

Mag-Bio-11/02

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Aboubekr Belkaid Tlemcen
Faculté des Sciences
Département de Biologie

Thèse de Magister

Présentée par

SOULIMANE Nassima Amel

En vue de l'obtention du
Diplôme de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire



**ACTIVITE DE QUELQUES FORMULATIONS DE
L'AMPHOTERICINE B CHEZ LES SOURIS WISTAR**

Soutenue le 2001, devant le jury

6977
30/04/2013

Président :	M ^r CHABANE SARI D.	Professeur
Examineur :	M ^{me} EL KEBIR F. Z.	Professeur (Université d'Oran)
Examineur :	M ^r DJAZIRI R.	Chargé de cours
Promoteur :	M ^r BENYOUCEF M.	Docent
Co-Promoteur :	M ^{me} BOUCHERIT Z.	Chargée de cours

REMERCIEMENTS

Mes vifs remerciements s'adressent à M^r M. BENYOUCEF, docent à la faculté de médecine, université de Tlemcen, chef de service de biochimie au CHU de Tlemcen, qui m'a permis de réaliser cette étude. Je lui témoigne ma profonde reconnaissance, pour ses précieux conseils, ses orientations bienveillantes, et la compétence scientifique avec laquelle il a dirigé ce travail. Je le remercie également de m'avoir permis d'effectuer une partie du travail au sein du service de biochimie, CHU de Tlemcen.

Je remercie M^{me} Z. BOUCHERIT, chargée de cours au département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, pour avoir pris en charge le co-encadrement de ce mémoire, et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens matériels, et scientifiques indispensables à la réalisation de ce travail. Je lui exprime ma profonde gratitude pour son dévouement, sa patience et ses qualités humaines.

Je remercie M^r D. CHABANE SARI, professeur au département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Je tiens à le remercier également pour ses précieux conseils, et son aide tout au long du travail effectué *in vivo*.

J'exprime ma reconnaissance à M^{me} F. Z. EL KEBIR, professeur au département de biologie, faculté des sciences, université Es-sénia d'Oran, d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de mon profond respect et de mes sincères remerciements.

Je remercie M^r R. DJAZIRI, chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, pour l'attention qu'il a bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger, et de faire partie du jury. Je lui exprime ma reconnaissance pour ses précieux conseils et orientations.

Je tiens à remercier M^r K. BOUCHERIT, chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, vice recteur de la pédagogie, de son aide, matérielle et morale, de sa disponibilité, et de ses encouragements. Qu'il trouve ici toute ma gratitude.

Je remercie M^r F. LAHFA, chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, de m'avoir aidée à effectuer la partie statistique. Je lui témoigne ma reconnaissance pour son aide et sa disponibilité.

Je remercie M^r A. TALEB, maître assistant, au CHU de Tlemcen d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à l'élaboration de la partie statistique.

Je tiens à remercier M^r S. ZAOUI, chargé de cours au département de biologie, faculté des sciences, université de Tlemcen, et chef de département de Biologie, faculté des sciences, pour son aide et sa compréhension.

Je tiens à remercier également tous non enseignants de nous avoir transmis leur savoir qui s'est concrétisé par ce travail.

Je n'oublie pas d'exprimer ma gratitude au personnel du service de biochimie, au technicien de l'animalerie, et à tout le personnel du département de Biologie.

ABREVIATIONS

AMB : Amphotéricine B

AMB-DOC : Amphotéricine B désoxycholate

DMSO : Diméthyl sulfoxide

ETH : Ethanol

FUN : Fungizone[®]

HDL : High density lipoprotein

LDL : Low density lipoprotein

SP : Sérum physiologique

PBS : Phosphate buffer saline

sommaire

Synthèse bibliographique	1
1. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B	4
1.1. Interaction avec la membrane et les constituants cellulaires	4
2. Stratégie de développement de l'amphotéricine B	11
2.1. Modification de la structure de base d'amphotéricine B	11
2.2. Modification de l'environnement physico-chimique	13
2.3. Complexation de l'amphotéricine B à d'autres molécules (vectorisation)	15
Matériel et méthodes	21
1. Matériel biologique	21
2. Méthodes	21
2.1. Préparation des solutions antifongiques	21
2.2. Préchauffage des solutions mères	22
2.3. Préparation des lipoprotéines	22
2.4. Combinaison des lipoprotéines à l'antifongique	25
2.5. Traitement des souris par l'antifongique	25
2.6. Infection des souris par <i>Candida albicans</i>	25
2.7. Traitement des souris après infection	27
2.8. Prélèvement	28
2.9. Dosage	28
2.10. Etude statistique	28

Résultats et discussion	29
Chapitre 1 : Effet de la variation de la concentration de la solution mère d'antifongique sur la toxicité	30
Chapitre 2 : Effet de la variation des doses finales d'amphotéricine B sur la toxicité	36
Chapitre 3 : Effet du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'antifongique sur la toxicité	40
Chapitre 4 : Effet du préchauffage de la solution mère d'amphotéricine B à différentes températures sur la toxicité	50
Chapitre 5 : Effet combiné du préchauffage de la solution mère de l'antifongique, a deux concentrations mères différentes, préparées dans deux solvants différents	55
Chapitre 6 : Effet des doses finales de l'antifongique (recherche de la dose létale)	67
Chapitre 7 : Effet de l'addition des lipoprotéines à l'amphotéricine B	87
Chapitre 8 : Test de l'efficacité des formulations les moins toxiques d'antifongique	145
Conclusion générale	154
Références bibliographiques	157
Annexes	169

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Les mycoses représentent actuellement un problème clinique important. Leur gravité dépend de leur aspect allant des formes superficielles (infections cutanéomuqueuses) à des formes profondes ou généralisées, mettant en jeu le pronostic vital.

La fréquence des mycoses systémiques est croissante (environ 15% par an), en raison d'une part, de la multiplicité des méthodes de diagnostic et des thérapeutiques, présentant un risque de contamination par les fongis, comme les explorations endoscopiques et les interventions chirurgicales ; et d'autre part de l'état d'immunodépression causé notamment par la chimiothérapie des cancers, et de l'extension de l'épidémie du SIDA (CANIAUX I. et al., 1984) ; (KWON-CHUNG K. J., BENNETT J. E., 1992).

En pathologie humaine, il s'agit principalement d'infections par *Candida*. Celles-ci représentent près de 83% de toutes les levures isolées de l'homme (KOENIG H., 1995) et sont à l'origine de 8% des septicémies acquises en milieu hospitalier. Les mycoses à *Candida* constituent une complication fréquente de nombreuses pathologies oncologiques et chirurgicales, avec une mortalité attribuable d'environ 40% (DUPONT C. et al., 1997) ; (YAMAMURA D. L. R. et al., 1999).

Si les mycoses cutanéomuqueuses bénéficient de traitements efficaces (nystatine, griséofulvine, imidazoles), il n'en est pas de même pour les mycoses systémiques, dont les traitements sont beaucoup plus décevants.

Cependant, l'avènement des antifongiques polyéniques, et particulièrement l'amphotéricine B en 1956, apporta un grand espoir dans le traitement de ces mycoses, grâce à son large spectre et son excellente activité. Selon UTZ et al. , 1964, le taux de mortalité par méningite cryptococcique, passa de 100% à 15% (CARLSON M. A. et al., 1994).

Cet antifongique isolé à partir de *Streptomyces nodosus* par GOLD et VANDEPUTTE, est de structure principalement formée d'une macrolactone heptaénique de 37 atomes de carbone, sur laquelle est fixé par une liaison glucosidique, un amino-sucre: La mycosamine (figure 1) (DUPONT G. et al., 1977); (BOLARD J., VERTUT DOI A., 1995).

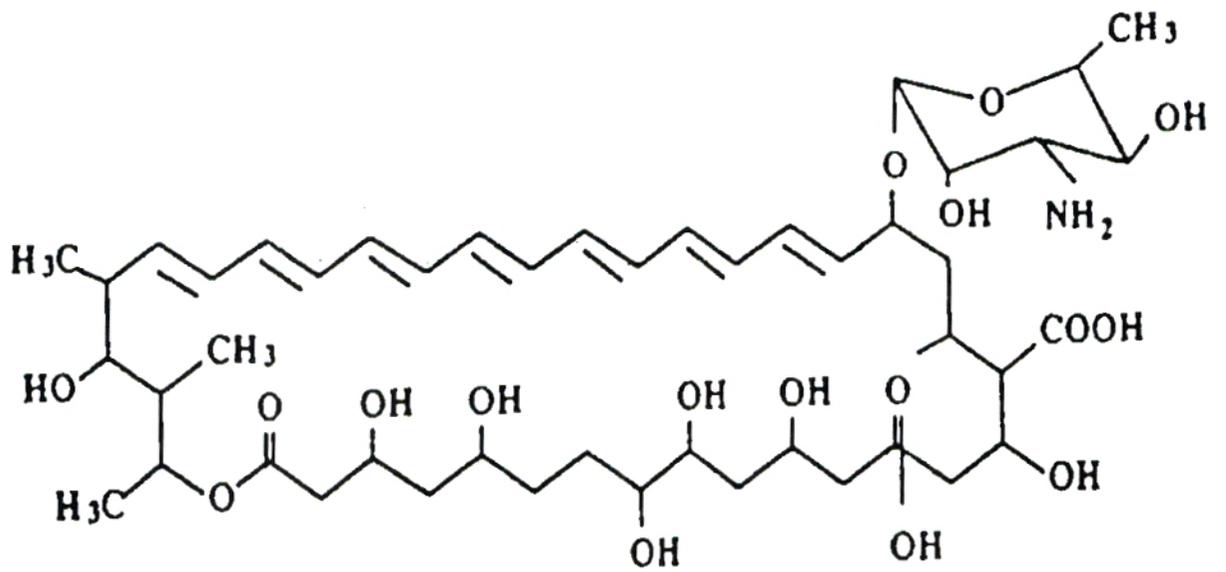


Figure 1 :Structure de l'amphotéricine
 B (BOLARD J., VERTUT-DOI A., 1995)

L'amphotéricine B est une molécule amphiphile constituée d'une chaîne polyénique de sept doubles liaisons (région hydrophobe) et de sept groupements hydroxyles polaires (régions hydrophiles) de la macrolactone (BOLARD J., VERTUT DOI A., 1995). La présence de deux groupements chargés, un groupement carboxyle ($-\text{COO}^-$) et un groupement amine ($-\text{NH}_3^+$), confère à la molécule un caractère amphotère. Son poids molaire est de 960.

L'absorption digestive de l'amphotéricine B étant trop faible (<5%), on a recours à la voie intraveineuse pour traiter les mycoses systémiques. Les concentrations sériques sont proportionnelles à la dose administrée jusqu'à atteindre la valeur maximale de 2,5 µg/ml, qui ne suit plus l'augmentation de la dose lorsque celle-ci excède 1 mg/kg (CANIAUX I. et al., 1984); (CARBON C. et al., 1994). La distribution cinétique d'amphotéricine B intraveineuse concerne trois compartiments : le compartiment vasculaire et deux compartiments extravasculaires ou périphériques, à savoir le liquide interstitiel des tissus ayant des capillaires discontinus comme le foie, la rate, les intestins et le liquide interstitiel des tissus à capillaires continus comme le muscle squelettique et la peau (ATKINSON A. J., BENNETT J.E., 1978)

Dans le sang, l'amphotéricine B est liée aux protéines sériques (>95%), et aux lipoprotéines de basse densité (LDL). Sa demi vie initiale d'élimination est de 24h à 48h, et sa demi vie terminale d'élimination est de l'ordre de 15 jours (CARBON C. et al., 1994), celle-ci se faisant essentiellement par voie biliaire et urinaire (CANIAUX I. et al., 1984).

Son spectre d'activité s'étend notamment aux levures, champignons dimorphiques, dermatophytes et moisissures, mais son utilisation est limitée par des problèmes de solubilité, de stabilité et d'absorption, ce qui induit une toxicité principalement rénale se traduisant sur le plan clinique par une diminution de la filtration glomérulaire, et du flux plasmatique rénal conduisant également à une perte de potassium et de magnésium, en plus d'une atteinte tubulaire (LEBRUN M. et al., 1996) qui se manifeste au niveau de l'anse de Henlé et le tube contourné distal par une hyposthénurie et polyurie, fuite électrolytique urinaire responsable de la survenue d'une hypokaliémie et une hypomagnésémie, et une acidose tubulaire distale (BOLARD J. et al., 1997); (WASAN M. K., CONKLIN J. S., 1997).

En plus de la néphrotoxicité, d'autres effets ont été observés: (CANIAUX I. et al., 1984); (CARBON C. et al., 1994); (BOLARD J., VERTUT DOI A., 1995).

- Fièvres et frissons dûs à la libération de médiateurs comme les prostaglandines.
- Diminution du taux de l'hématocrite qui passe de 45% à 30% voire 20%.
- Toxicité pulmonaire due à une augmentation de la perméabilité de l'endothélium pulmonaire, et sa pression artérielle par la thromboxane B₂.
- Toxicité neurologique.
- Thrombophlébite.

1. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B:

A l'échelle cellulaire, la toxicité de l'amphotéricine B dépend de son mode d'action qui est basé sur une interaction entre l'antifongique et la cellule cible (cellule hôte ou fongique), par action directe ou indirecte (BOLARD J., 1986); (KERRIDGE D., 1986); (THOMAS A. H., 1986); (BRAJTBURG J. et al., 1990).

1-1: Interaction avec la membrane et les constituants cellulaires:

L'amphotéricine B se fixe aux stérols membranaires, notamment les stérols ayant une fonction 3 β hydroxy et une chaîne latérale (ergostérol pour les fongis et cholestérol pour les cellules animales) (KITO M. et al., 1987). L'interaction avec l'ergostérol est directe. Le complexe amphotéricine B-ergostérol s'assemble perpendiculairement à la surface de la membrane, de manière à former des pores hydrophiles transperçant la bicouche lipidique (SCHOLER H. J., 1984); (PAGE-HAYNES P.M et al., 1996) (figure 2).

L'interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol se fait par insertion des formes oligomériques d'antifongique qui induit une polarisation membranaire, et une modification de la structure physique des phospholipides. Le cholestérol participerait indirectement à la formation des pores (BOLARD J., LEGRAND P., 1991); (HARTSEL S.C. et al., 1994); (BOLARD J. et al., 1997) (figure 3).

Il est largement établi que l'amphotéricine B, a plus d'affinité pour l'ergostérol que pour le cholestérol (MADDUX M. S., BARRIERE S. L., 1980). Ainsi, le seuil de la concentration toxique d'amphotéricine B est plus élevé pour les cellules animales que pour les cellules fongiques.

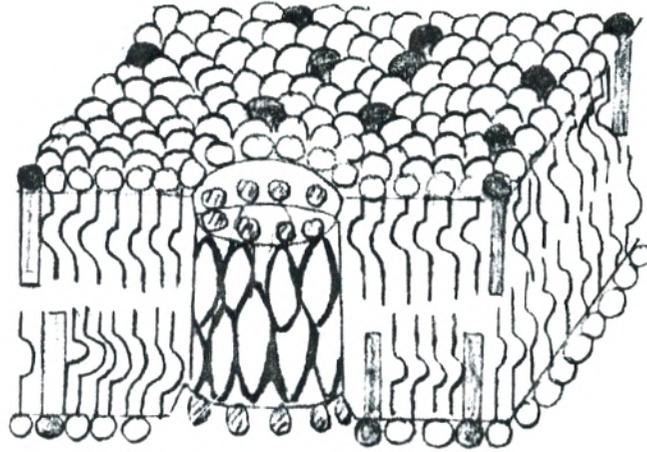


Figure 2 : Modèle illustrant la formation de pores par interaction de l'amphotéricine B avec l'ergostérol des membranes fongiques (BRAJTBURG J., BOLARD J., 1996).

 : Amphotéricine B

 : Cholestérol

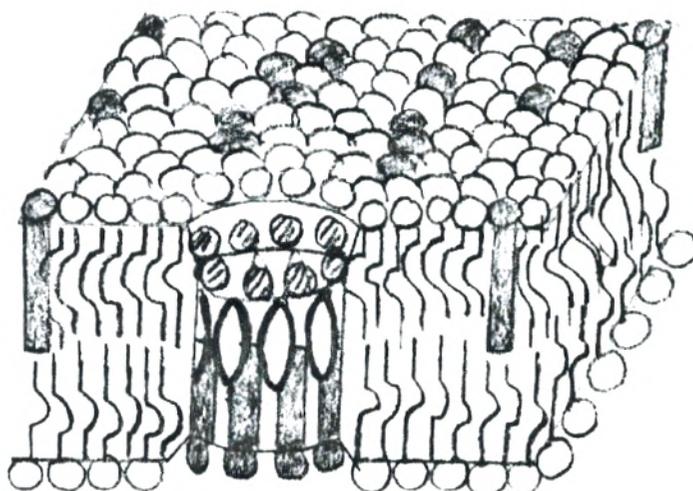


Figure 3 : Interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol des membranes des cellules animales (BRAJTBURG J., BOLARD J., 1996).

Cette interaction AmB-cellule cible induit d'une manière générale, après formation de pores, une fuite de potassium, une acidification du milieu intracellulaire et finalement un arrêt du métabolisme.

Chez les fongis il y a une modification de la perméabilité des cations monovalents (K^+ , H^+) et du Ca^{2+} (RAMOS H. et al., 1989); (RABASTE F. et al., 1996).

Chez les cellules animales, une fuite de potassium se produit. L'inhibition de la pompe à protons ATPase/ H^+ pour les fongis ou de la pompe Na^+/K^+ pour les cellules animales conduit à l'arrêt du métabolisme. L'inhibition est causée par action directe de l'antifongique sur la pompe (BOLARD et al., 1997).

Chez les fongis, la toxicité de l'amphotéricine B, dépend aussi de leur phase de croissance, BOLARD, 1991 et GLENN et al., 1989, ont trouvé que les *Candida* en phase exponentielle étaient plus sensibles à l'amphotéricine B qu'en phase stationnaire.

- **Péroxydation des lipides:**

L'utilisation de l'amphotéricine B à des doses très faibles (aux environs de 0,01 et 0,04 $\mu\text{g/ml}$), entraîne chez les *Candida* une augmentation du nombre d'unités formant colonies (UFC) (BRAJTBURG J. et al., 1981). A des doses sub-inhibitrices de l'antifongique, cette augmentation est attribuée à la fixation de la molécule aux acides gras du cytosquelette, qui est considérée comme une fixation non toxique (BOLARD J., 1991). Par contre, les doses intermédiaires d'amphotéricine B (de 0,02 à environ 0,1 $\mu\text{g/ml}$), entraînent une inhibition de croissance de *Candida*.

Cet effet fongistatique se traduit par une réduction d'activité de plusieurs enzymes de *Candida albicans* (SURARIT R. et al., 1987); (BOLARD J., 1991). A des doses supérieures à 0,3 $\mu\text{g/ml}$, l'AmB est létale, elle induit une dégradation oxydative ou peroxydation des lipides membranaires (SOKOL-ANDERSON M. L., 1986), celle-ci rend la membrane plus fragile et sensible au choc osmotique (BOLARD J., VERTUT DOI A., 1995); (BOLARD J., MILHAUD J., 1996) (figure 4). Le même mécanisme de peroxydation peut être mis en jeu chez les cellules animales (figure 5).

- **Mécanisme d'internalisation de l'amphotéricine B:**

Un autre mécanisme d'action expliquant la toxicité de l'amphotéricine B a été plus récemment mis en évidence, il s'agit de l'internalisation de l'antifongique (BOLARD J. et al., 1997). Celle-ci se fait essentiellement par l'intermédiaire des lipoprotéines sériques de basse densité (LDL) qui fixent la molécule d'amphotéricine B. Les tissus possédant les récepteurs LDL fixent le complexe AmB-LDL et l'internalisent, les LDL sont recyclés, et l'AmB s'accumule en grande quantité dans le milieu intracellulaire. Elle bloque la fusion de l'endosome avec le lysosome et induit la toxicité cellulaire (HARTSEL S., BOLARD J., 1996); (LEGRAND P. et al., 1996) (figure 6).

Le potentiel cytotoxique de l'amphotéricine B, a conduit à la recherche d'autres alternatives thérapeutiques dont les dérivés azolés qui étaient largement prescrits en raison de l'absence d'effets toxiques majeurs. Cependant, si la plupart des patients ont une bonne réponse à ces traitements, la guérison clinique n'est pas synonyme d'éradication mycologique (PLETTERBERG A. et al., 1994); (DUPONT C. et al., 1997). Cette constatation explique d'une part la fréquence élevée des récives, et d'autre part la nécessité de traitements itératifs avec risque d'émergence de souches de *Candida* résistantes (METZGER S. et al., 1994 ; RHUNKE M. et al., 1994 ; SANGEORZAN J. et al., 1994).

De ce fait, il y a eu un regain d'intérêt pour l'amphotéricine B. Les études entreprises visent de nouvelles formulations, de manière à modifier sa pharmacocinétique dans un sens favorable, tout en gardant son efficacité. Cet intérêt est d'autant plus grand que la molécule possède d'autres applications intéressantes en clinique, comme son activité sur certains protozoaires (*Naegleria*, *Trichomonas*, *Leishmania*) (HARTSEL S., BOLARD J., 1996) ; (LAMOthe J., 1997) ; (PETIT C. et al., 1999) ; (BRYSKIER A., 1999).

D'autre part, on a observé que l'amphotéricine B possédait des propriétés antivirales, spécifiquement anti- HIV, des propriétés anti-prion et même des propriétés antibactériennes (anti- *Listeria* et anti-*Staphylococcus*) mais le mécanisme d'action reste mal connu (HARTSEL et BOLARD, en 1996). Néanmoins, des études réalisées sur des modèles membranaires, ont montré que les stérols ne sont pas le seul site de fixation de l'amphotéricine B ; celle ci peut

interagir spécifiquement avec les phospholipides et former des pores membranaires (PERKINS W. R. et al., 1992).

Par ailleurs, l'amphotéricine B peut augmenter la cytotoxicité des différents agents antitumoraux, cette potentialité a été décrite également *in vivo* par MEDOFF et al. en 1981, en particulier contre les cellules transplantables de type AKR, qui sont à l'origine de la leucémie chez les souris. Cette action peut s'expliquer par deux mécanismes ; La stimulation du système immunitaire des hôtes, et la potentialisation de la cytotoxicité par augmentation de la fixation des agents anticancéreux aux membranes que l'amphotéricine B rend perméables (BOLARD J., VERTUT DOI A., 1995). Cette propriété a fait l'objet d'essais en thérapie génique où un dérivé d'amphotéricine B est utilisé comme vecteur de gènes transplantables sur des cellules cancéreuses (BLANC I. et al., 2000) ; (GARCIA- CHAUMONT C. et al., 2000)

L'immunomodulation a été observée, en utilisant des doses sub-inhibitrices d'antifongique. Dans ce cas l'amphotéricine B a un effet fongicide sur *Candida albicans*, non pas par attaque directe, mais par la stimulation des défenses naturelles de l'hôte (BOLARD J., 1991). Il a été aussi établi que les monocytes et les macrophages accumulent l'amphotéricine B et constituent un réservoir de la molécule sous forme monomérique (MARTIN E., et al., 1994) ; (LEGRAND P., et al., 1996).

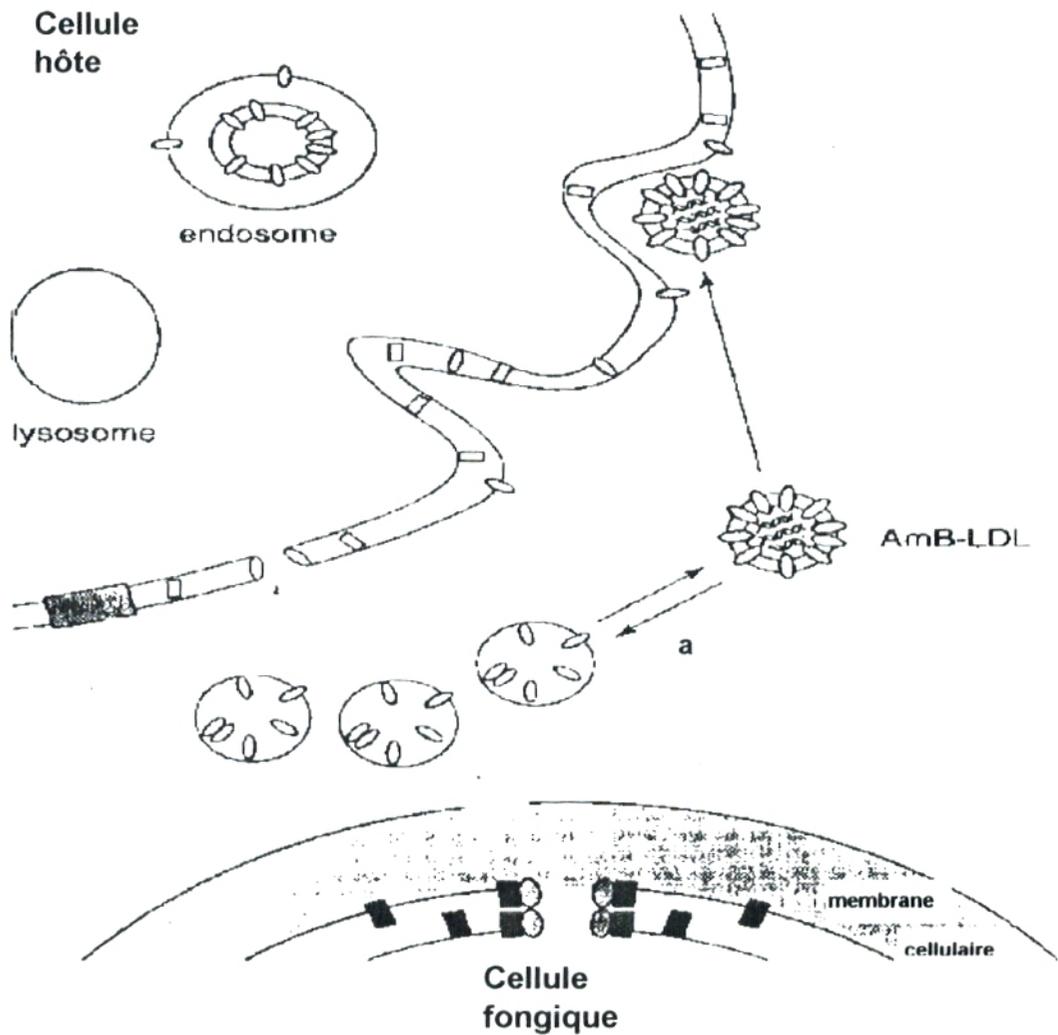


Figure 6 : Mécanisme d'internalisation de l'amphotéricine B par les LDL
(HARTSEL S., BOLARD J., 1996)

a : Internalisation de l'amphotéricine B lié aux LDL .

○ : Amphotéricine B ;

□ : Cholestérol ;

■ : Ergostérol.

2 : Stratégies de développement de l'amphotéricine B :

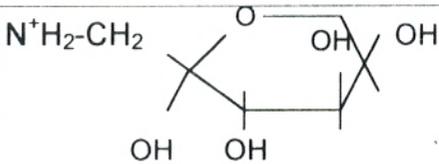
La gravité et la fréquence des mycoses systémiques d'une part, l'efficacité antifongique et les espoirs qu'offre l'amphotéricine B d'autre part, justifient les recherches menées sur cette molécule en vue d'améliorer son index thérapeutique. A savoir réduire la toxicité vis à vis des cellules animales tout en gardant son efficacité sur les levures et les champignons.

Plusieurs solutions ont été proposées. Elles consistent en une modification de la structure de base de l'amphotéricine B, une modulation de l'environnement physico-chimique de la molécule d'amphotéricine B, ou sa vectorisation.

2-1 : Modification de la structure de base d'amphotéricine B :

Des dérivés solubles d'amphotéricine B ont été synthétisés. Plusieurs de ces composés ont été étudiés, en particulier l'amphotéricine B méthylester (AME) et la D-ornithyl amphotéricine B méthylester. Ces derniers tout en conservant une activité antifongique satisfaisante, entraînent moins d'effets néphrotoxiques. En revanche, ils induisent une toxicité neurologique (démýélinisation du système nerveux central), ce qui a conduit à abandonner ces molécules. D'autres dérivés (dérivés N- Acyl, N- méthyle, N- Glycosylé, N- Amino acétyle, N- guanidine de l'amphotéricine B) n'ont pas dépassé le stade des études expérimentales préliminaires (CHERON M. et al., 1988) ; (SZPONARSKI W. et al., 1988) ; (WIETZERBIN J. et al., 1990) ; (BOLARD J., 1991) ; (RIDENTE Y. et al., 1996) (tableau 1).

Tableau 1 : Structure chimique de l'amphotéricine B et quelques de ses dérivés (BOLARD J., 1991)

Amphotéricine B (AmB)	COO^-	NH_3^+
Amphotéricine B methylester (AmE)	COOCH_3	N^+H_3
Amphotéricine B3-(N',N' dimethyl-amino) propylamide (AmA)	$\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$	N^+H_3
N-acetyl amphotéricine B (Ac AmB)	COO^-	NHCOCH_3
N-thiopropionyl amphotéricine B(AmBSH)	COO^-	$\text{N}^+\text{H}_2\text{-CO}(\text{CH}_2)_2\text{SH}$
N-(1-deoxy-D-fructose-1-yl) amphotéricine B (N-Fru AmB)	COO^-	
N,N,N,- trimethylamphotéricine B methylester (DMS-AmB)	COOCH_3	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
N-(N',N'-dimethylglycyl) amphotéricine B (DM gly-AmB)	COO^-	$\text{NHCOCH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_3)_2$
N-D ornithyl amphotéricine B methylester (O AmE)	COOCH_3	$\begin{array}{c} \text{N}^+\text{H}_3 \\ \\ \text{NHCO-CH-}(\text{CH}_2)_3\text{-N}^+\text{H}_3 \end{array}$

2-2 : Modification de l'environnement physico chimique :

Il est connu que l'amphotéricine B existe, en milieu aqueux, sous trois formes en équilibre : Les monomères, les oligomères solubles et les agrégats insolubles. Plusieurs études, ont souligné le rôle de certains paramètres physico-chimiques dans les phénomènes toxiques de l'antifongique (CASS A. et al., 1970) ; (DUPONT G. et al., 1977) ; (HEMINGER R. P. et al., 1983) ; (KERRIDGE. D, 1986) ; (HUNG C. T. et al., 1988) ; (GLENN J. et al., 1989) ; (LEGRAND P. et al., 1992) ; (HARTSEL S. C. et al., 1994) ; (GABORIAU F. et al., 1997 a ,1997 b) ; (PETIT C. et al., 1998).

La modulation de cet environnement déplace l'équilibre des formes solubles vers les formes insolubles et peut entraîner une modification de la toxicité de l'antifongique. Plusieurs facteurs peuvent intervenir:

- La concentration finale ainsi que la concentration de la solution mère de l'antifongique en solution :

Il a été démontré qu'en solution aqueuse, à des concentrations finales inférieures à 10^{-7} M, l'amphotéricine B est sous forme monomérique alors qu'à des concentrations supérieures à 10^{-7} M, elle s'associe sous forme d'oligomères et d'agrégats (HEMINGER R. P. et al., 1983) ; (MAZERSKI T. et al., 1982, 1990). La concentration de la solution mère d'amphotéricine B est également un facteur important dans la détermination des formes de l'antifongique. Partant de solutions mères à des concentrations relativement élevées ($>10^{-4}$ M), l'amphotéricine B resuspendu en milieu aqueux à des concentrations de l'ordre de $\mu\text{g/ml}$ est majoritairement sous forme d'agrégats, alors qu'en utilisant des solutions mères plus diluées ($<10^{-5}$ M), l'amphotéricine B en milieu aqueux est essentiellement sous forme de monomères et d'oligomères solubles (LEGRAND P. et al., 1992) ; (GABORIAUD F. et al., 1997).

- Les solvants :

L'amphotéricine B a une faible solubilité dans l'eau, les alcools, les éthers, les esters et les cétones. En revanche, sa solubilité est meilleure dans le diméthyl sulfoxyde (DMSO) et le diméthyl formamide (DMF), ce qui fait que les proportions des formes de l'antifongique rencontrées dans les solutions aqueuses finales diffèrent selon le solvant utilisé pour la préparation de la solution mère (Legrand P. et al., 1992).

- Le pH :

La variation du pH du milieu a une influence sur les formes de l'amphotéricine B en raison de son caractère amphotère (LAMPEN J. O., 1966) ; (DUPONT G. et al., 1977) ; (BOUCHERIT Z., 1995).

- La température :

Constitue aussi est un facteur déterminant les proportions des différentes formes. Les travaux *in vitro* de GABORIAU et al., 1997, ont montré que le préchauffage de l'amphotéricine B à 70°C, induit la formation de superagrégats, résultant de l'association des agrégats avec les monomères. Cependant, ces superagrégats constituent une forme stable de l'antifongique (LAMY-FREUND M. T. et al., 1991).

Une application *in vivo* a été réalisée par PETIT et al., en traitant par l'AmB-DOC préchauffée à 70°C des souris infectées par des *Candida* (PETIT et al., 1998), et des souris infectées par *Leishmania* (PETIT et al., 1999).

Les résultats obtenus au cours de ces études concordaient avec les résultats obtenus *in vitro*. Les auteurs ont en effet remarqué que le préchauffage de l'AmB-DOC, induisait une réduction de la cytotoxicité vis à vis de l'organisme hôte d'où la possibilité d'augmenter la dose finale injectée de 2,5 fois, et une amélioration de l'activité antifongique.

2-3 : Complexation de l'amphotéricine B à d'autres molécules (vectorisation) :

Cette approche expérimentale semble prometteuse, les vecteurs généralement utilisés sont des liposomes, des mélanges lipides ou des lipoprotéines.

- Les ampholiposomes :

Il s'agit d'incorporer l'amphotéricine B dans des liposomes unilamellaires de petite taille (S.U.V), des liposomes unilamellaires de grande taille (L.U.V), ou des liposomes multilamellaires (M.L.V).

Actuellement seul l'AmBisome qui constitue une préparation de l'amphotéricine B dans des liposomes (S.U.V) est disponible ; après des essais de la molécule, on a noté une diminution de l'altération des fonctions glomérulaires. En revanche, une hypokaliémie, et une fièvre modérée ont été observées. La dose quotidienne peut aller de 1 à 4 mg/kg. Son efficacité semble très bonne puisque sur 150 patients traités par cette molécule, il y a eu 80% de guérison chez les patients porteurs de candidoses ou de cryptococcoses. En revanche, le taux de guérison n'était que de 30% dans le cas des aspergilloses (BRAJTBURG. J, BOLARD J., 1996) ;(BOLARD J. et al., 1997) ; (BERINGER W. A., 1998).

Plus récemment un programme thérapeutique concerté entre le PNUD (programme des nations unis et développement)/Banque mondiale/OMS (organisation mondiale de la santé) et Nextar pharmaceuticals, INC, a été institué, afin d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de l'AmBisome, au Brésil, en Inde et au Kenya en suivant trois schémas thérapeutiques. Le traitement consistait à injecter aux malades atteints de Leishmaniose viscérale, l'AmBisome à raison de 2mg/kg/jour ; du premier au sixième jour et au dixième jour (la dose totale est de 14 mg/kg) pour le premier schéma; du premier au quatrième jour puis au dixième jour (la dose totale est de 10 mg/kg) pour le deuxième schéma; et aux jours 1, 5 et 10 (la dose totale est de 6 mg/kg) pour le troisième schéma. Le taux d'efficacité en Inde a été de 100% pour les trois schémas, au Kenya 100% pour le premier schéma et 20% pour le troisième, au Brésil 62% pour le premier schéma. Les effets indésirables étaient bénins (BERMAN J. D. et al, 1998).

- Les ampholipides :

La complexation de l'amphotéricine B se fait avec les lipides non liposomiaux. Le mode d'action est identique à celui des liposomes. Pour les préparations utilisées on distingue :

- Amphotéricine B colloidal dispersion (ABCD) ou Amphocil : Il s'agit de complexer l'amphotéricine B au cholesteryl sulfate de sodium a un taux équimolaire. Bien que la dose limite tolérée ne soit pas très élevée par rapport à l'AmBisome, les effets secondaires représentés par des céphalées et des nausées sont bénins (ALLENDE M. C., 1994).

- Amphotéricine B lipid complex (ABLC) : 33% d'amphotéricine B sont complexés au dimirystoyl phosphatidylcholine et au dimirystoyl phosphatidylglycérol utilisés dans un rapport molaire de 7 : 3. Sa tolérance est satisfaisante, avec cependant, quelques cas d'élévation d'enzymes hépatiques. Sa distribution dans tissus est rapide (4 à 10 fois plus rapide que la fungizone[®]) (BRAJTBURG J., BOLARD J., 1996) ; (BERINGER W. A. et al., 1998).

Le tableau 2 illustre, la comparaison entre les propriétés biochimiques et pharmacocinétiques des formulations lipidiques de l'amphotéricine B (BERINGER W. A. et al., 1998).

La diminution de la toxicité de ces nouvelles formulations donne à penser que la sélectivité de l'antifongique augmente pour les cellules fongiques et non pour les cellules animales (JULIANO R. L., 1987) ; (MEHTA R. L., 1984). PERKINS, 1992 a expliqué ce phénomène par l'hypothèse suivante : Les cellules fongiques produisent une lipase qui dégrade le complexe AmB-lipide, et libère de ce fait l'amphotéricine B qui attaque les fongis.

Bien qu'elle soit efficace, la complexation de l'amphotéricine B aux liposomes et aux lipides reste une alternative onéreuse, surtout dans les pays en voie de développement où les mycoses constituent un problème majeur par leur fréquence et leur gravité. De ce fait une autre solution a été proposée, la complexation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines dont l'isolement est plus abordable.

Tableau 2 : comparaison entre les propriétés biochimiques et pharmacocinétiques des formulations lipidiques d'amphotéricine B (WONG-BERINGER et al., 1998).

Propriétés	AmB-DOC	ABLc	ABCD	L-AmB
Composition en phospholipides (nombre de moles)	/	DMPC/DMPG (7 :3)	Cholesteryl sulfate	HPC/Chol/DSPG (2 :1 :0.8)
Taux d'AmB (%)	50%	33%	50%	10%
Doses injectées (mg/kg de poids)	1	Entre 3 et 5		
Distribution dans les tissus humains(µg/g de tissu)				
Foie	93.2	196		175.7
Rate	59.3	290		201.5
Poumons	12.9	222		16.8
Reins	18.9	6.9		22.8
Cerveau	/	1.6		0.56
Cœur	3.7	5		4.3

AmB-DOC : Amphotéricine B desoxycholate

ABLc : : Amphotéricine B lipid complex

ABCD : : Amphotéricine B Colloidal dispersion

L-AmB : : Amphotéricine B liposomal

Chol : Cholestérol

DMPC : Dimirystoylphosphatidylcholine

DMPG : Dimirystoylphosphatidylglycérol

DSPG :Distearoylphosphatidylglycérol

HPC :Phosphatidylcholine hydrogène

- Complexation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines :

Les lipoprotéines sont des macromolécules amphiphiles composées d'une partie protéique ou apolipoprotéine, et d'une partie lipidique. Elles interviennent dans la solubilisation des substances liposolubles dans le plasma et leur distribution dans l'organisme.

A l'état nature, elles ont une structure sphérique, dont le centre est occupé par des lipides neutres (triglycérides, cholestérol estérifié), et la surface par des molécules disposant de groupes polaires (les phospholipides, le cholestérol libre et les apolipoprotéines) (figure 7).

Les lipoprotéines peuvent être classées selon leur densité, leur mobilité électrophorétique, leur taille ou leur composition en apolipoprotéines (LUC G. et al, 1991).

L'effet toxique et thérapeutique de l'amphotéricine B *in vivo*, sont les résultats d'une interaction compétitive de l'AmB avec les stérols des membranes des fongis et ceux des cellules hôtes, et les composants du sérum, comme les lipoprotéines et les protéines (BRAJTBURG J. et al., 1984 ; 1986). La fixation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines d'une part, stabilise son activité antifongique qui persiste pendant plusieurs jours (FIELD B. T., 1970) alors que la décomposition de l'amphotéricine B dans les solutions est rapide ; d'autre part, elle protège les cellules hôtes.

Des études *in vitro* ont montré que l'amphotéricine B se fixe plus rapidement aux LDL qu'aux HDL, mais que le complexe AmB-LDL est plus toxique que le complexe AmB-HDL (KOLDIN H. M., 1985). Ceci est lié au fait que les cellules animales possèdent nettement plus de récepteurs aux LDL, que de récepteurs aux HDL. L'internalisation du complexe AmB-LDL est à l'origine de la toxicité élevée (VERTUT-DOI A. et al., 1994), quant aux HDL, elles protègent les cellules hôtes en bloquant leur contact avec l'amphotéricine B (WASAN M. K. et al, 1994). L'effet protecteur des HDL a été aussi confirmé par BRAJTBURG, 1985 ; BOUCHERIT, 1995 ; et PETIT, 1998.

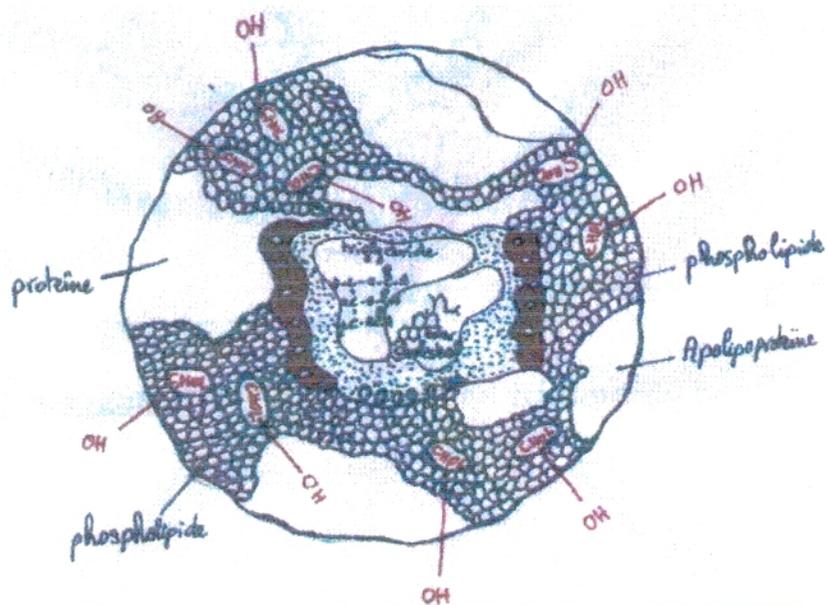


Figure 7 : Schéma d'une lipoprotéine
(LUC G., 1991)

1-MATERIEL BIOLOGIQUE :

Les expériences ont été menées sur des souris de type Wistar, provenant de l'institut Pasteur d'Alger, et reproduites au sein de l'animalerie du département de biologie, de la faculté des sciences, université de Tlemcen. L'âge minimum des souris est de deux mois, et leur poids moyen est de 30 g. La nourriture (aliment ONAB pour rats) et l'eau leur sont fournies *ad libitum*. Elles sont maintenues à une température de 25°C environ et soumises à un cycle lumière/obscurité 12h/12h.

La souche de *Candida albicans* utilisée provient de l'American Type Culture Collection (ATCC 9036)

2- METHODES :

2-1- Préparation des solutions antifongiques :

L'amphotéricine B des laboratoires SIGMA, et la fungizone[®] des laboratoires SQUIBB et dont la composition est donnée en annexe , sont diluées dans différents solvants (le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le tampon phosphate salin (PBS), le sérum physiologique, l'éthanol de concentrations différentes allant de 20% à 70%), à deux concentrations mères différentes $10^{-3}M$ et $10^{-4}M$.

Ces solutions sont gardées à l'abri de la lumière à 4°C, 12 heures au minimum avant leur utilisation et ceci pour la stabilisation des formes antifongiques.

Les dilutions réalisées dans des conditions stériles, se font à partir des solutions mères, dans le PBS afin d'atteindre des concentrations finales allant de 0,1 mg/kg à 3 mg/kg, dans un volume de 0,3 à 0,5 ml (selon le poids de la souris). Nous augmentons d'abord la concentration par palier de 0,1 mg/kg ensuite de 0,5 mg/kg.

2-2- Préchauffage des solutions mères :

Le préchauffage est effectué sur la solution mère, juste après sa préparation, dans un bain-Marie, à différentes températures (55°C, 70°C, 80°C), pendant 20 minutes (GABORIAU F. et al., 1997).

2-3- Préparation des lipoprotéines :

Les lipoprotéines sont préparées à partir de sérum fraîchement prélevé sur des souris Wistar (figure 8).

2-3-1- Préparation des lipoprotéines de haute densité (HDL) :

Nous utilisons la méthode de séparation au dextran-sulfate (BURSTEIN M. et al., 1989), qui consiste à précipiter les LDL, VLDL, et chylomicrons par le dextran-sulfate qui joue le rôle de polyanion et le $MgCl_2$ qui joue le rôle de cation, pour la formation du complexe lipoprotéine- cation- polyanion. Nous ajoutons à 400 μl de sérum 40 μl de réactif (voir annexe), après une incubation de 15 min à température ambiante nous centrifugeons à 4000 tours/min pendant 20 min (Jouan), et nous récupérons le surnageant qui contient les HDL.

2-3-2- Préparation des lipoprotéines de basse densité (LDL) :

Nous utilisons la méthode citrate- héparine (BURSTEIN M. et al., 1970). Cette méthode est basée sur la précipitation en atteignant le pH isoélectrique des LDL. Nous ajoutons à 200 μl de sérum 2 ml de réactif de précipitation LDL (voir annexe), nous incubons à température ambiante pendant 15 min, ensuite nous centrifugeons à 4000 tours/min pendant 20 min, nous éliminons le surnageant et nous solubilisons le culot qui contient les LDL dans 200 μl de solution de solubilisation (voir annexe).

Ces deux méthodes de précipitation des lipoprotéines sont réversibles, sélectives et complètes (BURSTEIN M. et al., 1970).

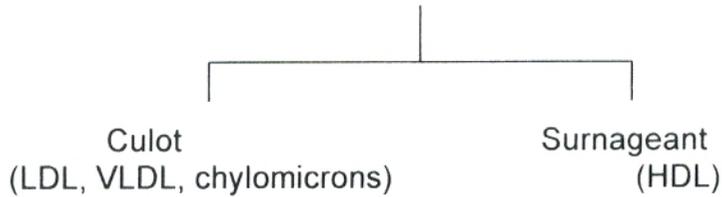
400 μ l de sérum frais + 40 μ l de réactif dextran-sulfate
Agitation



Incubation à température ambiante pendant 10 min



Centrifugation à 4000 tour/min pendant 20 min



Séparation des HDL par la méthode du dextran-sulfate
(BURSTEIN M. et al., 1984)

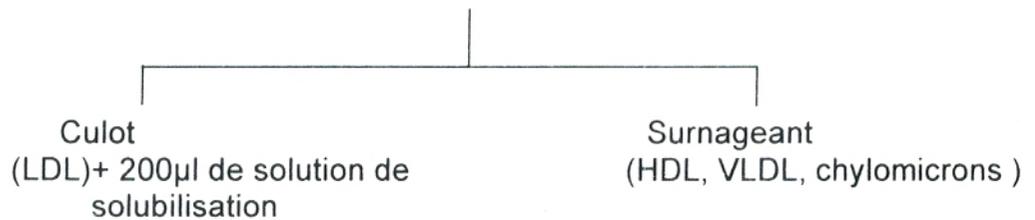
200 μ l de sérum frais + 2 ml de réactif de précipitation LDL
Agitation



Incubation à température ambiante pendant 15 min



Centrifugation à 4000 tours/min pendant 20 min



Séparation des LDL par la méthode Citrate – héparine
(BURSTEIN M. et al., 1970)

Figure 8 : Méthode de séparation des lipoprotéines HDL et LDL

2-3-3-: Contrôle de la pureté des lipoprotéines séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose :

- Les lipoprotéines migrent suivant leur charge électrique et leur poids moléculaire. Ainsi les HDL migrent le plus loin, les chylomicrons restent au point de dépôt, et la séparation des LDL des VLDL est nette.

- Réactifs :

- Plaques d'acétate de cellulose (titan 3 lipo).
- Solution tampon pH 8.6 (H.R Buffer).
- Solution rouge O.R.O à 14% (14 g dans 100ml de méthanol).
- Glycérine pure à 80% + méthanol à 20%.
- Soude 1 N.

- Procédé :

- Tremper la plaque dans la solution tampon 30 min au minimum.
- Sécher la plaque et déposer 2 à 3 μ l de sérum.
- Faire migrer à 180 volt pendant 15 à 20 min.
- 5 min avant la fin de la migration, mélanger dans un bac 35 ml de rouge O.R.O et 10 ml de soude 1 N.
- A la fin de la migration, plonger la plaque dans le mélange rouge O.R.O–NaOH, pendant 30 min au minimum jusqu'à l'apparition d'une coloration.
- Retirer la plaque et à l'aide d'un mince filet d'eau, la nettoyer du précipité .
- Plonger la plaque pendant 10 min dans le mélange glycérine – méthanol.
- La sécher et pulvériser la bombe lipo-spray pour la fixer.
- Laisser sécher et lire au densitomètre à une longueur d'onde de 525 nm.

2-3-4- Dénaturation des lipoprotéines :

La dénaturation des lipoprotéines HDL ou LDL se fait dans un bain-Marie à 70°C pendant 15 à 20 min.

2-4 : Combinaison des lipoprotéines à l'antifongique (amphotéricine B ou fungizone[®]) :

Les lipoprotéines (HDL ou LDL) sont ajoutées au ¼ de leur concentration sérique à la solution mère de l'antifongique. Nous incubons à 37 °C pendant 15 min (RIDENTE Y. et al., 1999), ensuite nous réalisons des dilutions avec du P.B.S pour atteindre la concentration finale voulue. Ces opérations sont réalisées stérilement.

2-5-: Traitement des souris par l'antifongique :

Une fois la solution à injecter préparée, nous la stérilisons par les filtres millipores 0.22µm stériles (MILLEX- GS 0.22µm Filter unit), l'injection d'un volume variant entre 0,3 et 0,5 ml, se fait par voie intraveineuse (au niveau de la veine caudale de la souris), en une seule fois, sur 20 à 30 secondes (PETIT C. et al., 1999).

2-6- Infection des souris par *Candida albicans* :

Après une revivification de la souche, préculture et culture, dans le bouillon Sabouraud à 37°C pendant 8h à 10h, nous dénombrons d'une part, les *Candida* sur cellule de Thoma et d'autre part, nous centrifugeons pour éliminer le surnageant, nous lavons les cellules 2 fois par la solution de lavage (voir annexe), glacée, afin d'éviter les fuites d'ions. Nous centrifugeons à chaque fois, nous éliminons la solution de lavage, et nous suspendons les cellules dans du P.B.S stérile (SOUZA L. C. et al., 1993)

A partir de cette solution mère de *Candida albicans*, nous effectuons une deuxième numération et nous diluons dans du P.B.S stérile afin d'atteindre une concentration finale de 6.10^5 cellules de *Candida*/ ml.

Souche de *Candida albicans* (ATCC 9036)

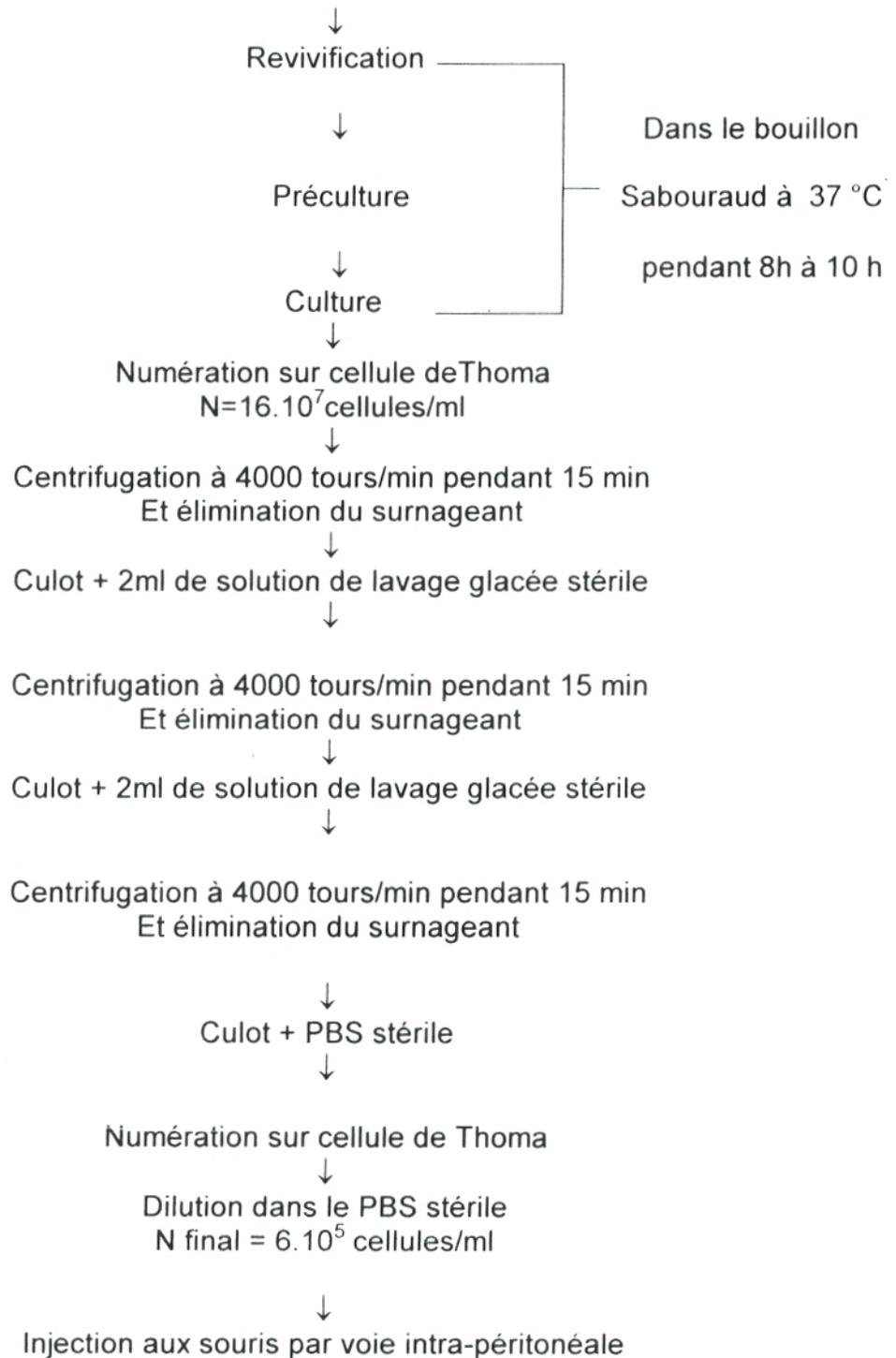


Figure 9: Les différentes étapes de préparation des cellules de *Candida albicans* Pour l'infection des souris.
(JOLY V. et al., 1992 ; SOUZA L.C. et al., 1993)

L'infection des souris se fait par injection de 0.3 ml de *Candida albicans* à 6.10^5 cellules/ml (PETIT C. et al., 1998), par voie intra- péritonéale (figure 9).

Par ailleurs, nous ensemençons par étalement la solution de *Candida* à 6.10^5 cellules/ml, sur gélose Sabouraud – chloramphénicol pour contrôler le nombre de cellules viables, exprimé en Unité Formant Colonie (UFC) (PETIT C. et al., 1998).

2-7- Traitement des souris après infection :

Le traitement se fait après 16h de l'infection, il se fait par injection, unique ou répétitive soit toutes les 24h, toutes les 48h ou 1 fois par semaine. Nous utilisons trois formules différentes :

- AmB-DOC à concentration mère 10^{-4} M, préparé dans le sérum physiologique, préchauffé à 70°C, et dilué dans le PBS pour atteindre une concentration finale de 1 mg/kg.

- AmB-DOC à concentration mère 10^{-4} M, préparé dans le sérum physiologique, préchauffé à 70°C, combiné aux HDL natives, et dilué dans le PBS pour une concentration finale de 1 mg/kg.

- AmB-DOC à concentration mère 10^{-4} M ,préparé dans le sérum physiologique, préchauffé à 70°C, combinée aux LDL dénaturées, et dilué dans le PBS pour une concentration finale de 1 mg/kg.

2-8- Prélèvements :

2-8-1- Prélèvements après injection de l'antifongique:

Concernant les traitements par injection unique de l'antifongique, nous effectuons un prélèvement sur les souris dans un premier temps au bout de 8h, 24h, 48h et 1 semaine, à partir de la veine abdominale sur tube sec, nous centrifugeons et nous récupérons le sérum sur tube Eppendorf.

Pour les manipulations qui suivent, nous réduisons le nombre de prélèvements à 2 seulement, le premier au bout de 24h, et le deuxième au bout d'une semaine.

2-8-2- Prélèvements après infestation des souris, et traitement par l'antifongique:

Concernant les traitements par injections répétitives après infection par *Candida*, le prélèvement se fait toutes les 24h ou toutes les 48h ou 1 fois par semaine (selon le lot) à partir de la veine abdominale sur tube sec d'un côté pour récupérer le sérum et évaluer la toxicité, et d'un autre côté sur tube hépariné pour effectuer une numération de *Candida* sur cellule de Thoma d'une part, et une hémoculture sur gélose Sabouraud d'autre part, et ceci pour évaluer le degré d'infection.

2-9- Dosage :

Pour évaluer la toxicité induite par l'antifongique, nous effectuons des dosages de paramètres rénaux et hépatiques, à partir du sérum collecté, au sein du service de biochimie, CHU de Tlemcen.

Le dosage de substrats et enzymes a été effectué sur automate Technicon type RA-1000, le principe est le suivant :

- Pour la créatinine, le dosage se fait par la méthode de Jaffé basée sur la réaction de l'acide picrique avec la créatinine en milieu basique.
- Le dosage de l'urée est basé sur une méthode de cinétique enzymatique. Il s'agit du dosage par ultra violet de l'ammonium après catalyse de l'urée par l'uréase.
- Le dosage des enzymes phosphatases et transaminases est réalisé par une méthode de cinétique enzymatique.
- L'ionogramme du sodium et potassium a été réalisé sur automate type Beckman CX3 par électrodes spécifiques.

2-10- Etude statistique :

Nous avons utilisé le logiciel Epiinfo 6 pour une analyse de variance (ANOVA 1), et le test de student (test « t »). les différences entre les moyennes sont considérées significatives, quand $P < 0.05$.

RESULTS ET DISCUSSION

Bien que l'amphotéricine B soit utilisée depuis de nombreuses années, ses propriétés pharmacocinétiques et son mécanisme d'action ne sont pas totalement connus. Cependant son interaction avec la membrane cellulaire, et notamment les stérols (le Cholestérol chez les eucaryotes et l'ergostérol chez les procaryotes), est certainement une étape fondamentale de son activité comme de sa toxicité.

Cette interaction dépend de plusieurs facteurs ; d'une part, de la forme d'amphotéricine B en solutions aqueuses, celle-ci étant déterminée par un certain nombre de propriétés physico- chimiques telles que la concentration de la solution mère et la concentration finale de l'antifongique, le solvant utilisé, la température... ; d'autre part, de l'affinité de la molécule avec les stérols ; et enfin, de la présence ou non de systèmes vecteurs.

C'est sur la base de ces données que de nouvelles formulations d'amphotéricine B, cherchant à augmenter son index thérapeutique ont été élaborées.

Dans ce travail, il nous a paru intéressant d'étudier d'abord, l'effet de ces nouvelles préparations sur la toxicité rénale et hépatique. Ensuite, nous avons testé, l'efficacité antifongique anti *Candida albicans*.

Dans la première partie du travail, nous avons étudié l'effet de la modulation de certains paramètres physico- chimiques puis l'effet de l'addition des lipoprotéines sériques de haute et de basse densité (HDL et LDL) sur la toxicité de l'amphotéricine B chez des souris Wistar. Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons testé l'efficacité des formulations les moins toxiques chez des souris infectées par *Candida albicans*.

Etant donné la mauvaise valeur prédictive des tests *in vitro* sur l'efficacité *in vivo*, et en tenant compte de la toxicité du produit, son métabolisme et l'état immunitaire de l'hôte, nous avons testé les différentes formulations *in vivo*.

Pour envisager le maximum de conditions expérimentales, notre travail a porté sur environ 2500 souris réparties comme suit :

N = 20 souris pour les témoins.

N = 10 souris pour chaque contrôle.

N = 4 souris / prélèvement / condition expérimentale pour les lots test.

Sur la base de l'ensemble de ces données, nous avons choisi d'évaluer dans un premier temps, l'effet spécifique puis l'effet conjugué de la modulation de certains paramètres physico-chimiques et de la vectorisation de l'amphotéricine B par les lipoprotéines du sérum sanguin sur d'une part, la toxicité de la molécule vis à vis d'un modèle de mammifères, et d'autre part, sur son efficacité antifongique.

Les tests ont été effectués *in vivo* sur des souris Wistar saines ou infectées par *Candida albicans*. Le choix s'est porté sur cette levure en raison de la très grande fréquence de candidoses (83% des levures isolées chez l'homme).

Notre travail a comporté deux volets. Le premier a été celui des tests de toxicité, le second celui de l'efficacité antifongique.

Dans la première partie, l'étude a porté sur la modulation des paramètres physico-chimiques, en l'occurrence, nous avons étudié l'effet de la toxicité,

- De la concentration mère et de la concentration finale d'amphotéricine B.
- Des solutions d'amphotéricine B et d'amphotéricine B-DOC préparées dans différents solvants.
- Du préchauffage de l'amphotéricine B et de l'amphotéricine B-DOC

Dans la deuxième partie, nous avons évalué sur la toxicité, les effets de l'association de l'amphotéricine B aux lipoprotéines de haute densité (HDL) et aux lipoprotéines de basse densité (LDL).

Enfin, dans la troisième partie, nous avons testé l'efficacité antifongique des formulations les moins toxiques chez des souris Wistar infectées par *Candida albicans*.

MATERIEL ET METHODES

Chapitre 1

EFFET DE LA VARIATION DE LA CONCENTRATION DE LA SOLUTION MÈRE D'ANTIFONGIQUE (AMPHOTERICINE B) SUR LA TOXICITE

LEGRAND et al., 1992 ont montré que la concentration de la solution mère d'amphotéricine B joue un rôle primordial dans la détermination des formes solubles et insolubles de l'antifongique. Aux concentrations élevées des solutions mères, l'amphotéricine B se présente sous forme d'agrégats non solubles. GABORIAU et al., 1997, indiquent qu'à des concentrations de solution mère variant entre 10^{-2} M et 10^{-4} M, la proportion des formes monomériques est constante lorsqu'on utilise une concentration finale de $2 \cdot 10^{-6}$ M, alors que la proportion d'agrégats varie selon les conditions expérimentales.

Selon ces mêmes auteurs, la toxicité induite par l'amphotéricine B sur les cellules animales, est inversement proportionnelle à la concentration de la solution mère d'AmB, car à des concentrations de solutions mères élevées (10^{-2} M à 10^{-4} M), l'AmB s'associe pour donner des formes insolubles (agrégats) non toxiques ; tandis que les formes solubles d'antifongique (oligomères) présentes à des concentrations moins élevées ($<10^{-4}$ M), sont toxiques pour les cellules animales. Ceci est lié au fait que les formes oligomériques d'antifongique interagissent avec le cholestérol, au niveau de la membrane des cellules, et induisent la formation de pores membranaires (BRAJTBURG. J, BOLARD. J, 1996).

Dans notre travail, nous avons testé deux concentrations de solutions mères d'AmB pur 10^{-3} M et 10^{-4} M, favorables à la formation des agrégats. Ces solutions stocks ont été préparées dans du DMSO et diluées dans du PBS pour obtenir une dose finale à injecter de 0,1 mg/kg de poids.

Les souris ont été traitées par une injection unique d'antifongique, et suivies pendant une semaine sur le plan du comportement général et des paramètres biologiques. Les prélèvements en vue d'analyses ont été effectués à 8h, 24h, 48h et une semaine, après l'injection.

Dans cette partie expérimentale, 4 lots de souris ont été utilisés :

- Un lot de souris témoin qui n'ont subi aucun traitement.
- Un lot contrôle : Les souris sont traitées par le DMSO seul dilué dans le PBS à une quantité correspondant à l'utilisation de la solution mère d'AmB à 10^{-3} M et 10^{-4} M.
- Un premier lot test : Les souris sont traitées par l'AmB provenant d'une solution mère de 10^{-3} M.
- Un deuxième lot test : Les souris sont traitées par l'AmB provenant d'une solution mère de 10^{-4} M.

Les souris traitées par l'AmB provenant de la solution mère à 10^{-3} M, présentent 1heure après l'injection un trouble comportemental se traduisant par des convulsions une asthénie et une agressivité. Une polyurie, et une thrombophlébite de la veine caudale ont été également observées dès 8 heures. Ces troubles persistent jusqu'à la mort des souris.

Les souris traitées par l'AmB provenant de la solution mère à 10^{-4} M, présentent les mêmes troubles comportementaux à 1h jusqu'à 8h après l'injection ; le comportement redevient normal dès la 24^{ème} heure.

Sur le plan biologique les résultats obtenus, et représentés dans la figure 1 et 2, montrent que pour la concentration de la solution mère 10^{-3} M, les paramètres rénaux et les enzymes hépatiques augmentent significativement à la 8^{ème} heure de +40 à +70% par rapport au témoin, sauf la phosphatase alcaline qui reste inchangée (figure 2 courbe c). A 24h, le taux de la créatinine (figure 1 courbe b), et les activités de la TGO (figure 2 courbe a) et de la TGP (figure 2 courbe b), diminuent de 40 à 60% par rapport aux paramètres dosés à 8h. Tous les autres paramètres (urée, Na^+ , K^+ , phosphatase alcaline) restent élevés.

Par ailleurs, le DMSO seul (quelle que soit sa concentration 10^{-3}M ou 10^{-4}M) entraîne une toxicité considérable qui se traduit par une élévation sérique allant de +30 à +55% de la créatininémie, de la natrémie, de la kaliémie, de la phosphatase alcaline et de la TGP.

Comme cela est discuté par BOLARD et al., 1997, l'hypercréatininémie, l'hypernatrémie, l'hyperurémie et l'hypertransaminasémie observées lorsqu'on utilise une solution mère d'AmB à 10^{-3}M , peuvent être dus au moins une partie à une diminution de la filtration glomérulaire et une atteinte tubulaire.

D'autre part l'hyperkaliémie provient d'une hémolyse constatée. La toxicité hépatique se traduit par une élévation du taux des transaminases. LA mort des souris survient à 48 h.

Les préparations de l'AmB issues d'une solution mère à 10^{-4}M d'antifongique, induisent une toxicité relativement modérée, avec cependant une augmentation des taux sériques de la créatinine, du Na^+ , du K^+ , et des transaminases à 8h. Cette élévation varie de 10 à 55%.

Ces paramètres se normalisent au bout d'une semaine. Aucune mort n'a été notée.

Ces résultats sont à l'inverse de ceux de LEGRAND et al., 1992, qui montrent *in vitro* que, la concentration de la solution mère 10^{-4}M d'AmB est plus toxique vis à vis des cellules animales que la concentration de la solution mère 10^{-3}M . Cependant, il faut noter que cette équipe a travaillé à une concentration finale d'antifongique de $2\mu\text{moles/l}$ alors que nous avons utilisé une dose finale de $0,1\text{mg/kg}$ de poids correspondant à une concentration sérique de l'ordre de $0,5\mu\text{m/l}$.

Aux deux concentrations de solutions mères (10^{-3}M et 10^{-4}M) utilisées, l'AmB est sous forme d'agrégats (95% d'agrégats non solubles pour des solutions mères concentrées $>10^{-5}\text{M}$) (GABORIAU F. et al., 1997). La dilution de ces solutions mères à une faible dose finale ($0,5\mu\text{mole/l}$), entraîne une dissociation des agrégats non solubles, en monomères et oligomères qui sont toxiques pour les cellules hôtes.

Nous pouvons suggérer que cette discordance soit liée d'une part à la différence des conditions expérimentales, et d'autre part au fait que l'AmB ne se comporte pas de la même manière *in vitro* et *in vivo* par suite de la fixation de la molécule aux lipoprotéines sériques. De plus, la pharmacocinétique étant mal connue, nous pouvons seulement supposer qu'*in vivo* l'AmB est instable, et les agrégats se dissocient en monomères, et oligomères toxiques ; et que l'AmB à 10^{-3} M étant plus riche en agrégats que 10^{-4} M, libère un taux plus élevé de monomères et oligomères, et devient de ce fait toxique.

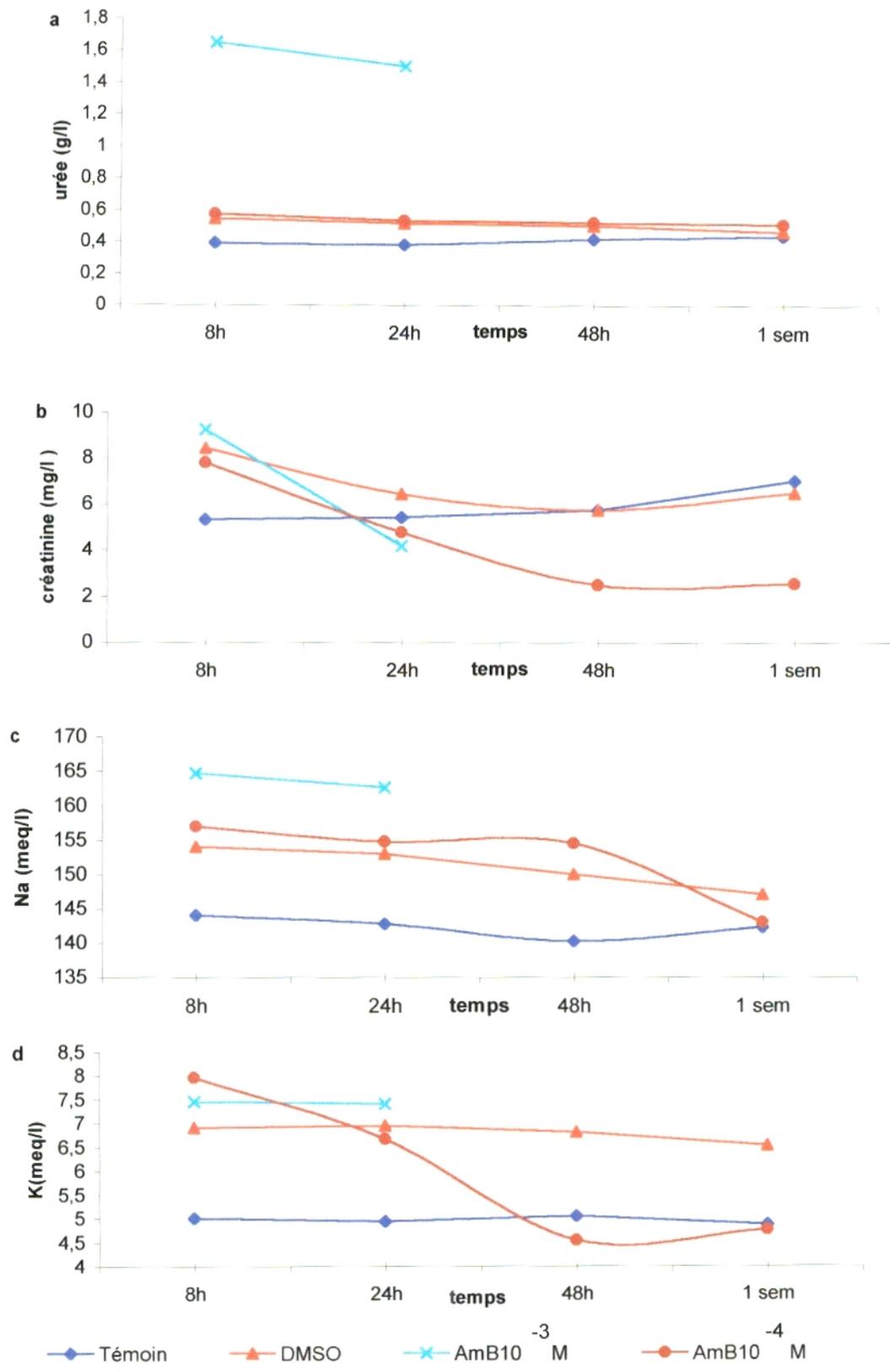


Figure 1: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction de la concentration mère de l'AmB. L'antifongique est préparé dans du DMSO. La dose finale est de 0,1 mg/kg de poids

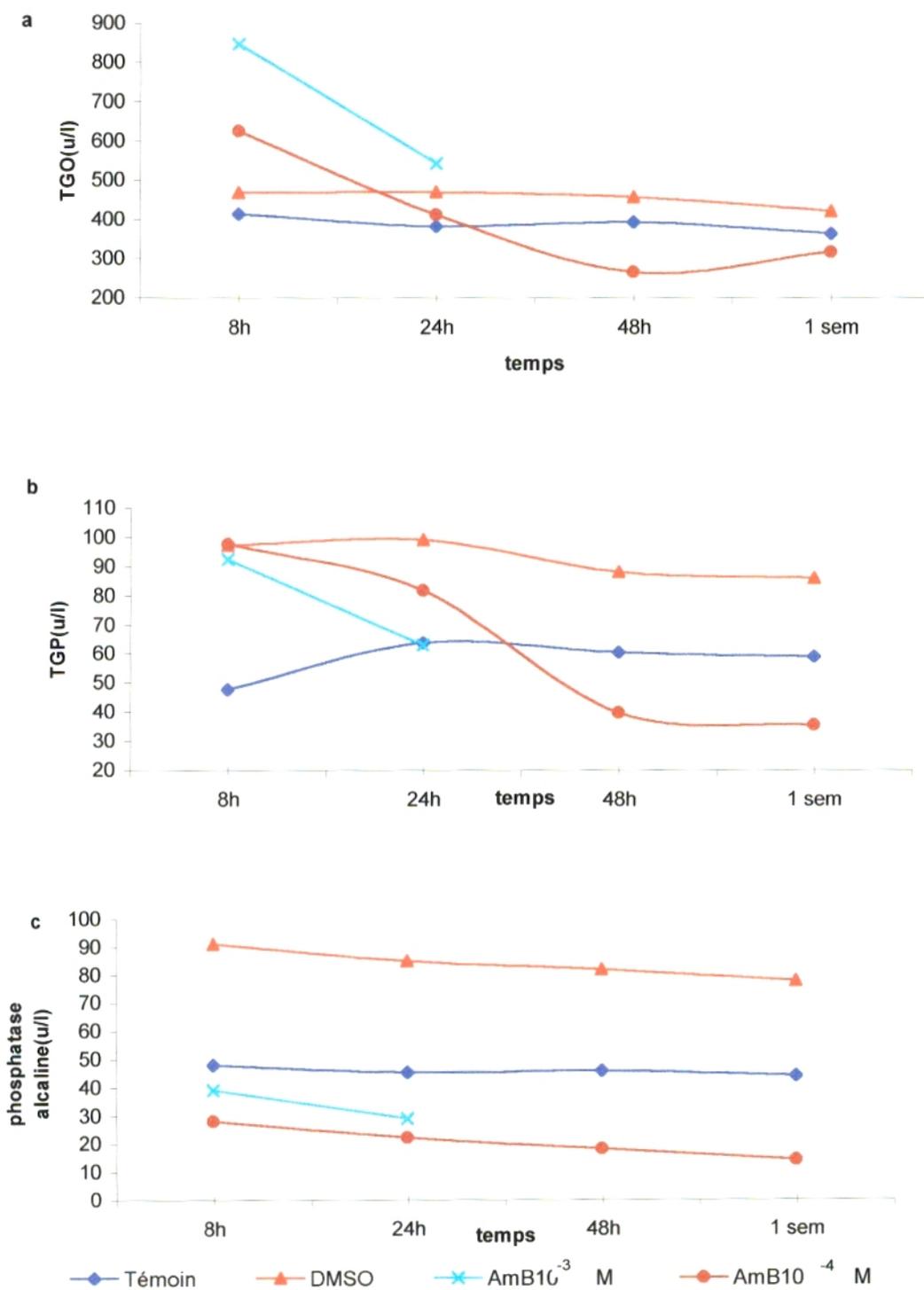


Figure 2: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de la concentration mère de l'AmB
 L'antifongique est préparé dans du DMSO.
 La dose finale est de 0,1 mg/kg de poids

Chapitre 2

EFFET DE LA VARIATION DES DOSES FINALES D'AMPHOTERICINE B SUR LA TOXICITE

Comme la concentration de la solution mère, les proportions des différentes formes d'antifongique en solutions aqueuses dépendent de la concentration finale. Aux concentrations inférieures à 10^{-7} M, l'antifongique sous forme monomérique, ne présente pas de toxicité *in vitro* sur les cellules animales, alors qu'à des concentrations supérieures à 10^{-7} M, il s'associe en oligomères (forme toxique pour les cellules hôtes) et en agrégats (forme non toxique) (HEMENGER R.P., 1983 ; MAZERSKI J., 1982 ; 1990).

A partir d'une solution stock de 10^{-4} M d'AmB pur, préparé dans du DMSO, différentes dilutions sont effectuées dans du PBS. Les doses finales injectées, varient de 0,1mg/kg de poids de la souris à 3mg/kg de poids. Les doses ont été augmentées d'abord par paliers de 0,1mg/kg ensuite par paliers de 0,5mg/kg, ces doses correspondent par rapport au volume de distribution à une concentration molaire de l'ordre de 0,5 μ mole/l pour la dose finale de 0,1mg/kg.

11 lots de souris répartis comme suit ont été testés :

Un lot témoin sans aucun traitement.

Un lot contrôle : Souris traitées par le DMSO seul à une quantité correspondant à la solution mère 10^{-4} M dilué dans le PBS.

Neuf lots test ayant reçus une dose finale allant de 0,1 à 3 mg/kg (0,1- 0,2- 0,3- 0,5- 1- 1,5- 2- 2,5 et 3 mg/kg) de l'AmB 10^{-4} M, préparé dans du DMSO, et dilué dans du PBS.

Les résultats sont représentés dans les figures 3 et 4.

❖ A des doses finales variant de 0,1 à 1 mg/kg, les souris ont un comportement qui semble normal. A l'exception de la créatinine et la TGO, les paramètres biologiques sont modérément perturbés et ne diffèrent pas significativement de ceux des souris témoins. La créatinine et la TGO sont en revanche, augmentées respectivement de +50 à +75% selon la dose administrée (figure 3 courbe b), et de +75% (figure 4 courbe a).

❖ Les souris traitées par l'AmB à 1,5 mg/kg présentent un trouble comportemental à savoir ; des frissons, une asthénie, une agressivité. Une thrombophlébite de la veine caudale est notée au bout de 8 heures. Les paramètres biologiques se détachent des premiers indiquant une toxicité rénale et hépatique élevée dès la 8^{ème} heure, et qui persiste jusqu'à une semaine après l'injection.

8 heures après l'injection, les taux sériques de l'urée (figure 3 courbe a), de la TGP (figure 4 courbe b) et de la phosphatase alcaline (figure 4 courbe c), doublent par rapport à ceux déterminés à la dose de 1mg/kg d'AmB, et augmentent respectivement de +85 %, +92 %, et +80 % par rapport au témoin. Cependant, aucune mort n'a été notée.

Pour des doses d'AmB de 2- 2,5 et 3 mg/kg, le sang prélevé à 8h était fortement hémolysé, ce qui nous a empêché de doser les paramètres sériques. Nous avons noté par ailleurs, la mort de 37,5 % de souris à 8h et 100 % à 24h.

Les doses finales circulantes étant supérieures à 10^{-7} M, on peut supposer que l'antifongique est sous forme d'agrégats, et d'oligomères toxiques pour les cellules hôtes. CANIAUX et al., CARBON et al., indiquent que les concentrations sériques de l'AmB sont proportionnelles à la dose administrée par injection intraveineuse jusqu'à atteindre une dose maximale de 2,5 mg/kg qui ne suit plus l'augmentation de la dose injectée lorsque celle-ci dépasse 1mg/kg de poids.

Aux doses supérieures à 1mg/kg de poids, on peut supposer que c'est probablement le remplissage du compartiment interstitiel et du compartiment cellulaire (notamment les monocytes et les macrophages) qui sont connus pour accumuler l'AmB constituant ainsi un réservoir de la forme monomérique (MARTIN et al., 1994), ce qui pourrait expliquer l'importante toxicité de ces dernières conditions expérimentales.

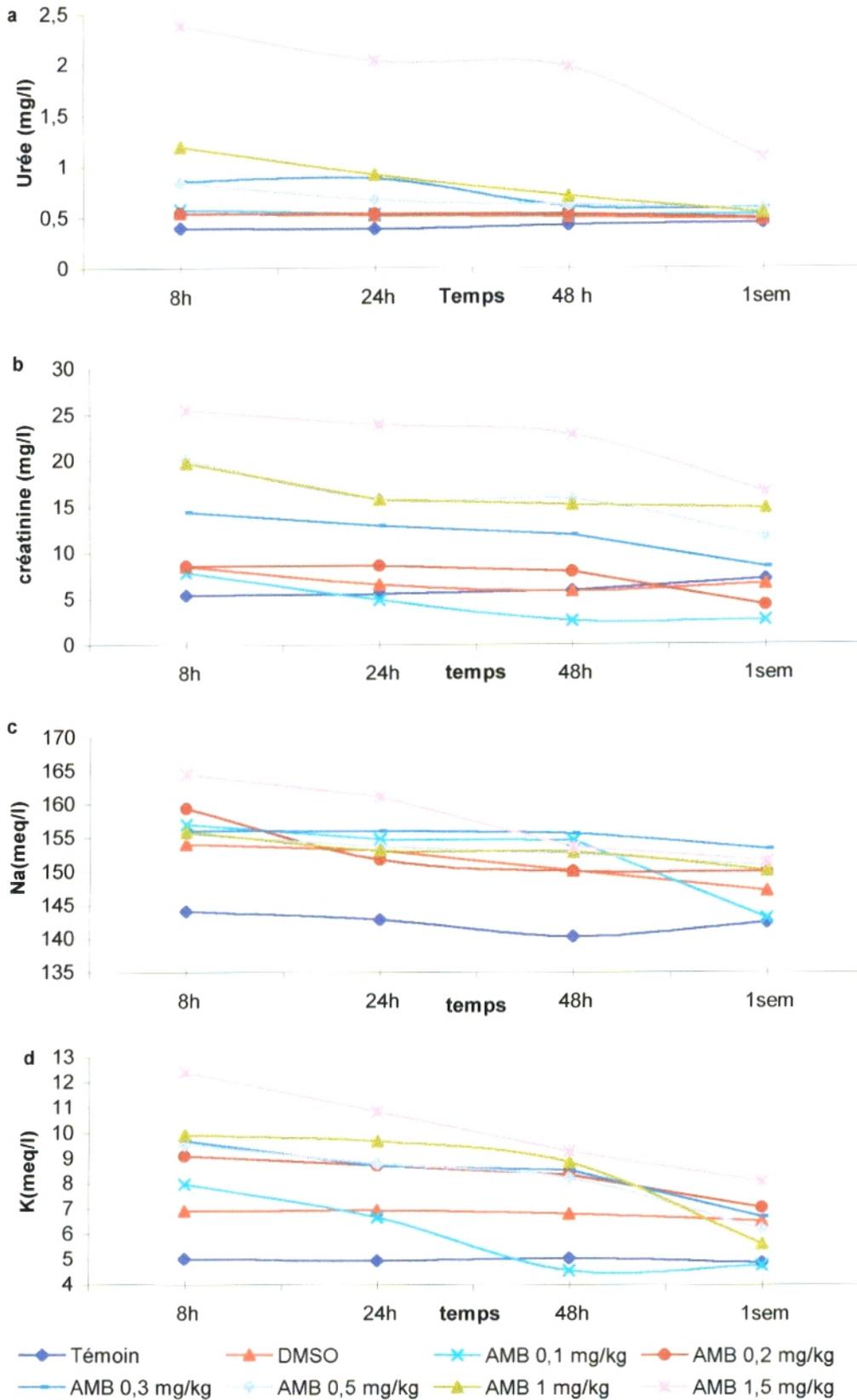


Figure 3: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction de la dose finale d'AmB .
 La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M

10

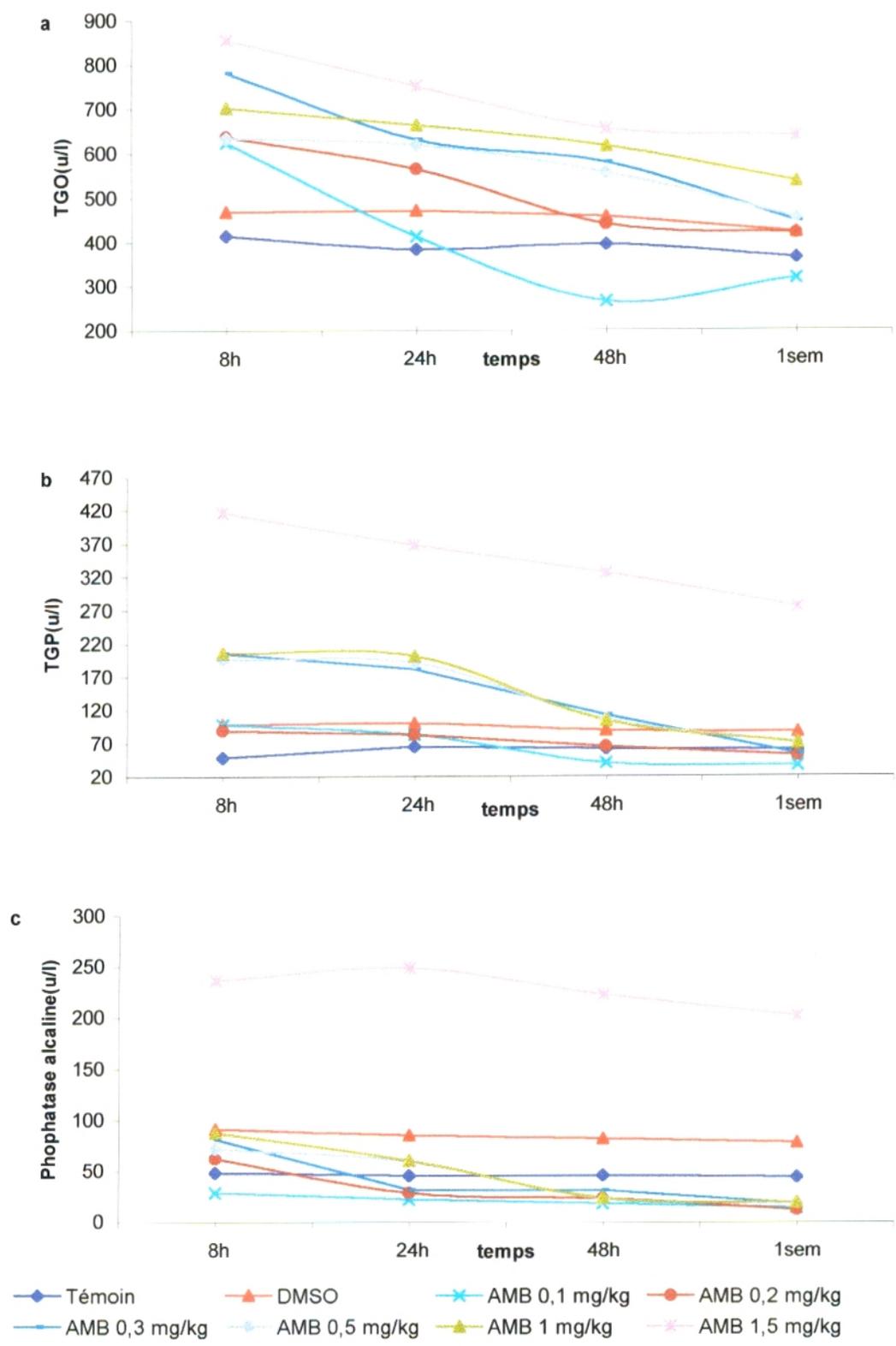


Figure 4: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de la dose finale d'AmB .

La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M

Chapitre 3

EFFET DU SOLVANT UTILISE POUR LA PREPARATION DE LA SOLUTION D'ANTIFONGIQUE (AMB ET AMB-DOC) SUR LA TOXICITE

L'importance de la solubilité, et de la configuration spatiale d'AmB avant sa fixation aux membranes, dans la détermination de sa toxicité cellulaire est souvent soulignée (Lamy- Freund M.I. et al., 1989).

La nature du solvant est l'un des facteurs déterminant de cette toxicité, en modifiant l'équilibre entre les différentes formes présentes en milieu aqueux. Comme nous l'avons vu antérieurement, l'AmB est soluble dans certains solvants organiques (DMSO, DMF), et peu soluble dans les solvants hydrophiles comme les alcools d'où la formation de micelles qui sont aussi des formes toxiques pour les cellules hôtes de mammifères (Harnois I., et al., 1988).

Sur la base de ces données, et de leurs toxicités propres, nous avons choisi les solvants suivants : le DMSO, un solvant hydrophile : l'éthanol, et le sérum physiologique pour préparer des solutions mères à 10^{-4} M.

Dans un premier temps, nous avons effectué des tests préliminaires en vue de déterminer la concentration la moins toxique de la solution hydroalcoolique. Pour cela nous avons testé 5 dilutions de l'éthanol pur dans de l'eau (éthanol dilué à 20 % - 30 % - 40 % - 55 % - 70 %) utilisées comme solvant de l'AmB ou de l'AmB-DOC pour préparer des solutions mères à 10^{-4} M. La dose finale de 1 mg/kg est obtenue par dilution dans du PBS. Ces solutions sont administrées en injection unique.

Les résultats sont rapportés, sur les figures 5 et 6 pour l'AmB, et les figures 7 et 8 pour l'AmB-DOC.

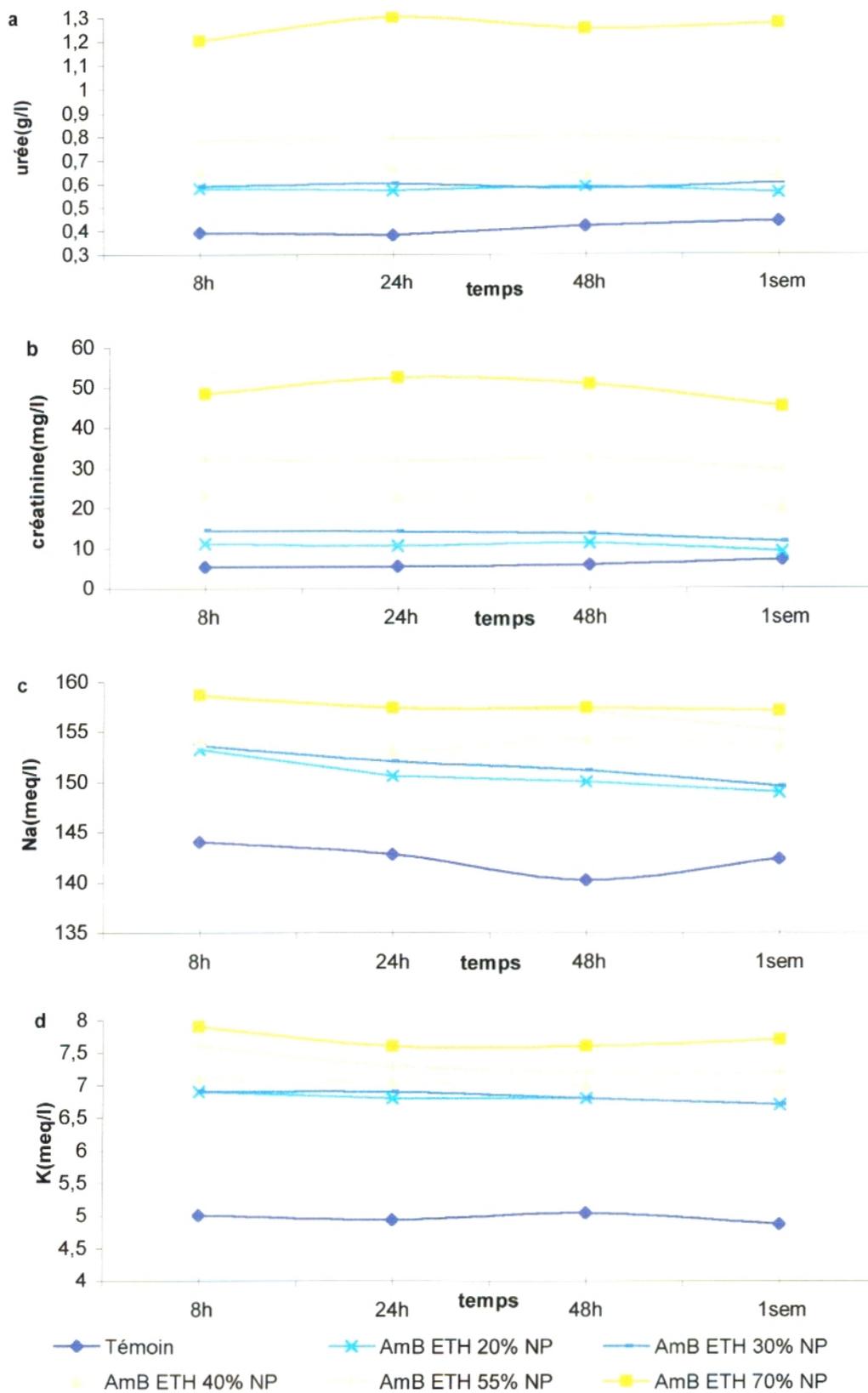


Figure 5: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction de l'AmB seul préparé dans l'éthanol à différentes concentrations. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1mg/kg de poids.

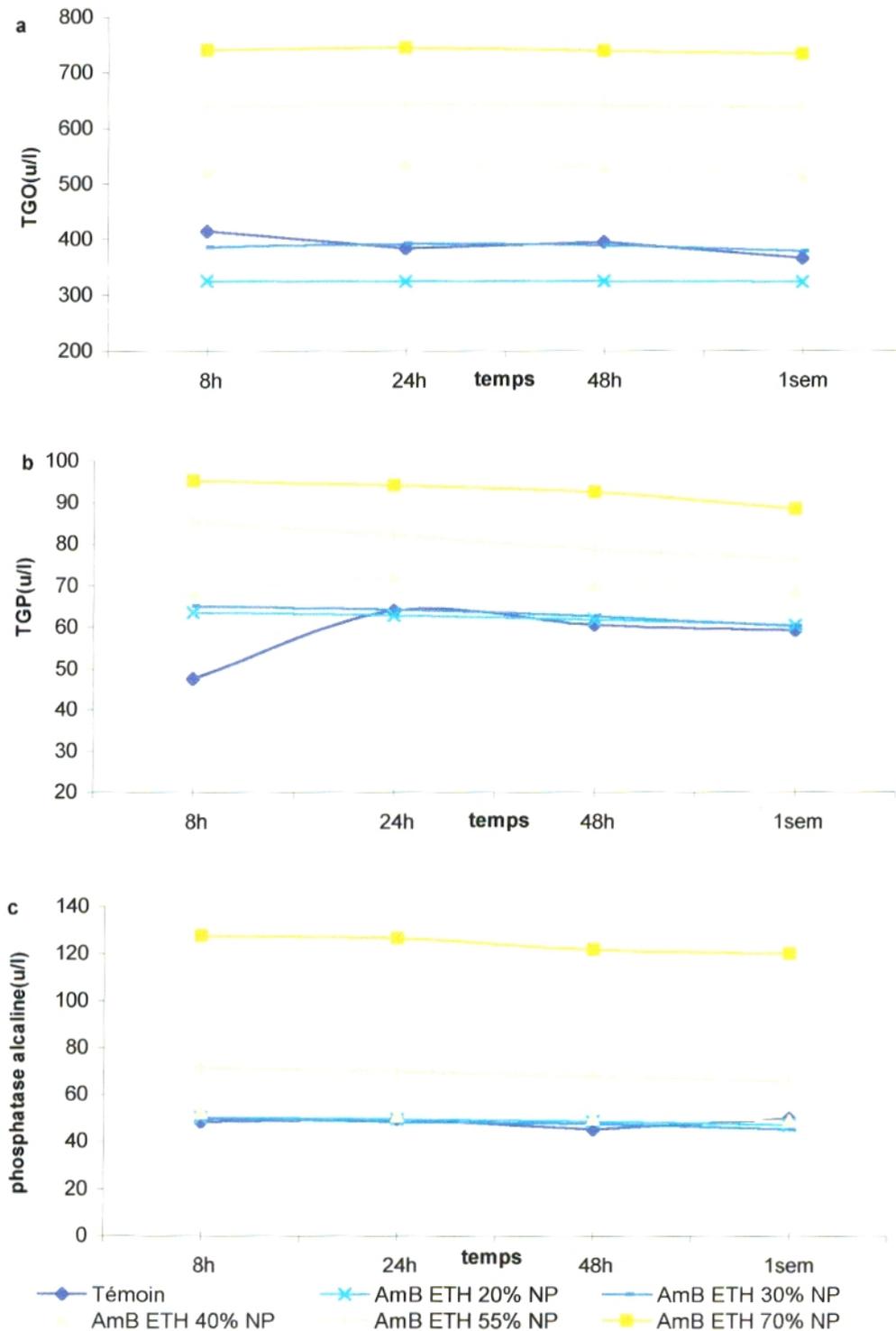


Figure 6: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de l'AmB seul préparé dans l'éthanol à différentes concentrations. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1mg/kg de poids.

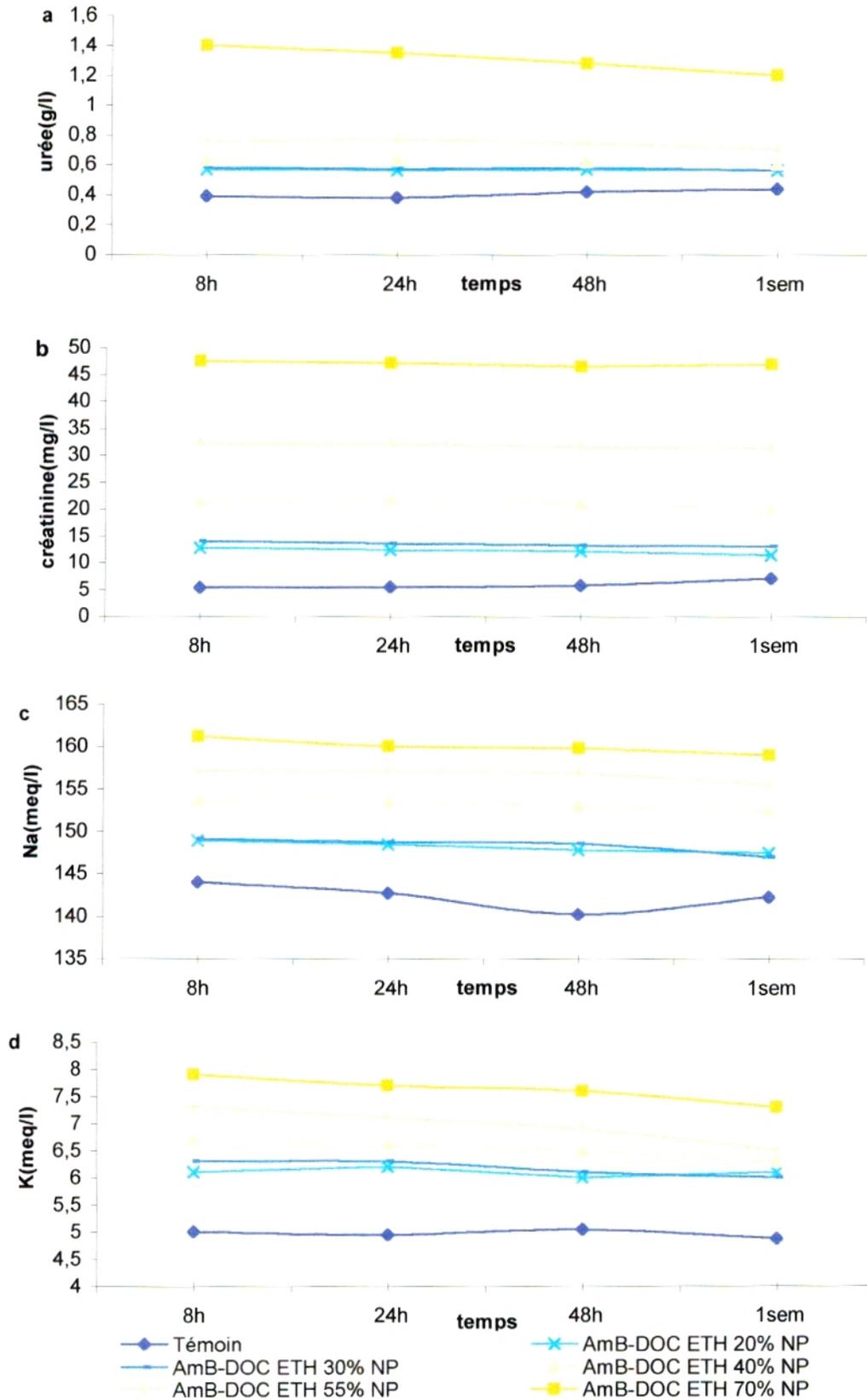


Figure 7: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction de l'AmB-DOC préparé dans l'éthanol à différentes concentrations. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1mg/kg de poids.

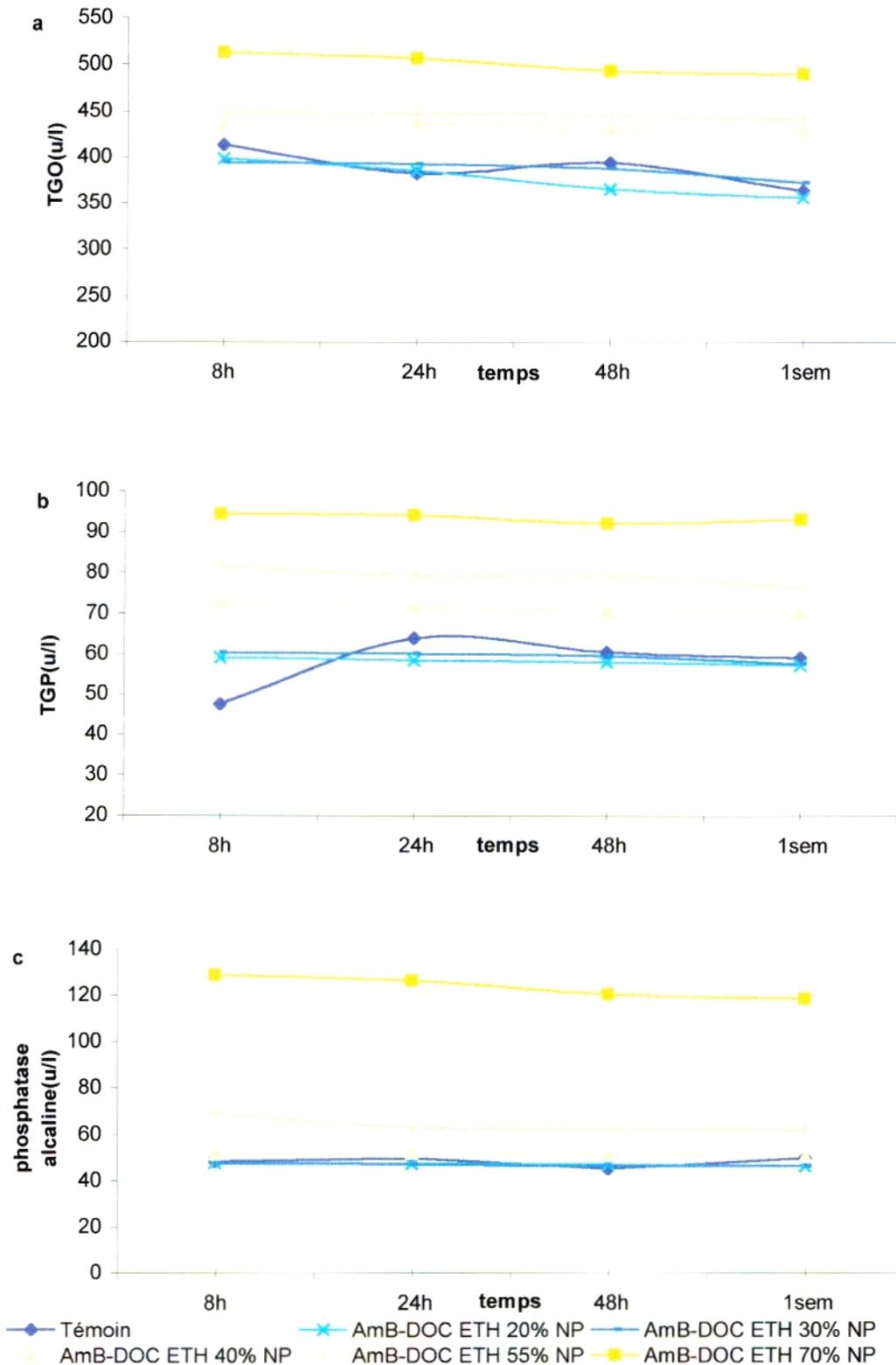


Figure 8: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de l'AmB-DOC préparé dans l'éthanol à différentes concentrations.

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

La dose finale est de 1mg/kg de poids.

Nous remarquons que le traitement par l'AmB seul préparé dans l'éthanol à 20% et 30 % induit une augmentation des paramètres rénaux de +30 à +50% par rapport au témoin (figure 5), à l'exception du Na^+ (figure 5 courbe c) dont la différence n'est pas significative. Les paramètres hépatiques ne diffèrent pas significativement de ceux des souris témoins (figure 6).

Avec la solution hydroalcoolique à 40 %, la toxicité augmente significativement à 8h, se traduisant par une hyperurémie (figure 5 courbe a) (+10 % par rapport au témoin), une hypercréatininémie (figure 5 courbe b) (+75 % par rapport au témoin), une hyperkaliémie (figure 5 courbe d) (+30% par rapport au témoin), la natrémie (figure 5 courbe c) ne diffère pas significativement. L'hypertransaminasémie (figure 6 courbe a et 6 courbe b) varie de +20 % par rapport au témoin pour la TGO, et de +30% par rapport au témoin pour la TGP, la phosphatase alcaline n'augmente pas. Ces paramètres se normalisent à 1 semaine.

Avec les préparations d'AmB dans les mélanges hydroalcooliques à 55 % et 70 %, nous observons une augmentation significative de tous les paramètres sanguins dès 8h et qui se maintient sur toute la durée d'une semaine. L'urée, la créatinine, le potassium et la TGP augmentent de +40 à +90%, alors que le sodium s'élève de +10%, la TGO et la phosphatase alcaline, de +35% à +45%. Les prélèvements effectués à une semaine sont fortement hémolysés.

Le traitement par la fungizone[®] ou AmB-désoxycholate (AmB-DOC) à différentes concentrations hydroalcooliques induit les mêmes types de variations des paramètres rénaux et hépatiques que le traitement par l'AmB seul (figures 7 et 8). Cependant, la toxicité est légèrement plus faible pour la plupart des paramètres. Cette diminution varie approximativement de 2 à 18,3% par rapport au traitement par l'AmB pur.

Les travaux de RINNERT et al., 1977, confirmés par ceux de HEMENGER et al., 1983, indiquent qu'à des concentrations mères élevées (10^{-4}M et 10^{-3}M), préparées dans des solutions hydroalcooliques inférieures à 35%, l'AmB et l'AmB-DOC se présentent sous forme d'agrégats dont la masse molaire reste constante. A des concentrations supérieures à 35%, la masse des agrégats diminue et devient indécélable à 50%.

Sur la base de ces données, il peut être suggéré qu'à des concentrations de solution hydroalcoolique supérieures à 35%, les agrégats se dissocient en donnant des formes solubles notamment des oligomères toxiques pour les cellules hôtes.

Dans tout le reste de notre travail, nous avons utilisé la concentration hydroalcoolique à 30%.

Pour les tests aux différents solvants, 10 lots de souris ont été traités, en injection IV unique, par l'AmB ou l'AmB-DOC, issus de solutions mères de 10^{-3} M, préparées dans différents solvants, et diluées dans le PBS à une concentration finale de 1 mg/kg ; 2 lots contrôle et 1 lot témoin :

1 lot de souris : témoins qui n'ont subi aucun traitement,

1 lot contrôle : souris traitées par le sérum physiologique dilué dans le PBS.

1 lot contrôle : souris traitées par le DMSO dilué dans le PBS.

1 lot contrôle : souris traitées par l'éthanol à 30% dilué dans le PBS.

Dans ces trois lots contrôles, les quantités injectées sont équivalentes à celle d'une solution d'AmB ou AmB-DOC à 10^{-3} M.

3 lots tests : souris traitées par l'AmB préparé dans le DMSO, l'éthanol à 30 % ou le sérum physiologique.

3 lots test : souris traitées par AmB-DOC préparé dans le DMSO, l'éthanol à 30 % ou le sérum physiologique.

Les résultats sont rapportés sur les figures 9 et 10 pour l'AmB et les figures 11 et 12 pour l'AmB-DOC.

- L'AmB pur préparé dans du DMSO, induit une forte toxicité. Les paramètres rénaux (figure 9) et hépatiques (figure 10), augmentent de manière importante à 8h (+65 à +80% par rapport au témoin, pour les paramètres rénaux, et de +65 à +70% par rapport au témoin pour les paramètres hépatiques), et restent élevés à 24 h et 48h. Toutes les souris meurent au bout d'une semaine.

Il est à noter que le traitement des souris par le DMSO seul entraîne une élévation significative des paramètres rénaux et hépatiques, à l'exception de l'urée et de la TGO. Cette élévation varie entre +25 et +52% pour la créatinine, le Na^+ , le K^+ et la phosphatase alcaline. Et jusqu'à une semaine aucune mortalité n'est observée du fait du solvant seul.

- Le traitement par l'AmB pur préparé dans l'éthanol à 30 % induit également une toxicité non négligeable (+60 à +70% par rapport au témoin, pour les paramètres rénaux, et de +50 à +70% par rapport au témoin pour les paramètres hépatiques), mais moins élevée que celle qui est provoquée par l'AmB-DMSO. Cette réduction de toxicité varie entre 20 et 35% par rapport au traitement par l'AmB préparé dans le DMSO, pour l'urée et la créatinine, 10 et 20% pour les transaminases et aux alentours de 50% pour la phosphatase alcaline. Au bout d'une semaine on compte 40% de mortalité.

Par ailleurs, l'éthanol seul à 30%, induit lui aussi une élévation touchant essentiellement la phosphatase alcaline (figure 10 courbe c) et qui augmente d'environ +33% par rapport au témoin. Or, il est connu que la phosphatase alcaline est une enzyme membranaire facilement décrochable par l'éthanol, ce qui explique cette élévation dans le sérum. Les autres paramètres n'augmentent pas significativement, et toutes les souris survivent à une semaine.

- Les souris traitées par l'AmB pur préparé dans le sérum physiologique présentent une élévation allant de (+60 à +70% par rapport au témoin, pour les paramètres rénaux, et de +50 à +70% par rapport au témoin pour les paramètres hépatiques). La réduction de la toxicité par rapport au traitement par l'AmB préparé dans du DMSO est considérable, elle varie de 30 à 35% pour l'urée, de 20 à 65% pour la créatinine, de 50% pour la phosphatase alcaline et de 20 à 40% pour les transaminases. La réduction de la toxicité par rapport au traitement par l'AmB préparé dans de l'éthanol n'est pas significative.

Pour les traitements par l'AmB préparé dans l'éthanol et le sérum physiologique, le Na^+ et le K^+ ne diffèrent pas significativement du traitement par l'AmB préparé dans le DMSO. 30% des souris meurent à une semaine. Le sérum physiologique n'induit aucune modification des paramètres rénaux et hépatiques.

- Par ailleurs, le traitement par des préparations d'AmB-DOC dans les trois solvants induit les mêmes types de variations que le traitement par l'AmB seul (figures 11 et 12), mais la toxicité est moindre. Les baisses enregistrées sont d'environ 45% pour l'urée, 40% pour la créatinine, 5% pour le Na^+ , 10% pour le K^+ , et de 10 à 30% pour les paramètres hépatiques, par rapport à l'AmB pur. Les souris survivent à une semaine.

Des résultats obtenus, il ressort que le solvant joue un rôle important dans la détermination de la toxicité de l'AmB, ceci est lié au degré de solubilisation de l'antifongique. En partant du fait que la concentration mère 10^{-3} M d'AmB est toxique pour les souris (chapitre 1), nous pouvons supposer que les trois solvants étudiés agissent comme suit :

A des concentrations de solutions mères élevées (10^{-2} M), le DMSO solubilise l'antifongique (AmB ou AmB-DOC) et réduit sa toxicité (BOUANANE S., 2001) ; nous pouvons alors lier la toxicité de cette formulation (AmB ou AmB-DOC préparé dans le DMSO) au solvant qui présente une toxicité d'environ 40% à laquelle s'ajoute environ 35% de toxicité de la solution mère 10^{-3} M. Il semble que la toxicité de cette formulation soit le résultat de deux facteurs toxiques à savoir le solvant et la concentration mère.

L'antifongique se présente dans l'éthanol à 30% sous forme d'agrégats non toxiques pour les cellules animales (RINNERT H. et al., 1977), et le traitement par l'éthanol seul n'induit pas d'augmentation significative des paramètres biologiques sauf pour la phosphatase alcaline. L'élévation de ce paramètre est liée à 35% à l'éthanol et à 25% à l'AmB. L'antifongique préparé dans l'éthanol est moins toxique que celui préparé dans le DMSO par le fait que :

- L'éthanol est moins toxique de 5% par rapport au DMSO.
- L'antifongique préparé dans l'éthanol est moins toxique de 10% par rapport à l'antifongique préparé dans du DMSO.

Ceci est probablement dû pour la première formulation à la présence d'agrégats plus stables au sein de l'organisme hôte, tandis que pour l'antifongique préparé dans l'éthanol, et comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, les agrégats sont moins stables dans l'organisme, ce qui libère plus de formes solubles d'AmB, toxiques pour les cellules animales.

Le traitement par l'AmB ou l'AmB-DOC, préparé dans le sérum physiologique est encore moins toxique. Nous observons par ailleurs que le traitement par le sérum physiologique seul, n'entraîne aucune toxicité. Donc la toxicité de l'AmB ou l'AmB-DOC préparée dans le sérum physiologique est liée entièrement à la solution mère 10^{-3} M.

Les avantages de certains solvants utilisés dans la préparation de l'AmB, étudiés *in vitro*, peuvent se perdre *in vivo*. C'est le cas du DMSO qui solubilise l'AmB et donc réduit sa toxicité ; cependant, il entraîne *in vivo* une toxicité considérable pour les cellules animales, ce qui limite son utilisation.

Nous pouvons conclure de cette partie expérimentale que le solvant joue un rôle dans la détermination de la toxicité de l'AmB. Dans un ordre croissant de toxicité, les solvants étudiés sont classés de la manière suivante : Sérum physiologique, éthanol 30%, DMSO.

M

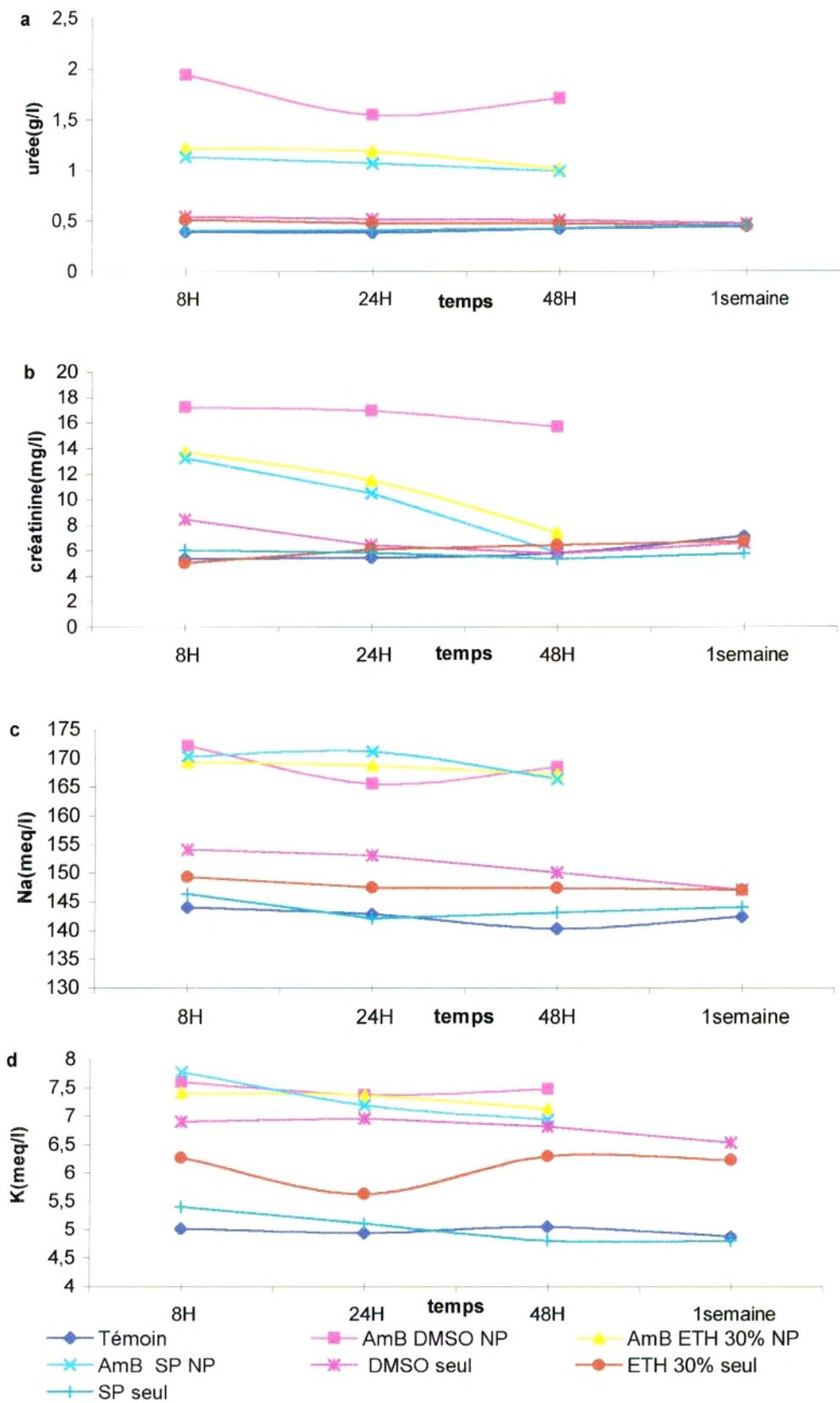


Figure 9: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AMB seul. La concentration de la solution mère est de 10^{-3} M. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

12

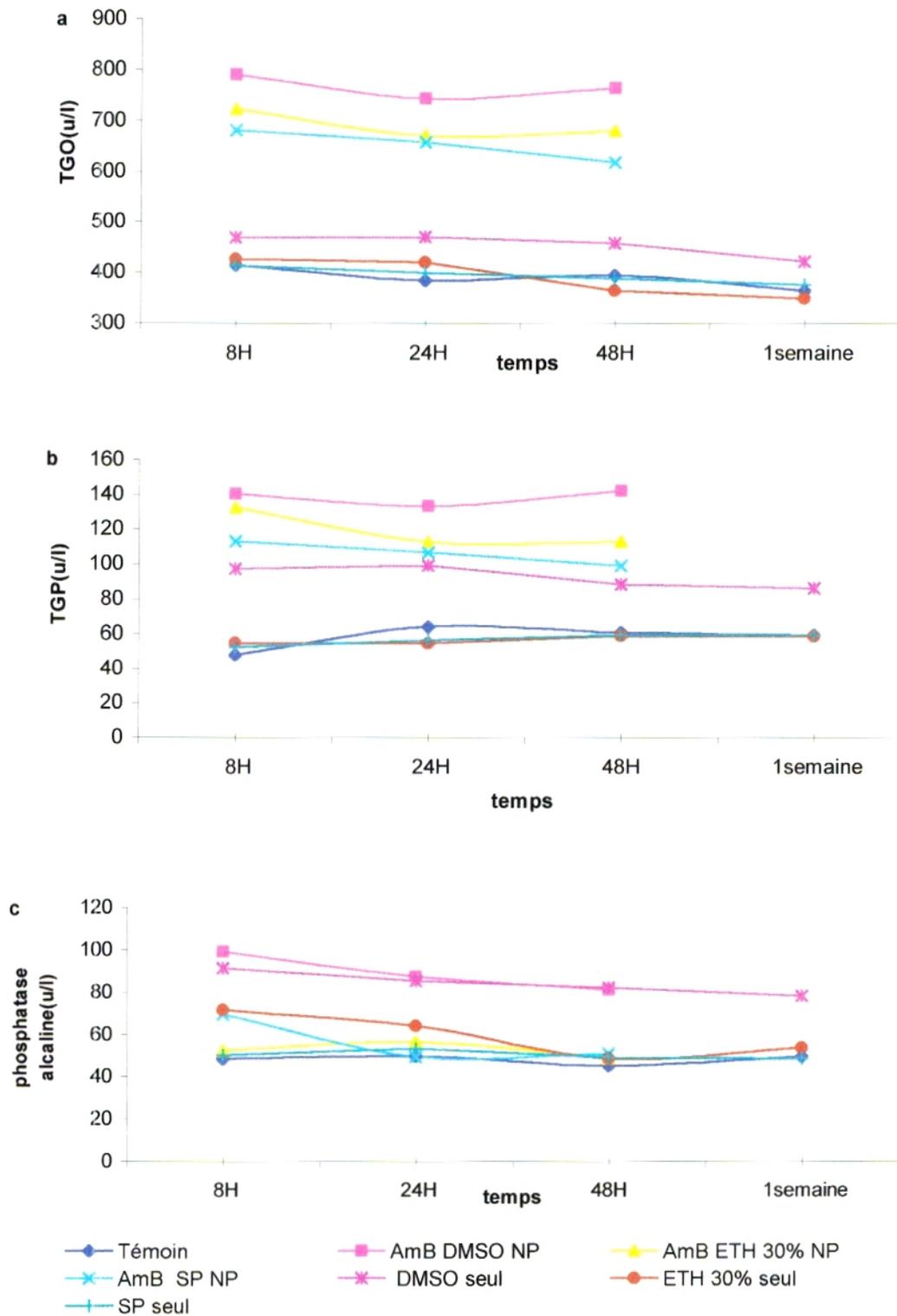


Figure 10: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AMB seul. La concentration de la solution mère est de 10^{-3} M. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

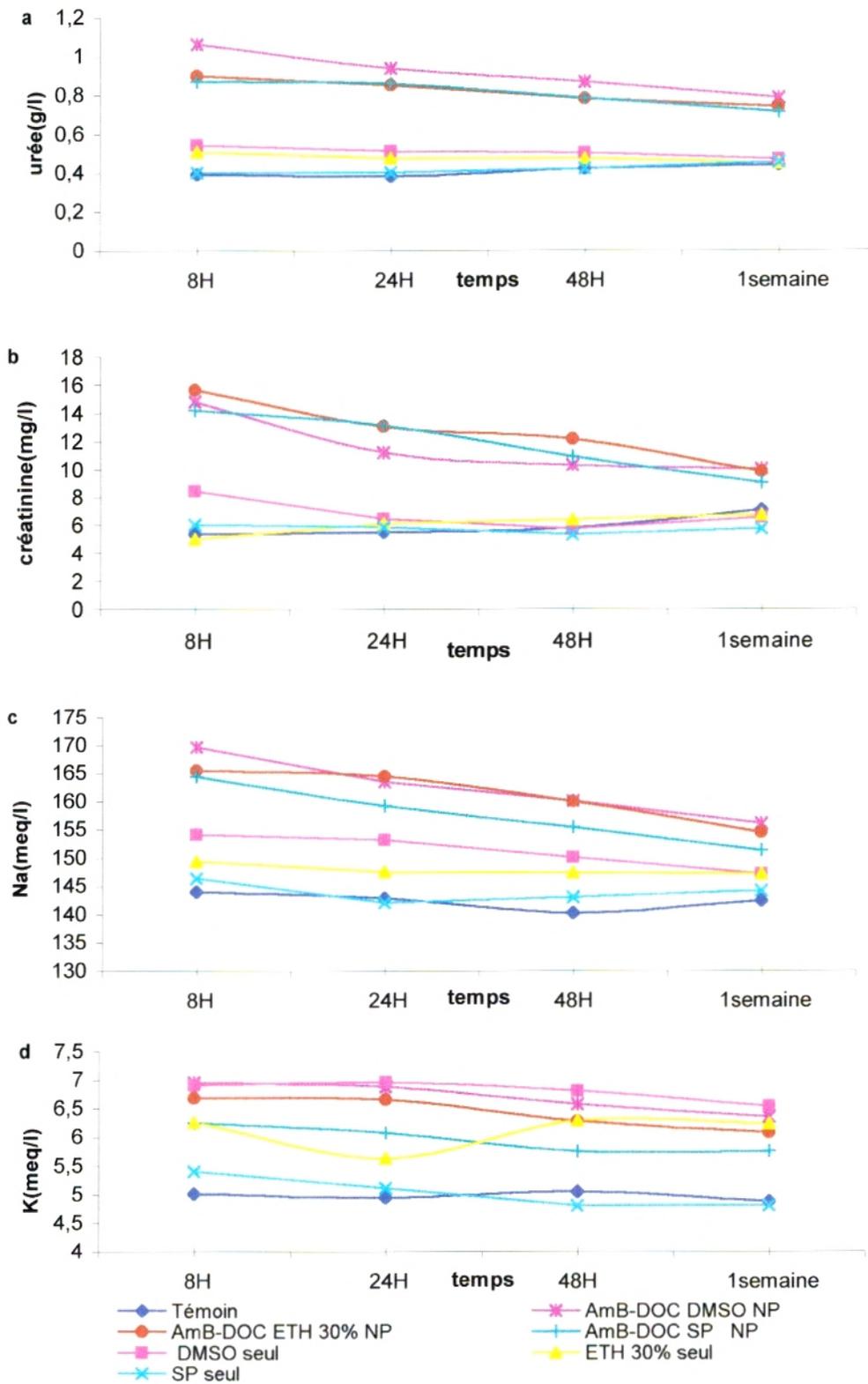


Figure 11: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AMB-DOC. La concentration de la solution mère est de 10^{-3} M. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

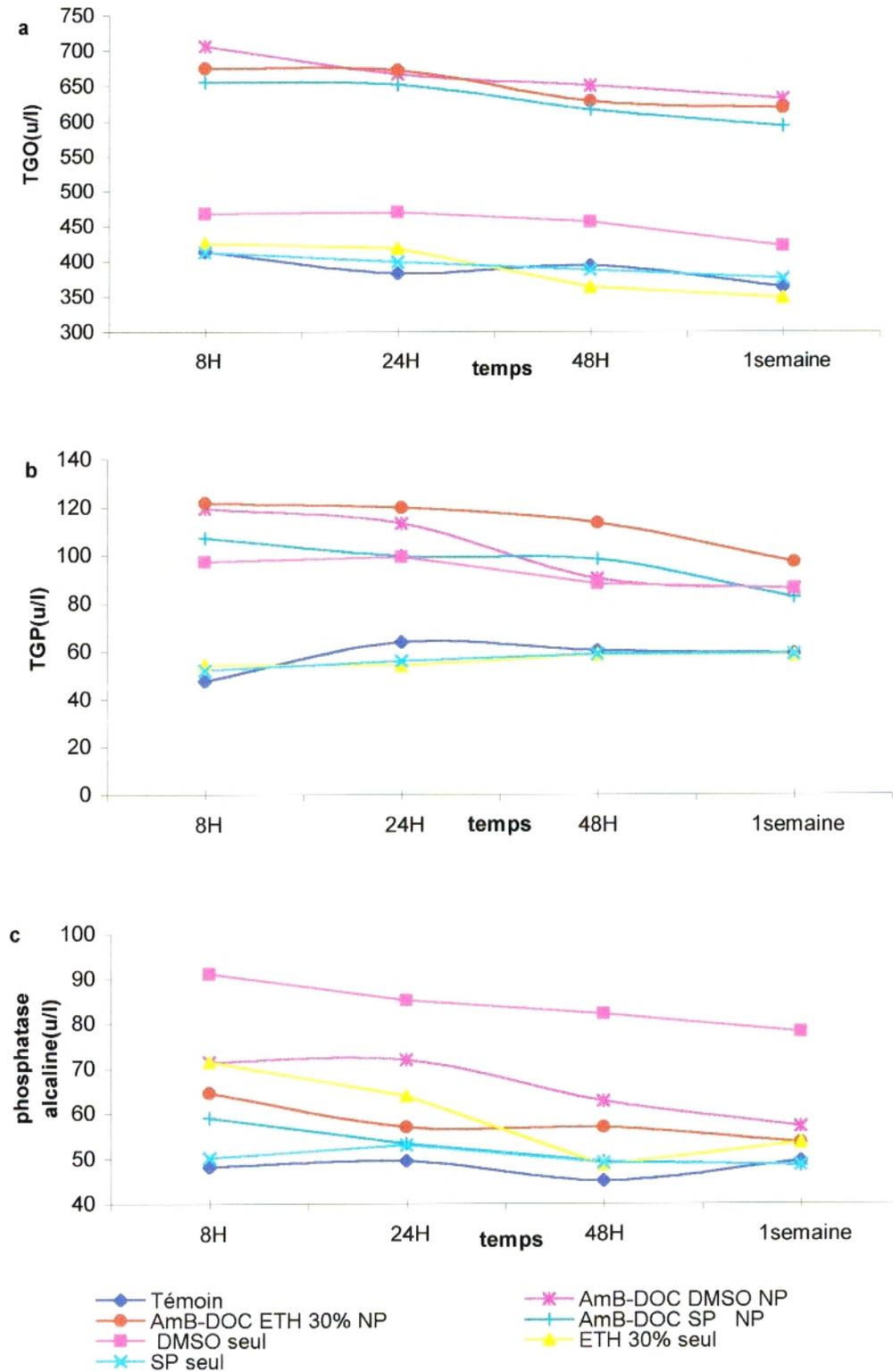


Figure 12: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AMB-DOC. La concentration de la solution mère est de 10^{-3} M. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

Chapitre 4

EFFET DU PRECHAUFFAGE DE LA SOLUTION MERE D'AMPHOTERICINE B À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES SUR LA TOXICITE

GABORIAU F. et al., 1997, ont montré que le préchauffage de l'AmB déplace l'équilibre vers les formes agrégées qui se condensent avec les formes monomériques et entraînent la formation de superagrégats. ERNST et al., 1978, ont testé l'effet du préchauffage de l'AmB en solution aqueuse et en solution hydroalcooliques à 30%, et ont conclu que le traitement par la température, entraîne une augmentation de la taille des agrégats de l'AmB. GABORIAU et al., 1997 ont testé l'effet du préchauffage de la solution mère 10^{-4} M à différentes températures allant de 25°C à 70°C. Selon cette étude le préchauffage de l'antifongique entraîne la formation de superagrégats dont le taux dépend de la température. A concentrations mères élevées (10^{-4} M), le taux de la forme monomérique est négligeable, et une température aux alentours de 50°C entraîne la transition des agrégats en superagrégats ; à 70°C, pratiquement toutes les formes d'agrégats sont converties en superagrégats.

Dans un autre travail GABORIAU et al., 1997, ont testé l'activité *in vitro* de l'AmB-DOC préchauffé à 70°C sur des cellules du cancer du colon humain (type HT 29), et ont observé une réduction de la toxicité de l'antifongique.

PETIT et al., 1998, ont initié des tests d'efficacité en comparant l'effet de l'AmB-DOC préchauffé, et non préchauffé, en traitant des souris infectées par *Candida albicans*, l'AmB-DOC préchauffé à 70°C pendant 20 minutes était deux fois moins toxique pour les souris d'où la possibilité d'augmenter la dose limite tolérée.

Ces résultats ont été complétés en 1999, par la même équipe, en testant la même formulation (AmB-DOC préchauffé) dans le traitement des souris infectées par *Leishmania donovani* contre laquelle l'antifongique semblait efficace tout en étant moins toxique pour les cellules hôtes.

Dans cette partie de notre travail nous avons abordé sur le plan de la toxicité l'effet du traitement par l'AmB seul, préchauffé à différentes températures (55°C, 70°C et 80°C). Les lots étudiés ont été les suivants :

Un lot témoin : Les souris n'ont subi aucun traitement.

Un lot contrôle : Les souris sont traitées par l'AmB provenant de la solution mère 10^{-4} M préparé dans du DMSO, dilué dans du PBS à la dose finale de 1mg/kg de poids.

Trois lots test : Les souris sont traitées par l'AmB provenant de la solution mère 10^{-4} M préparé dans du DMSO, dilué dans du PBS à la dose finale de 1mg/kg de poids, et préchauffé à :

- 55°C
- 70°C
- 80°C

Les figures 13 et 14 résument les résultats obtenus.

❖ Le préchauffage de l'AmB à 55°C ou à 70°C entraîne une diminution de la toxicité qui se traduit par une diminution des paramètres biologiques par rapport à l'AmB non préchauffé, de 5 à 10% pour l'urée et le Na^+ (figure 13 courbes a et c), de 15 à 20% pour la créatinine (figure 13 courbes b), le K^+ (figure 13 courbes d), la TGO la TGP (figure 14 courbes a et d) et de 30% pour la phosphatase alcaline (figure 14 courbes d).

Nos résultats concordent avec ceux de GABORIAU et al., 1997b et PETIT et al., 1998 ;1999. Le préchauffage de l'AmB à 55°C ou à 70°C pendant 20 minutes induit la formation de superagrégats (forme d'antifongique non toxique pour les cellules animales) et réduit la toxicité chez les cellules hôtes.

Dans le cadre limité d'observations nous constatons que l'AmB préchauffé à 70°C est légèrement moins toxique que l'AmB préchauffé à 50°C. Ceci est marqué par l'urée (figure 13 courbe a), la TGO à 48h et 1 semaine (figure 14 courbe a), et pour le sodium à 8h, 24h, 48h, et une semaine (figure 13 courbe c). Les autres paramètres (la créatinine, le K^+ , la TGO et la phosphatase alcaline) ne diffèrent pas significativement. Ceci est lié probablement au fait que la transition d'agrégats en superagrégats commence à 50°C, donc l'antifongique est en partie sous forme de superagrégats et l'autre partie comporte les formes monomériques solubles et

toxiques pour les cellules hôtes. A 70°C cette transition atteint un maximum et les formes antifongiques présentes sont des formes superagrégées (non toxiques pour les cellules hôtes).

❖ A 80°C l'AmB induit une toxicité significativement élevée par rapport au témoin (+30 à +40% pour l'urée, +65% pour la créatinine, de +40 à +50% pour les transaminases et phosphatase alcaline) ; les paramètres rénaux et hépatiques sont également élevés par rapport à l'AmB non préchauffé (d'environ +20% pour l'urée et les transaminases). Ce qui mène à penser, qu'il y a une dissociation des superagrégats en formes agrégées, et en formes solubles toxiques pour les cellules animales.

En conclusion, le préchauffage de l'AmB, à 70°C, semble constituer la condition la plus favorable pour la réduction de la toxicité de l'antifongique vis à vis des cellules animales, ce qui est du probablement à la formation d'un taux maximal de superagrégats.

13

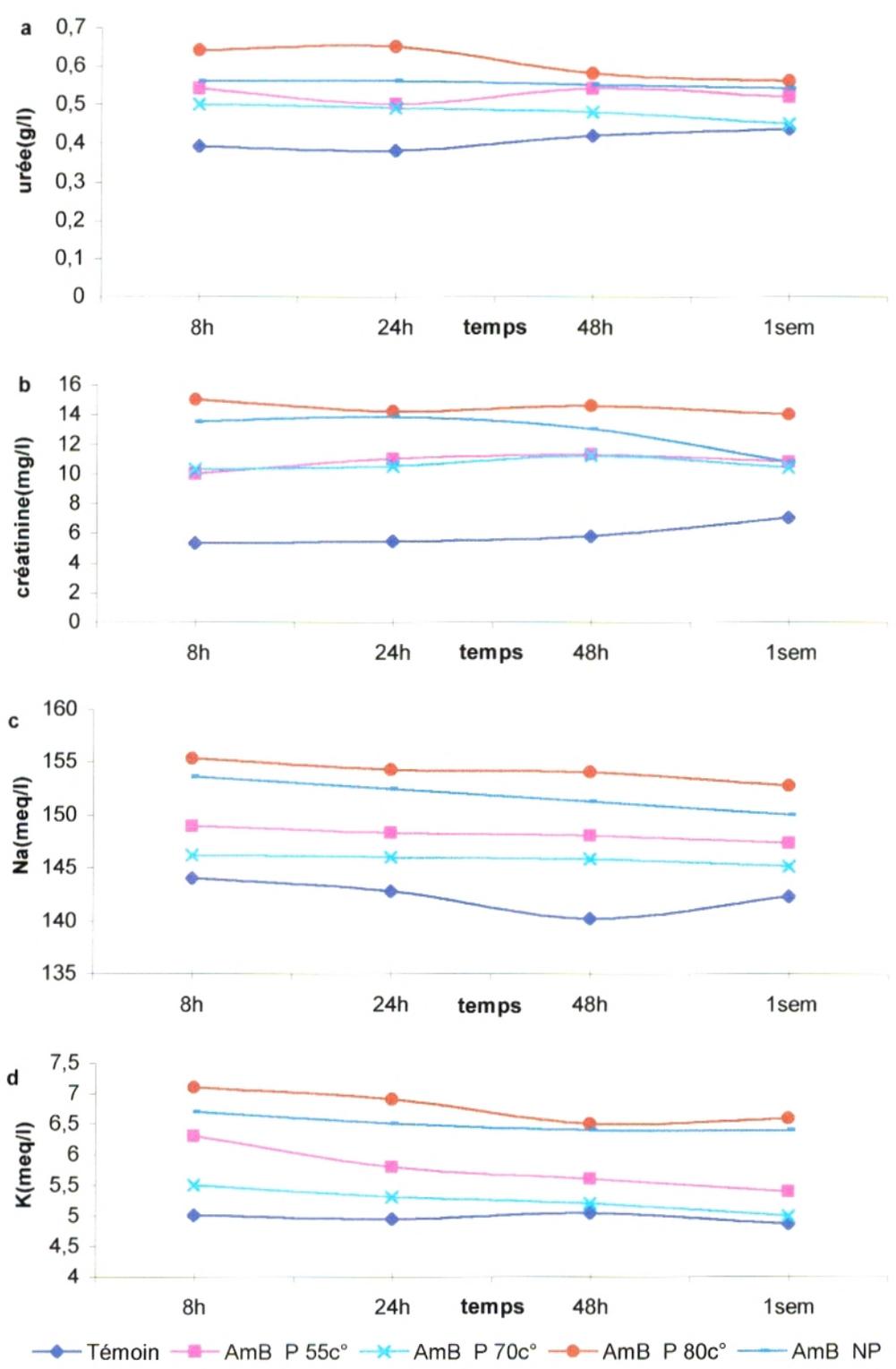


Figure 13: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du traitement par l'AmB préparé dans l'éthanol à 30%, préchauffé à différentes températures. La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

14

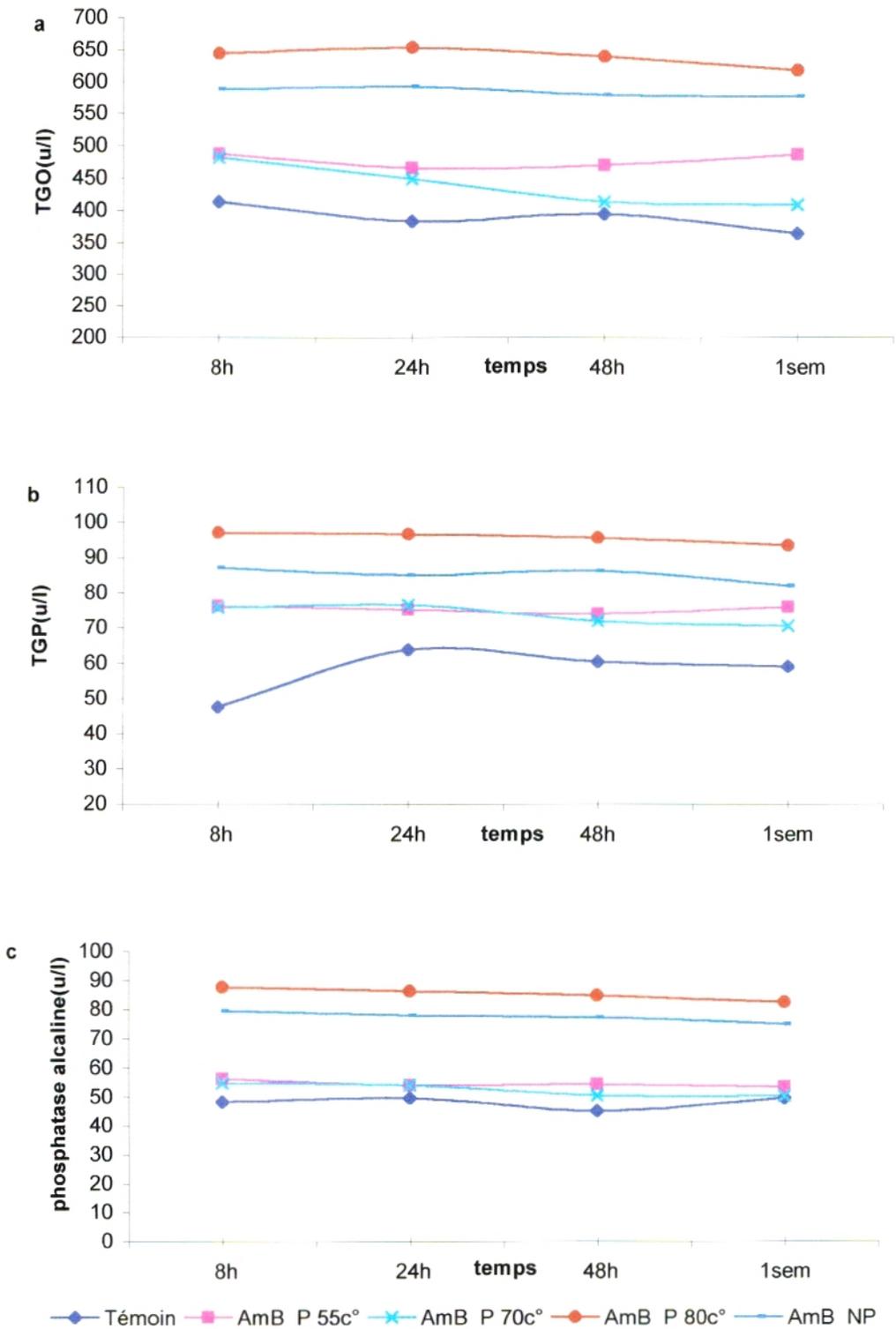


Figure 14: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du traitement par l'AmB préparé dans l'éthanol à 30%, préchauffé à différentes températures. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

Chapitre 5

EFFET COMBINE DU PRECHAUFFAGE DE LA SOLUTION MERE DE L'ANTIFONGIQUE, A DEUX CONCENTRATIONS MERES DIFFERENTES, PREPAREES DANS DEUX SOLVANTS DIFFERENTS

Les expériences menées jusqu'à ce niveau, ont permis de dégager des conditions favorables, permettant tout à la fois, une réduction de la toxicité de l'AmB vis à vis de l'organisme hôte, et une préservation de l'activité antifongique. Ces conditions correspondent à l'utilisation d'une part de deux concentrations de la solution mère d'AmB (10^{-4} M et 10^{-3} M), d'autre part, de deux solvants appropriés (mélange hydroalcoolique 30% ou eau physiologique), enfin l'utilisation du préchauffage à 70°C.

Toutes ces conditions favorables ont été testées séparément, la question qui se pose alors est de savoir si leur combinaison permet une amélioration des résultats obtenus. Pour cela nous avons établi le protocole suivant :

Nous avons traité les souris par injections uniques, en utilisant les formulations suivantes :

- Solution mère d'AmB à 10^{-3} M préparée dans de l'éthanol à 30%, NP à 70°C.
- Solution mère d'AmB à 10^{-3} M préparée dans de l'éthanol à 30%, P à 70°C.
- Solution mère d'AmB à 10^{-3} M préparée dans du sérum physiologique, NP.
- Solution mère d'AmB à 10^{-3} M préparée dans du sérum physiologique, P à 70°C.
- Solution mère d'AmB à 10^{-4} M préparée dans de l'éthanol à 30%, NP.
- Solution mère d'AmB à 10^{-4} M préparée dans de l'éthanol à 30%, P à 70°C.
- Solution mère d'AmB à 10^{-4} M préparée dans du sérum physiologique, NP.
- Solution mère d'AmB à 10^{-4} M préparée dans du sérum physiologique, P à 70°C..

NP : Solution non préchauffée.

P à 70°C : Solution préchauffée à 70°C pendant 20 minutes.

L'antifongique est ensuite dilué dans du PBS pour être administré à une dose finale de 1 mg/kg de poids de l'animal.

Les mêmes conditions expérimentales sont ensuite reprises avec l'AmB-DOC. Nous obtenons ainsi 16 lots tests. En utilisant une dose finale d'antifongique de 1mg/kg de poids, nous avons obtenu les résultats résumés dans les figures 15 à 18 pour l'AmB et 19 à 22 pour l'AmB-DOC.

❖ Quelque soit le solvant utilisé (éthanol à 30% ou sérum physiologique), le traitement par l'AmB provenant de la solution mère 10^{-3} M, non préchauffée, induit une augmentation significative des paramètres biologiques. Cette augmentation est observée aux différents temps d'exploration (8h, 24h, 48h et 1 semaine). Les paramètres rénaux (figure 15 courbes a, b, c et d) augmentent par rapport au témoin d'environ, 60 à 70% pour l'urée et la créatinine, de 15% pour le Na^+ , de 35% pour le K^+ . Les enzymes hépatiques (figure 16 courbes a, b, c) s'élèvent de 40 à 70%. A une semaine toutes les souris meurent.

❖ Le traitement par l'AmB provenant de la solution mère 10^{-4} M d'AmB, non préchauffée, présente une toxicité rénale modérée (figure 17 courbes a, b, c et d), même si les paramètres rénaux diffèrent significativement du témoin (l'urée augmente de 35%, la créatinine de 60%, le Na^+ de 6% et le K^+ de 25%. Quant aux paramètres hépatiques (figure 18 courbes a, b et c), ils ne présentent pas de différence significative par rapport au témoin sauf pour la TGP (figure 18 courbe b) qui augmente de 67%. L'ensemble de ces paramètres diminue de 30 à 50% par rapport au traitement par la solution mère 10^{-3} M. A une semaine aucune mortalité n'a été observée.

❖ Le préchauffage de la solution mère d'AmB seul à 10^{-3} M, entraîne par rapport à l'AmB non préchauffé, une réduction de la valeur des paramètres biologiques d'environ 60% pour l'urée, 10% pour le Na^+ et de 40% pour la phosphatase alcaline. Les autres paramètres ne diffèrent pas significativement. Aucune mort n'a été notée (figures 15 et 16). Par rapport à l'AmB non préchauffé, le préchauffage de la solution mère d'AmB seul à 10^{-4} M, réduit de manière significative la toxicité rénale se traduisant par une diminution d'environ 20% pour l'urée et la créatinine (figures 17 a, 17 b) ; alors que le K^+ (figure 17 d) et les paramètres hépatiques (figure 18) retournent dès la 24^{ème} heure aux valeurs des témoins.

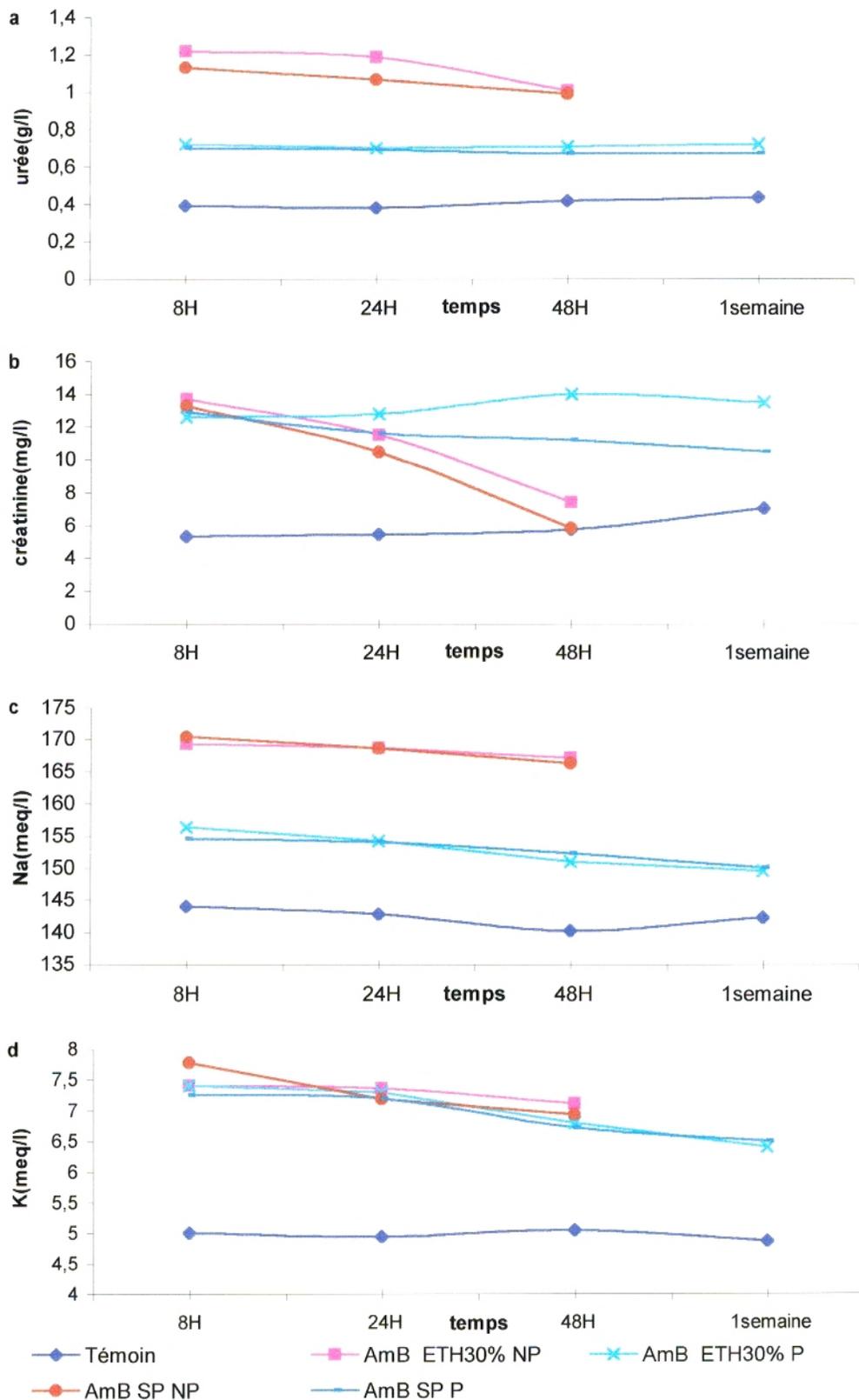


Figure 15: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, $10^{-3}M$, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

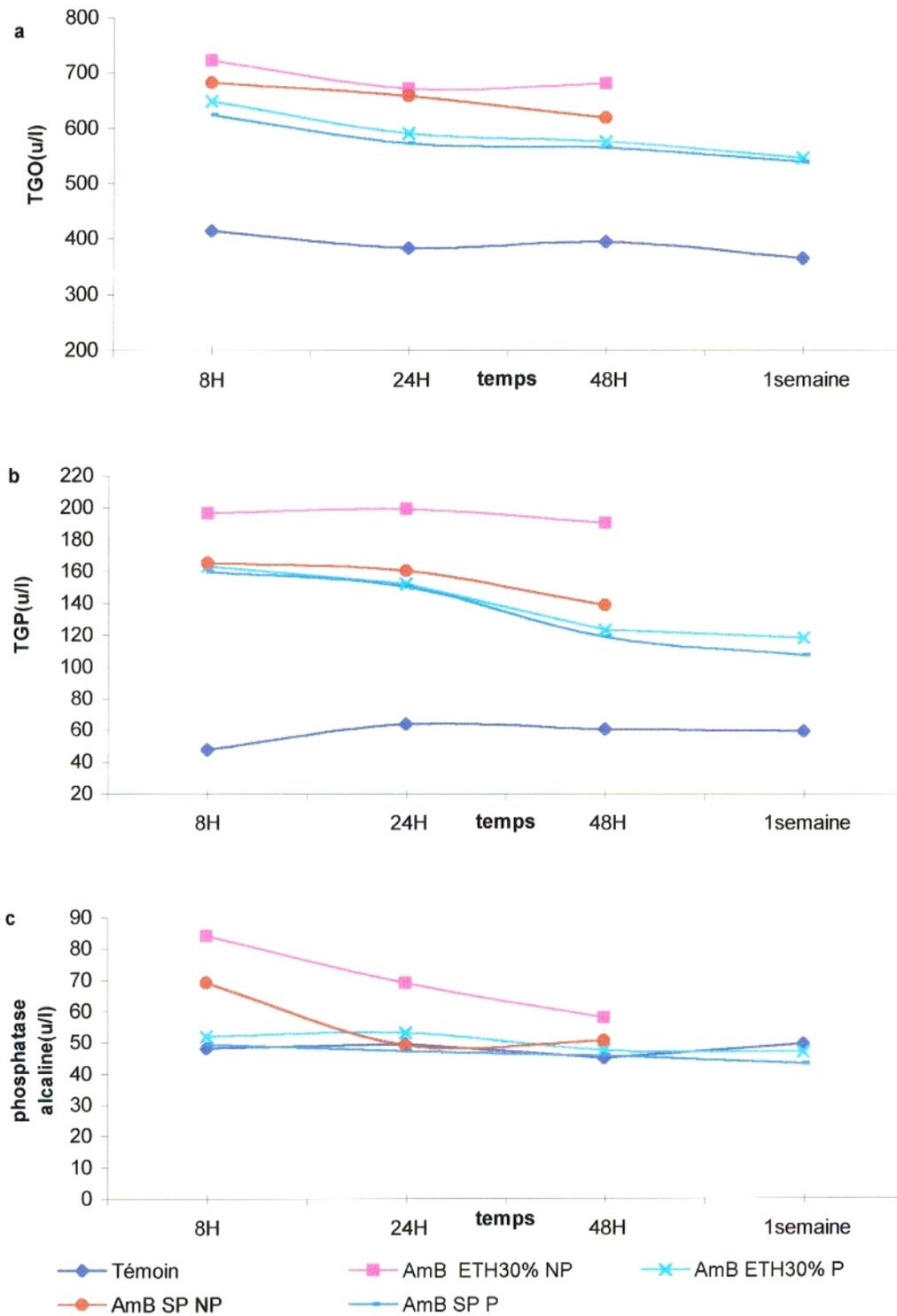


Figure 16: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, 10^{-3} M, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

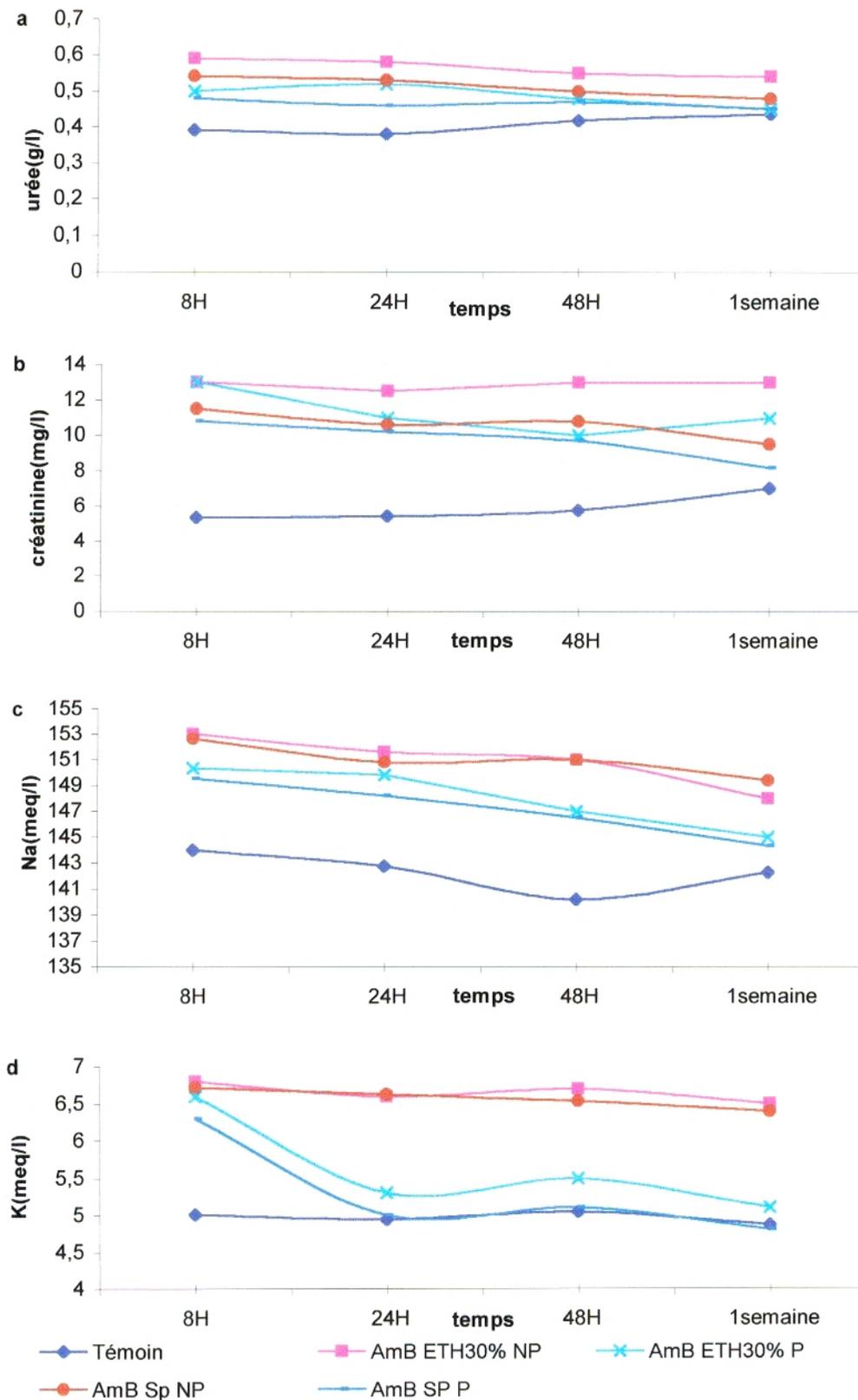


Figure 17: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, $10^{-4}M$, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/ kg de poids.

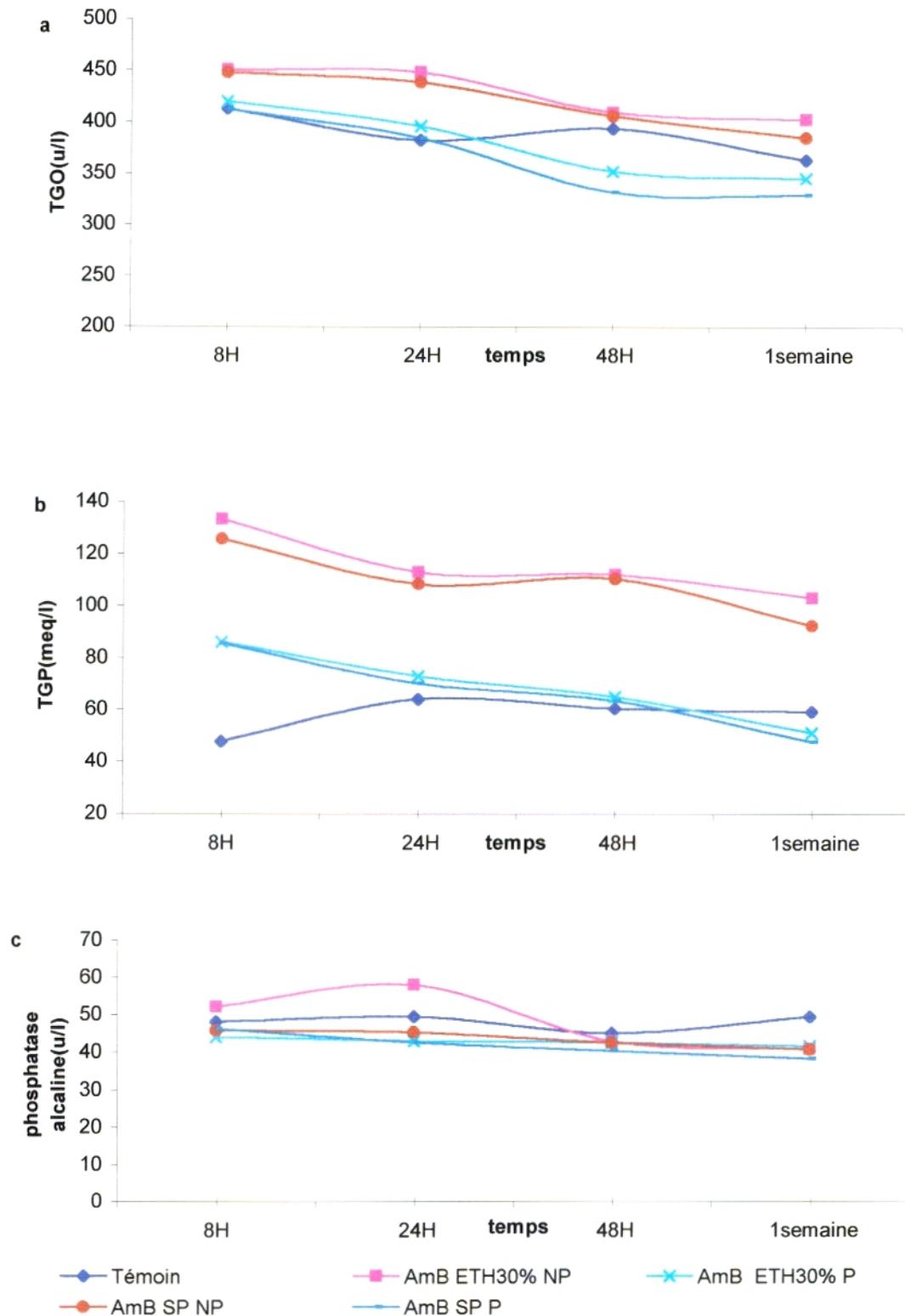


Figure 18: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, 10^{-4} M, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/ kg de poids.

❖ Le traitement par l'AmB-DOC préparé à partir de solution stock 10^{-3} M, non préchauffée, entraîne une toxicité significativement élevée. L'augmentation des paramètres rénaux varie entre +45 et +60% (courbes a, b, c et d) par rapport au témoin non traité à l'exception du Na^+ qui n'augmente que de 10% (figure 19 c). Les paramètres hépatiques s'élèvent de +40 à +70% par rapport au témoin (figures 20 courbes a, b et c).

❖ Les paramètres biologiques analysés après traitement par la solution mère d'AmB-DOC à 10^{-4} M, montrent par rapport au témoin sans traitement une augmentation d'environ +35% pour l'urée (figure 21 a), +60% pour la créatinine (figure 21 b), +5% pour le Na^+ (figure 21 c), et +25% pour le K^+ (figure 21 d). Les paramètres hépatiques ne sont que modérément élevés (+15% par rapport au témoin).

Le préchauffage de ces deux solutions mères 10^{-3} M et 10^{-4} M induit par rapport aux solutions non préchauffées une diminution de la toxicité qui varie de 30 à 70%. Lorsqu'on utilise une solution mère d'AmB-DOC à 10^{-4} M préalablement chauffée à 70°C , les valeurs de l'ensemble des paramètres biologiques se normalisent au bout d'une semaine, alors que lorsque l'on utilise une solution mère d'AmB-DOC à 10^{-3} M, les paramètres sanguins restent significativement élevés par rapport au témoin jusqu'à au moins une semaine.

Par ailleurs, lorsque l'on compare les courbes des figures 19 à 22 avec celles des figures 15 à 18, on remarque que quels que soit la concentration de la solution mère, et le solvant utilisé, l'AmB-DOC induit des perturbations biologiques moins importantes que l'AmB seul.

Sur la base de l'ensemble de ces résultats, et en considérant que la solution mère d'AmB à 10^{-4} M est plus riche en formes d'agrégats que la solution 10^{-3} M (chapitre 1), il peut être suggéré que le préchauffage de la solution mère 10^{-4} M d'AmB à 70°C pendant 20 minutes, induit à un taux plus élevé de superagrégats que le préchauffage de la solution mère 10^{-3} M. Cette dernière possède plus de formes solubles toxiques que de superagrégats, ce qui explique sa toxicité. De plus l'utilisation du sérum physiologique comme solvant réduit la toxicité davantage, ce qui est dû à son innocuité (chapitre 3).

D'autre part, le traitement par l'AmB-DOC préparé dans les mêmes conditions expérimentales, entraîne moins de toxicité que le traitement par l'AmB seul. Ceci est dû à la présence du désoxycholate qui solubilise l'antifongique et le rend moins toxique.

On peut conclure de cette partie expérimentale que la combinaison des conditions favorables (concentration de solution stock à 10^{-4} M, préchauffage à 70°C , utilisation du sérum physiologique comme solvant, addition du désoxycholate), améliore les paramètres biologiques et entraîne une réduction considérable de la toxicité.

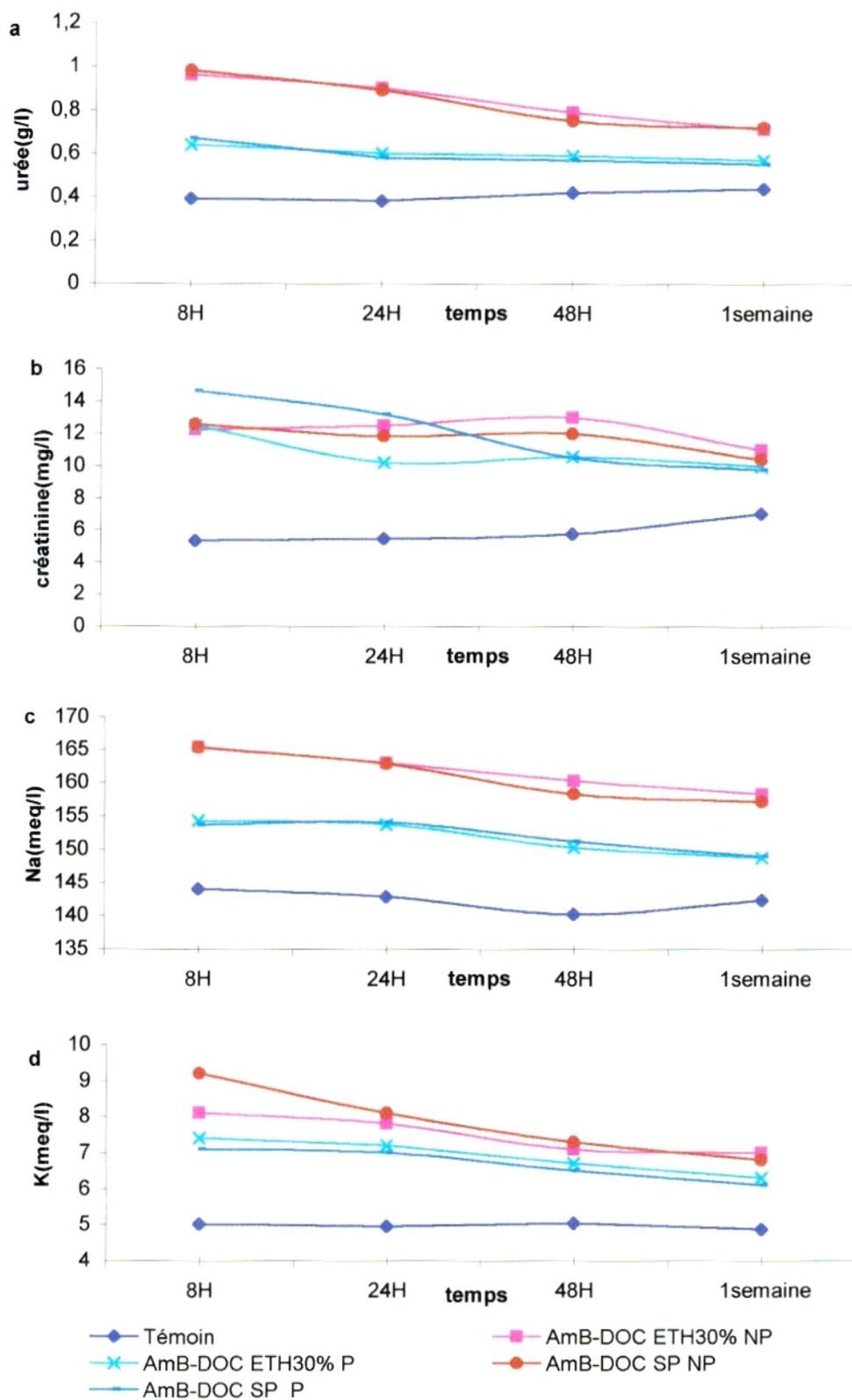


Figure 19: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, 10^{-3} M, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/ kg de poids.

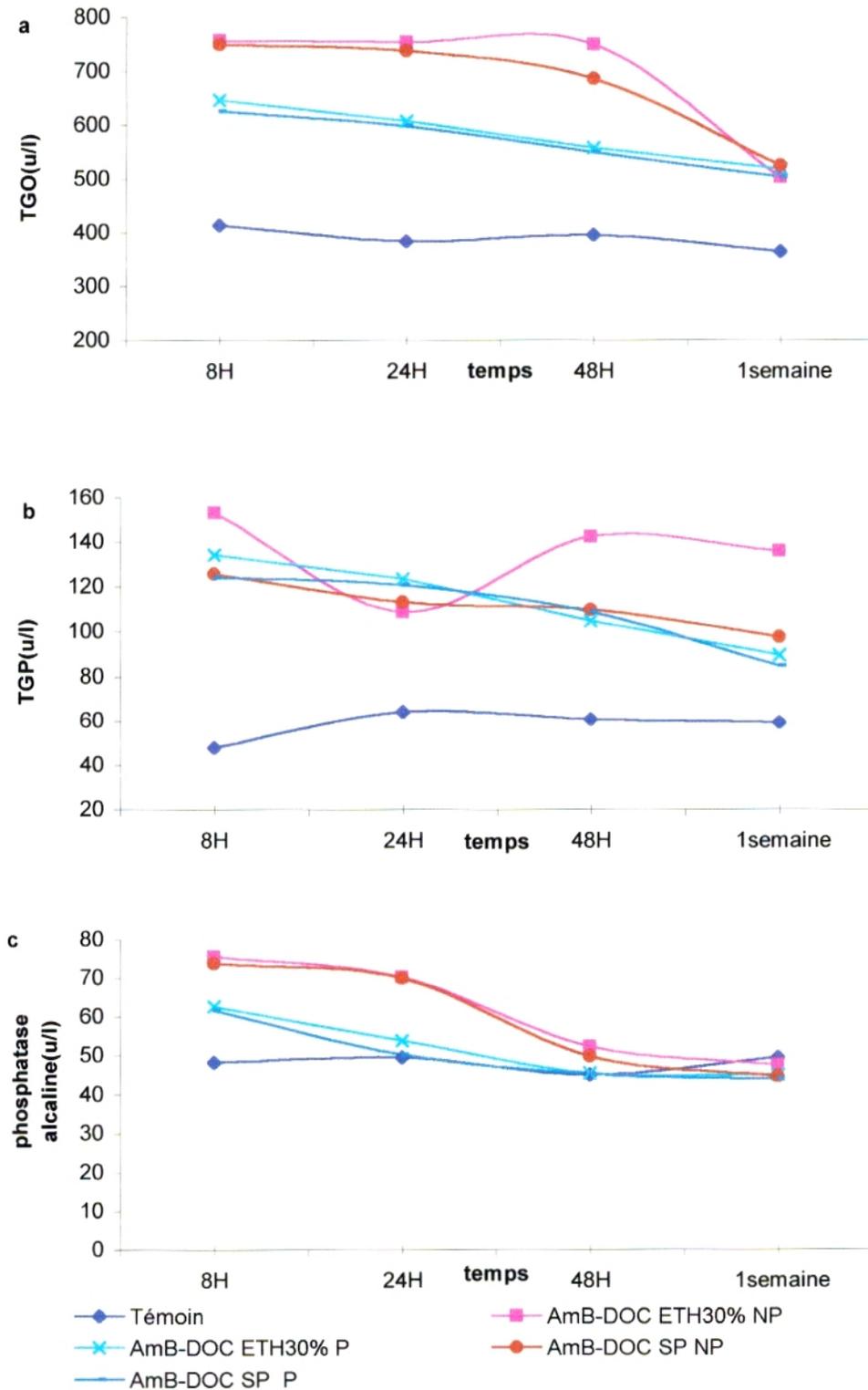


Figure 20: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, 10^{-3} M, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/ kg de poids.

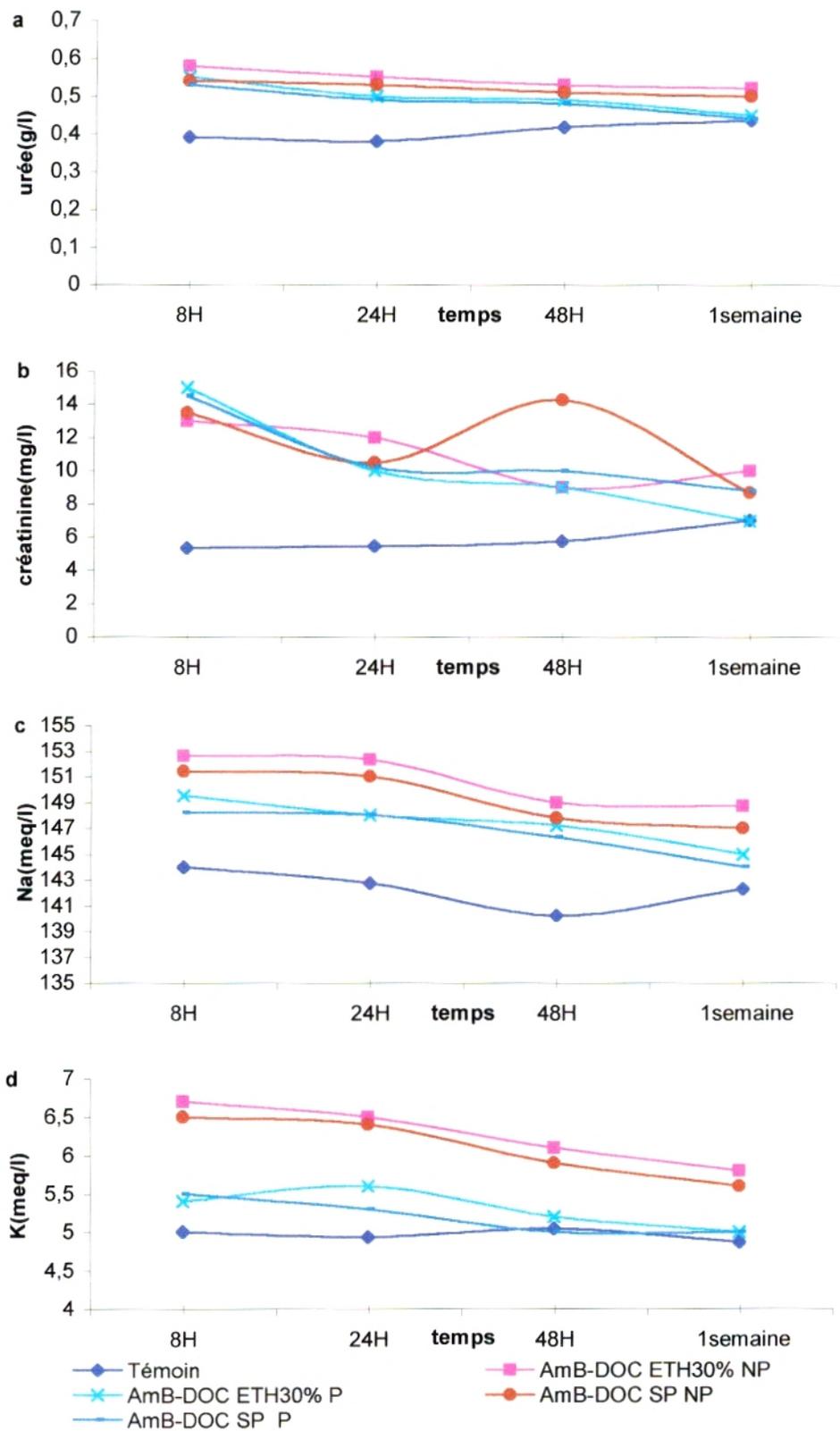


Figure 21: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, 10^{-4} M, préparée dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/ kg de poids.

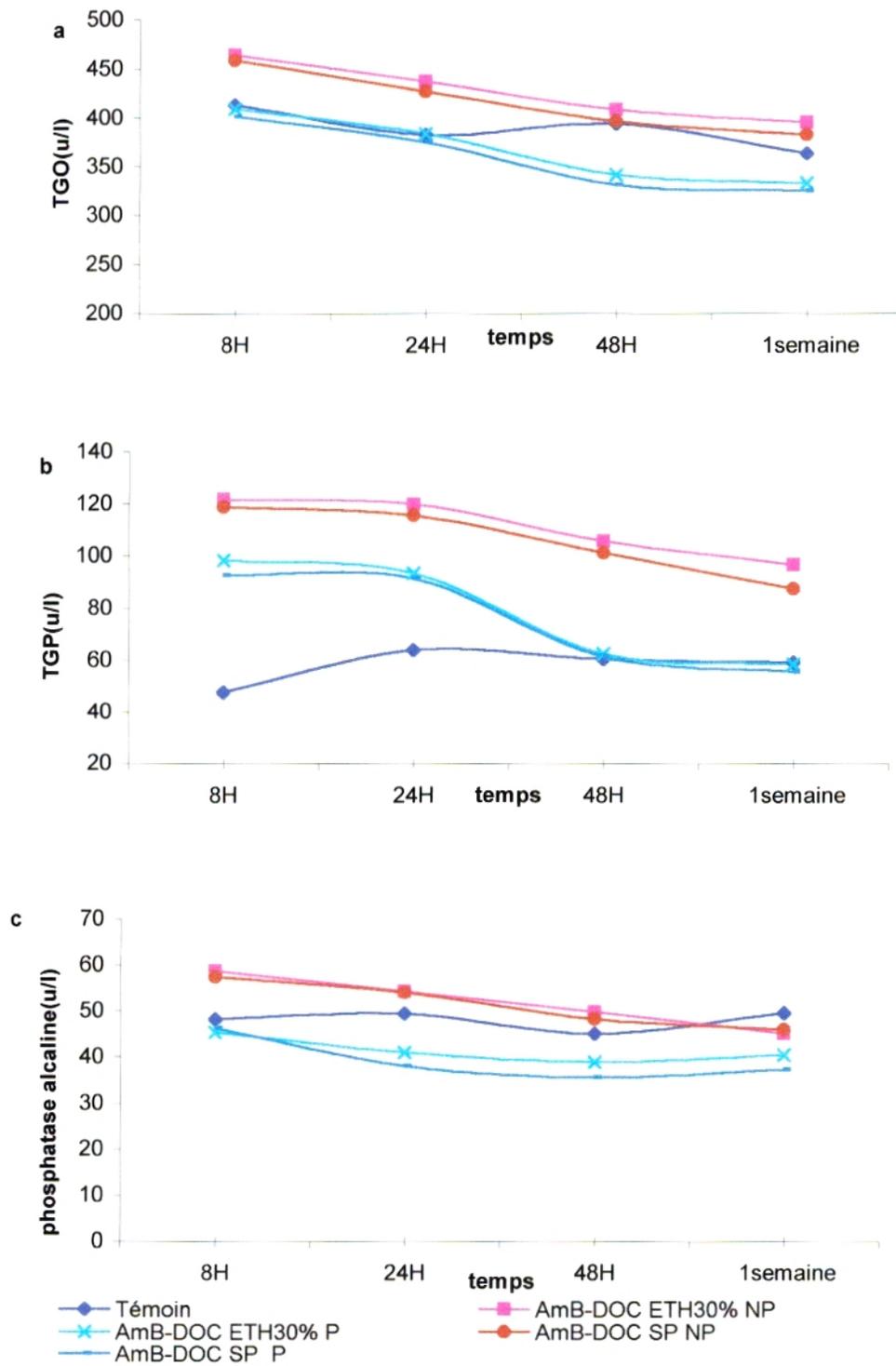


Figure 22: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, 10^{-4} M, préparé dans dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/ kg de poids.

Chapitre 6

EFFET DES DOSES FINALES DE L'ANTIFONGIQUE (RECHERCHE DE LA DOSE LETALE)

Après la fixation des conditions expérimentales favorables, nous avons fait varier les doses finales injectées, pour déterminer la dose létale de chaque formulation. Dans ce cadre nous avons testé d'abord l'AmB puis l'AmB sous forme désoxycholate.

Les solutions mères d'AmB seul sont préparées à 10^{-4} M, dans deux solvants (l'éthanol à 30% ou le sérum physiologique), préchauffées ou non, et sont utilisées à des doses finales variant de 0,5 à 3 mg/kg en augmentant la dose par paliers de 0,5 mg/Kg de poids. Les 24 lots tests sont les suivants :

12 lots tests dans lesquels on a utilisé l'éthanol à 30% (ETH) comme solvant pour préparer la solution mère, et le PBS pour réaliser la dilution finale.

AmB ETH 0,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB ETH 1 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB ETH 1,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB ETH 2 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB ETH 2,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB ETH 3 mg/kg NP et P à 70 °C.

12 lots tests dans lesquels on a utilisé le sérum physiologique (SP) comme solvant pour préparer la solution mère, et le PBS pour réaliser la dilution finale.

AmB SP 0,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB SP 1 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB SP 1,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB SP 2 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB SP 2,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB SP 3 mg/kg NP et P à 70 °C.

La dose finale injectée est obtenue par dilution dans du PBS

En se basant sur les résultats obtenus avec l'AmB, et représentés sur les figures 23- 24- 25 et 26 pour l'AmB préparé dans l'éthanol et les figures 27- 28- 29- et 30 pour l'AmB préparé dans le sérum physiologique, et en considérant que l'AmB-DOC est moins toxique que l'AmB seul, nous avons testé l'AmB-DOC dans les mêmes conditions expérimentales, mais en partant de la concentration finale 2mg/kg. Les lots étudiés sont :

AmB-DOC ETH 2 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB-DOC ETH 2,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB-DOC ETH 3 mg/kg NP et P à 70 °C.

Enfin, les mêmes formulations sont reprises en utilisant le sérum physiologique comme solvant des solutions stocks.

AmB-DOC SP 2 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB-DOC SP 2,5 mg/kg NP et P à 70 °C.

AmB-DOC SP 3 mg/kg NP et P à 70 °C.

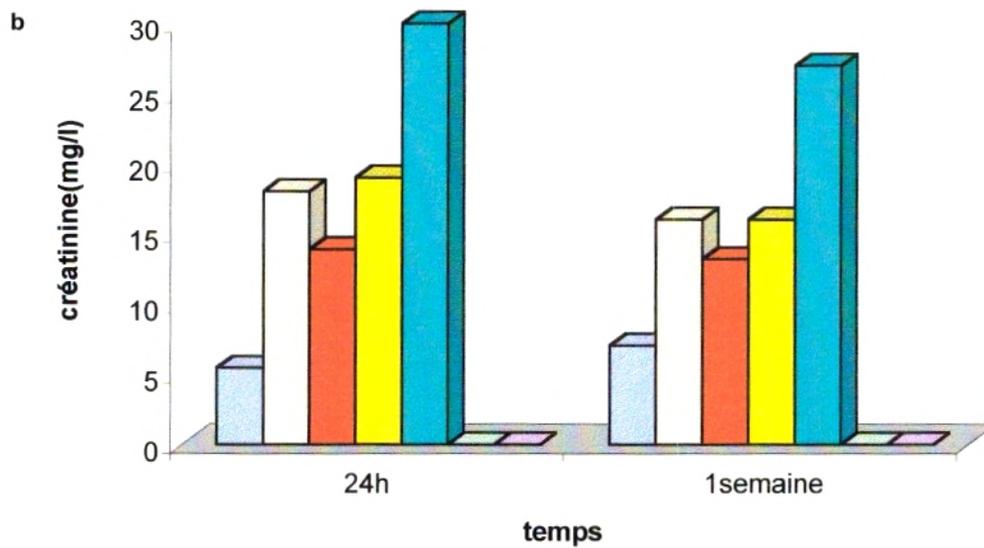
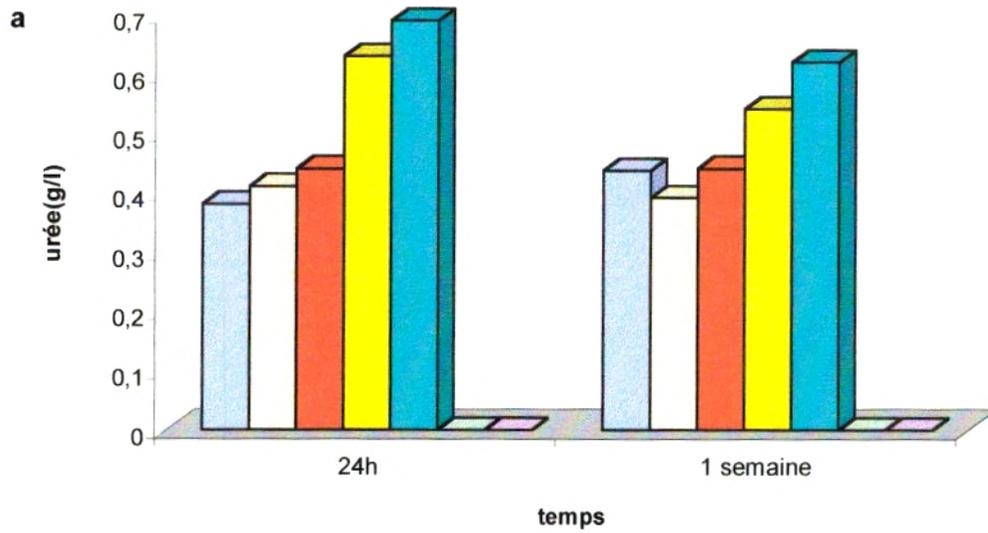
Afin d'éviter la surcharge hydrique chez la souris, nous n'avons pas pu augmenter la dose finale au delà de 3 mg/kg.

Les résultats sont rapportés sur les figures 31- 32- 33 et 34 pour l'AmB-DOC ETH, et les figures 35- 36- 37 et 38 pour l'AmB-DOC SP.

Pour des raisons de manipulations et de nombre de souris, nous avons limité les prélèvements à 24h et 1 semaine seulement.

Dans un premier temps, nous avons utilisé comme solvant de l'éthanol à 30%.

❖ Les résultats du traitement par l'AmB seul montrent que l'AmB ETH 0,5mg/kg non préchauffé n'induit pas une augmentation significative des paramètres hépatiques (figure 24) ; pour le compartiment rénal, l'urée ne diffère pas significativement du témoin (figure 23 a), alors que la créatinine augmente de +65% par rapport au témoin (figure 23 b). La comparaison des figures 23 et 24 aux figures 25 et 26 montre que le préchauffage n'a aucun effet sur la réduction du taux des paramètres rénaux notamment la créatinine, et des paramètres hépatiques.



□ Témoin □ AmB ETH 0,5mg/kg NP ■ AmB ETH 1mg/kg NP
 ■ AmB ETH 1,5mg/kg NP ■ AmB ETH 2mg/kg NP □ AmB ETH 2,5mg/kg NP
 □ AmB ETH 3mg/kg NP

Figure 23: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, non préchauffé (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

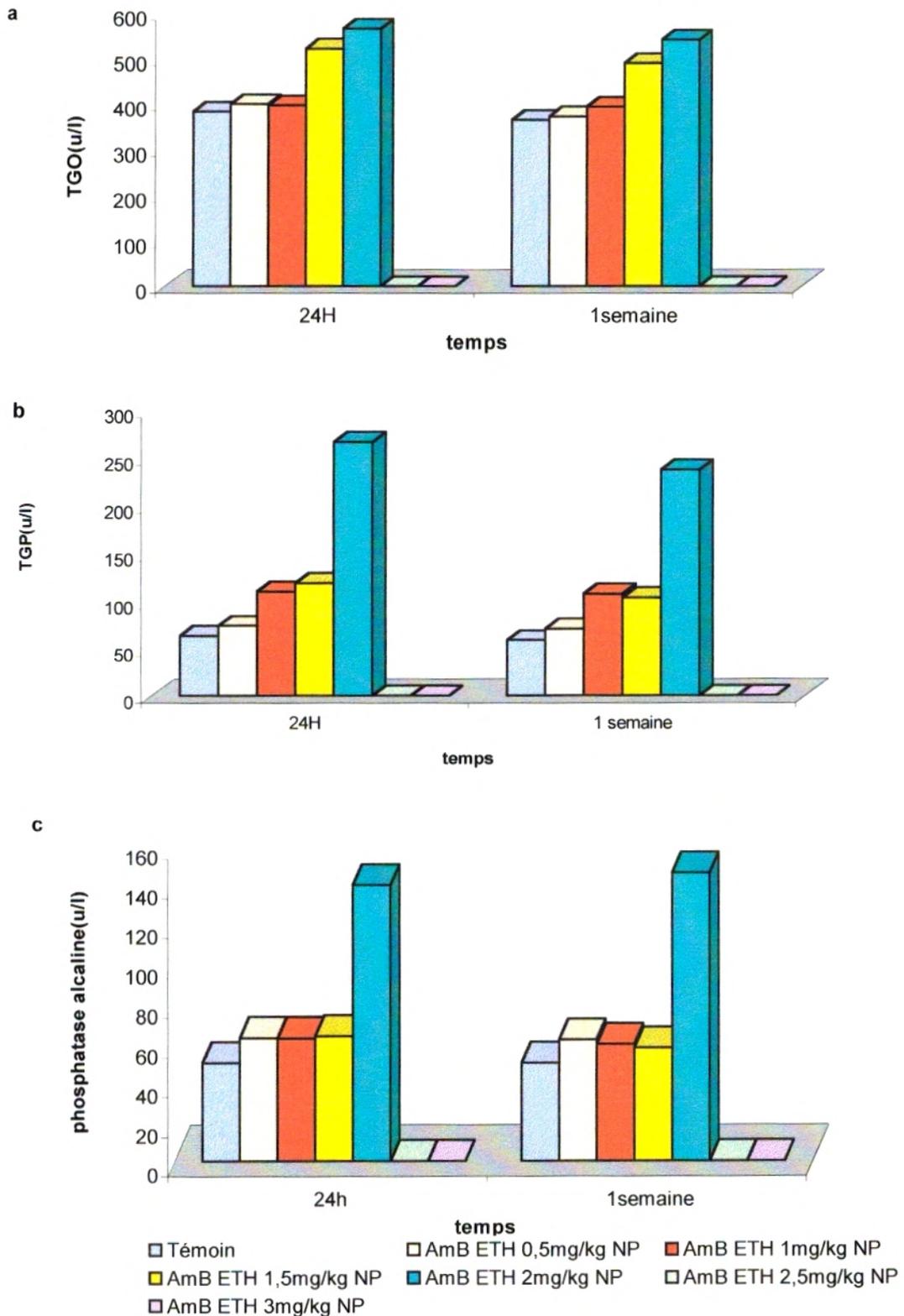


Figure 24: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, non préchauffé (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

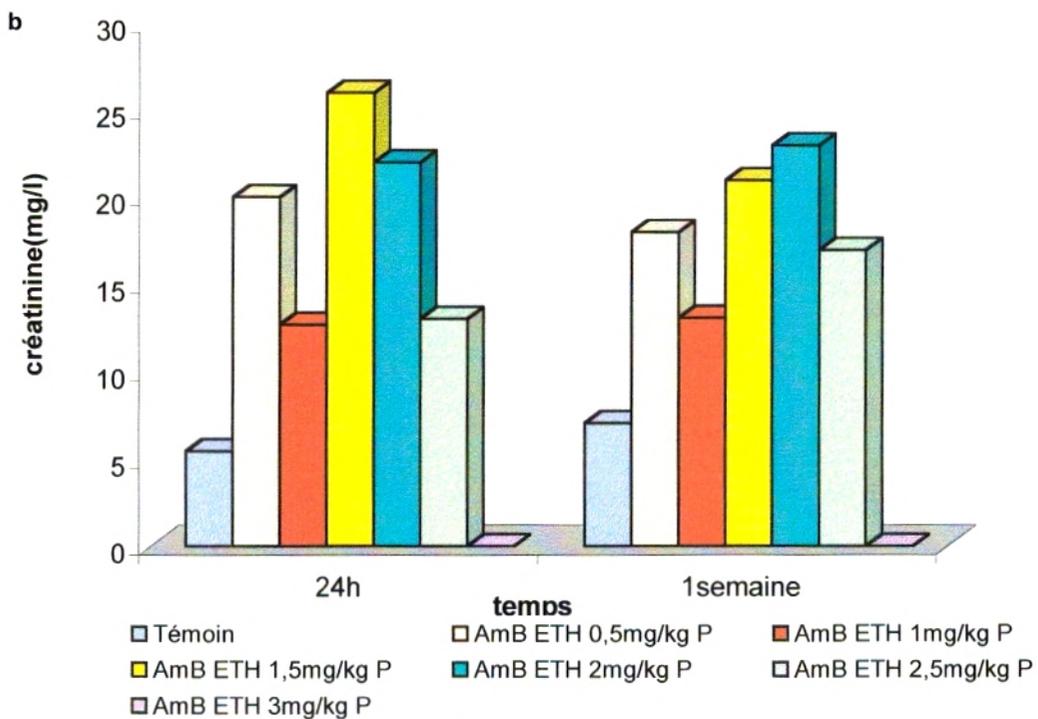
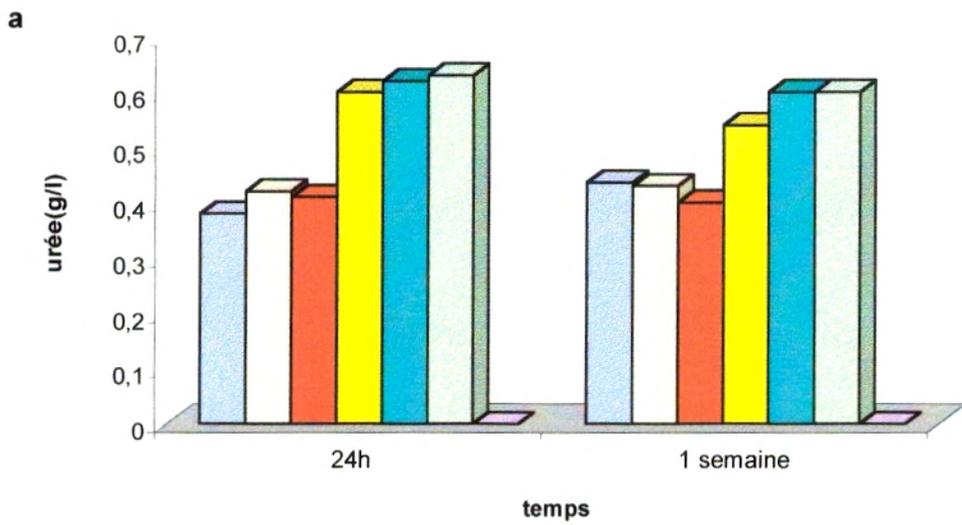


Figure 25: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'ethanol, préchauffé. (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

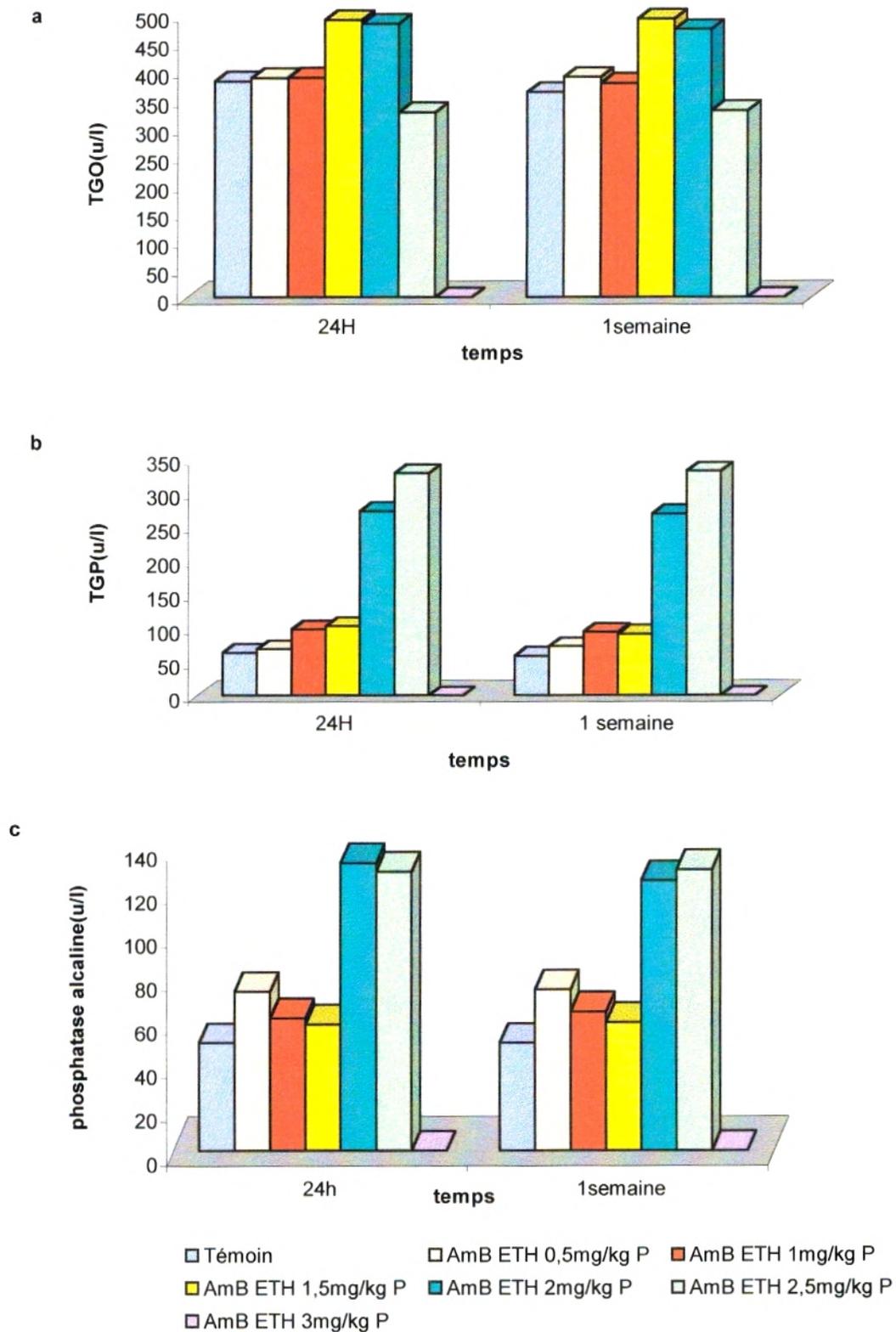


Figure 26: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, préchauffé. (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$.

❖ Le traitement par l'AmB ETH 1 mg/kg non préchauffé, entraîne une augmentation par rapport au témoin, de +50% de la créatinine (figure 23 b), et de +35% pour la TGP (figure 24b), les autres paramètres ne diffèrent pas significativement du témoin (figures 23 et 24). Le préchauffage n'induit pas de changement du taux des paramètres biologiques, à l'exception de la TGP qui diminue de 12% (figure 26 b).

❖ Le traitement par l'AmB aux doses finales de 1,5 mg/kg et 2 mg/kg, entraîne une augmentation significative de tous les paramètres, allant de +60 à +80% pour les paramètres rénaux, de +30 pour la TGO, et +35% pour la TGP à la dose 1.5 mg/kg, +80% pour la TGP à la dose 2 mg/kg. La phosphatase alcaline n'augmente que dans le cas du traitement par l'AmB à 2 mg/kg, cette élévation est de +60% (figure 23 et 24). Le préchauffage entraîne une diminution de la toxicité par rapport à l'AmB non préchauffé et qui varie de 10 à 20% pour l'ensemble des paramètres. Cependant, ces derniers restent toujours élevés par rapport au témoin.

❖ Le traitement par l'AmB aux doses finales de 2,5 et 3mg/kg entraîne la mort des souris. Après préchauffage, l'AmB à la dose finale de 3 mg/kg reste toujours létal, tandis que les souris traitées par l'AmB à 2,5 mg/kg survivent, mais les prélèvements sanguins montrent une hémolyse, ce qui fausse visiblement nos résultats (figures 25 et 26).

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le sérum physiologique comme solvant. Les variations des paramètres, sont les mêmes que celles observées avec l'AmB préparé dans l'éthanol, préchauffé ou non et injecté à des doses allant de 0,5 à 2 mg/kg de poids. A la dose de 2,5 mg/kg l'AmB n'est pas létal avec le sérum physiologique à la différence du premier cas, mais il entraîne une toxicité élevée se traduisant par une augmentation de l'urée de +45% (figure 27 a), la créatinine de +85% (figure 27 b), et les enzymes hépatiques de +50 à +80% (figure 28). La dose de 3 mg/kg est létale dès la 8^{ème} heure. Le préchauffage (figure 29 et 30) induit une diminution de 10 à 20% de la toxicité pour 2,5 mg/kg, et une survie des souris à 3 mg/kg qui reste cependant toxique.

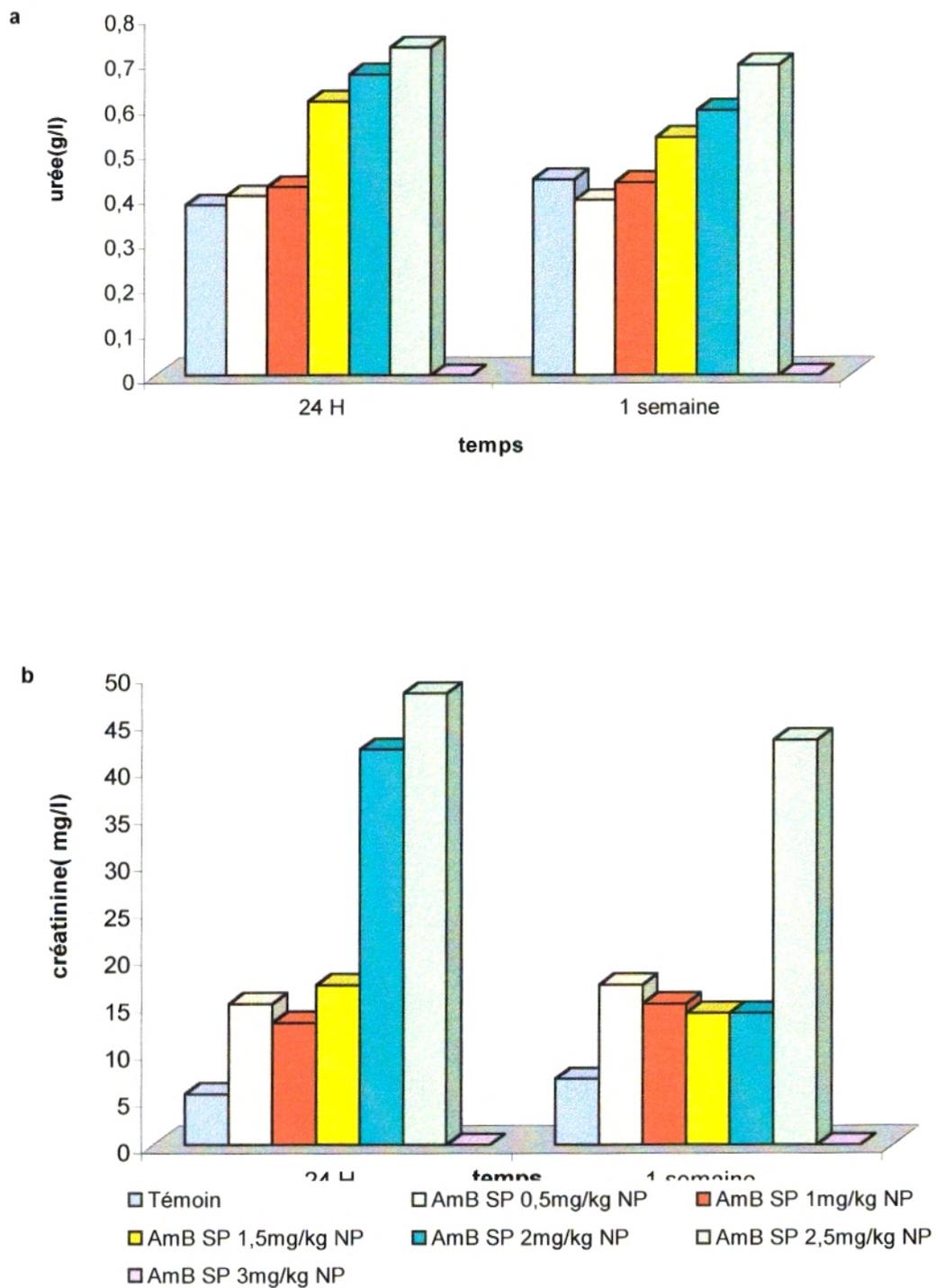


Figure 27: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans le sérum physiologique, non préchauffé. (recherche de la dose létale).
 La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

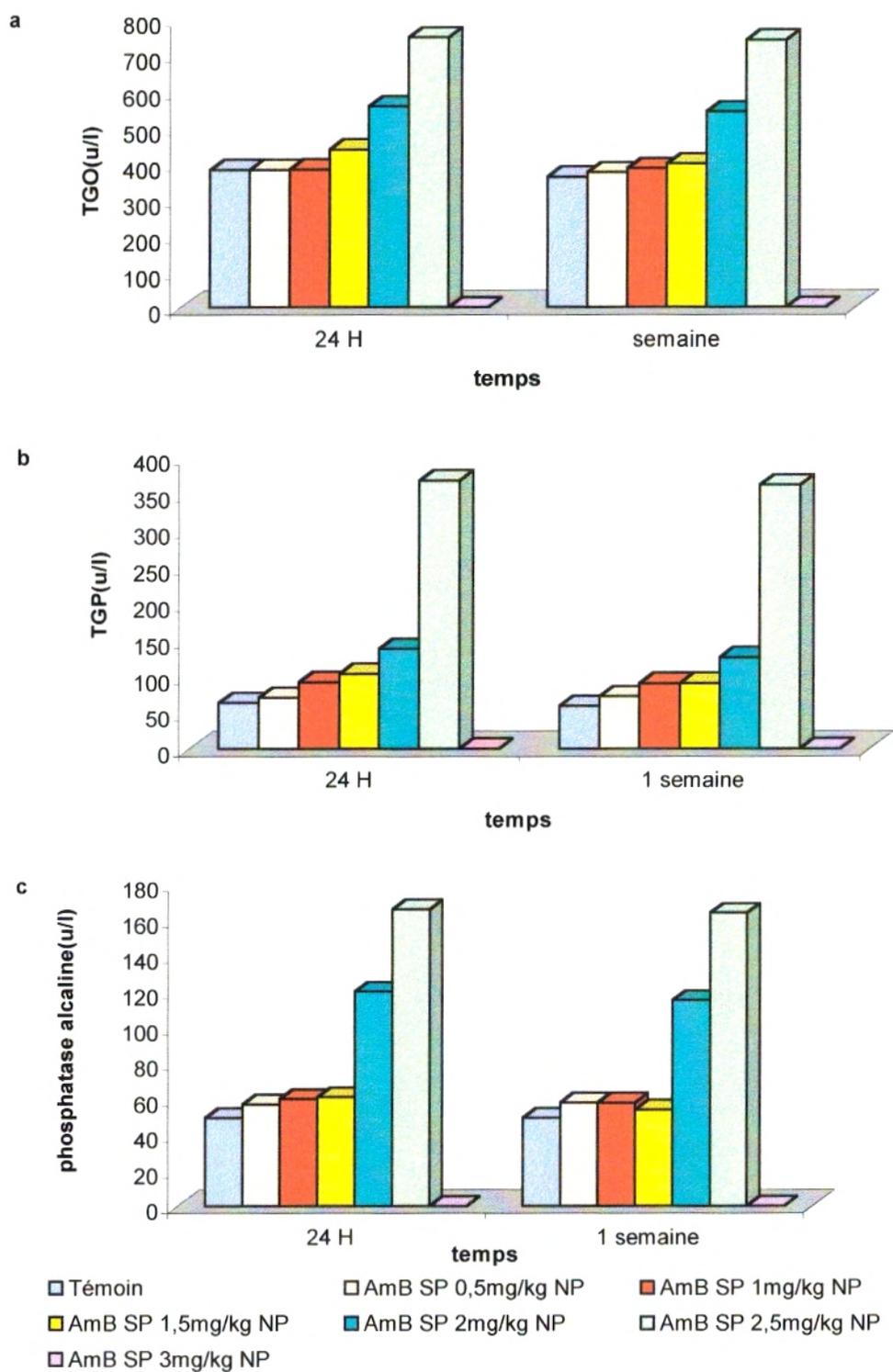


Figure 28: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans le sérum physiologique, non préchauffé. (recherche de la dose létale). La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

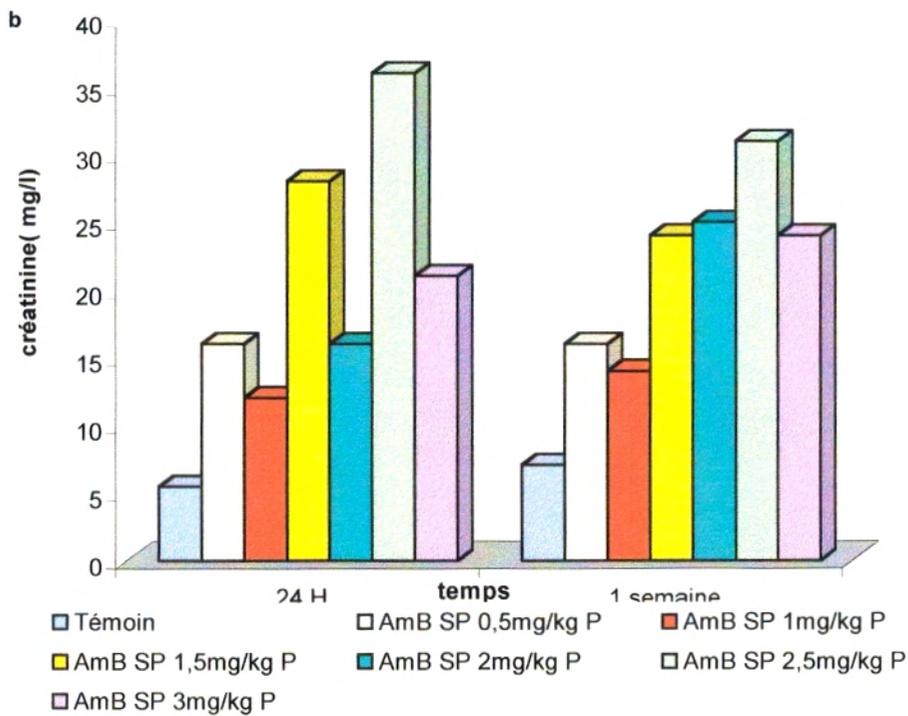
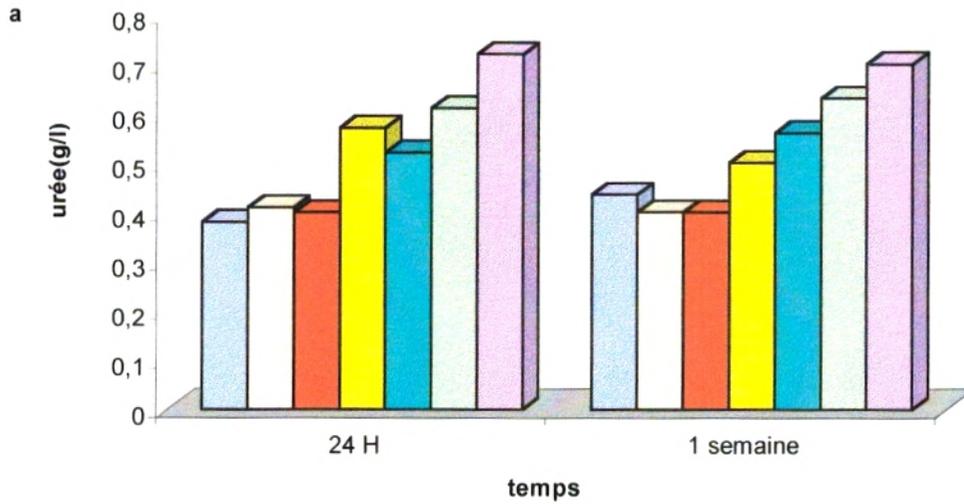


Figure 29: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans le sérum physiologique, préchauffé. (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$.

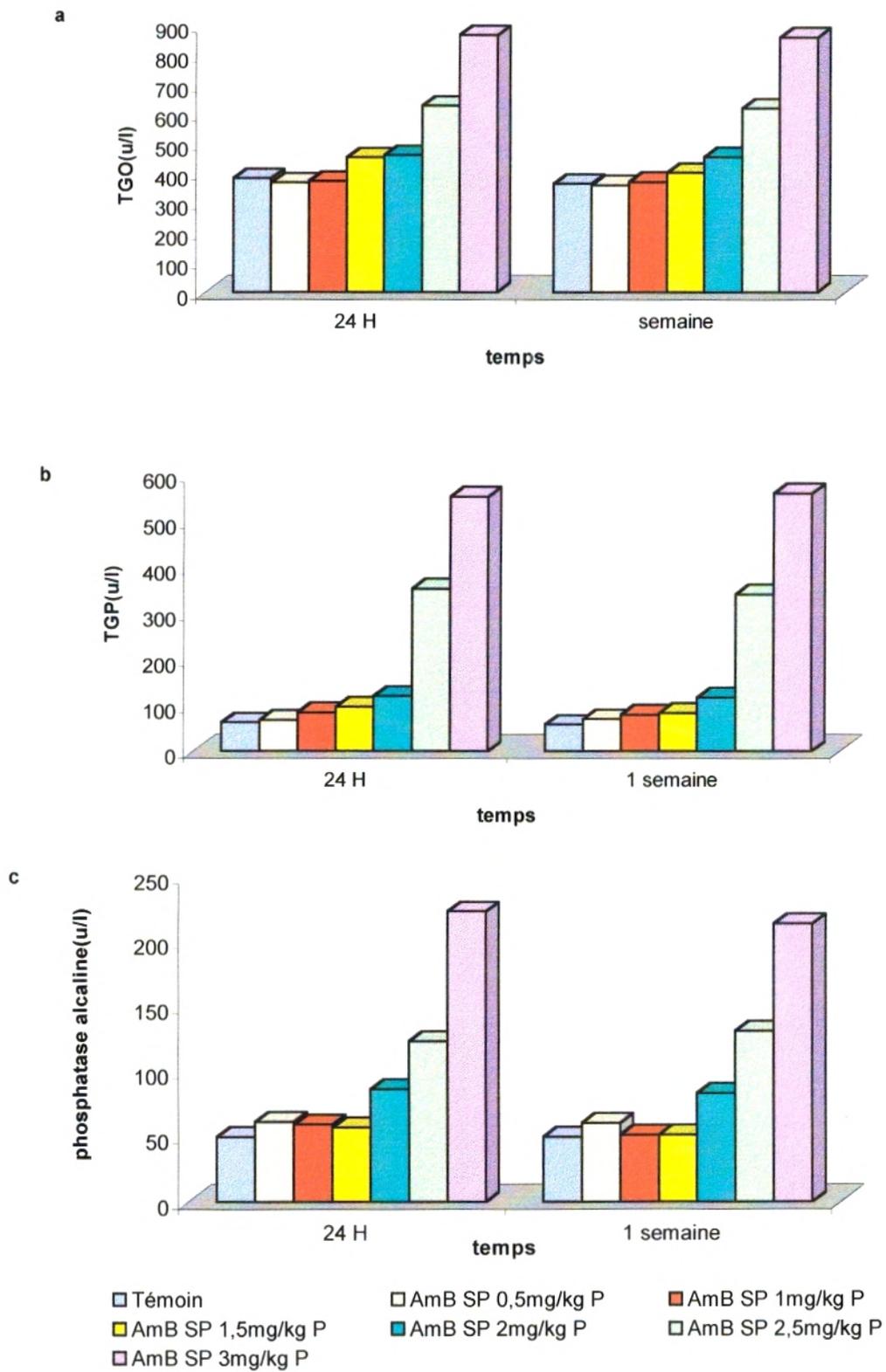


Figure 30: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans le sérum physiologique, préchauffé. (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$.

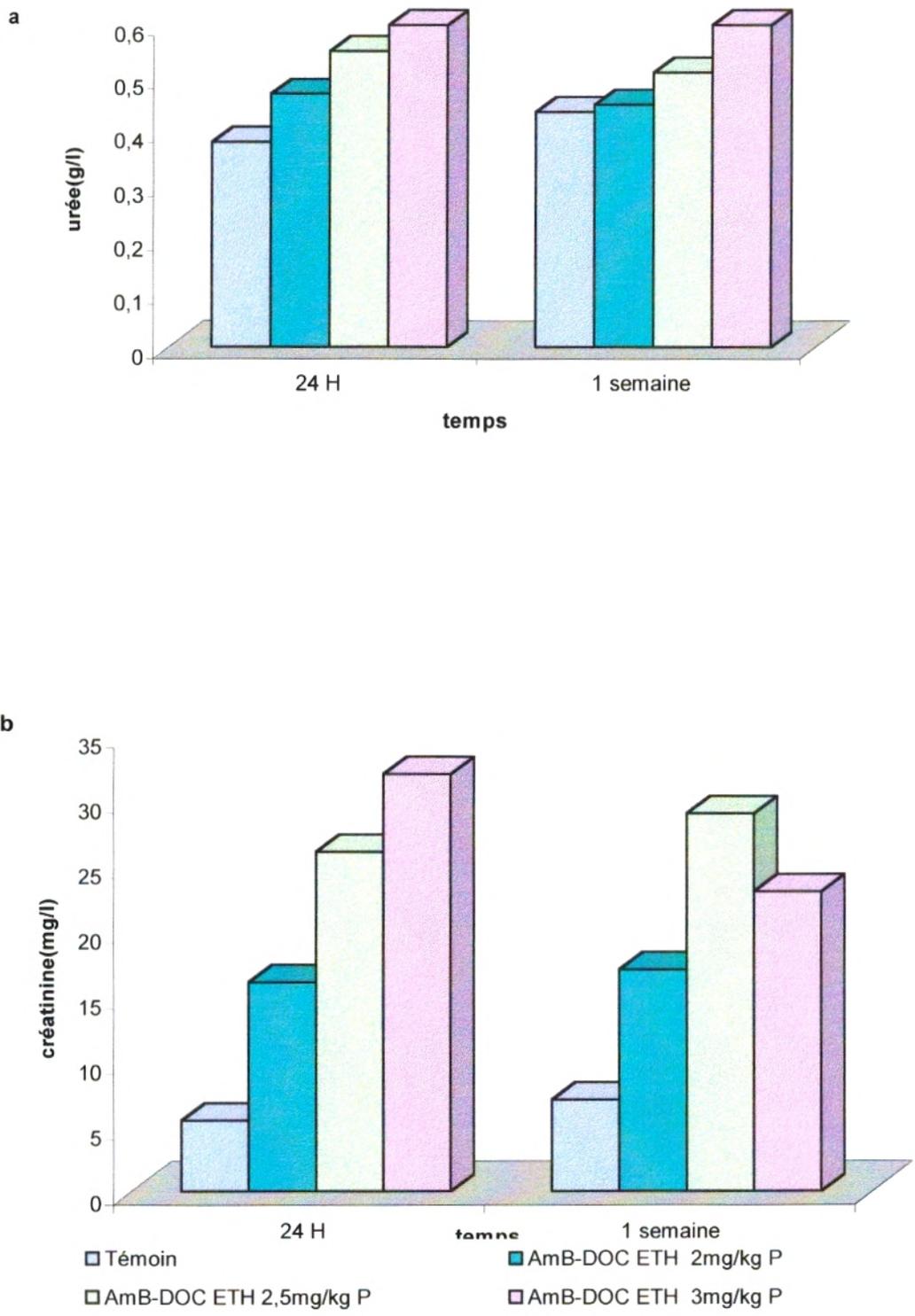


Figure 33: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales, d'AmB-DOC préparé dans l'éthanol, préchauffé. (recherche de la dose létale).
 La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$.

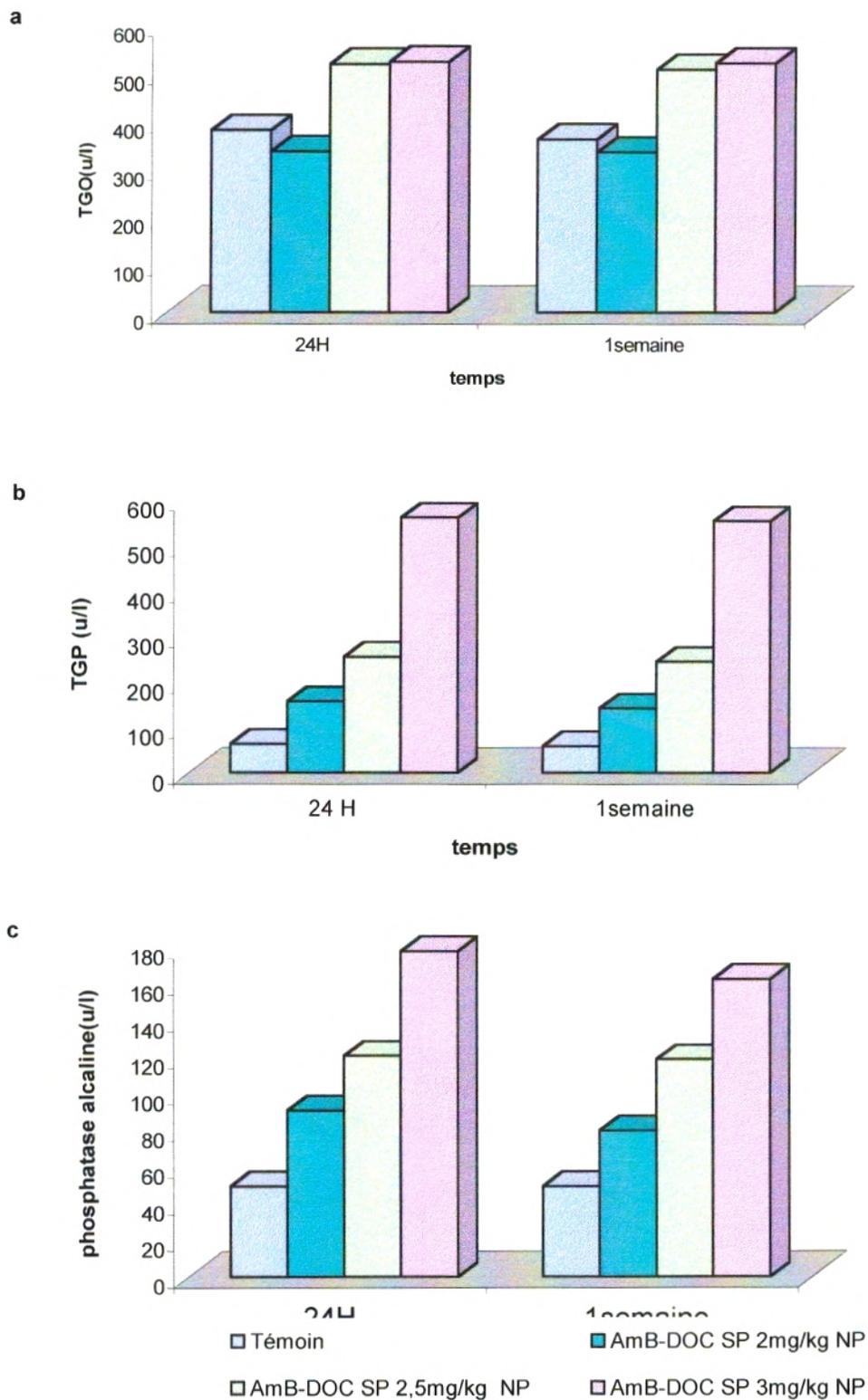
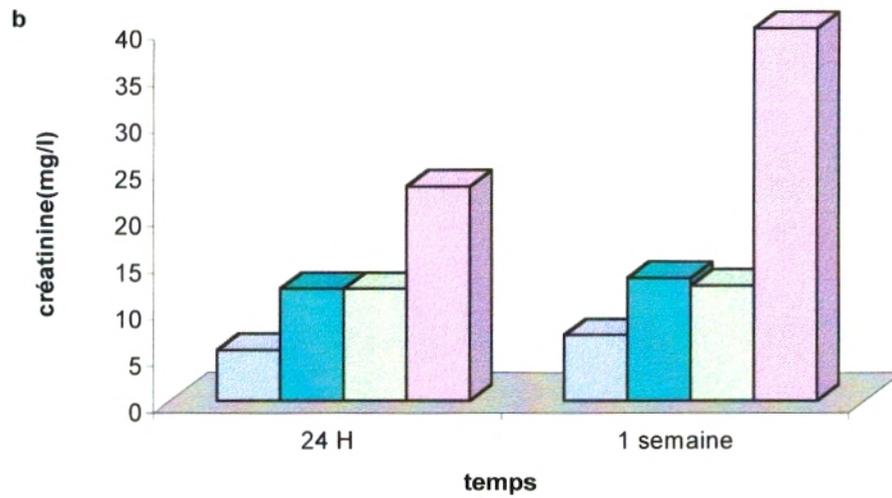
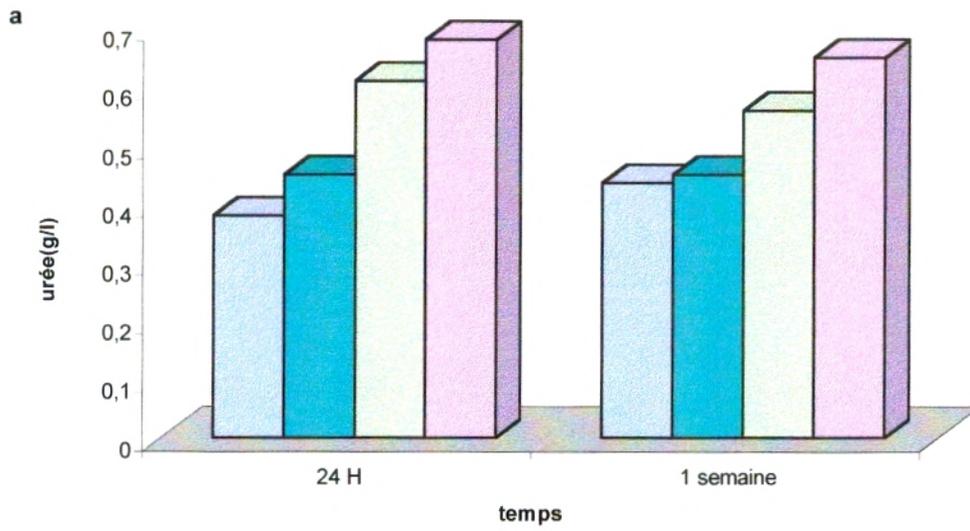


Figure 36: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB-DOC, préparé dans le sérum physiologique, non préchauffé. (recherche de la dose létale). La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.



Témoin
 AmB-DOC SP 2mg/kg P
 AmB-DOC SP 2,5mg/kg P
 AmB-DOC SP 3mg/kg P

Figure 37: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB-DOC préparé dans le sérum physiologique, préchauffé. (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

Chapitre 7

EFFET DE L'ADDITION DES LIPOPROTEINES A L'AMPHOTERICINE B

L'affinité de l'amphotéricine B avec les lipoprotéines constitue un axe de recherche important, plusieurs auteurs ont étudié cette affinité et ont également essayé de combiner l'amphotéricine B aux lipoprotéines.

BRAJTBURG et al., 1984 ont défini l'interaction de l'amphotéricine B aux lipoprotéines plasmatiques, leurs travaux ont montré que l'amphotéricine B interagit avec le cholestérol des lipoprotéines, et que cette interaction est plus rapide avec les lipoprotéines de basse densité (LDL) qu'avec les lipoprotéines de haute densité (HDL). Aussi l'amphotéricine B lié aux lipoprotéines devient stable, ce qui explique la persistance de l'effet antifongique dans le sang, ou les tissus, pendant des semaines (FIELD, 1970), malgré la décomposition rapide de cet agent dans les milieux et les tampons.

I. Effet de l'addition des HDL à l'antifongique :

Dans notre travail, nous avons combiné l'amphotéricine B ou l'amphotéricine B-DOC aux HDL avant son injection aux souris. Les mêmes tests de toxicité que ceux effectués dans les parties expérimentales précédentes, ont été repris, mais cette fois-ci, en combinant l'antifongique aux HDL.

I - 1. Effet de la variation de la concentration mère de l'amphotéricine B associé aux HDL :

L'amphotéricine B préparé dans du DMSO aux concentrations mères 10^{-3} M ou 10^{-4} M, est combiné aux HDL (au $\frac{1}{4}$ de leur concentration sérique). Cette préparation est ensuite diluée avec du P.B.S. pour obtenir une concentration finale de 0,1mg/kg.

Les lots de souris testées ont été les suivants :

- Un lot témoin : Les souris ne subissent aucun traitement.
- Un lot contrôle HDL : Les souris sont traitées par les HDL dilués au $\frac{1}{4}$ de leur concentration sérique par du PBS.
- Un lot contrôle DMSO : Les souris sont traitées par le DMSO ; la quantité administrée correspond l'utilisation d'une solution mère d'AmB de 10^{-4} M.
- Un lot test : Les souris sont traitées par l'amphotéricine B issu d'une solution mère de 10^{-3} M, combiné aux HDL.
- Un lot test : Les souris sont traitées par l'amphotéricine B issu d'une solution mère de 10^{-3} M, non combiné aux HDL.
- Un lot test : Les souris sont traitées par l'amphotéricine B issu d'une solution mère de 10^{-4} M, combiné aux HDL.
- Un lot test : Les souris sont traitées par l'amphotéricine B issu d'une solution mère de 10^{-4} M, non combiné aux HDL.

Les résultats sont représentés dans les figures 39 et 40.

❖ Le traitement des souris par l'amphotéricine B à 10^{-3} M combiné aux HDL, entraîne une diminution de la toxicité, qui se traduit par une diminution significative des paramètres rénaux (réduction de 70% pour l'urée, 10% pour le Na^+) en comparaison avec l'amphotéricine B à 10^{-3} M sans HDL (figures 39). Par contre, ce dernier traitement entraîne une hypercréatininémie (figure 39 b) qui n'est pas liée à l'addition des HDL puisque le contrôle HDL seules, donne des résultats qui ne diffèrent pas significativement du témoin.

Les paramètres hépatiques ne changent pas, à l'exception de la TGO qui diminue de 20%. Aucune mort de souris n'a été notée.

❖ Le traitement des souris par l'amphotéricine B à 10^{-4} M combiné aux HDL, réduit significativement la toxicité, et se traduit par un retour des paramètres rénaux aux valeurs du témoin (urée, Na^+ , K^+). L'hypercréatininémie est également observée dans ce cas. Les paramètres hépatiques diminuent significativement par rapport au témoin (figure 40).

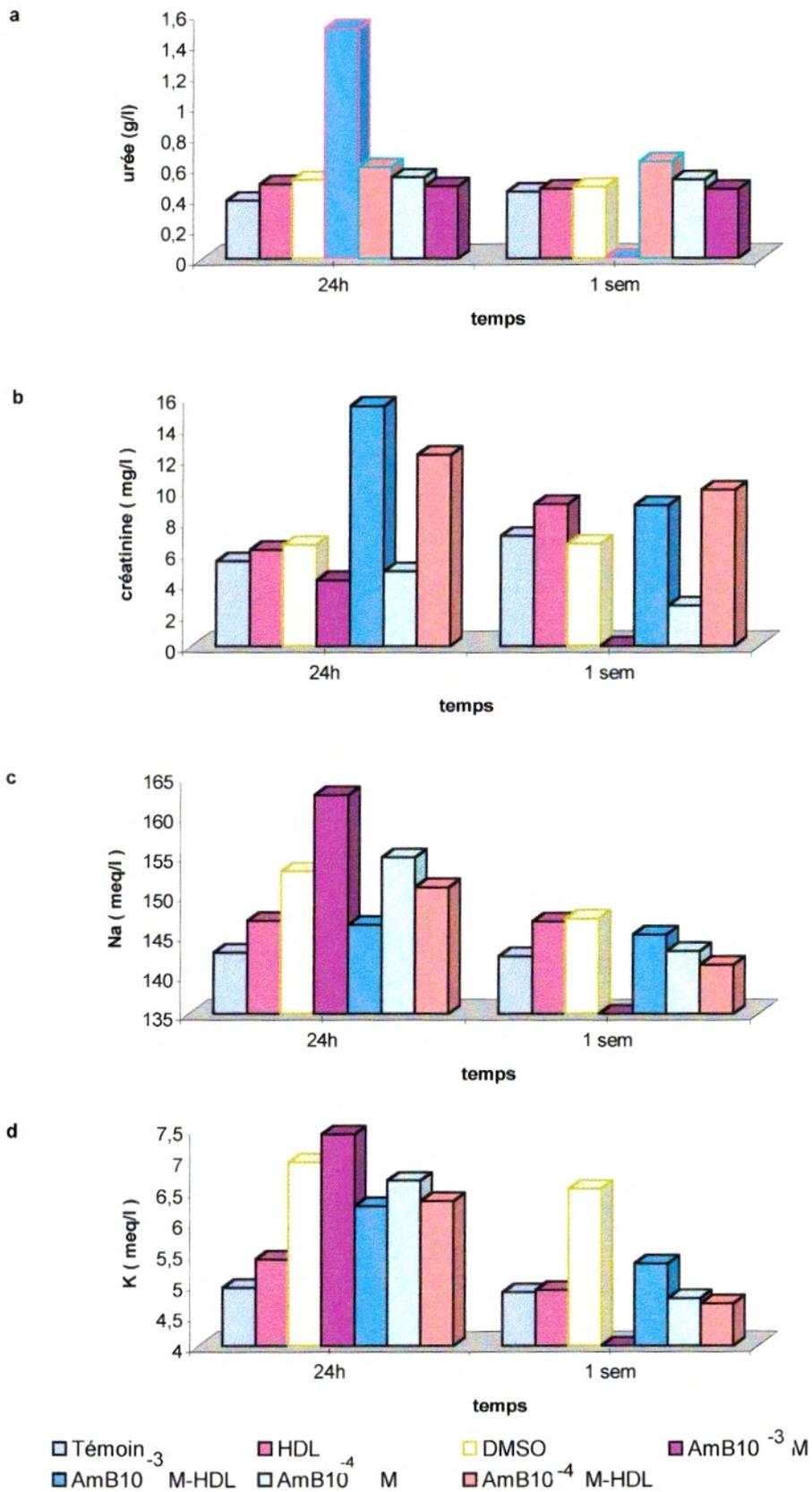


Figure 39: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction de la concentration de la solution mère de l'AmB, lié aux HDL. L'antifongique est préparé dans du DMSO. La dose finale est de 0,1 mg/kg de poids.

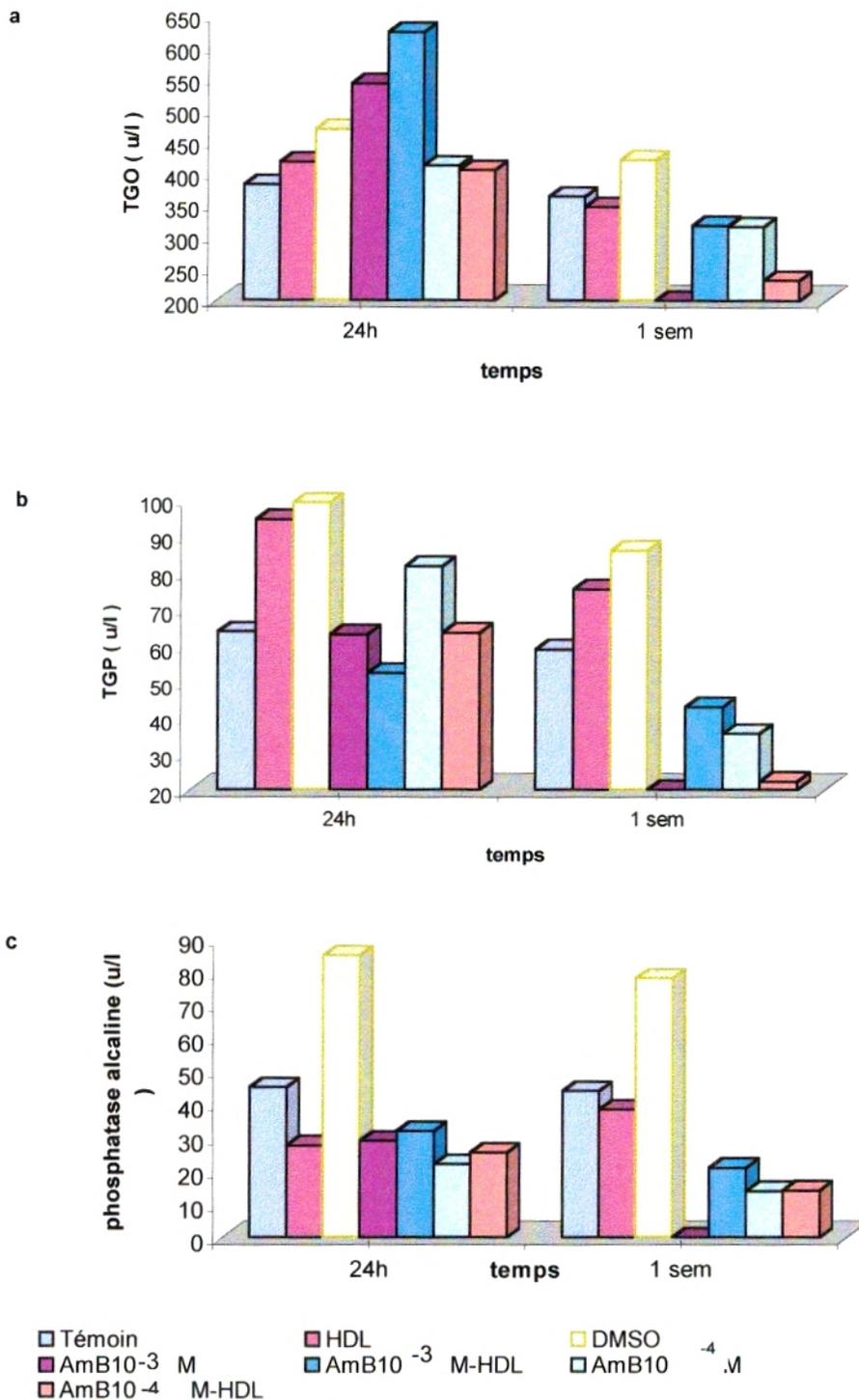


Figure 40: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de la concentration de la solution mère de l'AmB, lié aux HDL. L'antifongique est préparé dans du DMSO. La dose finale est de 0,1 mg/kg de poids.

Nous pouvons conclure que la combinaison de l'amphotéricine B aux HDL, réduit la toxicité. Ces résultats concordent avec ceux de BRAJTBURG et al., 1984-1986 ; de WASAN et al., 1994 ; qui ont trouvé que les HDL protègent les cellules hôtes de la toxicité de l'antifongique.

I – 2. Effet de la variation des doses finales l'amphotéricine B liée aux HDL :

Pour reprendre les mêmes conditions expérimentales que celles qui ont été utilisées dans le chapitre 2, l'amphotéricine B est préparé dans le DMSO à 10^{-4} M. et combiné aux HDL (au $\frac{1}{4}$ de la concentration sérique), ensuite dilué aux doses finales variant de 0,1mg/kg en augmentant par paliers de 0,1mg/kg puis 0,5mg/kg de poids.

Les lots sont :

- Un lot témoin : aucun traitement.
- Un lot contrôle DMSO : souris traitées par DMSO seul à dilué dans le PBS à une quantité équivalente à 10^{-4} M.
- Un lot contrôle HDL : souris traitées par HDL seules diluées dans le PBS au $\frac{1}{4}$ de leur concentration sérique.
- 9 lots tests : souris traitées par l'amphotéricine B à 10^{-4} M lié aux HDL aux doses finales : 0,1-0,2-0,3-0,5-1-1,5-2-2,5 et 3mg/kg de poids.

Bien que des mesures ont été effectuées à 8h, 24h, 48h et 1 semaine (tableau 23 annexe), nous avons choisi de noter à titre d'exemple les mesures 24h et 1 semaine. Les résultats sont rapportés sur les figures 41 et 42.

❖ Aux doses finales 0,1-0,2 et 0,3mg/kg, l'amphotéricine B lié aux HDL, n'entraîne pas une différence significative des paramètres rénaux et hépatiques, par rapport à l'amphotéricine B seul. A partir de 0,5mg/kg, la protection par les HDL est marquée, l'urée diminue de 37% par rapport à l'amphotéricine B seul, et tous les paramètres retournent aux valeurs témoins à partir de 24h.

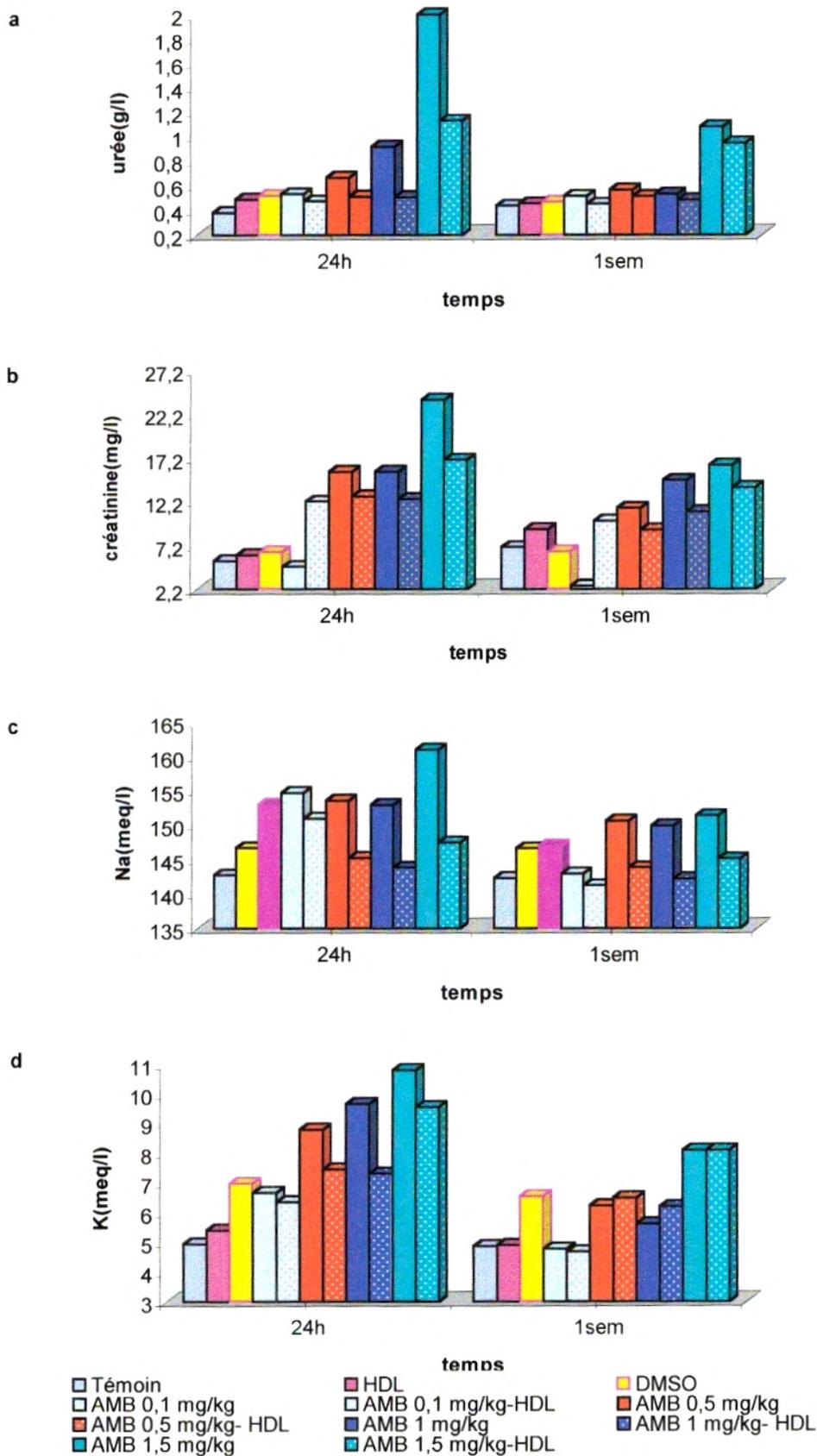


Figure 41: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction de la dose finale d'AmB, lié aux HDL.

La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M.

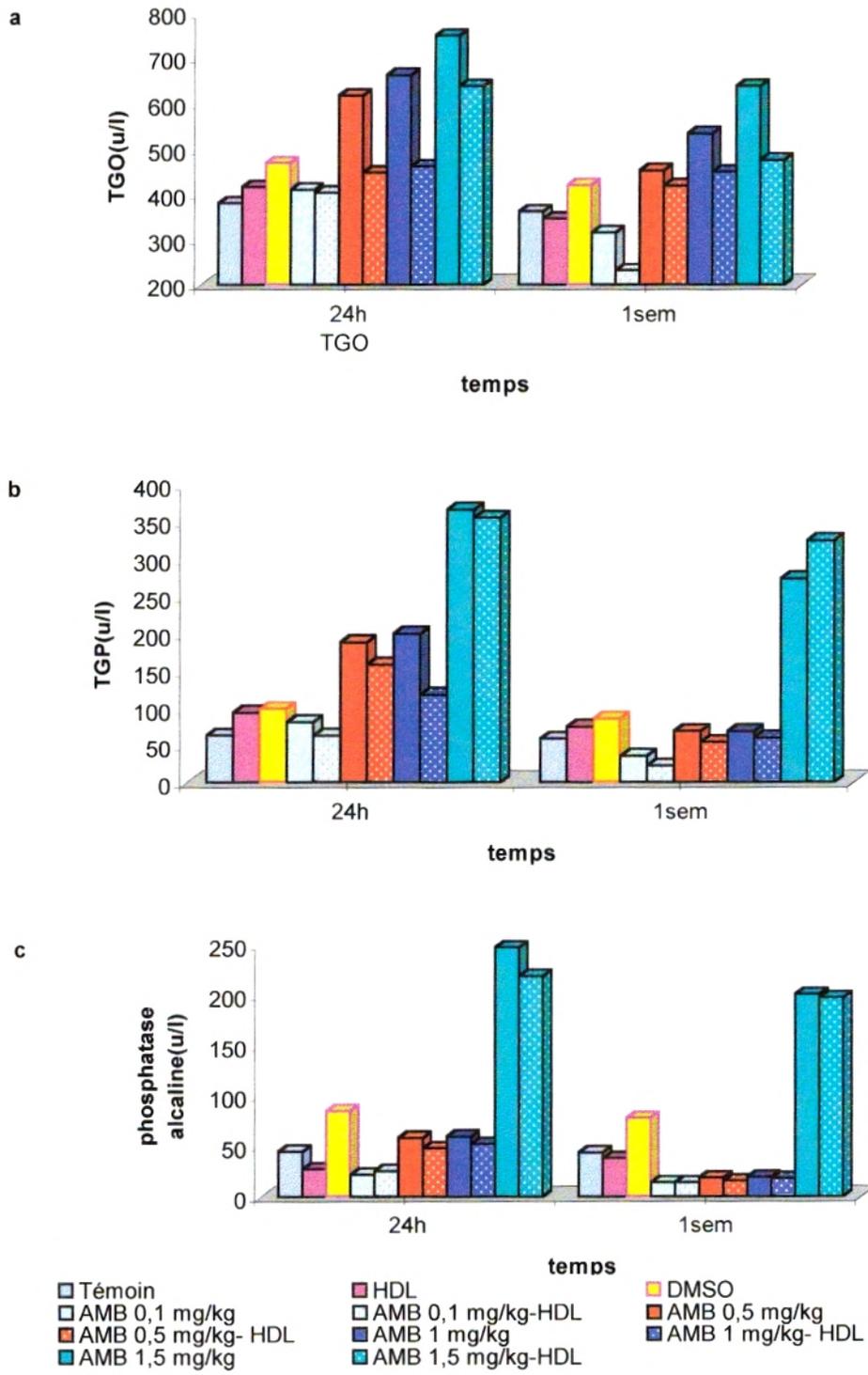


Figure 42: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de la dose finale d'AmB, lié aux HDL.
 La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M.

❖ Pour la dose de 1mg/kg, la diminution de la toxicité est plus marquée, elle est d'environ 53% pour l'urée à 8h, le taux des paramètres rénaux et hépatiques retournent aux normes entre 24h et une semaine. A 1,5 mg/kg, nous remarquons également une diminution de la toxicité par rapport à l'amphotéricine B seul (environ 30% pour l'urée), mais l'ensemble des paramètres restent significativement élevés par rapport au témoin (aux alentours de +20%).

❖ A 24h, les doses finales de 2mg/kg et 2,5mg/kg entraînent la mort de 70% des souris, tandis que la dose de 3mg/kg est létale à 100%: alors que la létalité observée avec l'amphotéricine B seul était de 100% à 24h pour les trois doses finales.

L'addition des HDL dans ce cas permet une réduction de la toxicité par rapport à l'amphotéricine B seul. Cependant, l'augmentation de la dose limite tolérée n'est pas possible et est maintenue à 1mg/kg, car la dose finale de 1,5mg/kg présente une toxicité considérable même en présence des HDL.

Pour les doses 2-2,5 et 3mg/kg la protection par les HDL n'est pas significative. Nous pouvons supposer qu'il n'y a qu'une partie des molécules d'amphotéricine B qui s'est combinée aux HDL, l'autre partie étant libre a été fixée aux cellules animales et internalisée, ce qui a induit la toxicité cellulaire.

La LD₅₀ est pour la dose finale 2mg/kg de :

- 2,22 mg/kg pour le traitement par l'AmB seul.
- 2,75 mg/kg pour le traitement par l'AmB combiné aux HDL.

I – 3. Effet du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'antifongique lié aux HDL :

Comme dans le chapitre 3, les trois solvants utilisés sont le DMSO, l'éthanol à 30% et le sérum physiologique pour la préparation de l'amphotéricine B et l'amphotéricine B-DOC, à une concentration de 10^{-3} M, et une dose finale de 1mg/kg de poids.

❖ Les résultats représentés dans les figures 43 et 44 pour l'amphotéricine B-HDL, indiquent une réduction de la toxicité. En considérant le point urée 8h, la diminution par rapport à l'amphotéricine B seul est de 36% pour le DMSO, 17% pour l'éthanol, et de 15% pour le sérum physiologique. De plus, nous ne notons aucune

mort à une semaine à l'inverse du traitement par l'amphotéricine B seul. Dans un ordre croissant de toxicité nous avons le sérum physiologique, l'éthanol, et enfin, le DMSO.

❖ - Pour l'amphotéricine B-DOC-HDL (figures 45 et 46), la réduction des paramètres rénaux et hépatiques est significative par rapport à l'amphotéricine B-DOC seul. Après 8 heures de temps, l'urée diminue de 10% pour les solutions préparées dans le DMSO, de 13% pour les solutions préparées l'éthanol, et de 27% pour les solutions réalisées avec le sérum physiologique. L'amphotéricine B-DOC-HDL réagit de la même manière aux solvants que l'amphotéricine B-DOC, le DMSO demeure le solvant le plus toxique, et le sérum physiologique le solvant le moins toxique.

Il ressort de cette partie expérimentale, que quelle que soit la nature du solvant, les lipoprotéines de haute densité (HDL) réduisent la toxicité de l'amphotéricine B et l'amphotéricine B-DOC.

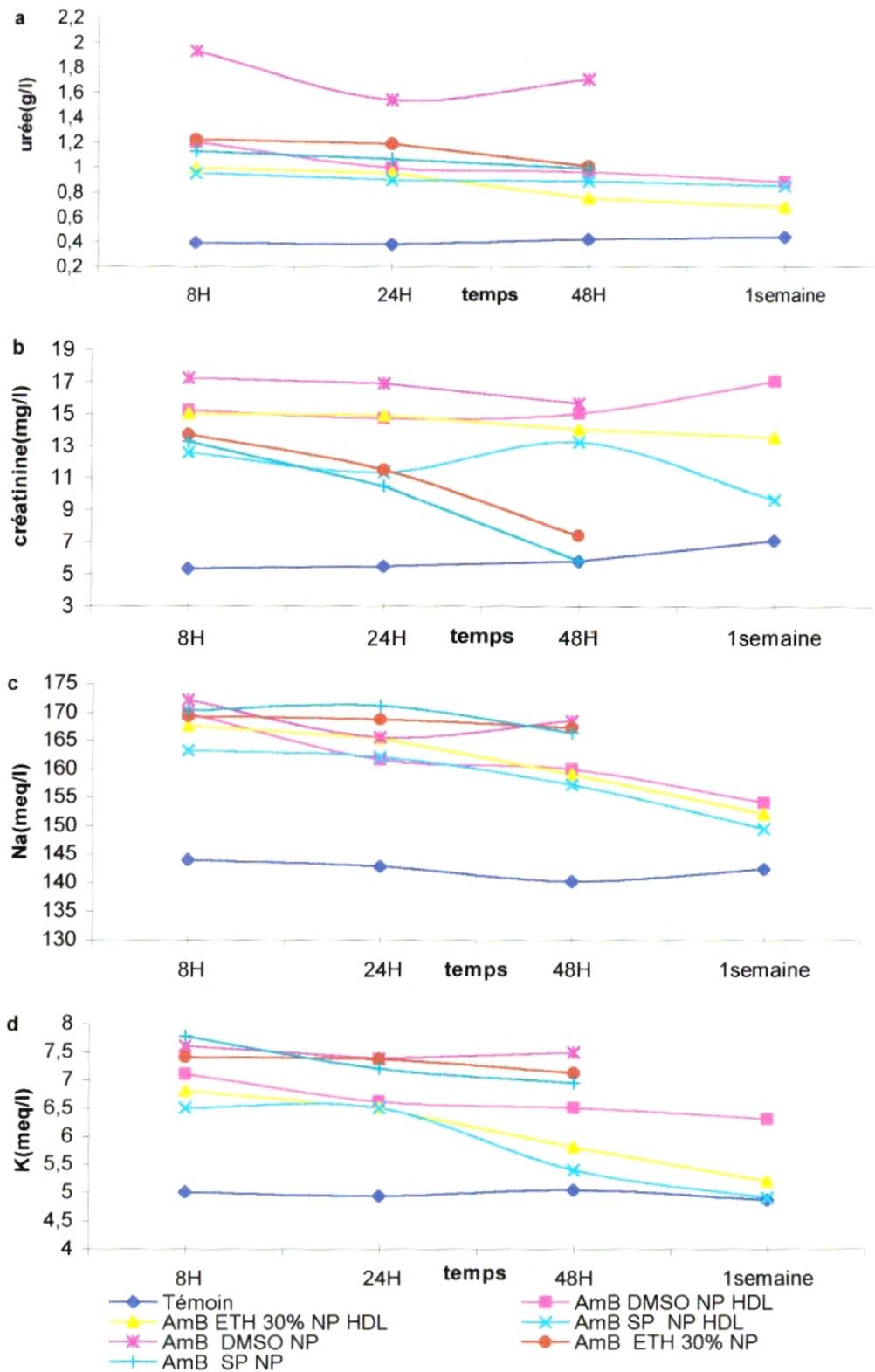


Figure 43: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AmB seul, lié aux HDL. La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M.

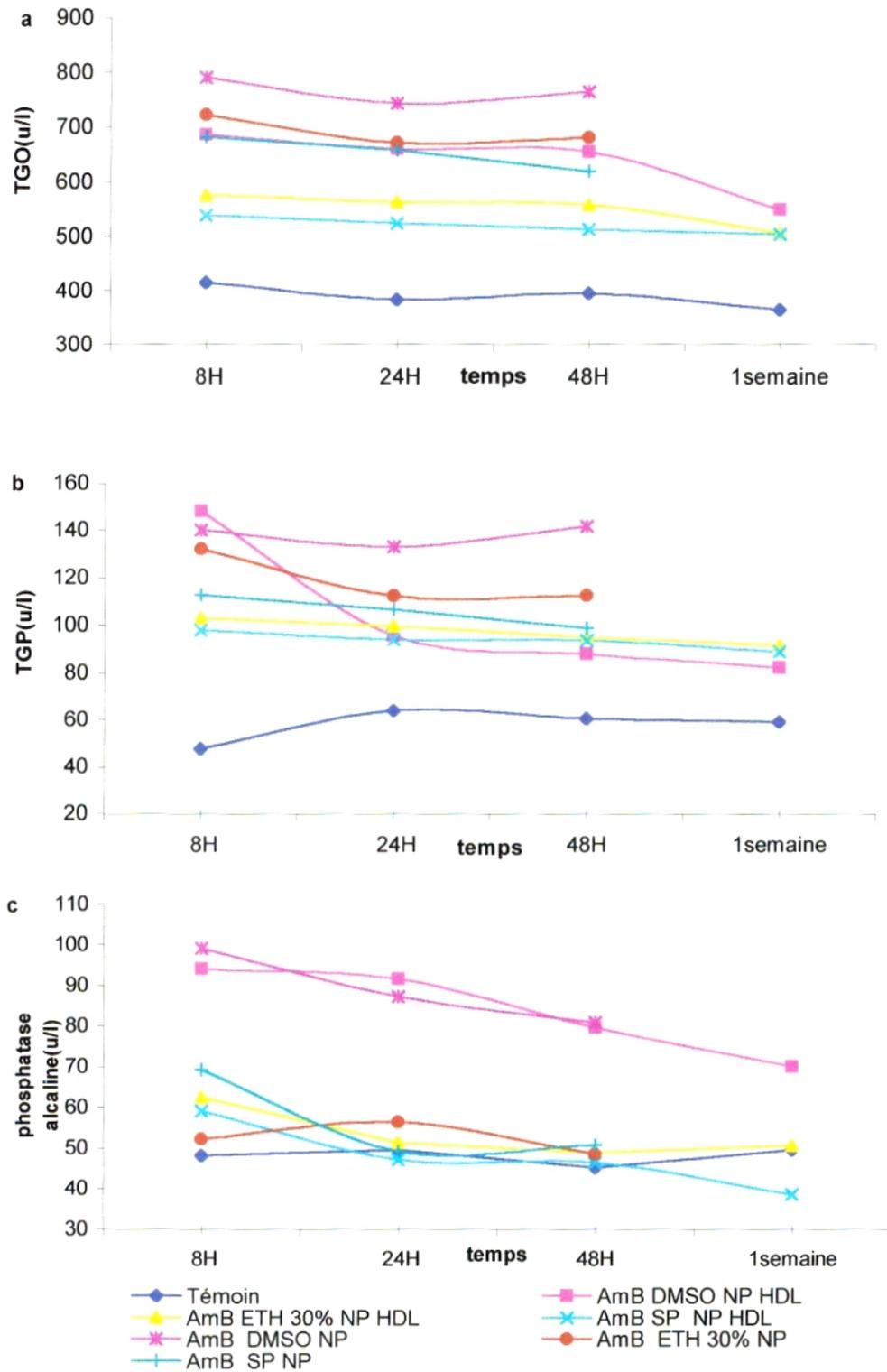


Figure 44: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AmB seul, lié aux HDL. La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M.

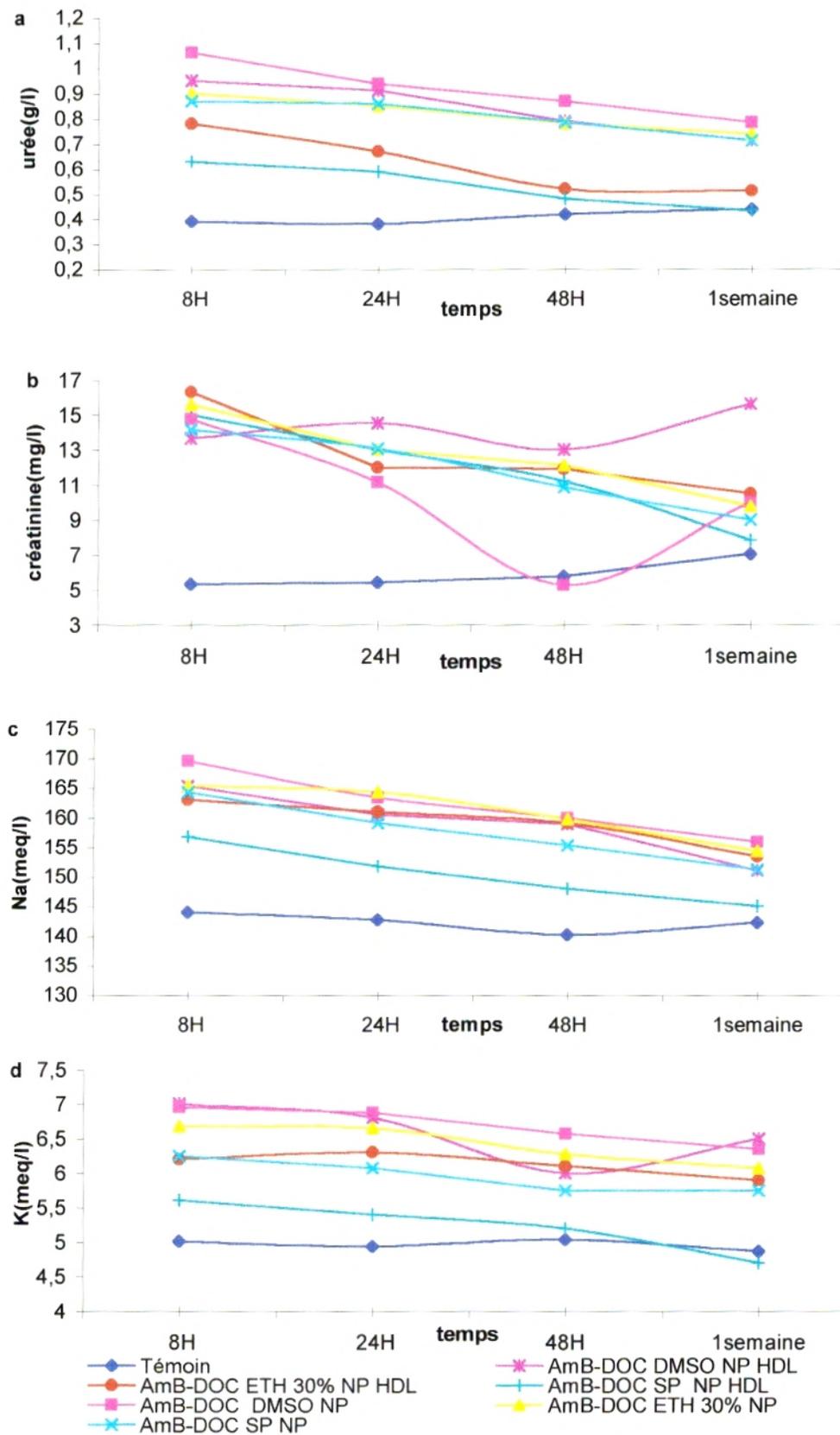


Figure 45: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AmB-DOC, lié aux HDL. La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M.

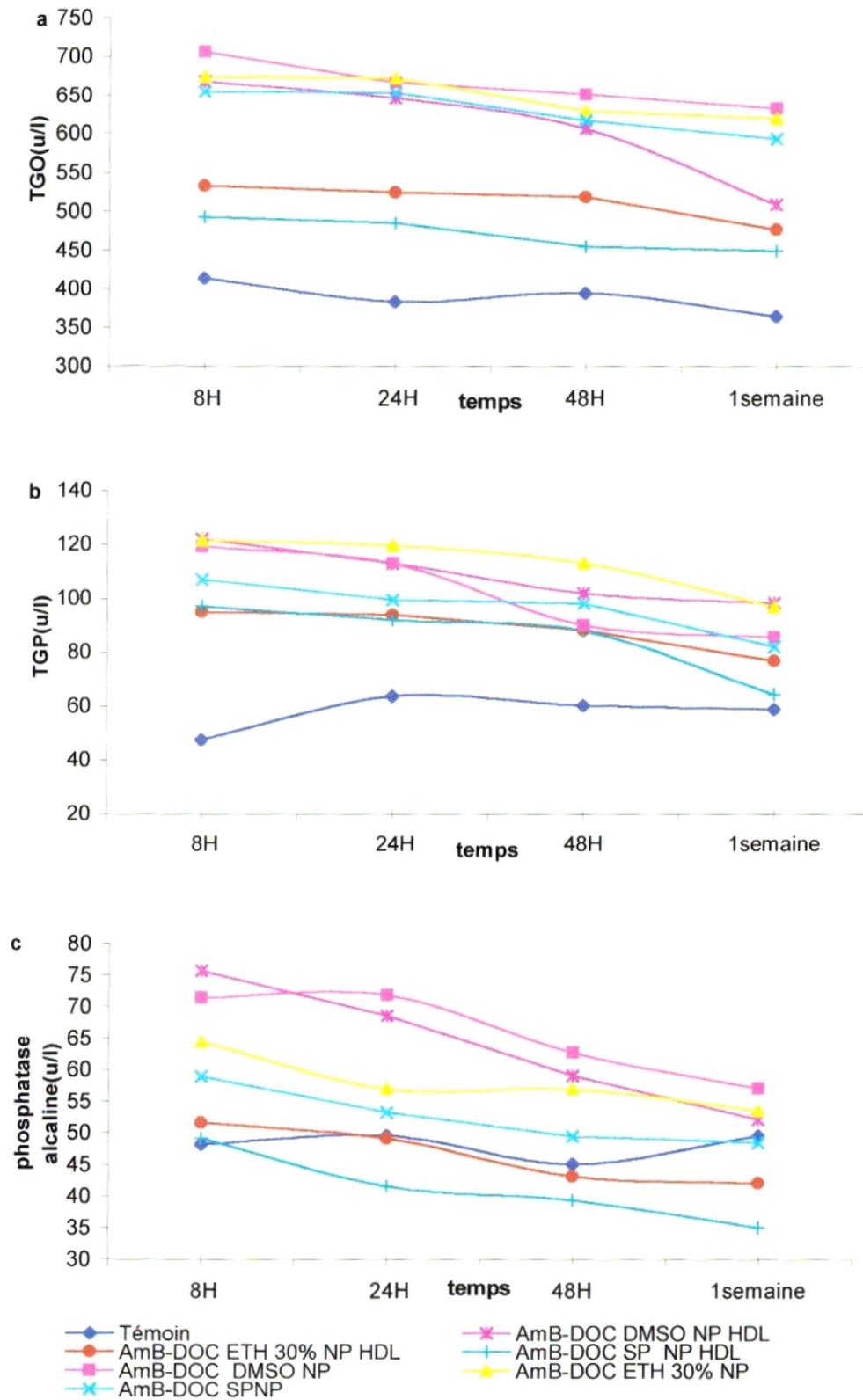


Figure 46: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du solvant utilisé pour la préparation de la solution d'AmB-DOC, lié aux HDL. La solution mère est préparée dans du DMSO, à 10^{-4} M.

I - 4. Effet du préchauffage de la solution mère d'antifongique liée aux HDL :

Nous avons vu antérieurement (chapitre 5) que la combinaison de plusieurs conditions favorables réduit davantage la toxicité de l'antifongique. Dans ce chapitre, il s'agit de voir si l'addition des HDL à ces mêmes formulations, réduit encore plus la toxicité. Pour cela, nous avons repris les mêmes conditions expérimentales du chapitre 5 en ajoutant aux différentes formulations les HDL natives au $\frac{1}{4}$ de leur concentration sérique.

Nous avons obtenu les lots tests suivants :

- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans l'éthanol à 30%, NP, lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans l'éthanol à 30%, NP.
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans le sérum physiologique, NP, lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans le sérum physiologique, NP.
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans l'éthanol à 30%, P à 70°C, lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans l'éthanol à 30%, P à 70°C.
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans le sérum physiologique, P à 70°C, lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-3} M, préparé dans le sérum physiologique, P à 70°C.
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans l'éthanol à 30%, NP, lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans l'éthanol à 30%, NP.
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans le sérum physiologique, NP, lié aux HDL natives.

- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans le sérum physiologique, NP.
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans l'éthanol à 30%, P à 70°C , lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans l'éthanol à 30%, P à 70°C .
- Lot test : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans le sérum physiologique, P à 70°C , lié aux HDL natives.
- Lot contrôle : Solution mère d'AmB à 10^{-4} M, préparé dans le sérum physiologique, P à 70°C .

La dilution se fait dans du PBS à une dose finale de 1 mg/kg de poids.

Les mêmes conditions sont reprises avec l'amphotéricine B-DOC-HDL.

Les résultats sont rapportés sur les figures 47- 48- 49 et 50 pour l'AmB pur, et les figures 51- 52- 53 et 54 pour l'AmB-DOC.

❖ Pour l'amphotéricine B-HDL provenant de la solution mère 10^{-3} M (figures 47 et 48), les paramètres rénaux et hépatiques sont significativement élevés par rapport au témoin, mais les souris survivent au delà d'une semaine, inversement au traitement par l'amphotéricine B à 10^{-3} M seul (figures 15 et 16) où les souris meurent à une semaine. L'amphotéricine B de la solution mère 10^{-3} M, non préchauffée et liée aux HDL, est plus toxique que l'amphotéricine B à 10^{-3} M, préchauffé et lié aux HDL. Aux différents temps de mesures, le préchauffage réduit par rapport à l'AmB non préchauffé, l'urée (figure 47 a) de 35%, et les enzymes hépatiques (figure 48 courbes a, b, c) de 10 à 20%.

❖ Avec l'amphotéricine B de la solution mère 10^{-4} M, lié aux HDL (figures 49 et 50), les paramètres rénaux et hépatiques, ne diffèrent pas significativement des paramètres obtenus après traitement par l'AmB de la solution mère 10^{-4} M, sans HDL (figures 17 et 18). Ceci est dû au fait que ces derniers sont proches des valeurs témoins.

❖ Pour l'amphotéricine B de la solution mère 10^{-4} M, préchauffé, lié aux HDL

l'ensemble des paramètres biologiques retournent aux valeurs témoin entre 24h et une semaine à l'exception de la créatinine qui est plus sensible et qui reste élevée de +30% par rapport au témoin.

L'addition des HDL à l'amphotéricine B-DOC n'entraîne pas une diminution des paramètres biologiques dosés.

❖ A 10^{-3} M (figures 51 et 52), les paramètres biologiques sont élevés pour la solution non préchauffée et moins élevés pour la solution préchauffée. Cette réduction varie de 30 à 70%, ce qui est identique au taux de la réduction des paramètres dosés après traitement par l'amphotéricine B-DOC de la solution 10^{-3} M, non préchauffée et sans HDL, par rapport au traitement par l'amphotéricine B-DOC de la solution 10^{-3} M, préchauffée et sans HDL (figures 19 et 20). Les paramètres de la solution AmB-DOC à 10^{-4} M lié aux HDL retournent aux valeurs témoin au bout d'une semaine (figures 53 et 54).

Nous déduisons de cela que l'addition des HDL aux formulations utilisant les conditions les plus favorables (concentration de la solution mère à 10^{-4} M, utilisation du sérum physiologique comme solvant, préchauffage de la solution mère à 70°C , doses finales injectées allant de 0,1 à 1mg/kg de poids), dans le cas où le traitement par des formulations de l'AmB n'induit pas une différence significative par rapport au témoin, l'addition des HDL n'entraîne aucune modification des paramètres biologiques. En revanche, elle pourrait maintenir cette diminution de la toxicité, en rendant la molécule plus stable. Par ailleurs, l'addition des HDL aux formulations toxiques entraîne une réduction de la toxicité relative aux conditions expérimentales.

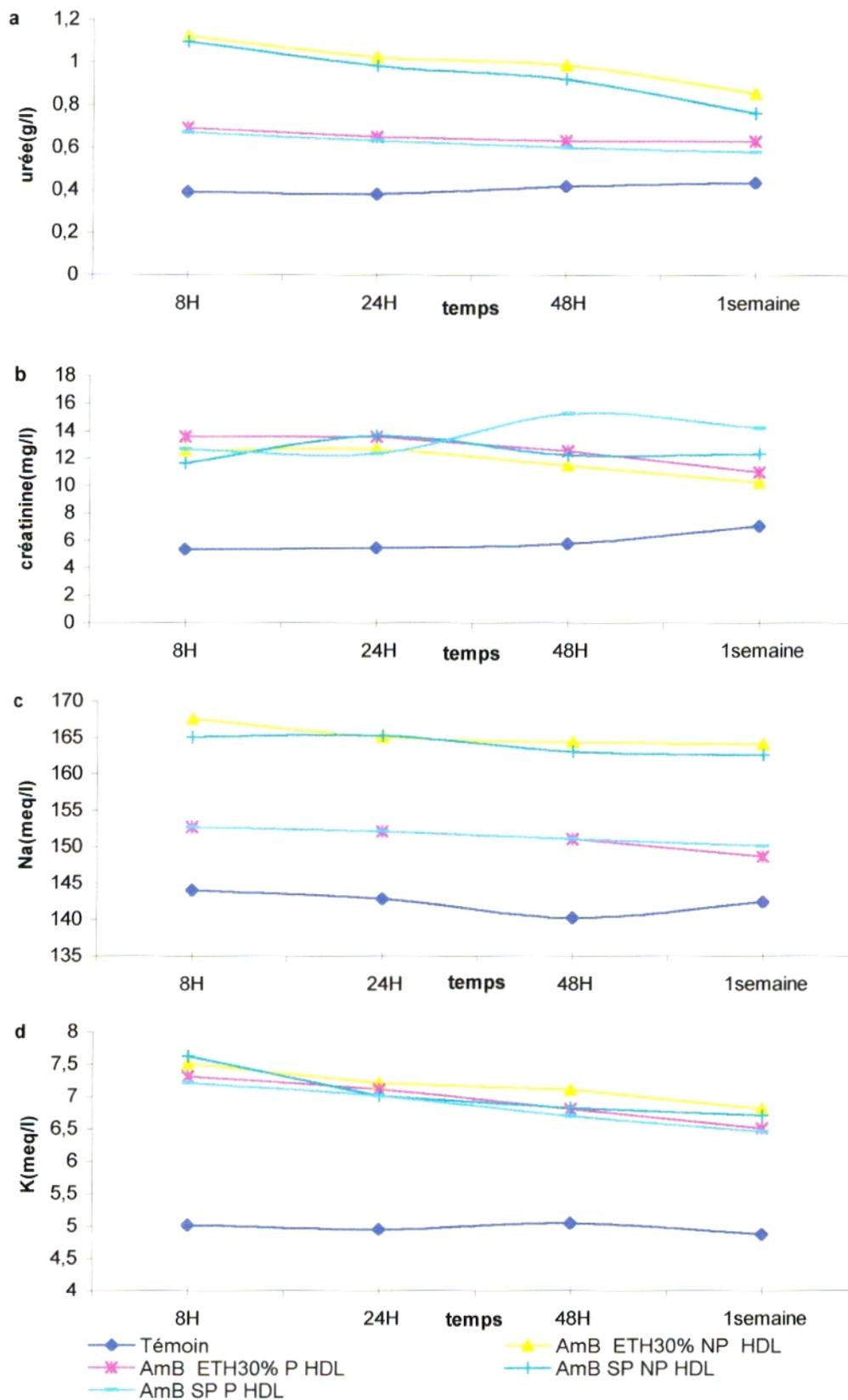


Figure 47: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, $10^{-3}M$, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

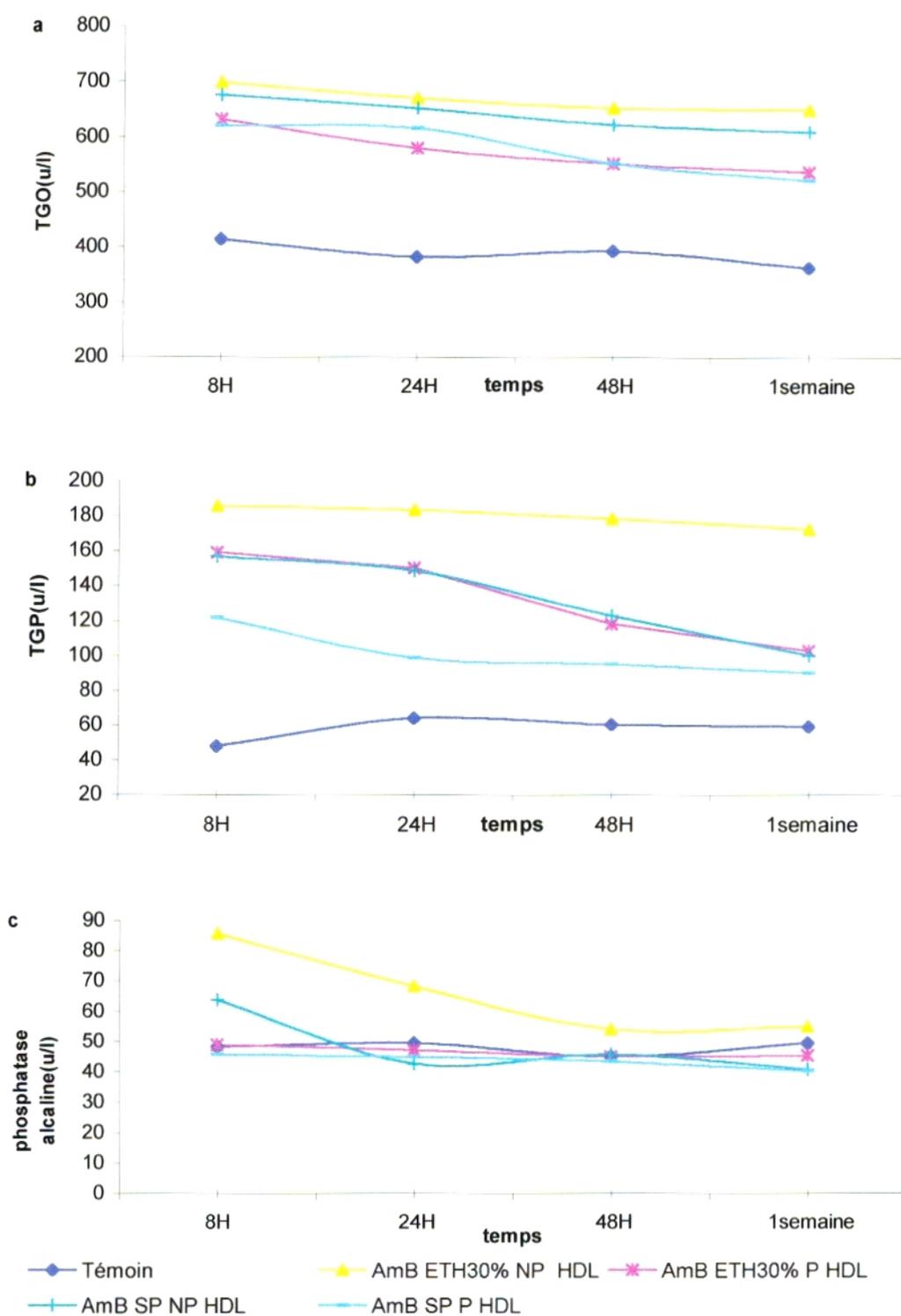


Figure 48: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction de du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, $10^{-3}M$, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

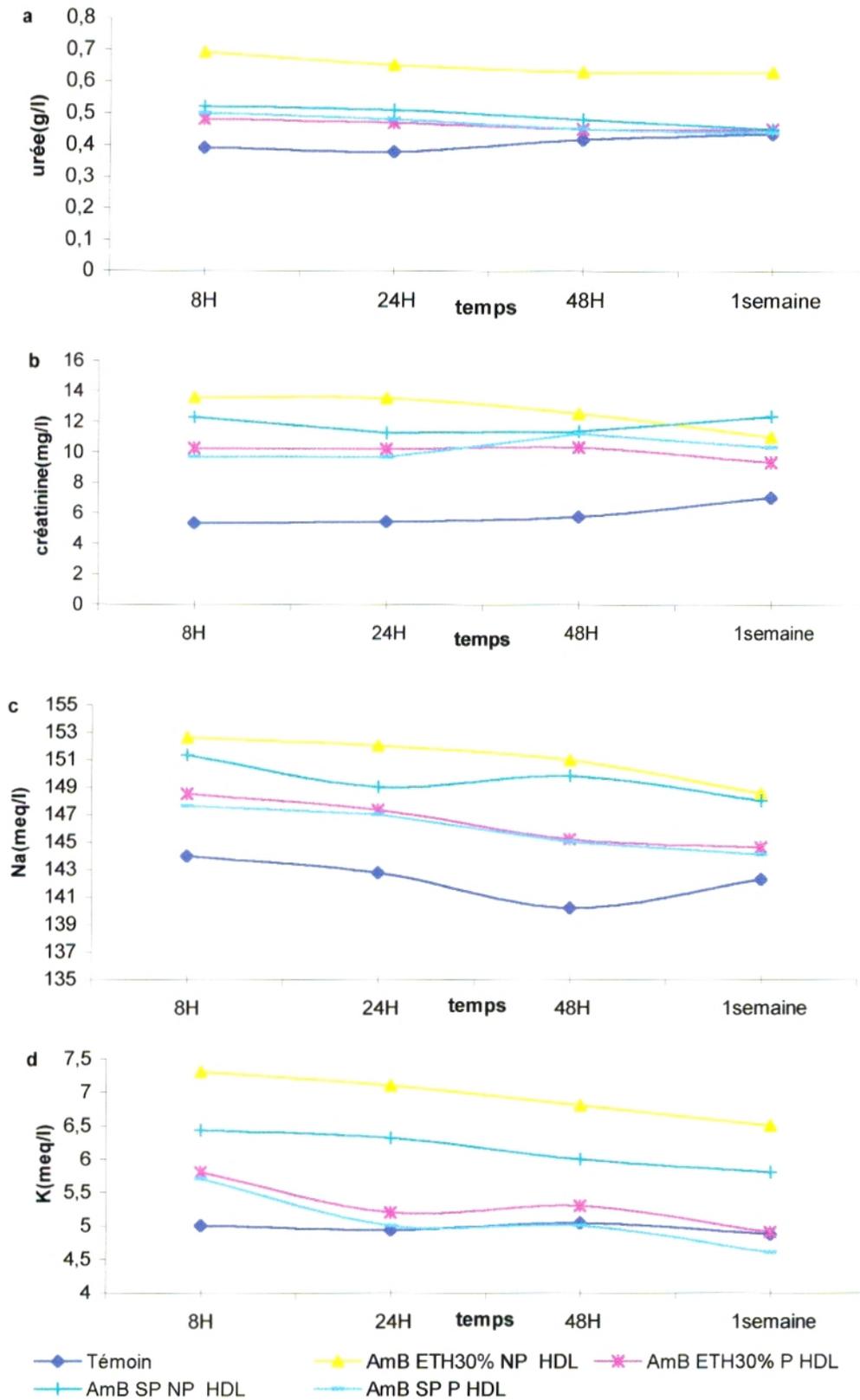


Figure 49: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, 10^{-4} M, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

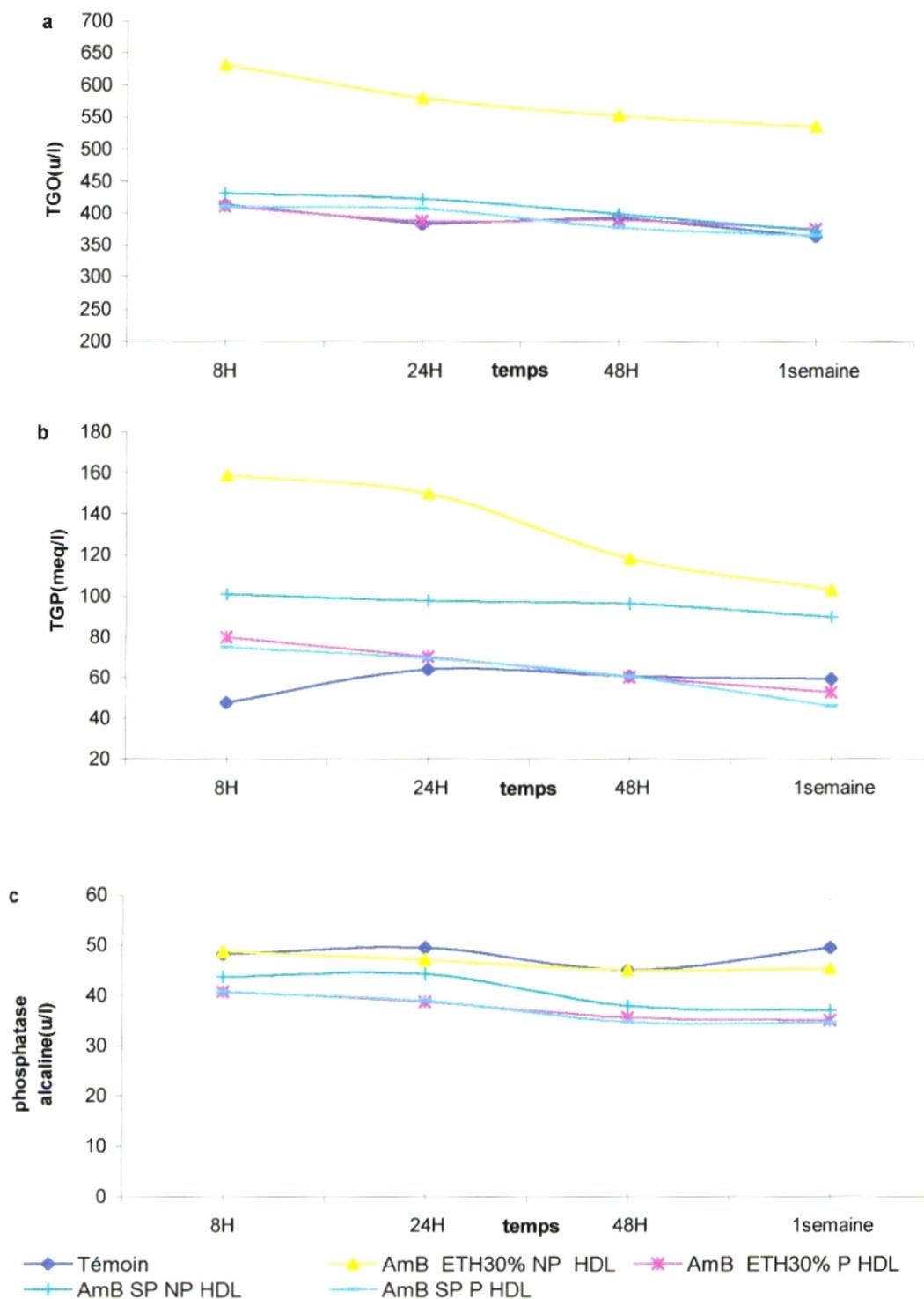


Figure 50: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB seul, 10^{-4} M, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

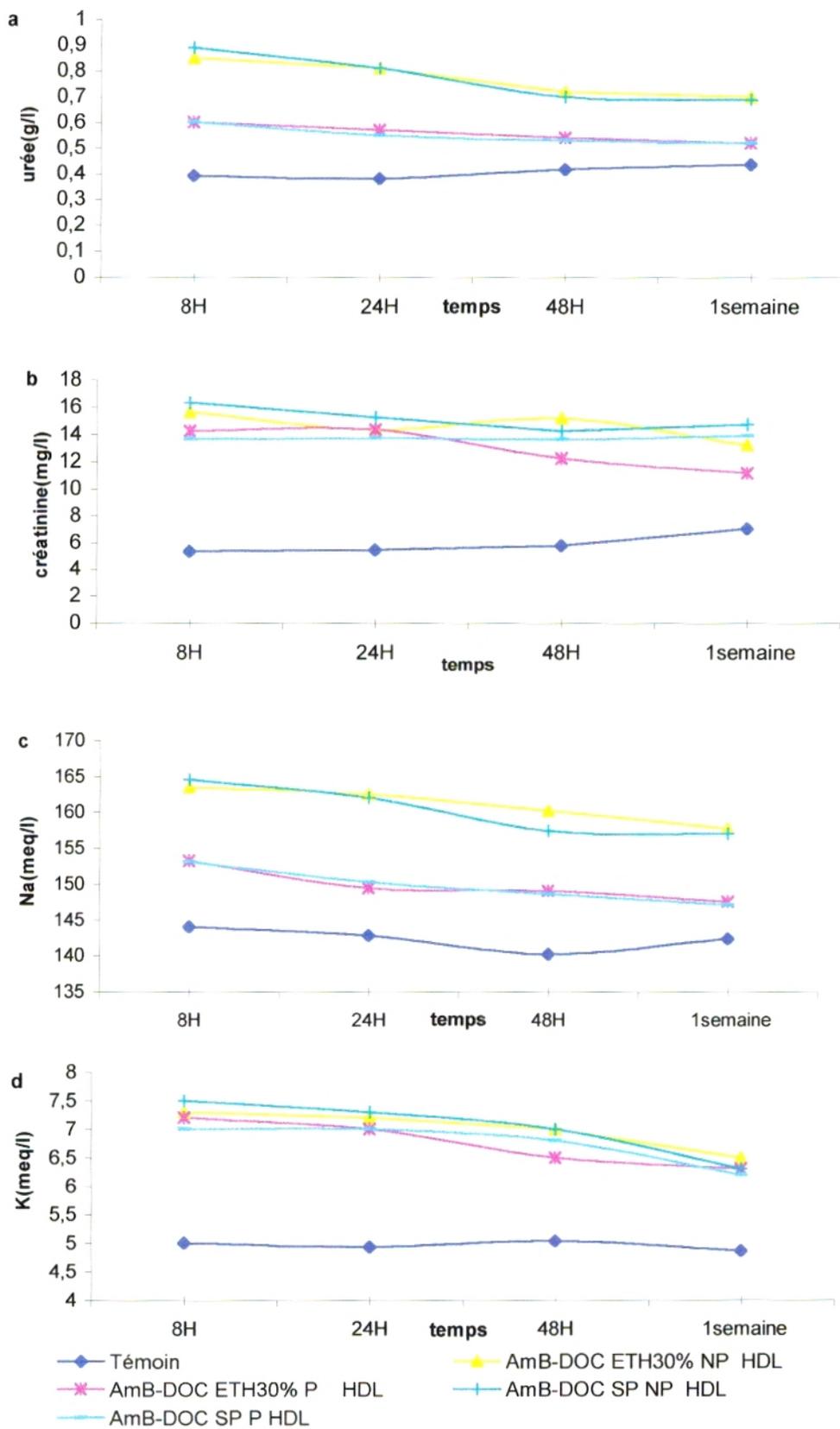


Figure 51: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, $10^{-3}M$, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

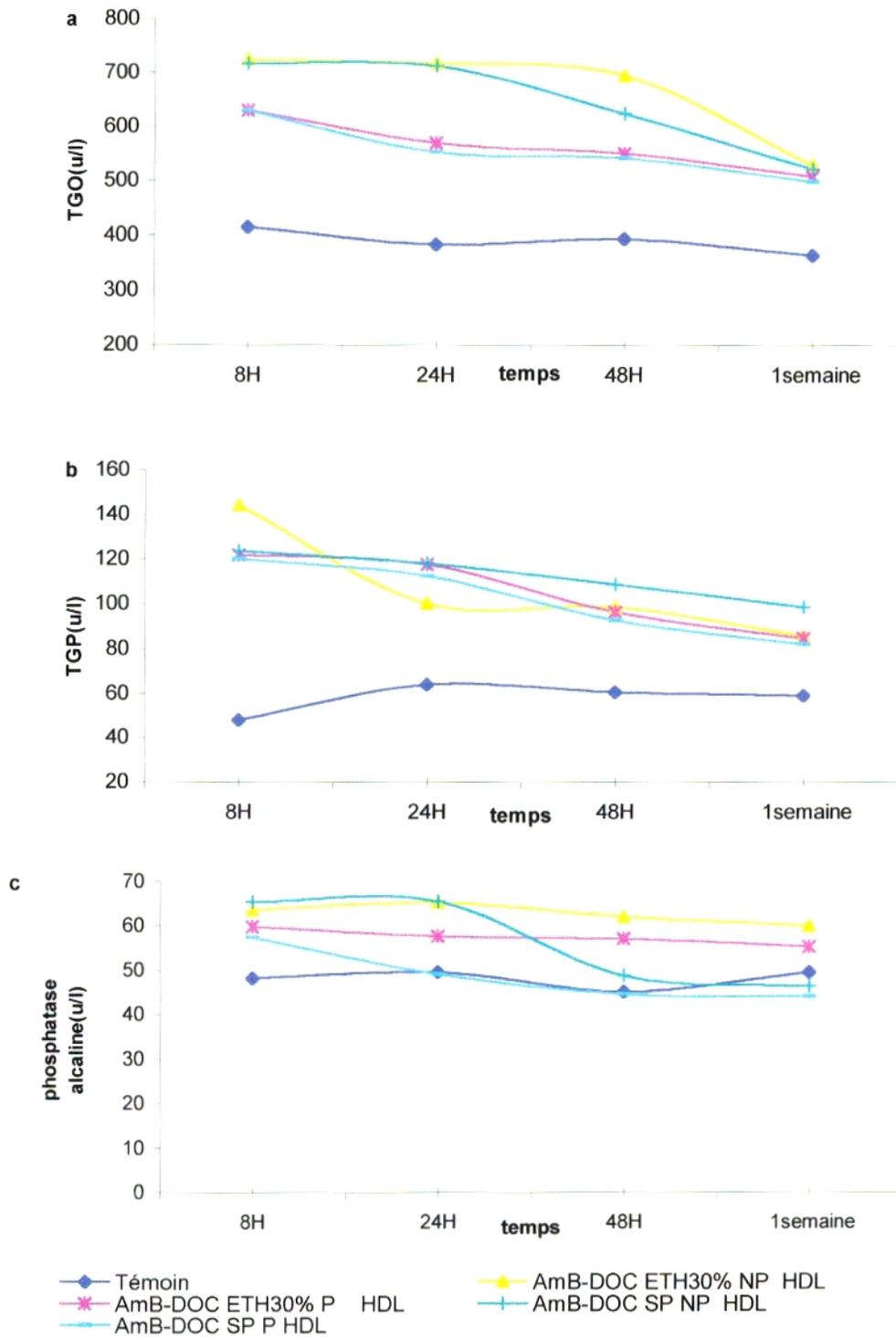


Figure 52: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, 10^{-3} M, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

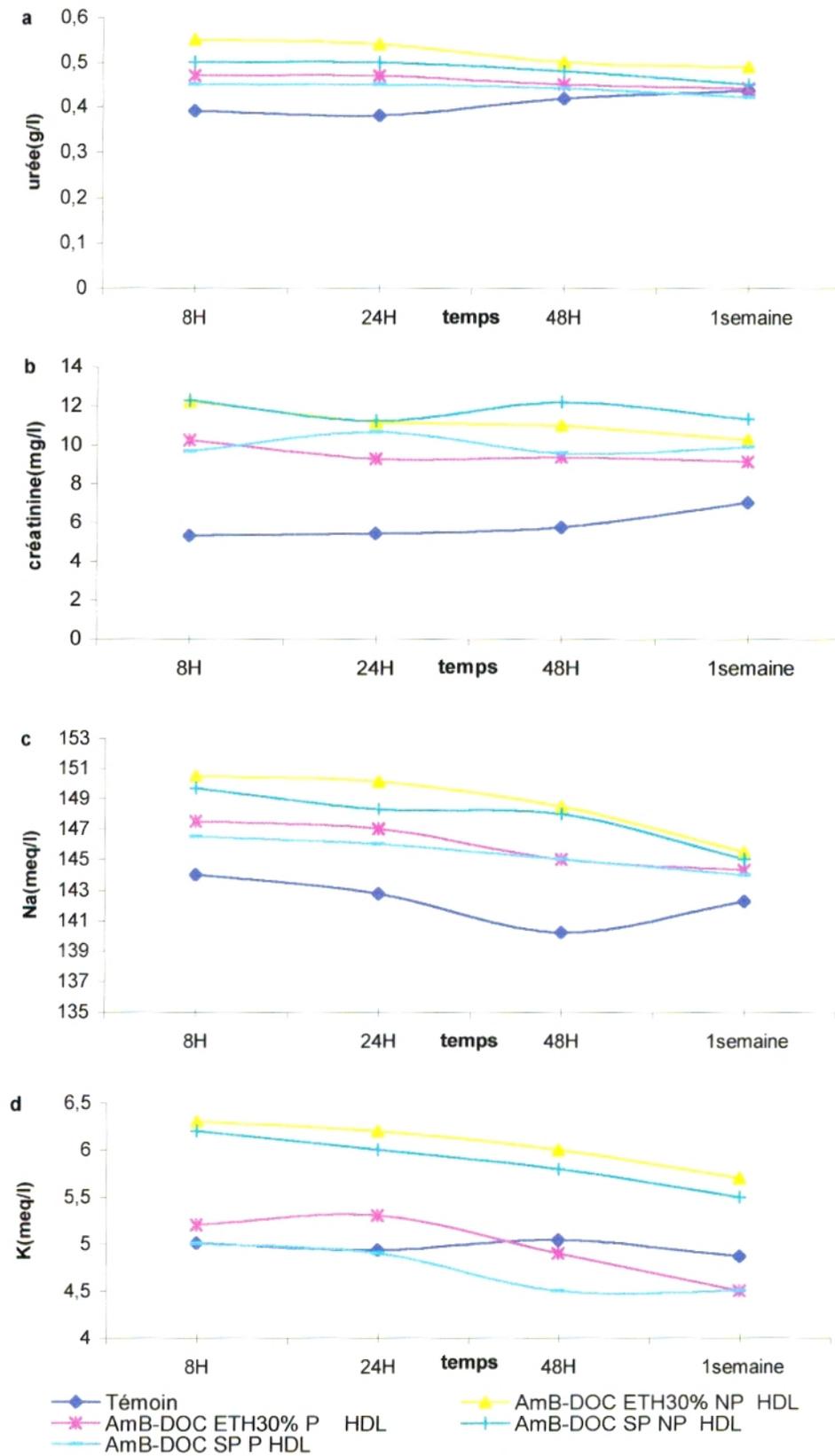


Figure 53: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, $10^{-4}M$, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

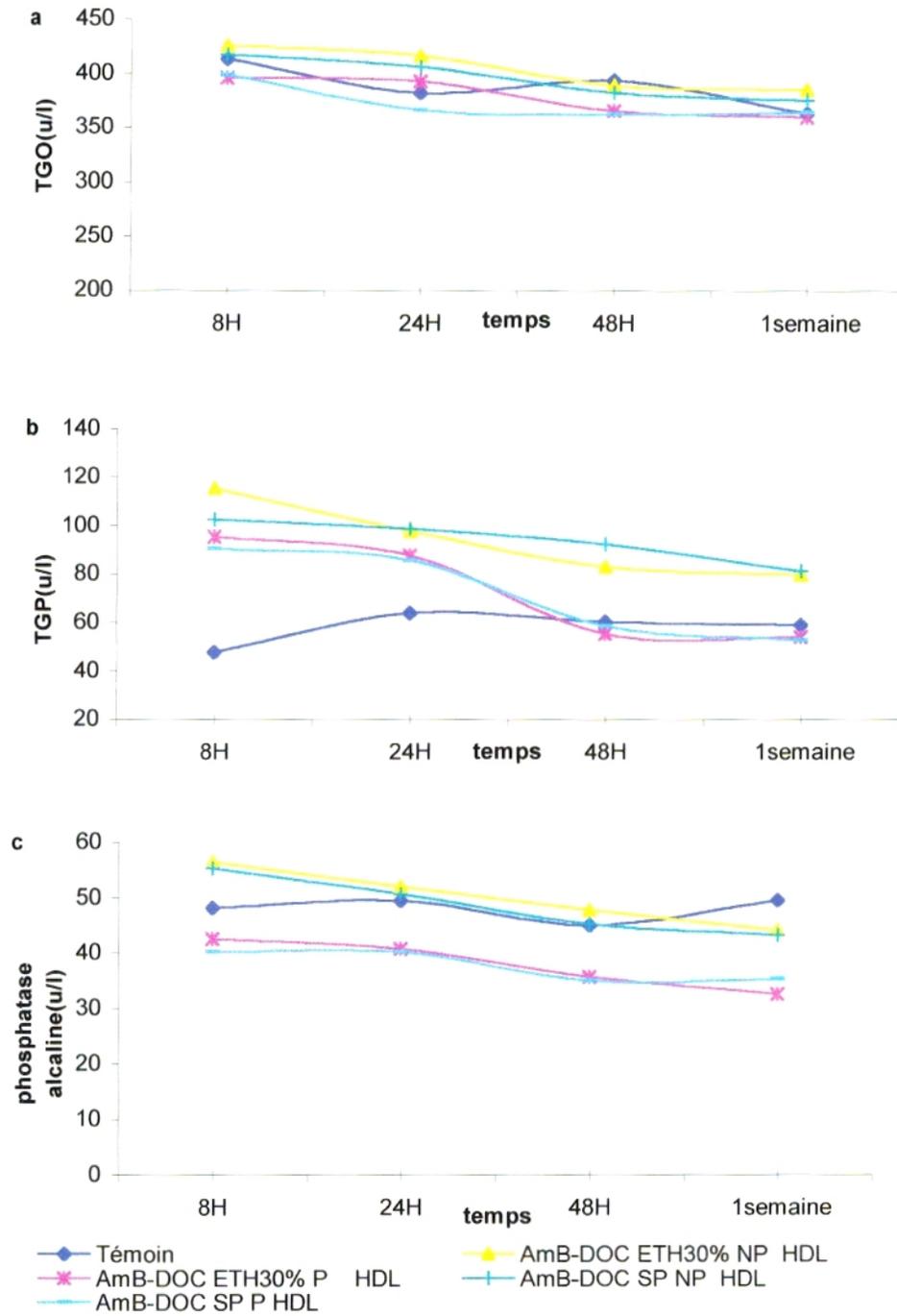


Figure 54: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du préchauffage de la solution mère de l'AmB-DOC, $10^{-4}M$, lié aux HDL, préparé dans deux solvants différents. La dose finale est de 1 mg/kg.

I - 5. Effet des doses finales d'antifongique lié aux HDL :

Dans le chapitre 6, nous avons déterminé les doses létales des formulations les plus favorables à la réduction de la toxicité. Par ailleurs, nous avons obtenu une réduction de la toxicité en ajoutant les HDL. La question est de voir si nous pouvons aller au-delà des doses létales obtenues dans le chapitre 6, si nous ajoutons les HDL à ces mêmes formulations.

Les lots sont :

– 12 lots d'amphotéricine B préparé dans l'éthanol à 30%.

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 0,5 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 1 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 1,5 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 2 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 2,5 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 3 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

– 12 lots d'amphotéricine B préparée dans le sérum physiologique, liée aux HDL, avec les mêmes formulations précédentes.

– 12 lots d'amphotéricine B-DOC

Amphotéricine B-DOC préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 2 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B-DOC préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 2,5 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B-DOC préparé dans l'éthanol, dilué dans le PBS à 2 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B-DOC préparé dans le sérum physiologique, dilué dans le PBS à 2 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B-DOC préparé dans le sérum physiologique, dilué dans le PBS à 2,5 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

Amphotéricine B-DOC préparé dans le sérum physiologique, dilué dans le PBS à 3 mg/kg de poids, NP et P à 70°C, lié aux HDL.

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

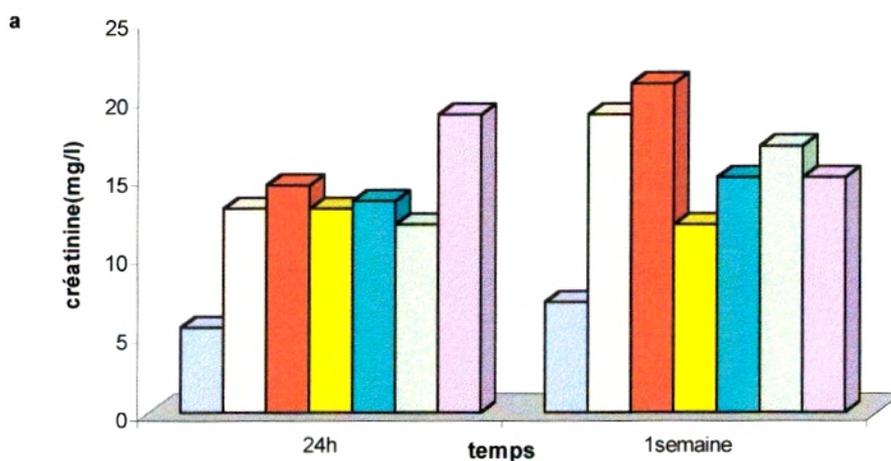
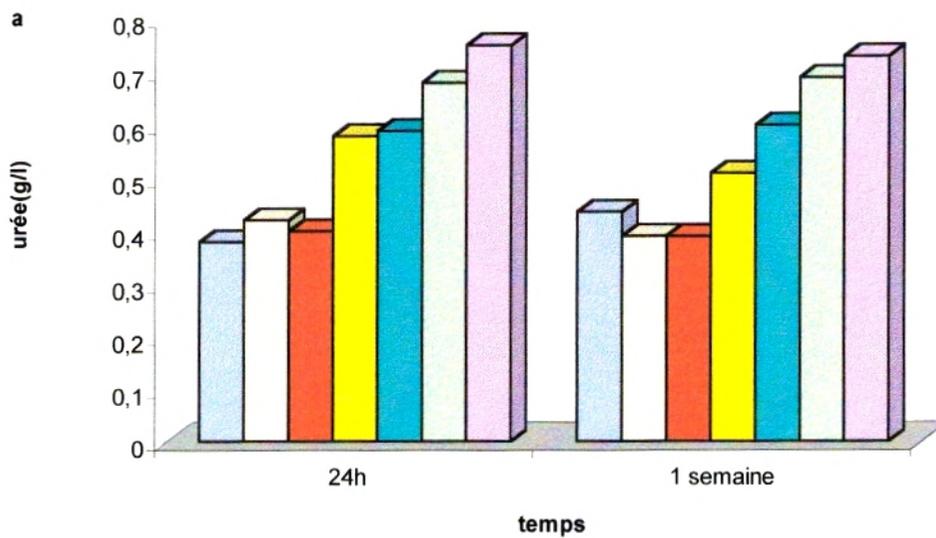
Les résultats sont représentés sur les figures 55 à 62 pour l'amphotéricine B-HDL et les figures 63 à 70 pour l'amphotéricine B-DOC-HDL.

❖ Le traitement par l'amphotéricine B lié aux HDL montre que quelque soit le solvant utilisé (ETH30% ou sérum physiologique), l'amphotéricine B-HDL non préchauffé n'induit pas une augmentation significative de l'urée à 0,5 et 1mg/kg (figures 55, 59 a) ; pour les paramètres hépatiques la dose non toxique va jusqu'à 1,5mg/kg (figures 56,60). Aux doses 2-2,5 et 3mg/kg, les valeurs des paramètres biologiques sont significativement élevées et varient de +30 à +70% par rapport au témoin. L'amphotéricine B préchauffé, préparé dans l'éthanol, lié aux HDL, varie de la même manière, mais les paramètres biologiques sont moins élevés (figures 57, 58) ; avec le sérum physiologique, l'urée et les enzymes hépatiques, ne diffèrent significativement qu'à partir de 2,5mg/kg (figures 59,60). Cette augmentation est de +50 à +70%.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus en utilisant l'amphotéricine B sans HDL (chapitre6), nous remarquons une réduction de la toxicité variant de 10 à 30%, et la dose létale dépasse 3mg/kg de poids, nous ne notons aucune mort des souris..

❖ Les paramètres biologiques mesurés après traitement par l'amphotéricine B-DOC préchauffé ou non, lié aux HDL, diminuent significativement de 10 à 45% par rapport aux paramètres mesurés après traitement par l'amphotéricine B-DOC sans HDL (chapitre6) et ceci, quelque soit le solvant (figures 63 à 70).

L'addition des HDL protège les cellules hôtes et permet ainsi d'augmenter la dose finale. Dans ce chapitre, les résultats montrent que quelque soit la formulation de l'amphotéricine B, l'addition des HDL entraîne pratiquement dans tous les cas, une réduction de la toxicité se traduisant, par une diminution des paramètres rénaux et hépatiques, ou par une absence de la mortalité des souris.



- Témoin
- AmB ETH 1mg/kg NP HDL
- AmB ETH 2mg/kg NP HDL
- AmB ETH 3mg/kg NP HDL
- AmB ETH 0,5mg/kg NP HDL
- AmB ETH 1,5mg/kg NP HDL
- AmB ETH 2,5mg/kg NP HDL

Figure 55: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, non préchauffé, lié aux HDL . (recherche de la dose létale)

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

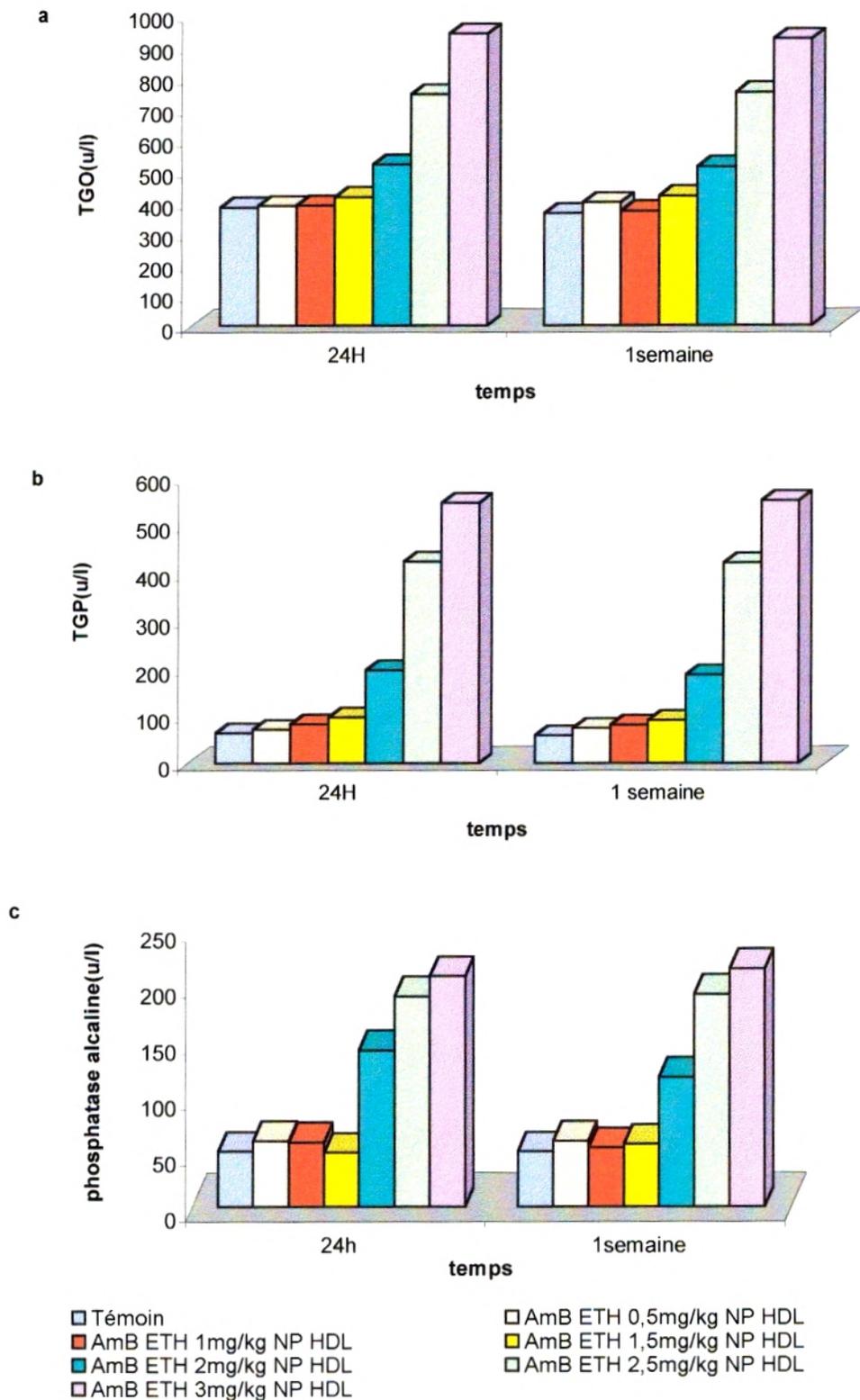
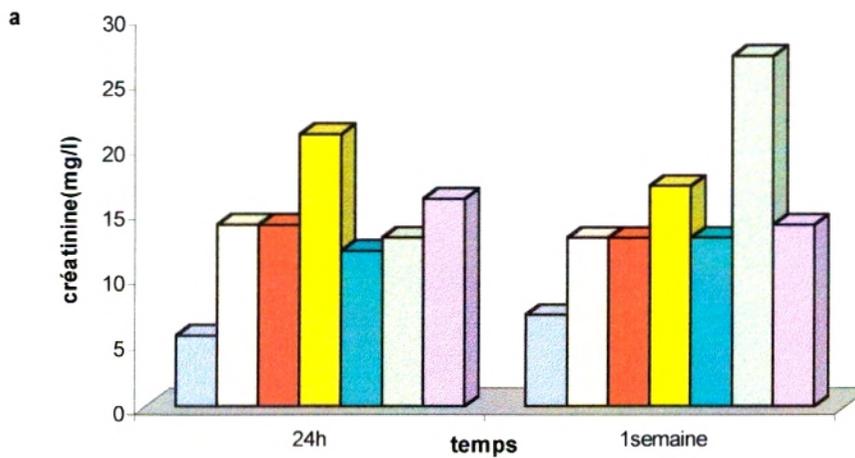
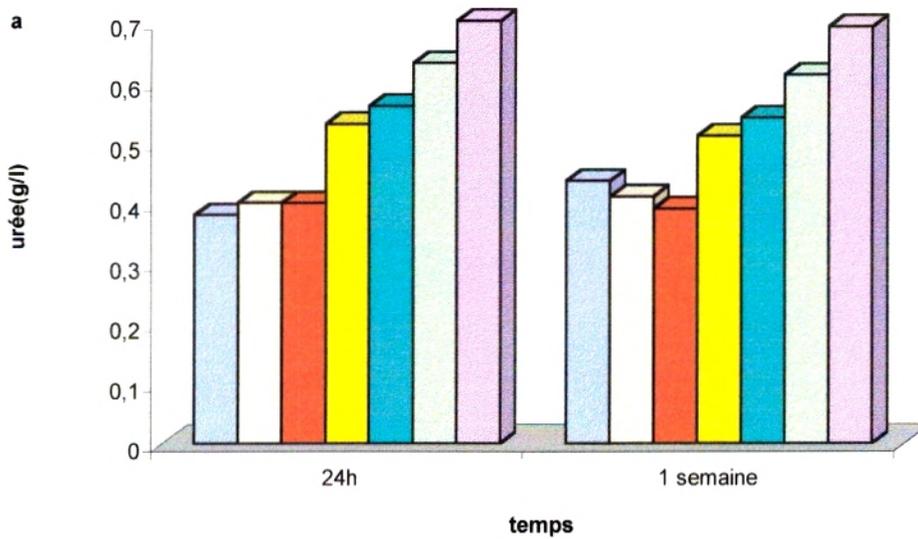


Figure 56: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, non préchauffé, lié aux HDL . (recherche de la dose létale)
 La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.



- Témoin
- AmB ETH 1mg/kg P HDL
- AmB ETH 2mg/kg P HDL
- AmB ETH 3mg/kg P HDL
- AmB ETH 0,5mg/kg P HDL
- AmB ETH 1,5mg/kg P HDL
- AmB ETH 2,5mg/kg P HDL

Figure 57: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, préchauffé, lié aux HDL . (recherche de la dose létale)

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

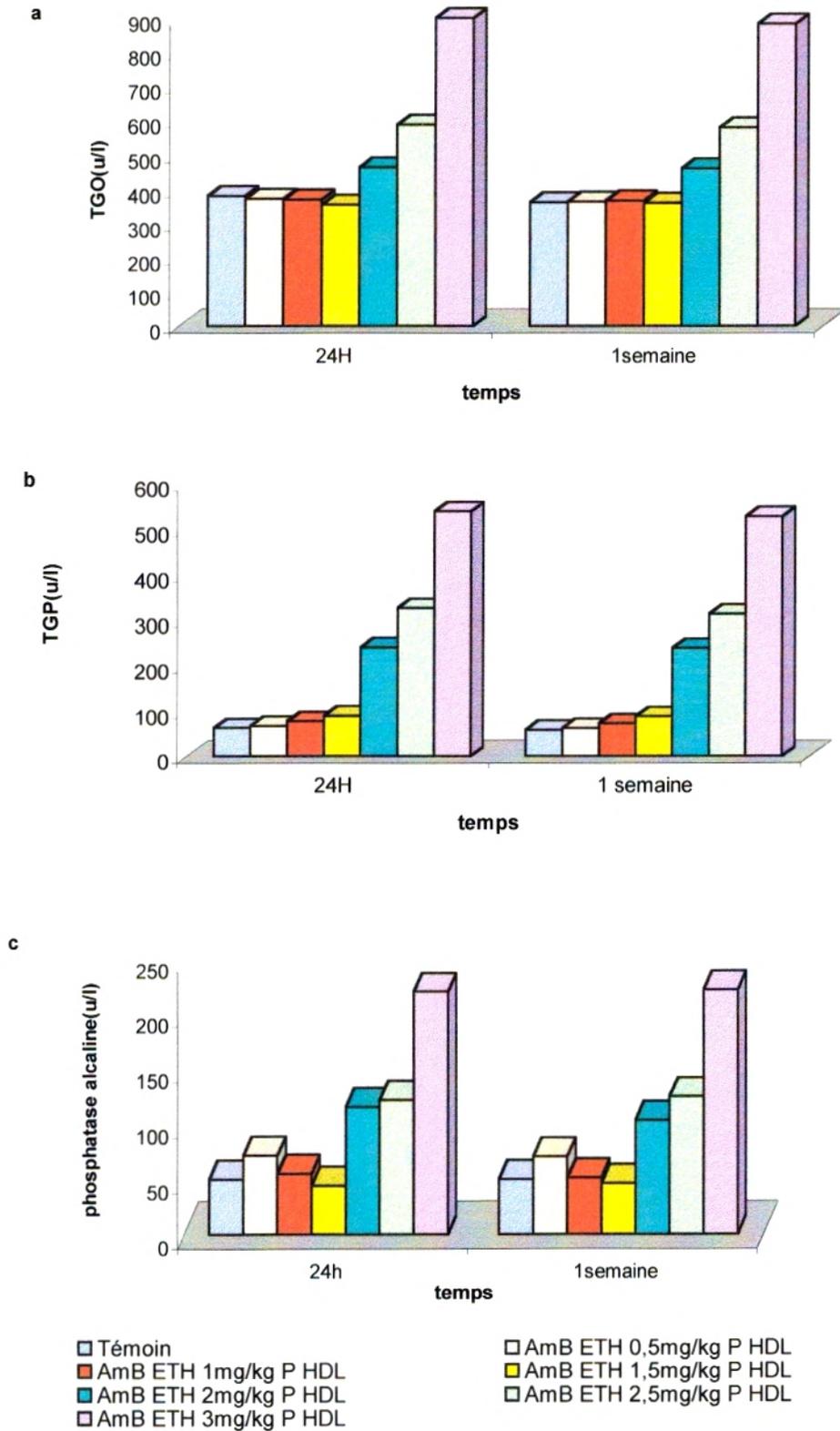
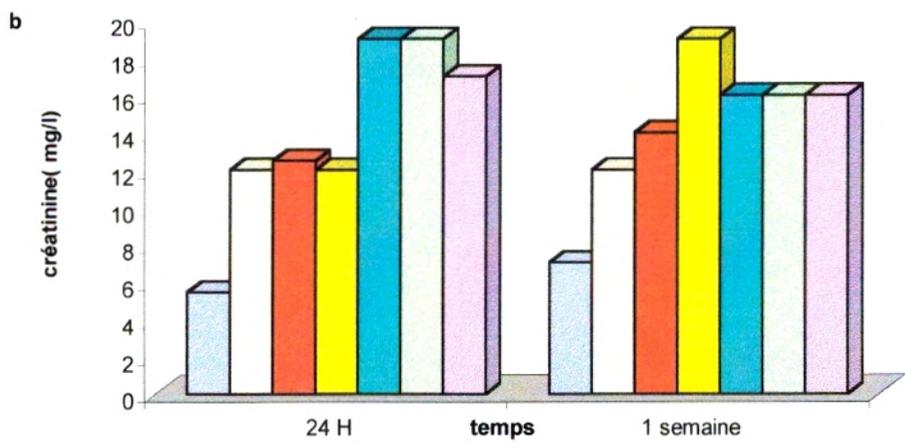
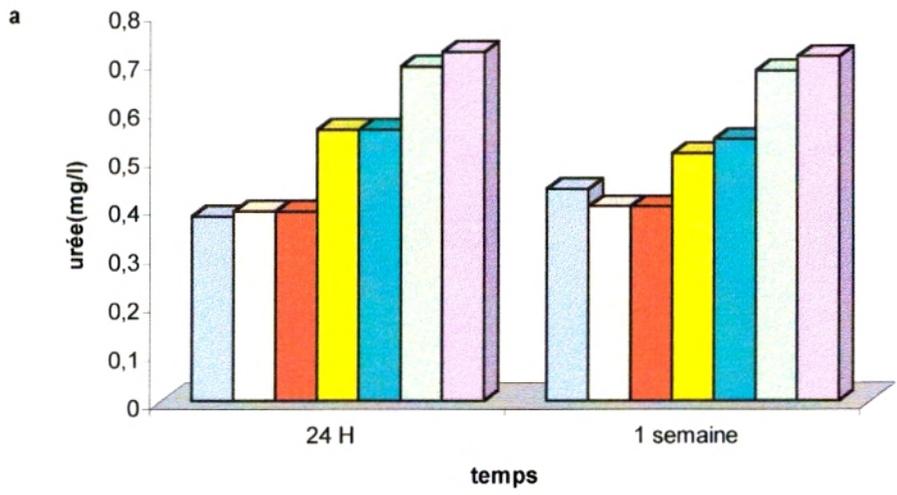


Figure 58: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans l'éthanol, préchauffé, lié aux HDL . (recherche de la dose létale)

La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$.



- Témoïn
- AmB SP 1mg/kg NP HDL
- AmB SP 2mg/kg NP HDL
- AmB SP 3mg/kg NP HDL
- AmB SP 0,5mg/kg NP HDL
- AmB SP 1,5mg/kg NP HDL
- AmB SP 2,5mg/kg NP HDL

Figure 59: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul, préparé dans le sérum physiologique, non préchauffé, lié aux HDL. (recherche de la dose létale).
La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

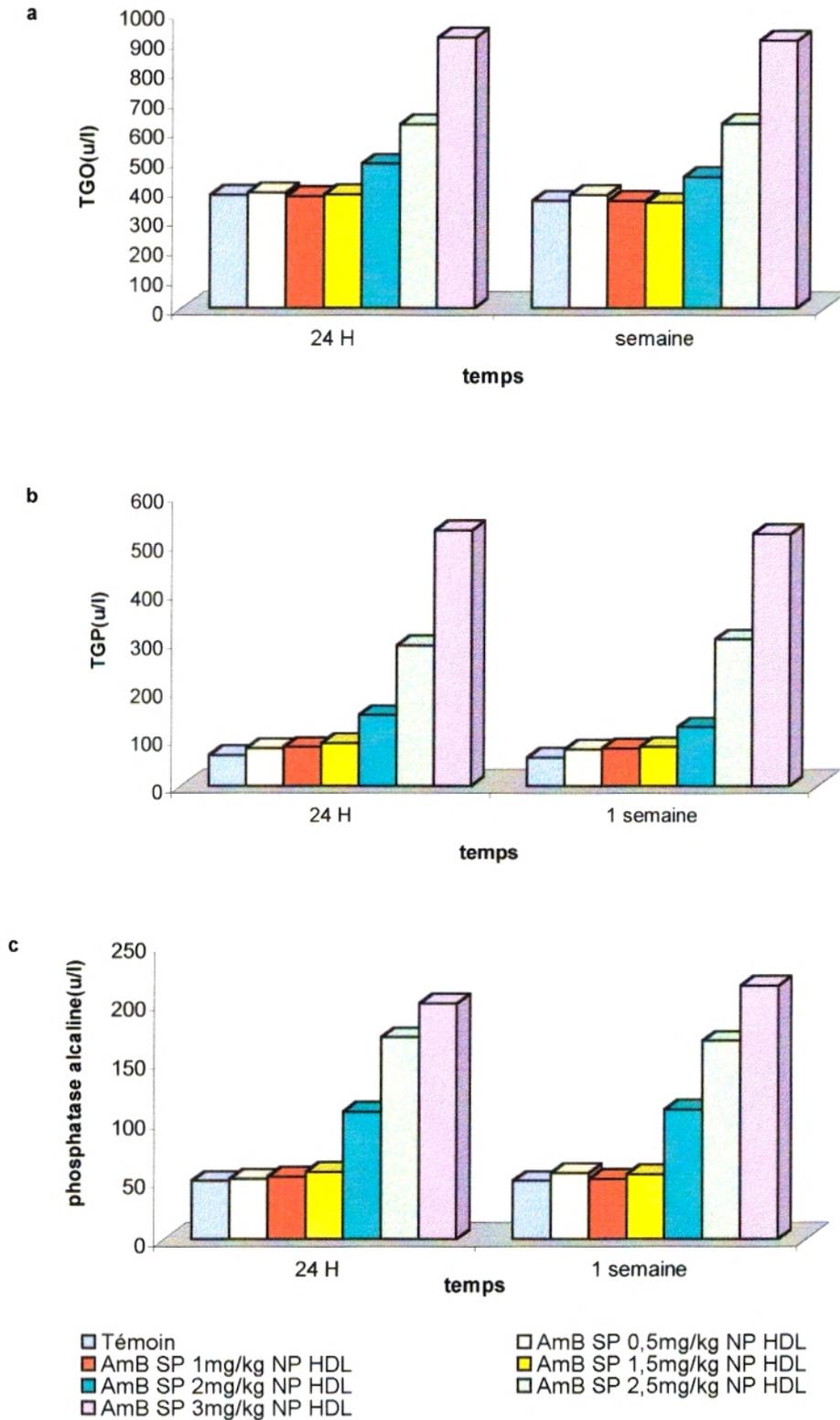
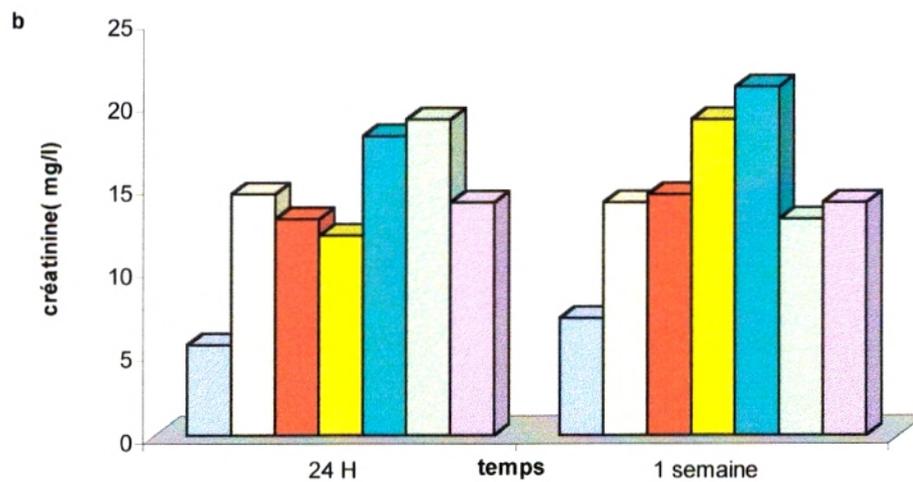
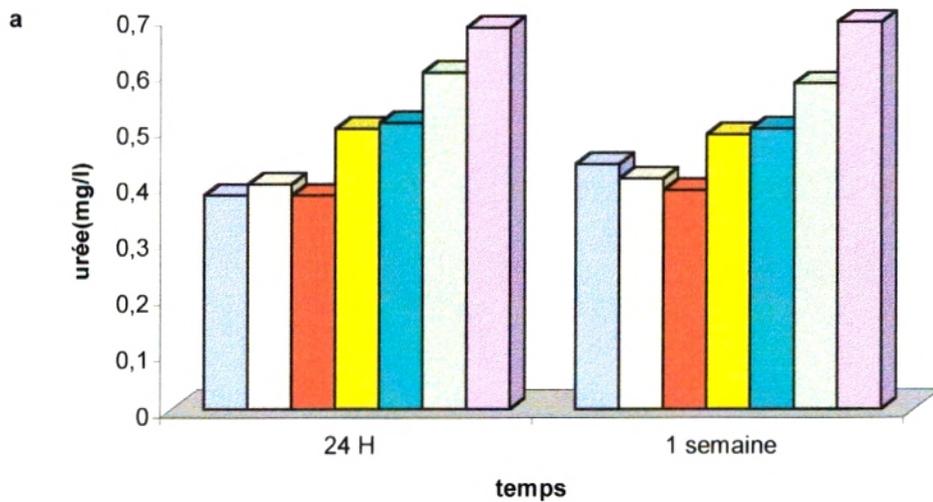


Figure 60: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul préparé dans le sérum physiologique, non préchauffé, lié aux HDL. (recherche de la dose létale). La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.



- Témoins
- AmB SP 1mg/kg P HDL
- AmB SP 2mg/kg P HDL
- AmB SP 3mg/kg P HDL
- AmB SP 0,5mg/kg P HDL
- AmB SP 1,5mg/kg P HDL
- AmB SP 2,5mg/kg P HDL

Figure 61: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction des doses finales d'AmB seul préparé dans le sérum physiologique, préchauffé, lié aux HDL. (recherche de la dose létale).

La concentration de la solution mère est de $10^{-4}M$.

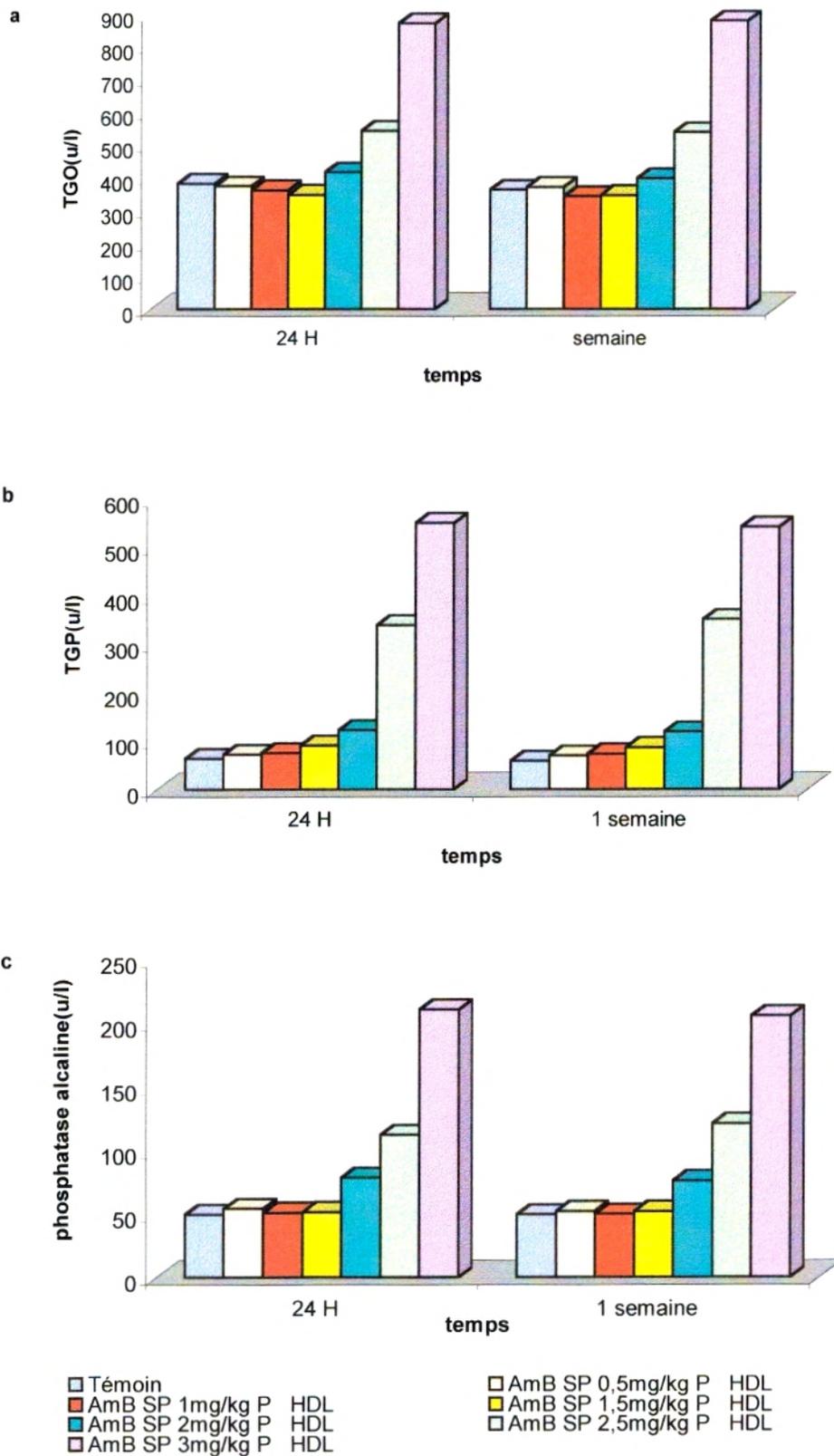


Figure 62: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB seul préparé dans le sérum physiologique, préchauffé, lié aux HDL. (recherche de la dose létale). La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

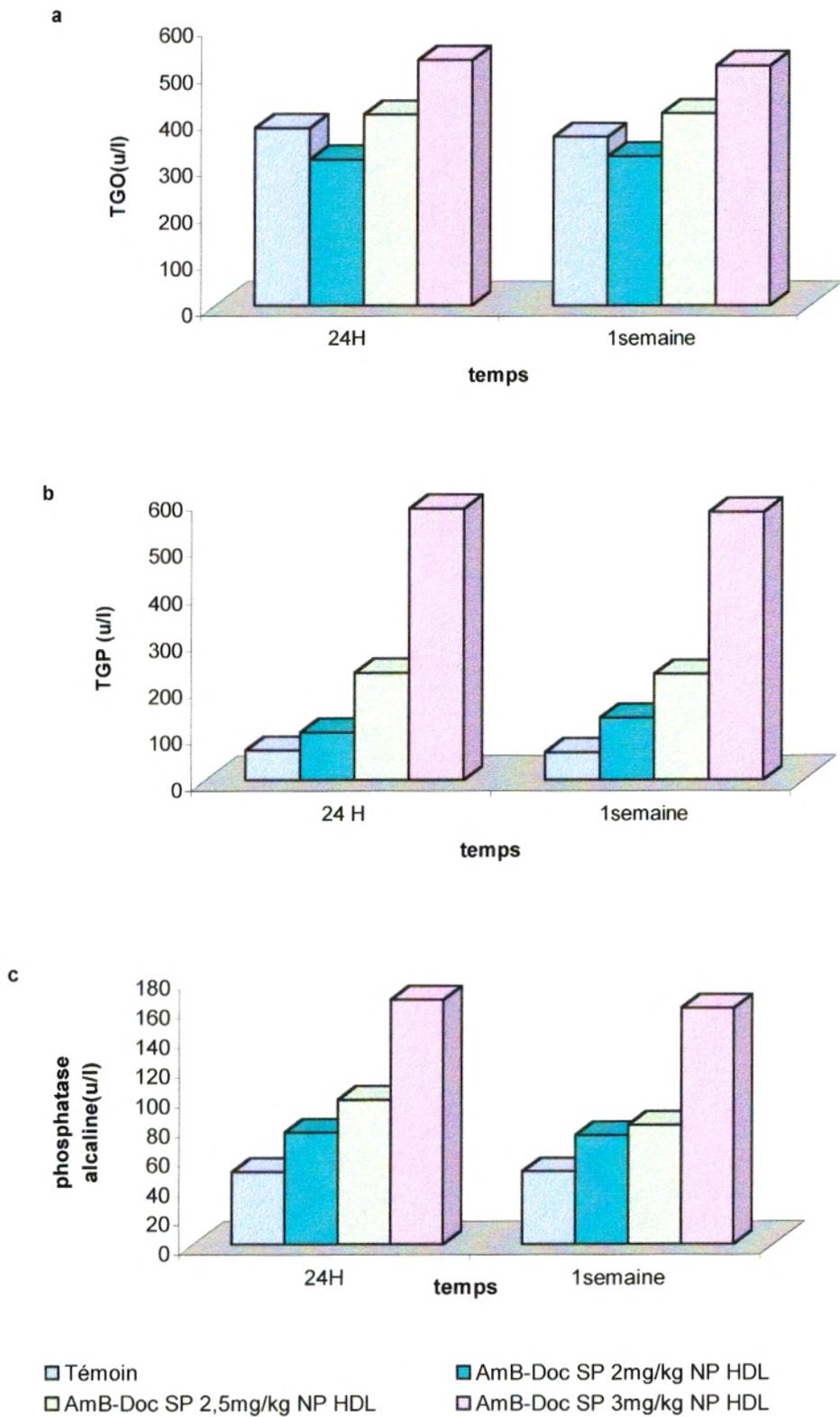


Figure 68: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction des doses finales d'AmB-DOC, préparé dans le sérum physiologique, non préchauffé, lié aux HDL (recherche de la dose létale). La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

Ceci est dû selon WASAN et al., 1994 à l'absence chez la plupart des cellules hôtes des récepteurs HDL, donc l'amphotéricine B lié aux HDL n'est pas reconnu par les cellules, ainsi il n'est pas internalisé, ni fixée sur ces dernières, ce qui rend la molécule moins toxique.

II. Effet de l'addition des LDL à l'antifongique :

Il s'agit de voir dans cette partie expérimentale si les lipoprotéines de basse densité (LDL) ont le même effet protecteur que le HDL ou à l'inverse, comme il a été trouvé par plusieurs auteurs (BRAJTBURG J. et al., 1984) ; (KOLDIN et al., 1985) ; (WASAN K. M. et al., 1994), la complexation de l'amphotéricine B aux LDL est *in vivo* plus toxique. Pour cela nous avons établi le protocole suivant :

L'antifongique est d'abord préparé dans trois solvants différents à la concentration de la solution mère 10^{-4} M (DMSO, ETH30%, SP), préchauffé ou non, puis dilué dans du P.B.S. pour permettre l'administration à des souris d'une dose finale de 1mg/kg de poids. Les lots tests sont :

Amphotéricine B préparé dans le DMSO, NP, lié aux LDL

Amphotéricine B préparé dans le DMSO, P à 70°C, lié aux LDL

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, NP, lié aux LDL

Amphotéricine B préparé dans l'éthanol, P à 70°C, lié aux LDL

Amphotéricine B préparé dans le sérum physiologique, NP, lié aux LDL

Amphotéricine B préparé dans le sérum physiologique, P à 70°C, lié aux LDL

Dans un deuxième temps, les mêmes préparations sont effectuées avec de l'amphotéricine B-DOC.

Les résultats sont représentés dans les figures 71 à 78.

Ces mêmes conditions expérimentales sont testées avec l'amphotéricine B à 10^{-3} M, ce qui entraîne la mort des souris.

❖ A 10^{-4} M, l'amphotéricine B-LDL et l'amphotéricine B-DOC-LDL, préparés dans le DMSO, ETH30% ou le sérum physiologique présentent une toxicité significativement élevée par rapport au témoin allant de +30 à +60% pour les paramètres rénaux, et de +50 à +85% pour les paramètres hépatiques (figures 71 à 78). De plus, l'AmB préparé dans le DMSO induit une toxicité plus élevée de +20 à +50% que l'AmB préparé dans l'éthanol et dans le sérum physiologique.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de KOLDIN et al., 1985 qui ont observé chez les lapins traités par l'AmB lié aux LDL, à une dose finale de 6,5mg/kg pendant 10 jours (dose cumulative 65mg/kg de poids), une toxicité plus élevée que celle induite par l'amphotéricine B seul. WASAN et al. 1994, ont confirmé ce fait en travaillant sur des cellules rénales. Selon cette équipe les cellules hôtes possèdent un taux considérable de récepteurs LDL, principalement les cellules rénales, ce qui entraîne une internalisation de la molécule antifongique et par conséquent la toxicité cellulaire. En 1997, WASAN a montré que les patients possédants un taux élevé en LDL étaient plus sensibles au traitement par l'amphotéricine B, ce qui entraîne chez eux une toxicité rénale.

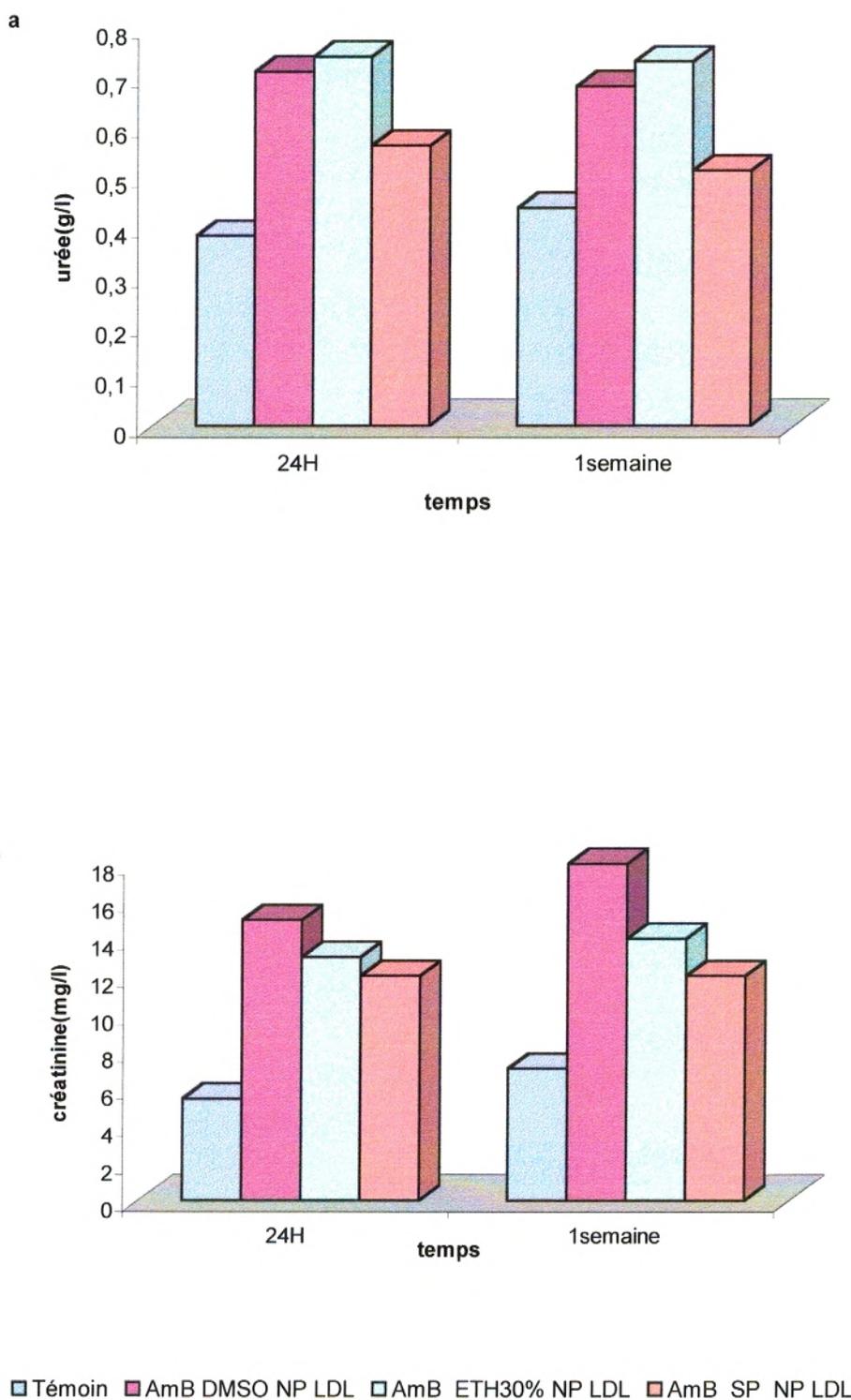
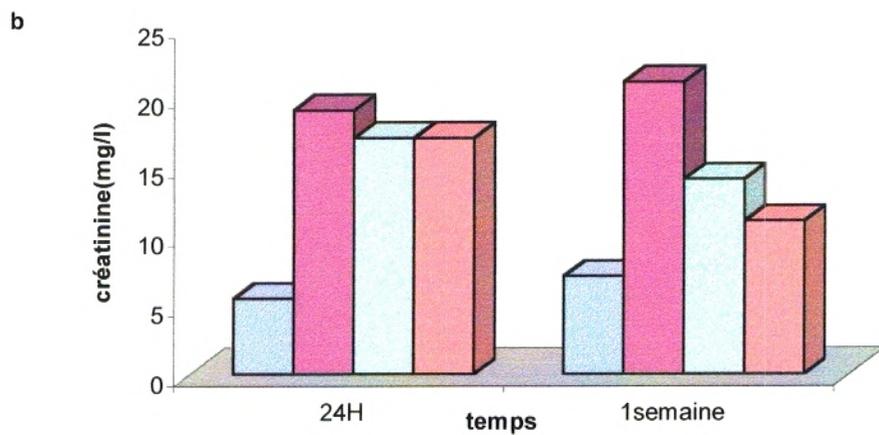
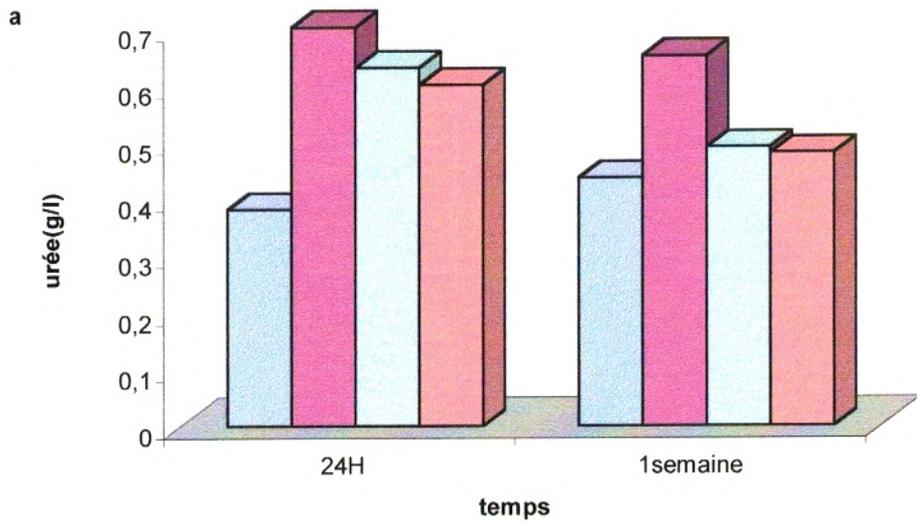


Figure 71: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du traitement par l'AmB seul, préparé dans trois solvants différents, non préchauffé, lié aux LDL.

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

La dose finale est de 1 mg/kg de poids.



- Témoin
- AmB-DOC DMSO NP LDL
- AmB-DOC ETH30% NP LDL
- AmB-DOC SP NP LDL

Figure 75: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du traitement par l'AmB-DOC, préparé dans trois solvants différents, non préchauffé, lié aux LDL.

La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M.

La dose finale est de 1 mg/kg de poids.

III. Effet de l'addition des lipoprotéines dénaturées à l'antifongique :

L'effet protecteur des HDL, et l'effet toxique des LDL, est basé sur l'interaction récepteur-ligands. Tous les travaux effectués par différents auteurs (cités plus haut) expliquent ce fait par la présence dans l'organisme animal, d'une plus grande richesse en récepteurs aux LDL comparativement aux récepteurs aux HDL. Ces récepteurs aux LDL fixent l'amphotéricine B, et l'internalisent entraînant ainsi la toxicité cellulaire. Sur la base de ces données nous avons voulu vérifier si après dénaturation des lipoprotéines (spécialement les LDL), les complexes AmB-lipoprotéines légères, entraînaient toujours une toxicité élevée chez des cellules hôtes de mammifères.

Le protocole expérimental a alors été le suivant :

Nous avons dénaturé les lipoprotéines, en procédant de deux manières différentes :

1) Nous avons d'abord dénaturé les lipoprotéines par la chaleur (70°C pendant 20mn), et ensuite nous l'avons incorporé à l'amphotéricine B préparé dans du sérum physiologique et également préchauffé à 70°C, ce qui nous a donné les lots tests suivants :

Amphotéricine, SP, P HDL (D)	Amphotéricine-DOC, SP, P, HDL (D)
Amphotéricine, SP, P LDL (D)	Amphotéricine-DOC, SP, P, LDL (D)

(D) : dénaturation avant incorporation à l'antifongique.

2) Nous avons incorporé les lipoprotéines à la solution mère d'amphotéricine B, ensuite nous avons préchauffé à 70°C pendant 20mn le complexe lipoprotéine-AmB. Les lots tests sont :

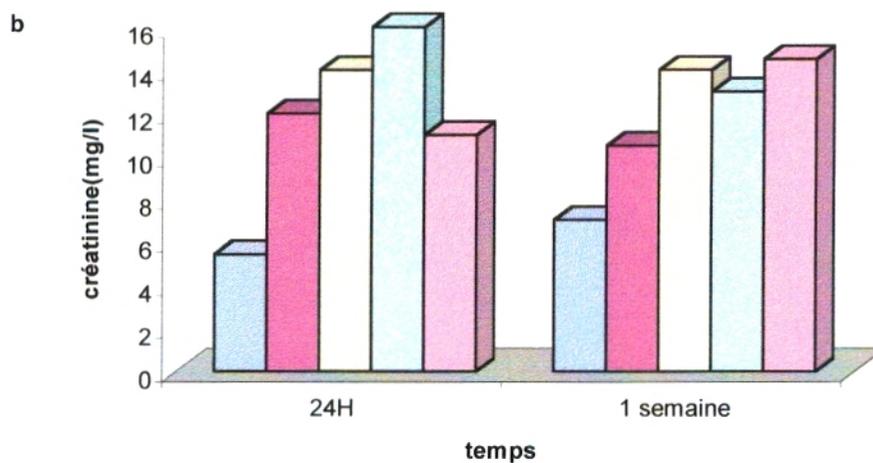
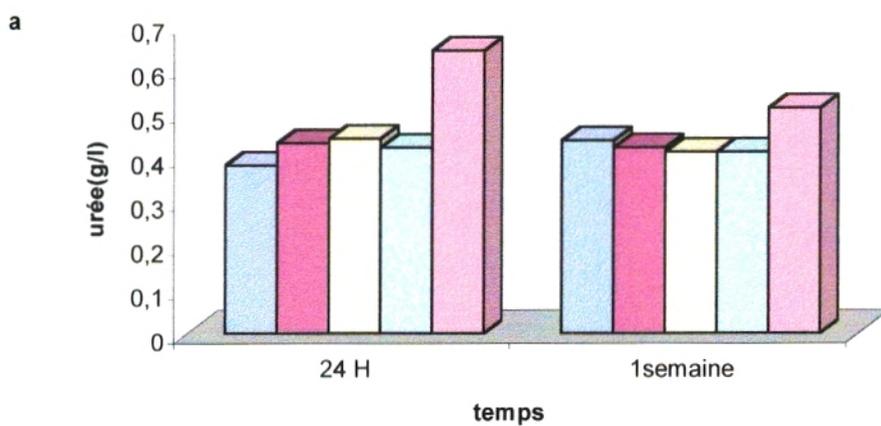
Amphotéricine, SP, P HDL (C)	Amphotéricine-DOC, SP, P, HDL (C)
Amphotéricine, SP, P LDL (C)	Amphotéricine-DOC, SP, P, LDL (C)

(C) : dénaturation après combinaison avec l'antifongique.

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures 79 à 82.

❖ Nous remarquons que les HDL dénaturées (quelque soit le procédé de dénaturation) liés à l'amphotéricine B ou l'amphotéricine B-DOC gardent leur effet protecteur, l'urée et les paramètres hépatiques ne diffèrent pas du témoin sans traitement antifongique, la créatinine augmente significativement de +50 à +60% par rapport au témoin.

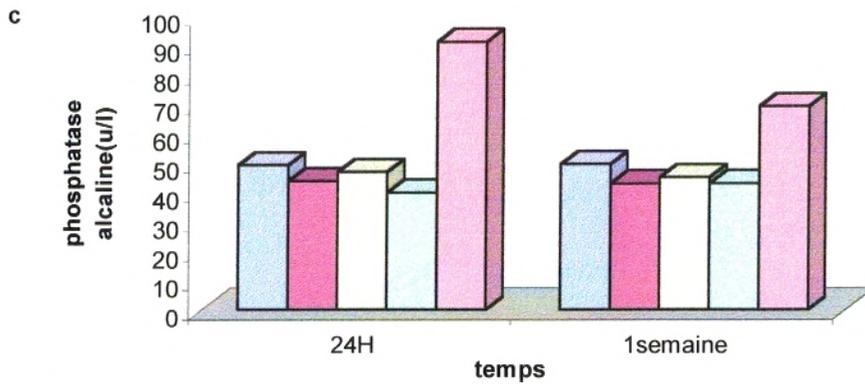
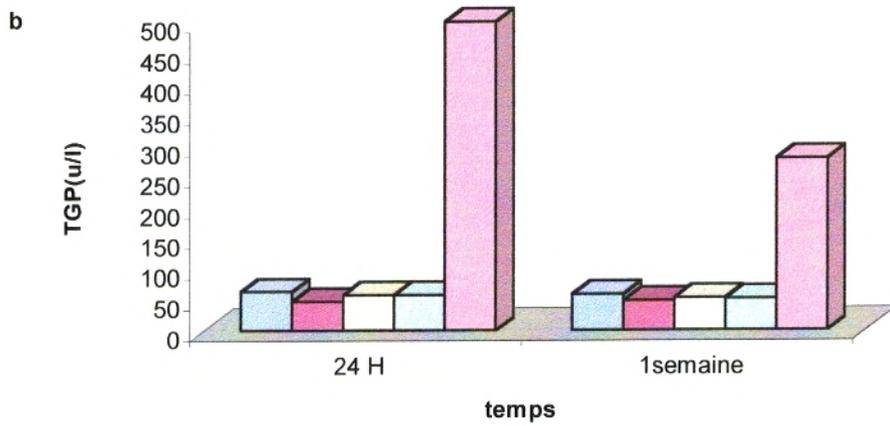
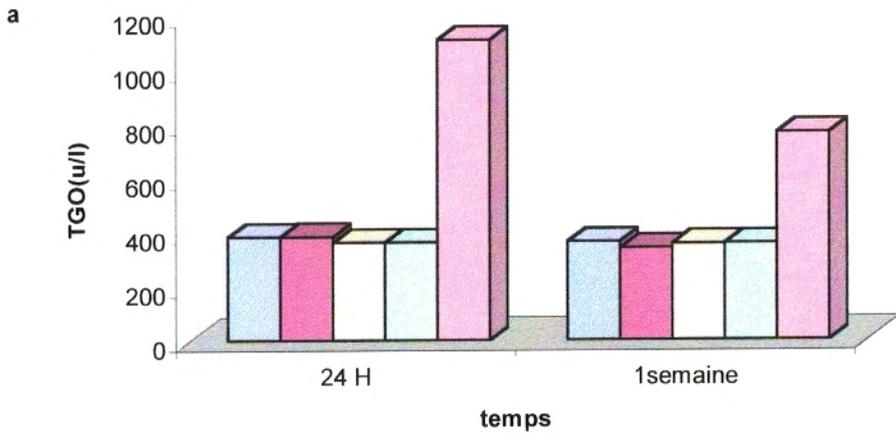
❖ L'amphotéricine B ou l'amphotéricine B-DOC liée aux LDL(D), entraîne une réduction de la toxicité allant de +30 à +80% pour l'ensemble des paramètres par rapport à l'AmB-LDL natives, ce qui laisse suggérer que les récepteurs LDL reconnaissent mal ou ne reconnaissent plus les LDL dénaturées et donc ne les internalisent pas, ce qui protège les cellules hôtes. Par contre, l'addition des LDL (C), c'est à dire des LDL dénaturées après leur complexation à l'antifongique induit toujours une toxicité chez l'organisme hôte. En effet, tous les paramètres biologiques sont significativement élevés par rapport au témoin et varient de +40 à +80%. Nous pouvons supposer que dans ce dernier cas la liaison des LDL aux molécules d'antifongiques empêche une dénaturation complète et les LDL seront ainsi reconnaissables par leurs récepteurs d'où la toxicité cellulaire.



Témoin
 AmB SP P HDL(D)
 AmB SP P LDL(D)

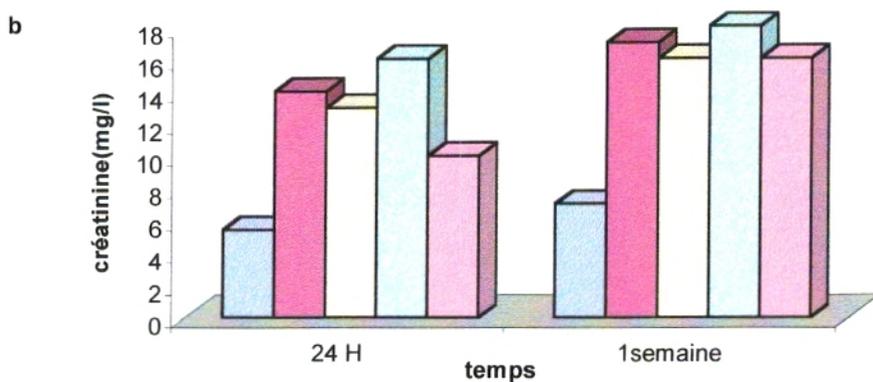
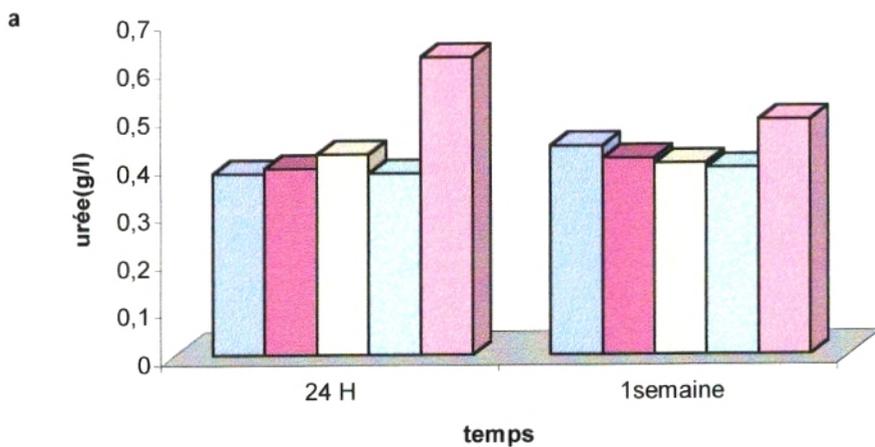
AmB SP P HDL(C)
 AmB SP P LDL(C)

Figure 79: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du traitement par l'AmB seul, lié aux lipoprotéines HDL et LDL dénaturées. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1 mg/kg.



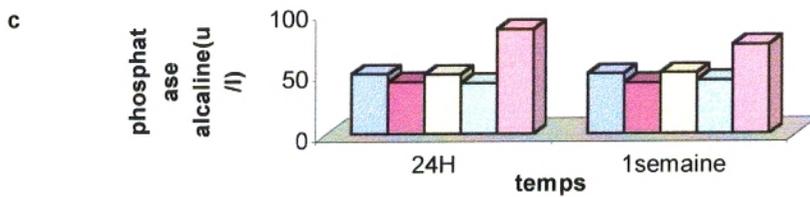
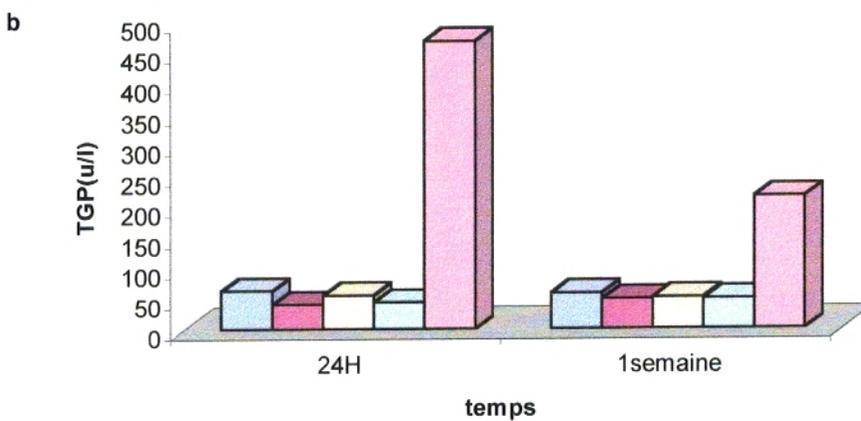
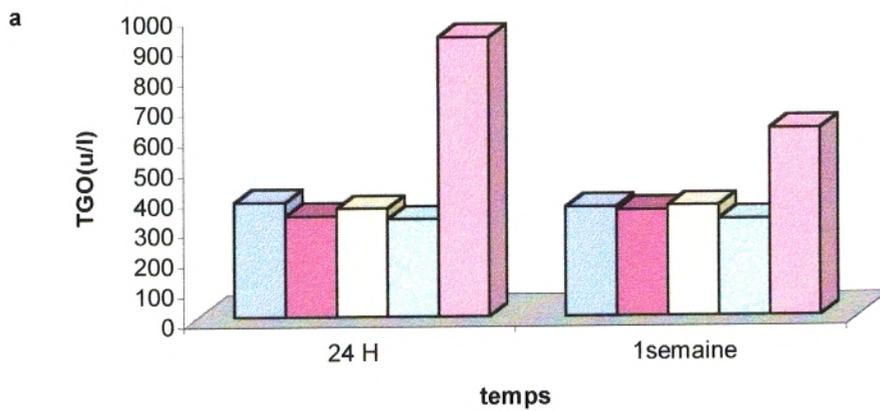
■ Témoin ■ AmB SP P HDL(D) ■ AmB SP P LDL(D)
■ AmB SP P HDL(C) ■ AmB SP P LDL(C)

Figure 80 : Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du traitement par l'AmB seul, liée aux lipoprotéines HDL et LDL dénaturées. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1 mg/kg.



■ Témoin ■ AmB-DOC SP P HDL(D) ■ AmB-DOC SP P LDL(D)
■ AmB-DOC SP P HDL(C) ■ AmB-DOC SP P LDL(C)

Figure 81: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux en fonction du traitement par l'AmB-DOC, lié aux lipoprotéines HDL et LDL dénaturées. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1 mg/kg.



Témoïn
 AmB-DOC SP P HDL(D)

AmB-DOC SP P LDL(D)
 AmB-DOC SP P HDL(C)

AmB-DOC SP P LDL(C)

Figure 82 : Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques en fonction du traitement par l'AmB-DOC, lié aux lipoprotéines HDL et LDL dénaturées. La concentration de la solution mère est de 10^{-4} M. La dose finale est de 1 mg/kg.

Chapitre 3

TEST D'EFFICACITE DES FORMULATIONS LES MOINS TOXIQUES D'ANTIFONGIQUE

Après avoir testé différentes formulations de l'amphotéricine B sur le plan de la toxicité, nous avons entrepris d'évaluer l'efficacité antifongique des préparations les moins toxiques chez des souris Wistar infectées par une souche de *Candida albicans* (ATCC 9036).

Tenant compte de la demi vie initiale de l'AmB qui est de 24 à 48 heure et de la demi vie terminale qui est de 15 jours, différents protocoles ont été utilisés, soit en injection intraveineuse unique, soit en injections répétitives à différents temps (24h, 48h, une fois par semaine). La solution mère est de 10^{-4} M, elle est préparée dans du sérum physiologique et préchauffée à 70°C, la dilution est effectuée dans du P.B.S. pour obtenir la dose injectable de 1mg/kg. Le traitement n'est démarré qu'après 16h suivant l'infection par *Candida albicans*. Le premier prélèvement se fait à la 40^{ème} heure après l'infection

- Dans un premier temps, les souris infectées ou non sont soumises à une injection IV unique d'antifongique.
- Dans un deuxième temps les injections IV d'antifongique ont été faites toutes les 24 heures.

Les lots obtenus sont :

Un lot témoin

Un lot contrôle de souris infectées non traitées.

Un lot de souris infectées par *Candida albicans* et traitées par l'amphotéricine B-DOC (FUN), toutes les 24h.

Un lot de souris infectées par *Candida albicans* et traitées par l'amphotéricine B-DOC (FUN) lié aux HDL natives, toutes les 24h.

Un lot de souris infectées et traitées par l'amphotéricine B-DOC (FUN) lié aux LDL (D), toutes les 24h.

- Dans un troisième temps, la même manipulation est répétée mais avec des injections à 48h d'intervalle.
- Enfin dans un quatrième temps, les injections sont effectuées une fois par semaine.

Pour évaluer la toxicité des injections répétitives, nous avons effectué les dosages de paramètres biologiques usuels (urée, créatinine, et enzymes hépatiques).

Les résultats sont rapportés sur les figures 83 à 86.

❖ Les souris infectées par *Candida* et non traitées ont bien résisté à l'infection, les paramètres biologiques ne traduisent pas une toxicité apparente. En revanche, un suivi de plus de 12 jours a indiqué un taux de mortalité de 10% de souris à 208h, de 50% à 256h et de 70% à 304h après l'infection (figures 83 et 84) (tableau 3).

❖ Quelque soit la formulation utilisée, le traitement par injection unique induit une élévation modérée des paramètres biologiques, qui retournent aux valeurs témoins au bout de 64h après l'infection.

❖ Le traitement par l'AmB-DOC seul induit une élévation des paramètres biologiques allant de +30 à +50% par rapport au témoin. Ce traitement est létal (mort de 90% des souris) au bout de 88h après l'infection, aussi bien dans le schéma utilisant des injections toutes les 24h. (dose cumulative 3mg/kg) que celui utilisant des injections toutes les 48h (figures 83 et 84) (dose cumulative 2mg/kg de poids).

❖ L'AmB-DOC lié aux HDL, n'est toxique qu'à partir de 160 h pour le traitement à 24h d'intervalle (dose cumulative 6mg/kg de poids). Les paramètres biologiques sont modérément augmentés entre 40h et 136 h ; mais, à partir de 160 h l'élévation des taux sériques de l'urée, de la créatinine, et des enzymes hépatiques est significative, et varie de +30 à +80% par rapport aux valeurs des souris non infectées, non traitées, d'une toxicité considérable.

❖ Pour le traitement à 48h d'intervalle (dose cumulative 3mg/kg de poids), les paramètres rénaux et hépatiques augmentent significativement de 30 à 80% à partir de 208h (dose cumulative 7mg/kg de poids).

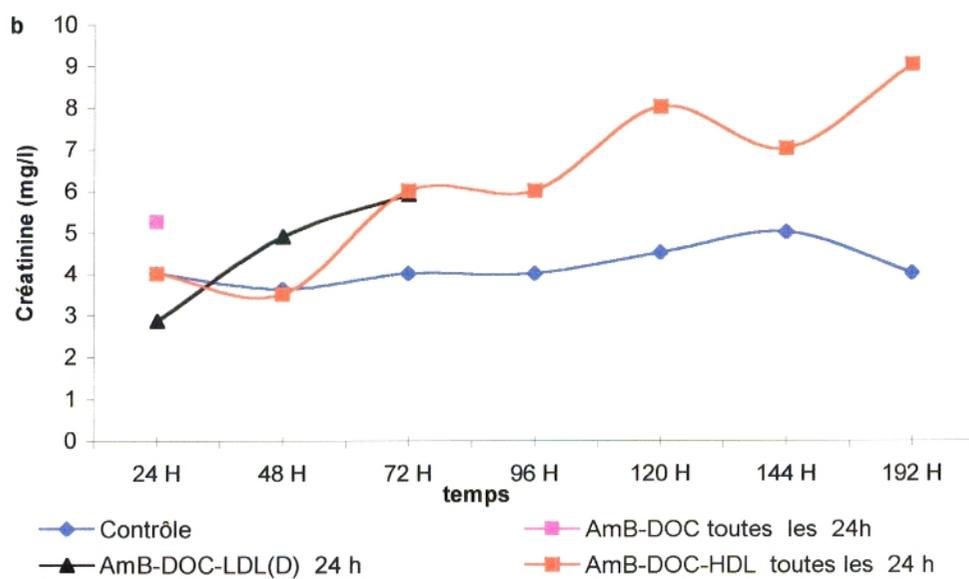
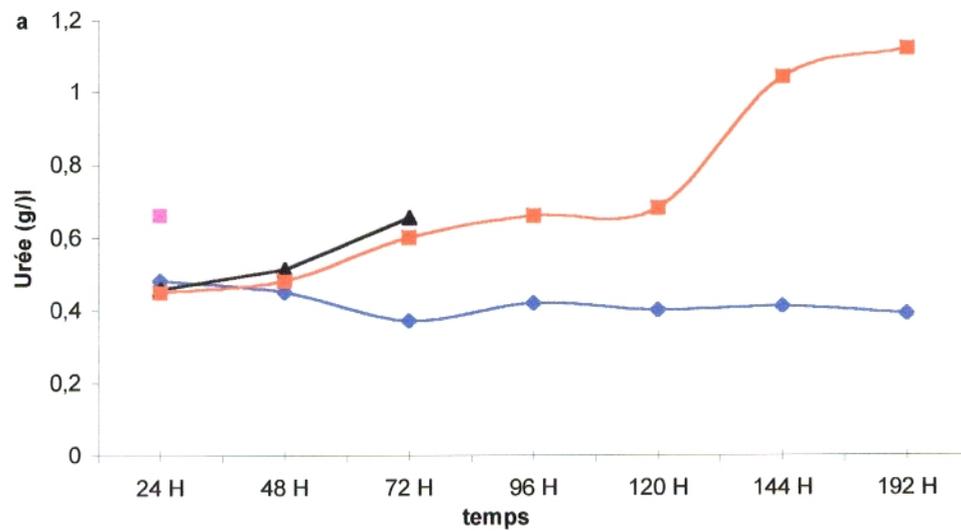


Figure 83: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux, en fonction du traitement toutes les 24 h, par différentes formulations d'AmB-DOC à 10^{-4} M.

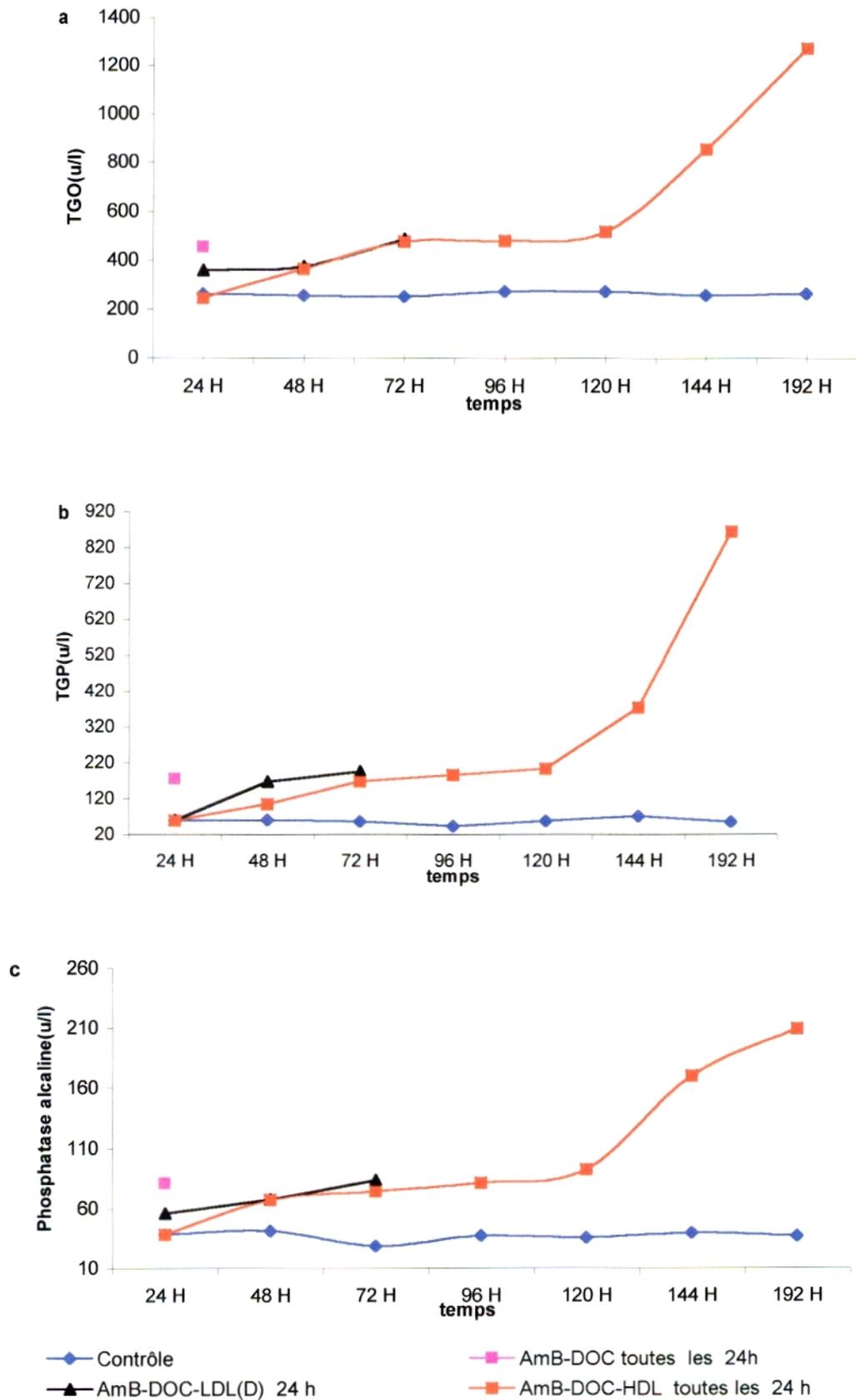


Figure 84: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques, en fonction du traitement toutes les 24 h, par différentes formulations d'AmB-DOC à 10^{-4} M.

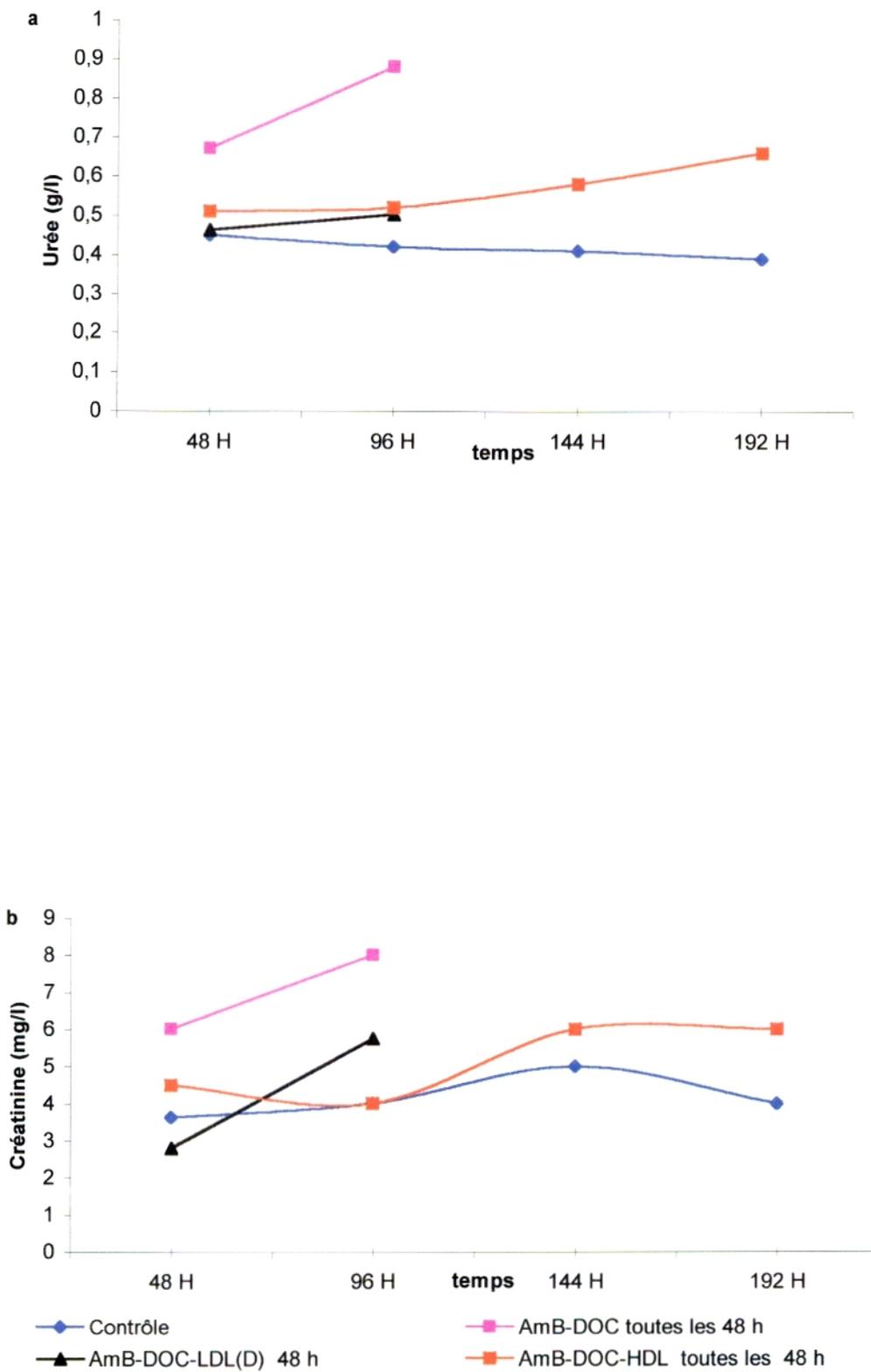
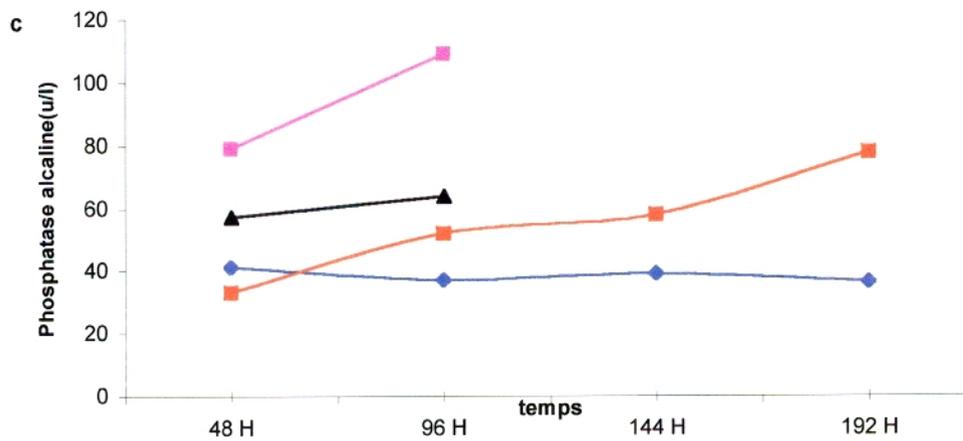
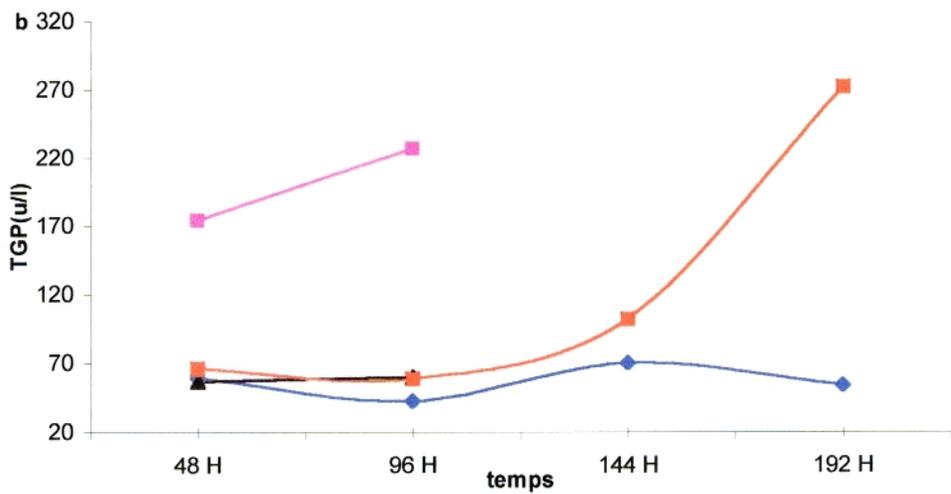
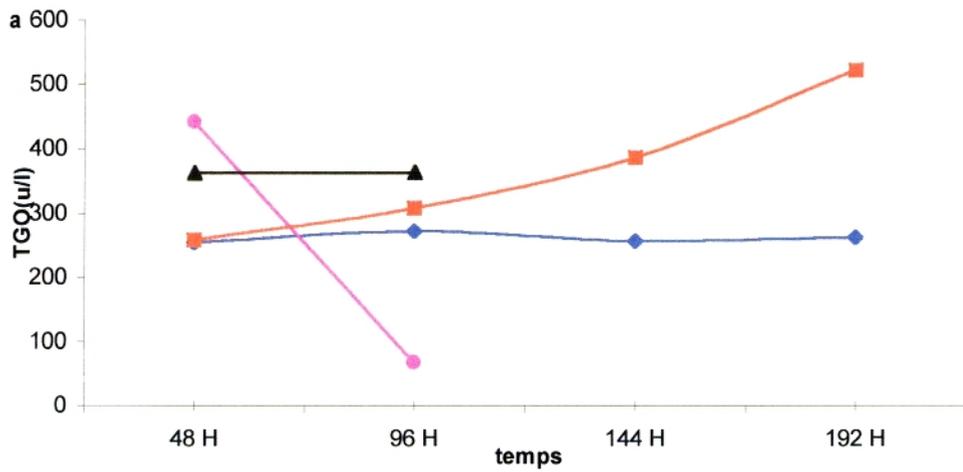


Figure 85: Evaluation dans le sérum des paramètres rénaux, en fonction du traitement toutes les 48 h, par différentes formulations d'AmB-DOC à 10^{-4} M.



● Contrôle
 ▲ AmB-DOC-LDL(D) 48 h
 ■ AmB-DOC toutes les 48 h
 ■ AmB-DOC-HDL toutes les 48 h

Figure 86: Evaluation dans le sérum des enzymes hépatiques, en fonction du traitement toutes les 48 h, par différentes formulations d'AmB-DOC à $10^{-4}M$.

❖ Le traitement par l'AmB-DOC lié aux HDL, n'induit aucune mort des souris, quelque soit la fréquence des injections.

❖ Le traitement par l'AmB-DOC lié aux LDL (D) n'est pas toxique à 40h (dose 1mg/kg) et à 64h (dose cumulative de 2mg/kg de poids) pour l'intervalle 24h. A 88h (dose cumulative de 3mg/kg de poids) les paramètres biologiques augmentent significativement de +30 à +65% par rapport aux valeurs du témoin. On note par ailleurs, une mort de 30% des souris à 88h, et de 100% à 112h.

❖ Le traitement par l'AmB-DOC lié aux LDL (D), répété toutes les 48h, n'entraîne pas une toxicité significative à 40h après la première injection (dose finale de 1mg/kg), et à 88h (dose cumulative de 2mg/kg de poids), en revanche, le sérum présente une forte hémolyse à 136h (dose cumulative de 3mg/kg de poids). On note par ailleurs, la mort de 60% des souris à 208h (dose cumulative de 4mg/kg de poids), et 100% à 256h (dose cumulative de 5mg/kg de poids).

Les figures 87 et 88 représentent les résultats des tests d'efficacité des formulations utilisées dans le traitement des souris infectées.

➤ Quelque soit la formulation utilisée en injection unique, la diminution du taux des *Candida* de 10^2 cellules au cours des premières 24 heures, ensuite le nombre des levures augmente pour atteindre 10^5 cellules/ml à 136h après l'infection, ce taux est maintenu jusqu'à 208h. une mort de 70% des souris survient à 304h. (résultats non représentés).

➤ La FUN (amphotéricine B-DOC), solution mère 10^{-4} M, préchauffée à 70°C, administrée à une dose finale de 1mg/kg est efficace, elle réduit le nombre de *Candida* de $10^2/24h$, cependant sa toxicité ne permet pas le suivi au traitement.

➤ La FUN (amphotéricine B-DOC) 10^{-4} M, préchauffée à 70°C, liée aux HDL natives, administrée à une dose finale de 1mg/kg, est efficace aussi bien lorsqu'on effectue des injections répétées toutes les 24h que lorsque les injections sont répétées toutes les 48h. Pour le premier intervalle de temps, nous obtenons une stérilité à 160h (la dose totale administrée est de 6mg/kg), tandis que pour le deuxième intervalle de temps, la stérilité est obtenue à 256h (la dose totale administrée est de 5mg/kg).

- Le traitement par FUN (amphotéricine B-DOC) à 10^{-4} M, préchauffée à 70°C , liée aux LDL (D) et injectée à la dose finale de 1mg/kg, n'est pas efficace et entraîne une mort de 30% de souris à 88h, et de 100% à 112h pour l'intervalle de 24h, et une mort à 60% de souris à 208h pour l'intervalle de 48h.
- Le traitement par les différentes formulations à une semaine d'intervalle, n'est pas efficace, le dénombrement des *Candida* donne un taux qui ne diffère pas du nombre de *Candida* du lot contrôlé (courbe non représenté).

Ces résultats montrent que le traitement par l'amphotéricine B-DOC à 10^{-4} M, préchauffé à 70°C , lié aux HDL natives, est le plus efficace et nous permet d'atteindre la stérilité chez les souris au bout de 6 à 10 jours. Le traitement par cette formulation toutes les 24h, est efficace à la dose finale cumulative de 6mg/kg, alors que pour l'intervalle de 48h, la dose finale cumulative efficace est de 5mg/kg. D'autre part, cet intervalle présente moins de toxicité, que l'intervalle 24h (figures 83, 84, 85, 86). Il serait donc recommandable de prendre en considération l'intervalle de 48h, pour une moindre toxicité et une efficacité à une dose plus faible. La stérilité est vérifiée jusqu'à 20 jours du début du traitement.

En conclusion, la formulation la moins toxique pour une meilleure efficacité semble être : amphotéricine B-DOC préparé dans le sérum physiologique à 10^{-4} M, préchauffé à 70°C , lié aux HDL natives, injecté à une dose finale de 1mg/kg toutes les 48h.

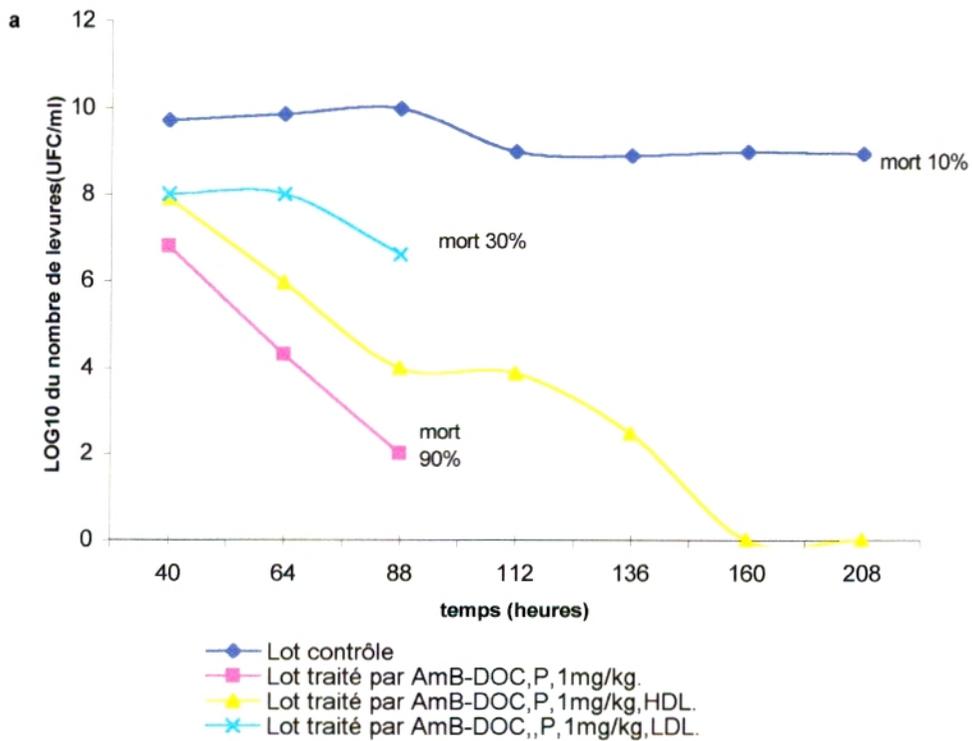


Figure 87: Dénombrement de *Candida albicans*, après culture sur gélose Sabouraud, suivant la formulation d'AmB-DOC à 10^{-4} M, utilisée pour le traitement des souris toutes les 24h.

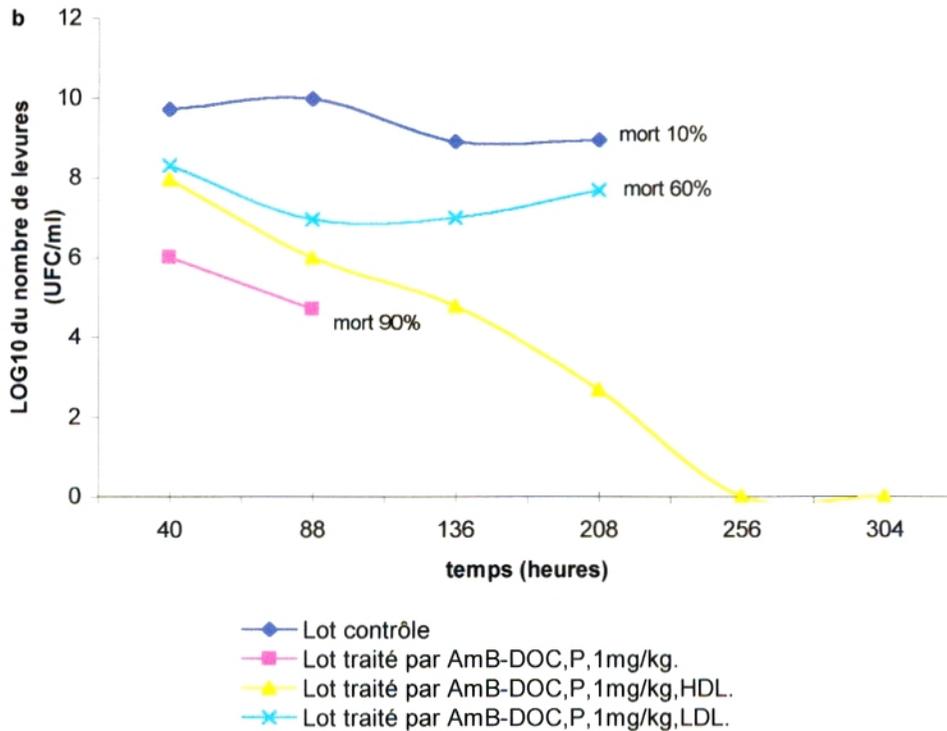


Figure 88: Dénombrement de *Candida albicans*, après culture sur gélose Sabouraud, suivant la formulation d'AmB-DOC à 10^{-4} M, utilisée pour le traitement des souris toutes les 48h.

**Tableau 3 : TEST D'EFFICACITE DE QUELQUES FORMULATIONS D'ANTIFONGIQUE
(Evaluation du nombre de *Candida albicans* pour chaque traitement)**

	40 H	64 H	88 H	112 H	136 H	160 H	208 H
Lot contrôle	8.10^9 cell/ml	8.10^9	1.10^{10}	10^{10}	10^{10}	$4.4.10^9$	$1.6.10^9$
	5.10^9 UFC/ml	7.10^9	$9.4.10^9$	10^9	8.10^8	10^9	9.10^8 mort à 10%
Lot traité par T1 (24 H)	5.10^6						
	6.10^6	2.10^4	10^2 Mort à 90%	Mort à 100%			
Lot traité par T1 (48 H)	2.10^6						
	10^6		5.10^4	Mort à 90%	Mort à 100%		
Lot traité par T2 (24 H)	10^8	6.10^6					
	8.10^7	9.10^5	10^4	$7.6.10^3$	3.10^2	Stérilité	Stérilité
Lot traité par T2 (48 H)	10^8		3.10^6				
	9.10^7		10^6		6.10^4		5.10^2
Lot traité par T3 (24 H)	2.10^8	9.10^7	5.10^6				
	10^8	10^8	4.10^6 Mort à 30%	Mort à 100%			
Lot traité par T3 (48 H)	3.10^8		10^7		2.10^7		9.10^7
	2.10^8		9.10^6		10^7 Mort à 10%		5.10^7 Mort à 60%

ETAVENEED NOISITONOC

L'objectif assigné au présent travail, été de rechercher une formulation permettant d'augmenter l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, c'est à dire diminuer la toxicité tout en préservant son efficacité antifongique.

Notre démarche a consisté à moduler l'environnement physico-chimique de la molécule et de la vectoriser par des lipoprotéines du sérum sanguin.

Dans la première partie de notre travail, nous avons effectué pour un certain nombre de formulations des tests de toxicité *in vivo* chez un modèle de rongeurs ; la souris wistar.

Dans la deuxième partie du travail, il s'agissait d'évaluer l'efficacité antifongique chez ces mêmes souris infectées par du *Candida albicans*.

Il ressort de nos résultats les principaux fait suivant :

1- La toxicité des formulations de l'amphotéricine B testé dépend d'un certain nombre de facteurs :

➤ La concentration de la solution mère de l'antifongique : A l'inverse des résultats obtenus par LEGRAND et al., 1992, *in vitro*, la concentration de la solution mère de l'amphotéricine B 10^{-3} M, est plus toxique que la concentration de la solution mère 10^{-4} M. Ceci est lié probablement à l'instabilité des formes insolubles de l'amphotéricine B dans l'organisme hôte, ce qui rend la solution mère 10^{-3} M plus riche en formes oligomériques toxiques pour les cellules animales, que la solution mère 10^{-4} M.

➤ Le solvant utilisé pour la préparation de la solution mère : La nature du solvant joue un rôle important dans le degré de la toxicité de l'amphotéricine B vis à vis des cellules animales, en déterminant les proportions des formes solubles et insolubles de l'antifongique en milieu aqueux. L'innocuité du solvant est également un facteur considérable dans la détermination de cette toxicité. C'est pourquoi l'amphotéricine B et l'amphotéricine B-DOC préparés dans le DMSO, se sont révélés les formulations les plus toxiques, suivies de l'amphotéricine B préparé dans l'éthanol et enfin de l'amphotéricine B préparé dans le sérum physiologique.

➤ La dose finale injectée : La toxicité de l'amphotéricine B est proportionnelle à la dose finale injectée. Aux doses finales de 0,1 mg/kg de poids de souris, l'antifongique induit une toxicité modérée qui se dissipe au bout d'une semaine après l'injection. Les souris traitées par l'amphotéricine B à la dose de 1,5 mg/kg, présentent une toxicité élevée. Aux doses finales 2 ; 2,5 et 3 mg/kg de poids, l'amphotéricine B est létal. La dose limite de la toxicité est de 1mg/kg.

➤ Le préchauffage de la solution mère d'amphotéricine B à 70°C pendant 20 minutes, permet de réduire la toxicité vis à vis des cellules hôtes. Ceci concorde avec les résultats de GABORIAU et al., 1997 et ceux de PETIT et al., 1999. De plus, la concentration de la solution mère de l'antifongique et la nature du solvant, jouent un rôle dans la détermination de la toxicité de l'antifongique. Le traitement par l'amphotéricine B et l'amphotéricine B-DOC, préchauffés et provenant de la solution mère 10^{-4} M induit moins de toxicité que le traitement par l'antifongique provenant de la solution mère 10^{-3} M. Par ailleurs, l'antifongique préparé dans le sérum physiologique est moins toxique que celui préparé dans l'éthanol à 30%. Il est à noter, que la combinaison des conditions favorables (préchauffage à 70°C, concentration mère 10^{-4} M, utilisation du sérum physiologique comme solvant) réduit la toxicité, et permet l'administration aux souris des doses finales plus élevées allant à 3 mg/kg de poids.

➤ La complexation de l'antifongique aux lipoprotéines : quelque soit la concentration de la solution mère la dose finale injectée et le solvant utilisé, l'addition des lipoprotéines de haute densité (HDL) à l'amphotéricine B préchauffé ou non réduit sa toxicité en inhibant son interaction avec les cellules hôtes. La dénaturation des HDL ne modifie en rien les paramètres biologiques dosés en comparaison au traitement par l'amphotéricine B lié aux HDL natives. Par contre, l'addition des lipoprotéines de basse densité (LDL), entraîne une toxicité plus élevée que celle induite par l'amphotéricine B seul, ceci est lié à la présence dans l'organisme animal d'une grande richesse en récepteurs LDL qui fixent le complexe AmB-LDL et l'internalise au niveau de la cellule. En revanche, la dénaturation de ces lipoprotéines réduit significativement la toxicité du fait qu'elles ne sont plus reconnues par les récepteurs.

2- En ce qui concerne l'efficacité antifongique, nous avons regroupé tous les paramètres favorables à la réduction de la toxicité de l'antifongique vis à vis des cellules animales. Deux formulations les moins toxiques ont été retenues pour les tests de l'activité antifongique. La formulation amphotéricine B-DOC, préparé dans le sérum physiologique à 10^{-4} M, préchauffé à 70°C, lié aux HDL natives enfin dilué dans le PBS à une dose finale de 1mg/kg, semble avoir une bonne efficacité contre *Candida albicans* après traitement toutes les 48 h par injections intraveineuses répétitives pendant 10 jours.

Ces formulations constituent des alternatives simples et peu onéreuses par rapport au traitement à l'AmBisome d'un coût très prohibitif. Pour apprécier les formes injectées de l'amphotéricine B, des méthodes spectroscopiques peuvent être mises à l'œuvre, afin de mieux comprendre le mécanisme de toxicité de cet antifongique.

Par ailleurs, les essais *in vivo* sur les mammifères (canins) seraient une bonne prolongation pour vérifier les résultats obtenus sur les rongeurs, et nous rapprocheraient plus des cas cliniques rencontrés chez l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **ALLENDE M. C., LEE J. W., FRANCIS P., GARRET K., DOLLENBERG H., BERGUER J., LYMAN C. A., PIZZO P. A., WALSH T. J., 1994,**
Dose- dependent antifungal activity and nephrotoxicity of amphotericin B colloidal dispersion in experimental pulmonary aspergillosis.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 38. n° 3 : 518-522.
2. **ATKINSON A., BENNET J., 1978,**
Amphotericin B pharmacokinetics in human.
Antimicrobial Agents of Chemotherapy. Vol. 13 : 271-276.
3. **BERINGER A.W., JACOBS R. A., GUGLIELMO B. J., 1998,**
Lipid formulations of amphotericin B : Clinical efficacy and toxicities.
Clinical Infectious Diseases. Vol. 27 : 603- 618.
4. **BERMAN J. D., BADARO R., THAKUR C. P., WASUNNA K. M., BEHBEHANI K., DAVIDSON R., KUZOE F., PANG L., WEERA SURIYA K., BRYCESON A. D. M., 1998,**
Efficacité et innocuité de l'amphotéricine B incluse dans des liposomes (AmBisome) pour le traitement de la Leishmaniose viscérale endémique dans les pays en développement.
Bulletin of the World Health Organization. Vol. 6.
5. **BLANC I., BUENO DA COSTA M., BOLARD J. , CHAZALET M. S. P., 2000,**
Oligonucleotide delivery by a cationic derivative of the polyene antibiotic amphotericin B. I : Interaction oligonucleotide/vector as studied by optical spectroscopy and electron microscopy.
Biochimica et Biophysica Acta. 1464 : 299-308.
6. **BOLARD J., 1986,**
How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties ?
Biochimica et Biophysica Acta. 864 : 257- 304.
7. **BOLARD J., 1991,**
Mechanism of action of an anti *Candida* drug : Amphotericin B and its derivatives in *Candida albicans*.
Candida albicans : Cellular and Molecular Biology. Ed. prasad R. Berlin : springer-verlag : 210- 238.

8. BOLARD J., MILHAUD J., 1996,

Interaction of the anti-*Candida* amphotericin B (and other polyene antibiotics) with lipids.

Interaction of polyene antibiotics with lipids. CRC press, Inc, Chap. 12 : 253- 272.

9. BOLARD J., JOLY V., YENI P., 1997,

Amphotéricine B : Ancien médicament, nouveaux concepts.

Médecine thérapeutique : Vol. 3. n°3, 207-213.

10. BOLARD J, LEGRAND J. P., HEITZ F., CYBULSKA B., 1991,

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

Biochemistry. Vol. 30 : 5707- 5715.

11. BOLARD J., VERTUT-DOI A., 1995,

Internalization of Amphotericin B and other polyene antifungals in mammalian cells : A possible origin of their toxicity. Drug transport.

Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy. Vol. 11 : 307- 326.

12. BOUANANE S., 2001,

Etude *in vivo* de l'effet de l'amphotéricine B liée aux solvants organiques diméthyl formamide (DMF) et diméthyl sulfoxyde (DMSO) sur quelques paramètres sériques. et urinaires chez les rats Wistar : 1-79.

13. BOUCHERIT Z., 1995,

Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée aux lipoprotéines du sérum sanguin chez des cellules de globules rouges humaines. Thèse de magister. Institut de Biologie. Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen.: 1-76.

14. BRAJTBURG J., 1986,

Effects of serum lipoprotein on damage to erythrocytes and *Candida albicans* cells by polyene antibiotics.

The Journal of Infectious Diseases. Vol. 153, n° 3 : 623-626.

15. BRAJTBURG J., BOLARD J., 1996,

Carrier effects on biological activity of amphotéricin B.

Clinical Microbiology Reviews. Vol. 9, n°4 : 512-531.

**16. BRAJTBURG J., ELBERG G., BOLARD J., KOBAYASHI G. S.,
LEVY R. A., OSTLUND R. E., SCHLESSINGER D., MEDOFF G., 1984,**
Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B.
Journal of Infectious Diseases. Vol. 149, n°6 : 623-626.

17. BRAJTBURG J., ELBERG G., MEDOFF G., KOBAYASHI G. S., 1981,
Increase in colony- forming units of *Candida albicans* after treatment with polyene
antibiotics.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 19, n° 1 : 199-200.

**18. BRAJTBURG J., ELBERG G., SCHWARTZ A., VERTUT-CROQUIN D.,
SCHLESSINGER G. S., KOBAYASHI G. S., MEDOFF G., 1985,**
Involvement of oxidative damage in erythrocyte lysis induced by amphotericin B.
Antimicrobial Agents Chemotherapy. Vol. 27 : 172- 176.

**19. BRAJTBURG J., MEDOFF G., KOBAYASHI G. S., BOGGS S.,
SCHLESSINGER D., PANDEY R. C., RINEHART K. L. JR., 1979,**
Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological
effects.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 15. n° 5 : 716-722.

**20. BRAJTBURG J., POWDERLY W. G., KOBAYASHI G. S., MEDOFF
G., 1990,**
Amphotericin B : Current understanding of mechanisms of action.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 34. n°2 : 183-188.

21. BRYSKIER A., 1999
Antibiotiques agents antibactériens et antifongiques.
Ed. ELLIPSES : 1104- 1132.

22. BURSTEIN M., FINE A., ATGER V., GIRARD-GLOBA W. E. A., 1989,
Rapid method for the isolation of two purified subfractions of HDL by differential
dextran sulfate- magnesium chloride precipitation.
Biochimie. Vol. 71 : 741-746.

23. BURSTEIN M., SCHOLNICK H. R., MORFIN R., 1970,
Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation
with polyanions.
Journal of Lipid Research. Vol. 11 : 583-595.

- 24. CANIAUX I., VILLARD J., PORTE M., ODDOUX L., 1984,**
Les antifongiques utilisés en thérapeutique humaine.
Lyon Pharmaceutique. Vol. 35, n°3 : 131-141.
- 25. CARBON C., REGNIER B., SAIMOT G., VILDE J. L., YENI P., 1994,**
Antifongiques : données générales.
Médicaments anti-infectieux. Ed. Médecine Science Flammarion Chap. 41-42 :
449-461.
- 26. CARLSON M. A., CONDON R. E., 1994,**
Nephrotoxicity of amphotericin B.
Journal of the American College of Surgeons. Vol. 179 : 361-381.
- 27. CASS A., FINKELSTEIN A., KRESPI V., 1970,**
The ion permeability induced in the thin lipid membranes by the polyene antibiotics
nystatin and amphotericin B.
The Journal of General Physiology. Vol. 56 : 100-124.
- 28. CHERON M., CYBULSKA B., MAZERSKI J., GRZYBOWSKA A.,
CZERWINSKI J., CZERWINSKI A., BOROWSKI E., 1988,**
Quantitative structure activity relationships in amphotericin B derivatives.
Biochemical Pharmacology. Vol. 37 : 827- 836.
- 29. CYBULSKA B., BOLARD J., SEKSEK O., CZERWINSKI A., BOROWSKI
E., 1995,**
Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene
macrolide antibiotics of the heptaene group influencing the ionic selectivity of the
permeability pathways formed in the red cell membrane.
Biochimica et Biophysica Acta. 1240 : 167-178.
- 30. DUPONT C, BOUGNOUX M. E., MATEO J., SAULNIER P., PAYEN D.,
NICOLAS-CHAMOIN M. H., 1997,**
Diagnostic des candidoses profondes par PCR. Model *in vitro* et model animal.
Médecine et Maladies Infectieuses. T. 27 : 1005.
- 31. DUPONT G., RINNERT H., LEMATRE J., 1977,**
Chimie biologique- Etude physico-chimique de l'amphotéricine B en milieu alcalin.
C. R. Acad. Sc. Paris, tome 284 : 853 -856.

32.ERNST C., DUPONT G., RINNERT H., LEMATRE J., 1978,

Effet des variations de température sur le dichroïsme circulaire, le spectre d'absorption et la diffusion Rayleigh de l'amphotéricine B en solution aqueuse et hydroalcoolique.

Physique Moléculaire. C. R. Acad. Sc. Paris, T. 286 : 175- 178.

33.FIELDS B. T., BATES J. H., ABERNATHY R. S., 1970,

Amphotéricine B serum concentration during therapy.

Application in Microbiology. Vol. 19 : 955- 959.

34.GABORIAU F., CHERON M., LEROY L., BOLARD J., 1997 (a),

Physico-chemical properties of the heat- induced 'superaggregates' of amphotericin B.

Biophysical Chemistry. Vol. 66 : 1-12.

35.GABORIAU F., CHERON M., PETIT C., BOLARD J., 1997(b),

Heat induced superaggregation of amphotericin B reduces its *in vitro* toxicity : A new way to improve its therapeutic index.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 41. n°11 : 2345 -2351.

36.GARCIA-CHAUMONT C., SEKSEK O., JOLLES B., BOLARD J., 2000,

A cationic derivative of amphotericin B as a novel delivery system for antisense oligonucleotides.

Antisense & Nucleic Acid Drug Development. Vol. 10 : 177-184.

37.GLENN J., MERKEL G. J., PHELPS C. L.,1989,

Conditions affecting the amphotericin B mediated inhibition of *Candida albicans* attachment to cell cultures.

Canadian Journal of Microbiology. Vol. 35 : 260-264.

38.HAMMOND S. M., 1977,

Biological activity of polyene antibiotics.

Progress in Medicinal Chemistry. Ed. G. P. BLLIS and G. R. WEST, Vol. 14, Chap.3 : 105-178.

39.HARNOIS I., GENEST D., BROCHON J. C., PTAK M., 1988,

Micellization and interactions with phospholipid vesicles of the lipopeptide iturin A, as monitored by time-resolved fluorescence of a D-tyrosyl residue.

Biopolymers. Vol. 27: 1403-1413.

40. HARTSEL C., BENZ S. K., AYENEW W., BOLARD J., 1994,
Na⁺, K⁺, and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics.
European Biophysical Journal. Vol. 23 : 125-132.

41. HARTSEL C., BOLARD J., 1996,
Amphotericin B : New life for an old drug.
TIPS Vol. 17 : 445-449.

42. HEMENGER R. P., 1983,
Structure of amphotericin B aggregates based on calculations of optical spectra.
Biopolymers. Vol 22 : 911-918.

43. HUNG C. T., LAM F. C., PERRIER D. G., SOUTER A., 1988,
A stability of amphotericin B in aqueous media using factorial design.
International Journal of Pharmaceutics. Vol. 44 : 117-123.

44. JOLY V., SAINT-PIERRE-CHAZALET M., SAINT-JULIEN L., BOLARD J., CARBON C., YENI P., 1992,
Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture.
The Journal of Infectious Diseases. Vol. 165 : 337-343.

45. JULIANO R. L., GRANT C. W. M., BARBER K. R., KALP N. A., 1987,
Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes.
Molecular Pharmacology. Vol. 31 : 1-11.

46. KERRIDGE D., 1986,
Mode of action of clinically important antifungal drugs.
Advances in Microbial Physiology. Vol. 27 : 1-72.

47. KITO M., AKUTSU H., SUGETA H., KYOGOKU Y., SOHN D. H., YU B. S., 1987,
Association of polyene antibiotics with sterols.
Chemical and Biological Interactions. Vol. 64 : 61- 70.

48. KOENIG H., 1995,
Guide de mycologie médicale.
Ed. ELLIPSES : 251-267.

49. KOLDIN H. M., KOBAYASHI G., BRAJTBURG J., MEDOFF G., 1985,
Effects of elevation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipoprotein on amphotericin B induced toxicity in rabbits.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 28. n°1 : 144-145.

50. KWON-CHUNG K. J., BENNET J. E., 1992,

Medical mycology.

Lea & Febiger

51. LAMOTHE J., 1997,

Essai de traitement de la Leishmaniose canine par l'amphotéricine B (39 cas).

Practical Medicin Chirurgical Animal Company. Vol. 32 : 133-141.

52. LAMPEN J.O., 1966,

Interference by polyenic antifungal antibiotics (Especially nystatin and filipin) with specific membrane function.

Symp. Soc. Gen. Microb. Vol. 16: 111-130.

53. LAMY- FREUND M. T., SCHREIER S., PEITZCH R. M., REED W. F., 1991,

Characterization and time dependance of amphotericine B : Deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering.

Journal of Pharmacological Science. Vol. 80 : 262- 266.

54. LEBRUN M., GRENIER P., GOURDE P., BERGRON M. G., LABRECQUE G., BEAUCHAMP D., 1996,

Nephrotoxicity of amphotericin B in rats : Effects of the time of administration.

Life Sciences. Vol. 58 : 869-876.

55. LEGRAND P., CHERON M., LEROY L., BOLARD J., 1997,

Release of amphotericin B from delivery systems and its action against fungal and mammalian cells.

Journal of Drug Targeting. Vol 4. n°5 : 311-319.

56. LEGRAND P., ROMERO E. A., ELEAZAR COHEN B., BOLARD J., 1992,

Effect of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 36. n°11 : 2518-2522.

57.LEGRAND P., VERTUT-DOI A., BOLARD J., 1996,

Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formulations by a macrophage-like cell line.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Chap. 37 : 519-533.

58.LEHNINGER A. L., 1982,

Principes de biochimie.

Ed. Flammarion Médecine- Sciences : 316.

**59.LUC G., LECERF J.M., BARD J. M., HACHULLA E., FRUCHART J. C.,
DEVULDER B., 1991,**

Cholestérol et athérosclérose.

Ed. MASSON : 1-35.

60.MADDUX M. S., BARRIERE S. L., 1980,

A review of complications of amphotericin B therapy : Recommendations for prevention and management Drug.

Intelligence and Clinical Pharmacy. Vol. 14 : 177-181.

61.MARTIN E., STUBEN A., GORZ A., WELLER U., BHAKDI S., 1994,

Novel aspect of amphotericin B action : accumulation in human monocytes potentiates killing of phagocytosed *Candida albicans*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 38 n°1 : 13-22.

62.MAZERSKI J., BOLARD J., BOROWSKI E., 1982,

Self association of some polyene macrolide antibiotic in aqueous media.

Biochimica et Biophysica Acta. 719 : 11-17.

63.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 Biophysical Journal. Vol. 18 : 1-6.

64.MEDOFF G., VALERIOTE F., DIECKMAN J., 1981,

Potentialiation of anticancer agents by amphotericin B.

JNCI Vol. 6 : 131-135.

MEHTA R. L., LOPEZ-BERESTEIN G., HOPFER R., MILLS K., JULIANO R. L., 1984,

Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mamalian cells.

Biochimica et Biophysica Acta. 770 : 230-234.

65. METZGER S., JAGER H., HOFMANN H., 1994,

Fluconazole sensitivity of *Candida* strains *in vitro* in the microdilution test and agar diffusion test.

Mycoses ; 37(supp1) : 64-70.

66. PAGE-HAYNES P. M., CHONG P. L. G., BUCKLEY H. R., PIERINGER R. A., 1996,

Fluorescence studies on the molecular action of amphotericin B on susceptible and resistant fungal cells.

Biochemistry. Vol. 35 : 7983-7992.

67. PERKINS W. R., MINCHEY S. R., BONI L. T., SWENSON C. E., POPESCU M. C., PASTERNAK R. F., JANOFF A. S., 1992,

Amphotericin B phospholipid interactions responsible for reduced mammalian cell toxicity.

Biochimica et Biophysica Acta. 1107 : 271-282.

68. PETIT C., CHERON M., JOLY V., RODRIGUES J. M., BOLARD J., GABORIAU F., 1998,

In Vivo therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of amphotericin B-Deoxycholate obtained by mild heating.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol 42 : 779-785.

69. PETIT C., YARDLEY V., GABORIAU F., BOLARD J., CROFT S. L., 1999,

Activity of a heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (fungizone[®]) against *Leishmania donovani*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 43. n° 2 : 1-3.

70. PLETTERBERG A., STOEHR A., HOFFKEN G., BERGS C., TSCHECHN B., RHUNKE M., HEISE W., DIECKMANN S., MEIGEL W., 1994,

Fluconazole therapy of oral Candidiasis in HIV-infected patients : results of a multicenter study.

Infection ; 22 : 118-123.

71. RABASTE F., SANCELME M., DELORT A. M., 1996,

Effect of amphotericin B on glucose metabolism in *Candida albicans* blastospores evidenced by ¹³C NMR.

Canadian Journal of Microbiology. Vol. 42 : 705-710.

72. RAMOS H., ATTIAS DE MURCIANO A., COHEN B. E., BOLARD J., 1989,

The polyene antibiotic amphotericin B acts as a Ca^{2+} ionophore in steel containing liposomes.

Biochimica et Biophysica Acta. 982 : 303- 306.

73. RIDENTE Y., AUBARD J., BOLARD J., 1996,

Enhanced resonance Raman and circular dichroism spectra of amphotericin B and its methylester derivative in silver colloidal solutions. Vol. 2 : 1-8.

74. RIDENTE Y., AUBARD J., BOLARD J., 1999,

Absence in amphotericin B-spiked human plasma of the free monomeric drug, as detected by SERS.

Sous press : 1-10.

75. RINNERT H., THIRION C., DUPONT G., LEMATRE J., 1977,

Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of a polyene antibiotic : Amphotericin B.

Biopolymers. Vol. 16 : 2419-2427.

76. RHUNKE M., EIGLER A., ENGELMANN E., GEISELER B., TRAUTMANN M., 1994,

Correlation between antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from patients with HIV infection and clinical results after treatment with fluconazole.

Infection ; 22 : 132-136.

77. SANGEORZAN J., BRADLEY S., HEX M., ZARMS L. T., RIDENOUR G. L., TIBALLI R. N., KAUFFMAN C. A., 1994,

Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients : Colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance.

American Journal of Medicine ; 97 : 339-346.

78. SCHOLER H. J., 1984,

Resistance to systemic antifungal agents.

Antimicrobial Drug Resistance Review.

Academic Press. Inc. Chap. 14 : 393-460.

79. SEOANE R., MINONES J., CONDE O., CASAS M., IRIBARNEGARAY E., 1998,

Molecular organisation of amphotericin B at the air- water interface in the presence of sterols : A monolayer study.

Biochimica et Biophysica Acta. 1375 : 73-83.

80. SHORE V. G., SHORE B., LEWIS S. B., 1978,

Isolation and characterization of two threonine-poor apolipoproteins of human plasma high density lipoproteins.

Biochemistry. Vol. 17 : 2174- 2179.

81. SOKOL-ANDERSON M. L., BRAJTBURG J., MEDOFF G., 1986,

Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*.

Journal of Infectious Diseases. Vol. 154 : 76-82.

82. SOUZA L. C., MARANHAO R. C., SCHREIER S., CAMPA A., 1993,

In vitro and *in vivo* studies of the decrease of amphotericin B toxicity upon association with a triglyceride- rich emulsion.

The British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 32 : 123-132.

83. SPERRY P. J., CUA D. J., WETZEL S. A., ADLER-MOORE J. P., 1998,

Antimicrobial activity of AmBisome and non-liposomal amphotericin B following uptake of *Candida glabrata* by murine epidermal Langerhans cells.

Medical Mycology. Vol. 36 : 135-141.

84. SURARIT R., SHEPHERD M. G., 1987,

The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *Candida albicans*.

Journal of Medecin Veterinary Mycology. Vol. 25 : 403- 409.

85. SZPONARSKI W., WIETZEBIN J., BOROWSKI E., GARY-BOBO C. M., 1988,

Interaction of ¹⁴C- labelled amphotericin B with human erythrocytes : Relation ship between binding and induced K⁺ leak.

Biochimica et Biophysica Acta. 938 : 97-106.

86. THOMAS A. H., 1986,

Suggested mechanisms for the antimycotic activity of the polyene antibiotics and the *N*-substituted imidazoles.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol. 17 : 269- 279.

87.UTZ J. P., BENNET J. E., BRANDISS M. W., BUTLER W. T., HILL G. J., 1964,

Amphotericin B toxicity.

Annual International Medecin. Vol. 61 : 334-354.

88. VERTUT-DOI A., BOLARD J., ONISHI SH., 1994,

The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B.

Antimicrobial Agents of Chemotherapy. Vol. 38: 2373-2379.

89. WASAN K. M., ROSENBLUM M. G., CHEUNG L., BERESTEIN G. L., 1994,

Influence of lipoprotéin on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 38. n° 2 : 223-227.

90. WASAN K. M., RAASVELD M. H., WEEL F. L., BRAAT M. C. P., BAKKER J. M., 1997,

Enhanced Amphotericin B nephrotoxicity in intensive care patients with elevated levels of LDL cholesterol.

Clinical Infectious Diseases. Vol. 24 : 78- 80.

91. WIETZERBIN J., SZPONARSKI W., BOROWSKI E., GARY-BOBO C. M., 1990,

Kinetic study of interaction between [¹⁴C] Amphotericin B derivatives and human erythrocytes : Relation ship between binding and induced K⁺ leak.

Biochimica et Biophysica Acta. 1026 : 93-98.

92. YAMAMURA D. R. L., ROTSTEIN C., NICOLLE L.E., IOUANNOU S., 1999,

Candidemia at selected Canadian sites : results from the Fungal Disease Registry, 1992-1994.

Canadian Infectious Disease Society ; 160 : 493-499.

EXHIBIT

Composition de la fungizone[®] (amphotéricine B désoxycholate) :

Amphotéricine B	50 mg
Deoxycholate de sodium	38,8 mg
Na ₂ HPO ₄	15,8 mg
NaH ₂ PO ₄	4,40 mg

Réactif de précipitation des HDL :

Dextran sulfate	1%
MgCl ₂	0,5 mole/l
Azide de sodium (facultatif)	0,5%

Réactif de précipitation des LDL :

Citrate trisodique	64m mole/ l
--------------------	-------------

Ajuster le pH de la solution entre 5,08 et 5,12 avec de l'acide citrique
Ajouter 2% d'héparine à 100.000 UI/ l

Réactif de solubilisation des LDL :

Citrate trisodique	1 mole/l
Citrate	110 m mole/l

Solution de lavage :

NaCl	150 m mole/l
MgCl ₂	2 m mole/l

P.B.S :

Na ₂ HPO ₄	10 m mole/l
NaH ₂ PO ₄	10 m mole/l
NaCl	150 m mole/l
pH	7,4

Résumé

L'amphotéricine B reste l'antifongique de choix dans le traitement des mycoses systémiques qui constituent une grande préoccupation de par leur incidence importante notamment chez les sujets immunodéprimés. Seulement, sa toxicité vis à vis des cellules animales qui se traduit essentiellement par une néphrotoxicité, limite son utilisation en clinique. Cette toxicité est liée aux proportions des formes solubles et insolubles de l'antifongique en milieu aqueux. L'environnement physico-chimique de la molécule semble jouer un rôle fondamental. Selon plusieurs auteurs, ce sont les formes insolubles qui sont les moins toxiques pour les cellules animales. Sur cette base, nous avons procédé à la modulation des facteurs physico-chimiques afin de déterminer les conditions favorables à la réduction de la toxicité de l'amphotéricine B.

Par ailleurs, nous avons complexé l'amphotéricine B aux lipoprotéines de haute et basse densité, natives ou dénaturées, pour déterminer l'impact de ces dernières sur la toxicité induite par l'antifongique.

Les tests de toxicité *in vivo* étaient effectués sur des souris de type Wistar. Enfin, les formulations les moins toxiques ont été testées du point de vue efficacité, en infectant les souris par *Candida albicans*.

De cette étude *in vivo* chez des souris Wistar il ressort d'une part que :

Les facteurs physico-chimiques les plus favorables à la réduction de la toxicité de l'amphotéricine B sont les suivants :

Une concentration de solution mère d'antifongique $\leq 10^{-4}M$.

Le solvant de la solution stock le moins toxique est le sérum physiologique.

Une dose finale de 1mg/kg de poids.

Un préchauffage de la solution mère d'antifongique de 20 minutes à 70°C.

D'autre part,

La complexation de l'amphotéricine B aux lipoprotéines de haute densité, natives ou dénaturée, et aux lipoprotéines de basse densité dénaturées, protège les cellules animales, tandis que le complexe amphotéricine B-LDL natives induit une toxicité importante vis à vis des cellules animales.

Le test de l'efficacité antifongique a porté sur trois formulations dont une semble intéressante sur le plan toxicité et efficacité : Amphotéricine B-DOC, préparé dans le sérum physiologique à $10^{-4}M$, préchauffé à 70 °C, lié aux HDL natives, enfin dilué dans le PBS à une dose finale de 1mg/kg. Sur trois schémas thérapeutiques testés (traitement par la formulation toutes les 24h, toutes les 48h et 1 fois par semaine), le traitement par injections intraveineuses répétitives toutes les 48h sur 10 jours a été retenu.

Mots clés : Amphotéricine B, Amphotéricine B-désoxycholate, facteurs physico-chimiques, lipoprotéines, cellule animale, toxicité, activité antifongique, *Candida albicans*.