *Amino acids* 46, 2241-2257.
- Alqarni, M.M., Osman, M.A., Al-Tamimi, D.S., Gassem, M.A., Al-Khalifa, A.S., Al-Juhaimi, F., Mohamed Ahmed, I.A., 2019. Antioxidant and antihyperlipidemic effects of Ajwa date (*Phoenix dactylifera* L.) extracts in rats fed a cholesterol-rich diet. *Journal of Food Biochemistry* 43, e12933.
- Alvarez, C., Shin, D.H., Kwon, G.S., 2016. Reformulation of fungizone by PEG-DSPE micelles: deaggregation and detoxification of amphotericin B. *Pharmaceutical research* 33, 2098-2106.
- Amelung, W., Cheshire, M.V., Guggenberger, G., 1996. Determination of neutral and acidic sugars in soil by capillary gas-liquid chromatography after trifluoroacetic acid hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1631-1639.
- Anderson, T.M., Clay, M.C., Cioffi, A.G., Diaz, K.A., Hisao, G.S., Tuttle, M.D., Nieuwkoop, A.J., Comellas, G., Maryum, N., Wang, S., 2014. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology* 10, 400-406.
- Andres, E., Tiphine, M., Letscher-Bru, V., Herbrecht, R., 2001. Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. *Revue de la littérature. La Revue de médecine interne* 22, 141-150.

Antillón, A., De Vries, A.H., Espinosa-Caballero, M., Falcón-González, J.M., Flores Romero, D., González-Damián, J., Jiménez-Montejo, F.E., León-Buitimea, A., López-Ortiz, M., Magaña, R., 2016. An amphotericin B derivative equally potent to amphotericin B and with increased safety. *PloS one* 11, e0162171.

Anusuya, S., Sathiyabama, M., 2014. Preparation of β -d-glucan nanoparticles and its antifungal activity. *International journal of biological macromolecules* 70, 440-443.

Assirey, E.A.R., 2015. Nutritional composition of fruit of 10 date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars grown in Saudi Arabia. *Journal of Taibah University for Science* 9, 75-79.

Baginski, M., Czub, J., 2009. Amphotericin B and its new derivatives-mode of action. *Current drug metabolism* 10, 459-469.

Bailly, S., Bouadma, L., Azoulay, E., Orgeas, M.G., Adrie, C., Souweine, B., Schwebel, C., Maubon, D., Hamidfar-Roy, R., Darmon, M., 2015. Failure of empirical systemic antifungal therapy in mechanically ventilated critically ill patients. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191, 1139-1146.

Belhachemi, M.H., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Belmir, S., 2021. Influence of ascorbic acid and α -tocopherol on the autoxidation and in vitro antifungal activity of amphotericin B. *Current Medical Mycology* 7, 12.

Belkherroubi-Sari, L., Boucherit, Z., Chéron, M., Boucherit, K., Benyoucef, M., Belbraouet, S., 2008. Modulation of the polyene antibiotic amphotericin B selective toxicity by pH change of the stock solutions. *African Journal of Microbiology Research* 2, 242-246.

Belmir, S., 2015. Coupe longitudinale de la datte "Ajwa" Photographie LAPSAB. Université de Tlemcen

Bokhari, N.A., Perveen, K., 2012. In vitro inhibition potential of *Phoenix dactylifera* L. extracts on the growth of pathogenic fungi. *Journal of Medicinal Plants Research* 6, 1083-1088.

Borowski, E., Salewska, N., Boros-Majewska, J., Serocki, M., Chabowska, I., Milewska, M.J., Ziętkowski, D., Milewski, S., 2020. The substantial improvement of Amphotericin B selective toxicity upon modification of mycosamine with bulky substituents. *Medicinal Chemistry* 16, 128-139.

- Boucherit, Z., Seksek, O., Bolard, J., 2007. Dormancy of *Candida albicans* cells in the presence of the polyene antibiotic amphotericin B: simple demonstration by flow cytometry. *Medical mycology* 45, 525-533.
- Bouhlali, E.D.T., Zegzouti, Y.F., 2016. Antioxidant and anti-hemolytic activities of phenolic constituents of sixmoroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) syrups. *BioTechnology: An Indian Journal* 12.
- Carolus, H., Pierson, S., Lagrou, K., Van Dijck, P., 2020. Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *Journal of Fungi* 6, 321.
- Cavassin, F.B., Baú-Carneiro, J.L., Vilas-Boas, R.R., Queiroz-Telles, F., 2021. Sixty years of Amphotericin B: An overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. *Infectious Diseases and Therapy* 10, 115-147.
- Chabasse, D., Pihet, M., 2008. Les dermatophytes: les difficultés du diagnostic mycologique. *Revue francophone des laboratoires* 2008, 29-38.
- Cheng, H., Feng, S., Shen, S., Zhang, L., Yang, R., Zhou, Y., Ding, C., 2013. Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch. polysaccharide. *Carbohydrate Polymers* 96, 101-108.
- Chéron, M., Cybulska, B., Mazerski, J., Grzybowska, J., Czerwiński, A., Borowski, E., 1988. Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. *Biochemical pharmacology* 37, 827-836.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. World Health Organization, 2022.
- Czerwinski, A., KÖNIG, W.A., SOWINSKI, P., FALKOWSKI, L., MAZERSKI, J., BOROWSKI, E., 1990. Amphotericin B O-methyl oxime synthesis and biological properties. *The Journal of Antibiotics* 43, 1098-1100.
- Dannaoui, É., 2013. Résistance des *Candida* aux antifongiques : détection et mécanismes. *Revue Francophone des Laboratoires* 2013, 71-77.
- Dore, C.M.P.G., Faustino Alves, M.G.d.C., Pofírio Will, L.S.E., Costa, T.G., Sabry, D.A., de Souza Rêgo, L.A.R., Accardo, C.M., Rocha, H.A.O., Filgueira, L.G.A., Leite, E.L., 2013. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum*

vulgare with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. Carbohydrate Polymers 91, 467-475.

DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.t., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry 28, 350-356.

Efimova, S.S., Malykhina, A.I., Ostroumova, O.S., 2023. Triggering the Amphotericin B Pore-Forming Activity by Phytochemicals. Membranes 13, 670.

Elgart, A., Farber, S., Domb, A.J., Polacheck, I., Hoffman, A., 2010. Polysaccharide Pharmacokinetics: Amphotericin B Arabinogalactan Conjugate □ A Drug Delivery System or a New Pharmaceutical Entity? Biomacromolecules 11, 1972-1977.

Falci, D.R., da Rosa, F.B., Pasqualotto, A.C., 2015. Comparison of nephrotoxicity associated to different lipid formulations of amphotericin B: a real-life study. Mycoses 58, 104-112.

Falk, R., Grunwald, J., Hoffman, A., Domb, A.J., Polacheck, I., 2004. Distribution of amphotericin B-arabinogalactan conjugate in mouse tissue and its therapeutic efficacy against murine aspergillosis. Antimicrobial agents and chemotherapy 48, 3606-3609.

Fathy, H.M., Ibrahim, R.S., El-Hawiet, A., Omar, A.A., 2021. Chemical constituents of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit-free bunches and their biological activities. Pharmaceutical Chemistry Journal 55, 384-391.

Fatima, B., 2017. Caractérisation Structurale et Potentiel Biologique des Polysaccharides issus de *Plantago notata* Lagasca (Plantaginaceae) et *Urginea noctiflora* Batt. et Trab.(Liliaceae).

Faure, S., 2009. Antifongiques systémiques. Actualités pharmaceutiques 48, 49-52.

Fernández-Ferreiro, A., Fernández Bargiela, N., Varela, M.S., Martínez, M.G., Pardo, M., Piñeiro Ces, A., Méndez, J.B., Barcia, M.G., Lamas, M.J., Otero-Espinar, F., 2014. Cyclodextrin–polysaccharide-based, in situ-gelled system for ocular antifungal delivery. Beilstein Journal of Organic Chemistry 10, 2903-2911.

Filip Ciesielski, D.C.G., Jessica Loraine, Michael Rittig, Joss Delves-Broughton and Boyan B. Bonev, 2016. Recognition of Membrane Sterols by Polyene Antifungals Amphotericin B and Natamycin, A ¹³C MAS NMR Study. frontiers in Cell and Developmental Biology 4:57.

- Fiołka, M.J., Lewtak, K., Rzymowska, J., Grzywnowicz, K., Hułas-Stasiak, M., Sofińska-Chmiel, W., Skrzypiec, K., 2013. Antifungal and anticancer effects of a polysaccharide–protein complex from the gut bacterium *Raoultella ornithinolytica* isolated from the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Pathogens and Disease* 69, 49-61.
- Forsythe, A., Lewis, G., Jordan, R., Thompson III, G.R., 2020. US database study: burden and healthcare resource utilization in adults with systemic endemic mycoses and aspergillosis. *Journal of Comparative Effectiveness Research* 9, 573-584.
- Francis, A.P., Gurudevan, S., Jayakrishnan, A., 2018. Synthetic polymannose as a drug carrier: synthesis, toxicity and anti-fungal activity of polymannose-amphotericin B conjugates. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 29, 1529-1548.
- Gangneux, J.-P., Guiguena, C., 2007. Modifications récentes de l'épidémiologie des mycoses invasives. *Revue Francophone des Laboratoires* 2007, 85-89.
- Ghnimi, S., Umer, S., Karim, A., Kamal-Eldin, A., 2017a. Ajwa' dates (*Phoenix dactylifera* L.) extract ameliorates isoproterenol-induced cardiomyopathy through downregulation of oxidative, inflammatory and apoptotic molecules in rodent model
- Ghnimi, S., Umer, S., Karim, A., Kamal-Eldin, A., 2017b. Date fruit (*Phoenix dactylifera* L.): An underutilized food seeking industrial valorization. *NFS journal* 6, 1-10.
- Golenser, J., Frankenburg, S., Ehrenfreund, T., Domb, A.J., 1999. Efficacious treatment of experimental leishmaniasis with amphotericin B-arabinogalactan water-soluble derivatives. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43, 2209-2214.
- Gurudevan, S., Francis, A.P., Jayakrishnan, A., 2018. Amphotericin B-albumin conjugates: synthesis, toxicity and anti-fungal activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 115, 167-174.
- Hamad, I., AbdElgawad, H., Al Jaouni, S., Zinta, G., Asard, H., Hassan, S., Hegab, M., Hagagy, N., Selim, S., 2015. Metabolic analysis of various date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia to assess their nutritional quality. *Molecules* 20, 13620-13641.
- Han, Q., Wu, Z., Huang, B., Sun, L., Ding, C., Yuan, S., Zhang, Z., Chen, Y., Hu, C., Zhou, L., Liu, J., Huang, Y., Liao, J., Yuan, M., 2016. Extraction, antioxidant and antibacterial activities of *Broussonetia papyrifera* fruits polysaccharides. *International journal of biological macromolecules* 92, 116-124.

- Hu, J., Jia, X., Fang, X., Li, P., He, C., Chen, M., 2016. Ultrasonic extraction, antioxidant and anticancer activities of novel polysaccharides from *Chuanxiong rhizome*. International journal of biological macromolecules 85, 277-284.
- Ishurd, O., Kennedy, J.F., 2005. The anti-cancer activity of polysaccharide prepared from Libyan dates (*Phoenix dactylifera* L.). Carbohydrate Polymers 59, 531-535.
- Ishurd, O., Sun, C., Xiao, P., Ashour, A., Pan, Y., 2002. A neutral β -d-glucan from dates of the date palm, *Phoenix dactylifera* L. Carbohydrate research 337, 1325-1328.
- Jain, K., Verma, A.K., Mishra, P.R., Jain, N.K., 2015. Characterization and evaluation of amphotericin B loaded MDP conjugated poly (*propylene imine*) dendrimers. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 11, 705-713.
- Joanna Zielińska, M.W., Tomasz Bączek, Marcin Gruszecki, Czub, J., 2016. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. Scientific reports.
- Kagan, S., Ickowicz, D., Shmuel, M., Altschuler, Y., Sionov, E., Pitusi, M., Weiss, A., Farber, S., Domb, A.J., Polacheck, I., 2012. Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan. Antimicrobial agents and chemotherapy 56, 5603-5611.
- Kamiński, D.M., 2014. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. European biophysics journal 43, 453-467.
- Kamoun, A., Chaabouni, M.M., Ayedi, H.F., 2011. Plans d'expériences et traitements de surface-Méthodologie des surfaces de réponses (MSR).
- Kan, Y., Chen, T., Wu, Y., Wu, J., Wu, J., 2015. Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology. International journal of biological macromolecules 72, 151-157.
- Karagözler, A.A., Erdağ, B., Emek, Y.Ç., Uygun, D.A., 2008. Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastata*. Food Chemistry 111, 400-407.
- Khalid, S., Ahmad, A., Masud, T., Asad, M., Sandhu, M., 2016. Nutritional assessment of Ajwa date flesh and pits in comparison to local varieties. JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences 26.

- Khuri, A.I., 2006. Response surface methodology and related topics. World scientific.
- Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S., 2010. Response surface methodology. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2, 128-149.
- Kothandaraman, G.P., Ravichandran, V., Bories, C., Loiseau, P.M., Jayakrishnan, A., 2017. Anti-fungal and anti-leishmanial activities of pectin-amphotericin B conjugates. Journal of Drug Delivery Science and Technology 39, 1-7.
- Kristanc, L., Božič, B., Jokhadar, Š.Z., Dolenc, M.S., Gomišček, G., 2019. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1861, 418-430.
- Lee, Y., Yoon, J., von Gunten, U., 2005. Spectrophotometric determination of ferrate (Fe (VI)) in water by ABTS. Water research 39, 1946-1953.
- Leriverend, H., 2016. Insuffisance rénale et néphrotoxicité médicamenteuse. Actualités Pharmaceutiques 55, 23-30.
- Liu, J., Zhang, Z., Deng, Y., Chen, G., 2024. Effect of extraction method on the structure and bioactivity of polysaccharides from activated sludge. Water Research 253, 121196.
- Lombardi, G., Cascio, G.L., Andreoni, S., Blasi, E., Conte, M., Farina, C., Fazii, P., Sanna, S., Trovato, L., 2020. Superficial and subcutaneous mycoses. Microbiologia Medica 35.
- Manohar, M., Joseph, J., Selvaraj, T., Sivakumar, D., 2013. Application of Box Behnken design to optimize the parameters for turning Inconel 718 using coated carbide tools. International Journal of Scientific & Engineering Research 4, 620-644.
- Mansour, R.B., Serairi-béji, R., Ksouri, R., 2022. Date palm “deglet nour”(*Phoenix dactylifera*) fruit extracts: Functional components, antioxidant, anti-inflammatory activities and gastroprotective effect. Journal of Natural Product Research and Applications 2, 12-29.
- Maran, J.P., Priya, B., 2015a. Ultrasound-assisted extraction of pectin from *sisal* waste. Carbohydr Polym 115, 732-738.

- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S.-I., Lee, Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol–sulfuric acid method in microplate format. *Analytical biochemistry* 339, 69-72.
- Mazerski, J., Grzybowska, J., Borowski, E., 1990. Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *European Biophysics Journal* 18, 159-164.
- Meng, Q., Chen, Z., Chen, F., Zhang, Z., Gao, W., 2021. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of polysaccharides from *Hemerocallis citrina* and the antioxidant activity study. *Journal of food science* 86, 3082-3096.
- Mesa-Arango, A.C., Trevijano-Contador, N., Román, E., Sánchez-Fresneda, R., Casas, C., Herrero, E., Argüelles, J.C., Pla, J., Cuenca-Estrella, M., Zaragoza, O., 2014. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 58, 6627-6638.
- Mezerai, R., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Benbekhti, Z., Sari-Belkherroubi, L., 2017. Tissues and Plasma Drug Concentrations Following Intraperitoneal Administration of Amphotericin B Prepared in Acetate/Acetic Acid Buffer Solution. *Indian J Pharm Sci* 79, 72-78.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., 1997. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS•+ radical cation assay. *Free radical research* 26, 195-199.
- Mohamed-Ahmed, A.H., Les, K.A., Croft, S.L., Brocchini, S., 2013. Preparation and characterisation of amphotericin B-copolymer complex for the treatment of leishmaniasis. *Polymer Chemistry* 4, 584-591.
- Nazir, S., KHAN, A., NOOR, A., REHMAN, R., KHALID, B., 2021. Mucormycoses in Covid-19 Patients. *headache* 22, 24.24.
- Nivoix, Y., Levêque, D., Herbrecht, R., Ubeaud-Séquier, G., 2018. Traitement des infections fongiques invasives et superficielles. *Pharmacie Clinique et Thérapeutique*. Elsevier, pp. 893-924. e891.
- Noorbakhsh, H., Khorasgani, M.R., 2022. Date (*Phoenix dactylifera* L.) polysaccharides: A review on Chemical structure and nutritional properties. *Journal of Food Measurement and Characterization* 16, 3240-3250.

- Ozsoy, N., Can, A., Yanardag, R., Akev, N., 2008. Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. Food chemistry 110, 571-583.
- Parvez, R., Gautam, A., David, J., 2021. Study on antioxidant activity and health benefits of Ajwa dates. Energy 277, 14.
- Pathakumari, B., Liang, G., Liu, W., 2020. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. Biomedicine & Pharmacotherapy 130, 110550.
- Prakash Maran, J., Manikandan, S., Thirugnanasambandham, K., Vigna Nivetha, C., Dinesh, R., 2013. Box–Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide. Carbohydrate Polymers 92, 604-611.
- Qu, L., Li, L., Xie, H., 2014. Toxicity and pharmacokinetics of intrastromal injection of amphotericin B in a rabbit model. Current eye research 39, 340-347.
- Ramchoun, M., Alem, C., Ghafoor, K., Ennassir, J., Zegzouti, Y.F., 2017. Functional composition and antioxidant activities of eight Moroccan date fruit varieties (*Phoenix dactylifera* L.). Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences 16, 257-264.
- Raza, A., Li, F., Xu, X., Tang, J., 2017. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant polysaccharides from the stem of *Trapa quadrispinosa* using response surface methodology. International journal of biological macromolecules 94, 335-344.
- Ruiz, H.K., Serrano, D.R., Dea-Ayuela, M.A., Bilbao-Ramos, P.E., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J., Molero, G., 2014. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. International journal of pharmaceutics 473, 148-157.
- Samavati, V., Manoochehrizade, A., 2013. Polysaccharide extraction from *Malva sylvestris* and its anti-oxidant activity. International journal of biological macromolecules 60, 427-436.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture 76, 270-276.
- Saporta, G., 2006. Probabilités, analyse des données et statistique. Editions Technip.

Serrano, D., Ruiz-Saldaña, H., Molero, G., Ballesteros, M., Torrado, J., 2012. A novel formulation of solubilised amphotericin B designed for ophthalmic use. *International journal of pharmaceutics* 437, 80-82.

Serrano, D.R., Hernández, L., Fleire, L., González-Alvarez, I., Montoya, A., Ballesteros, M.P., Dea-Ayuela, M.A., Miró, G., Bolás-Fernández, F., Torrado, J.J., 2013. Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *International journal of pharmaceutics* 447, 38-46.

Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry* 113, 1202-1205.

Shraideh, Z.A., Abu-Elteen, K.H., Sallal, A.-K.J., 1998. Ultrastructural effects of date extract on *Candida albicans*. *Mycopathologia* 142, 119-123.

Solmi, S., Morreale, C., Ospitali, F., Agnoli, S., Cavani, F., 2017. Oxidation of d-Glucose to Glucaric Acid Using Au/C Catalysts. *ChemCatChem* 9, 2797-2806.

Tekindal, M.A., Bayrak, H., Ozkaya, B., Genç, Y., 2012. Box-Behnken experimental design in factorial experiments: the importance of bread for nutrition and health. *Turkish Journal of Field Crops* 17, 115-123.

Tirado-Sánchez, A., González, G.M., Bonifaz, A., 2020. Endemic mycoses: epidemiology and diagnostic strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 18, 1105-1117.

Voncik, K.S., de Mattos, R.H., Pinto, E.C., Ignachewski, J.D., Carraro, E., de Freitas, G.B., da Silva, W.C., Bonini, J.S., 2016. Difficulties in antifungal therapy with amphotericin B and the continuous search for new formulations: A literature review. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 10, 512-520.

Wang, M., Zhu, P., Zhao, S., Nie, C., Wang, N., Du, X., Zhou, Y., 2017. Characterization, antioxidant activity and immunomodulatory activity of polysaccharides from the *swollen culms* of *Zizania latifolia*. *International journal of biological macromolecules* 95, 809-817.

Wang, Z., Zhao, Y., Su, T., 2015. Extraction and antioxidant activity of polysaccharides from *Rana chensinensis* skin. *Carbohydr Polym* 115, 25-31.

Wang, Z., Zhou, X., Sheng, L., Zhang, D., Zheng, X., Pan, Y., Yu, X., Liang, X., Wang, Q., Wang, B., 2023. Effect of ultrasonic degradation on the structural feature,

physicochemical property and bioactivity of plant and microbial polysaccharides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* 236, 123924.

Whitcomb, P.J., Anderson, M.J., 2004. *RSM simplified: optimizing processes using response surface methods for design of experiments*. CRC press.

Yang, W., Wang, Y., Li, X., Yu, P., 2015. Purification and structural characterization of Chinese yam polysaccharide and its activities. *Carbohydr Polym* 117, 1021-1027.

Yeon Kang, J., Gao, J., Hwan Shin, D., Alvarez, C., Zhong, W., S Kwon, G., 2016. Pharmacokinetics and renal toxicity of monomeric amphotericin B in rats after a multiple dose regimen. *Pharmaceutical nanotechnology* 4, 16-23.

Zhang, J., Xu, H., Dong, Y., Chen, M., Zhang, Y., Shangguan, W., Zhao, W., Feng, J., 2021. Design, synthesis and biological evaluation of a novel N-aminoacyl derivative of amphotericin B methyl ester as an antifungal agent. *European Journal of Medicinal Chemistry* 211, 113104.

Zhang, Z., Lv, G., He, W., Shi, L., Pan, H., Fan, L., 2013. Effects of extraction methods on the antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Flammulina velutipes*. *Carbohydrate Polymers* 98, 1524-1531.

Zhao, Y., Chen, X., Zhao, Y., Jia, W., Chang, X., Liu, H., Liu, N., 2020. Optimization of extraction parameters of *Pleurotus eryngii* polysaccharides and evaluation of the hypolipidemic effect. *RSC advances* 10, 11918-11928.

Zheng, Y., Li, Y., Wang, W.D., 2014. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and in vitro antioxidant activities of polysaccharides from *Trametes orientalis*. *Carbohydr Polym* 111, 315-323.

Zhu, K., Zhang, Y., Nie, S., Xu, F., He, S., Gong, D., Wu, G., Tan, L., 2017. Physicochemical properties and in vitro antioxidant activities of polysaccharide from *Artocarpus heterophyllus* Lam. pulp. *Carbohydrate Polymers* 155, 354-361.

Zielińska, J., Wieczór, M., Chodnicki, P., Grela, E., Luchowski, R., Nierzwicki, Ł., Bączek, T., Gruszecki, W.I., Czub, J., 2021. Self-assembly, stability and conductance of amphotericin B channels: bridging the gap between structure and function. *Nanoscale* 13, 3686-3697.

