

UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID TLEMCEM
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

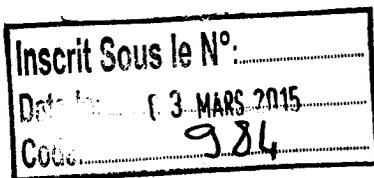
THESE

Présentée

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat d'état es-sciences

En Biologie Moléculaire et Cellulaire Option : Biochimie



Par

Mme BOUCHERIT-ATMANI Zahia

Thème

**Mécanisme d'action des antifongiques polyèniques.
Exemple de l'amphotéricine B**

Soutenue le : 10 Décembre 2007

Devant le jury :



Présidente	Mme Merzouk Haféda	Professeur, Université Tlemcen
Directeur de thèse	Mr Benyoucef Mohamed	Professeur, Université Tlemcen
Examineurs	Mr Benali Mohamed	Maître de Conférences, Université S.B.A.
	Mr Bolard Jacques	Directeur de recherche (CNRS)
	Mr Seksek Olivier	Directeur de recherche (CNRS)
	Mr Abdelouahed Djamel E.	Maître de Conférences, Université Tlemcen

Année Universitaire : 2007-2008



Louange à Dieu le tout puissant qui ma donné la force et la volonté de réaliser ce modeste travail que je dédie à :

A mes chers parents, des gens pleins d'attention et d'affection, qui n'ont jamais cessé de prier pour moi. Merci pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises.

A mon mari Kebir, un être cher et indispensable qui a su m'encourager, me remonter le moral et qui a cru en moi dans les moments difficiles. La réalisation de cette thèse a été exécutée grâce à ton soutien, ta compréhension et ta présence à mes côtés. Un grand merci pour les nombreux moments sacrifiés à la concrétisation de ce travail devenu, par la force des choses, une affaire familiale.

A mes frères et sœurs

A ma belle famille

A mon petit bonhomme Mourad Kara Zaïtri

A la mémoire de notre chère et regrettée Madame Lahfa Samira. Que son âme repose en paix

Remerciements

«A goal is a dream with a deadline»

J'ai lu cette phrase il y a quelques mois, elle m'a marquée car c'est un peu la définition que je donnerais de ma thèse : un rêve avec une date limite. Je n'étais pas seule dans ce rêve, loin de là ! Je tiens donc à remercier toutes les personnes qui m'ont permis de rêver et d'atteindre ce but.

Je tiens tout d'abord à remercier Messieurs Boucherit Kebir, Directeur du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » Tlemcen et Ghomi Mahmoud Directeur du laboratoire « Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi) » Paris, qui m'ont accueillie dans leurs laboratoires. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens matériels depuis le début jusqu'à la fin de ma thèse.

Mes remerciements les plus vifs vont à mon Directeur de thèse Monsieur le Professeur Mohamed Benyoucef, pour la qualité de son encadrement au quotidien, ses idées scientifiques et la rigueur avec laquelle il a dirigé ce travail.

Je tiens à remercier Madame Merzouk Hafida, Professeur au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant de présider ce jury. Je vous prie de trouver ici l'assurance de ma respectueuse gratitude.

Je souhaite remercier très sincèrement Monsieur le Professeur Bolard Jacques Directeur de recherche au CNRS pour son accueil et son très bon encadrement. J'ai pu bénéficier de sa grande expérience dans le domaine des antifongiques et de sa rigueur scientifique qui s'ajoute à ses nombreuses qualités humaines que j'ai pu découvrir au travers de notre travail commun. Je le remercie également pour sa présence au sein de mon jury de thèse.

J'exprime aussi ma sincère gratitude à Monsieur Seksek Olivier, Directeur de recherche au CNRS pour sa gentillesse, son implication dans le sujet et ses conseils avisés, son écoute et son soutien dans les moments difficiles. Ses connaissances et nos discussions m'ont été toujours utiles. Je le remercie pour avoir accepté de siéger parmi les membres du jury.



Je suis très honorée que Messieurs Benali Mohamed, Maître de Conférences à l'université Djilali Liabes, Sidi Bel Abbas, et Abdelouahed Djamel Eddine Maître de Conférences au Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen aient accepté la charge d'être examinateurs de ce travail. Je leur suis très reconnaissante.

Je voudrais remercier du fond du cœur Mademoiselle Ouided Friaa, une personne exceptionnelle que j'ai eu la chance de rencontrer par le biais de ma formation au BioMoCeTi. Ton esprit scientifique, ta disponibilité, ta gentillesse et avant tout ton amitié font de toi un être cher que je n'oublierai jamais. Surtout reste comme tu es.

J'adresse un grand merci à tous les membres du laboratoire antibiotiques antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique qui m'ont soutenu, compris et aidé pour aller au bout : Lahfa Farid, Djaziri Rabah, Sari Lamia, Bedrane Amine, Benmansour Meriem, Medjati Nouria, Abdellaoui Nacer, Benariba Nabila, Rahmoun Nadjib, Gouzi Khaled. Merci pour votre aide et votre amitié qui m'ont été bien précieuses au quotidien.

Une pensée particulière pour Mr Drissi Mourad qui actuellement traverse « la même épreuve que moi ».

Je remercie les personnes du BioMoCeti, équipe d'Evry, avec lesquelles j'ai passé une année agréable. Je pense tout particulièrement à Pierre-Yves Turpin, Sophie Deshayes, Jean Cognet, Irène Taticheff (mille merci), Françoise Lavielle (alors c'est dicty ou dictyo), Martine Nal (Martinou), Monique Cheron, Daniel Brault, Christian Zentz, Bélen, Halina, Imène, Guy, Karolina. Merci pour tous les échanges enrichissants que nous avons eu.

Je remercie du fond du cœur les familles Benabbas, Moucherit et Friaa de Paris ainsi que les familles Drissi, Fekkar, Lahfa, Berrached et Taouli pour leur soutien moral de chaque instant et pour la confiance qu'ils me donnent.

Merci enfin à tous ceux et celles qui, de près ou de loin, se sont intéressées à mon travail et qui m'ont encouragées pendant toutes ces années.

SOMMAIRE

Introduction.....	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique.....	3
1- Propriétés de l'amphotéricine B.....	8
1-1- Propriétés physico-chimiques.....	8
1-2 - Propriétés biologiques.....	10
1-2-1- Spectre d'action	10
1-2-2- Posologie et mode d'administration.....	10
1-2-3-Autres activités.....	10
1-2-4- Pharmacocinétique.....	11
1-2-5- Effets secondaires	11
2 - Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	12
3- Amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B	
voies de recherche.....	19
3-1- Formulations de l'amphotéricine B.....	19
3-1-1 Complexes.....	19
a- Amphotéricine B – Borate.....	19
b- Amphotéricine B – Sulfate de Cholestérol (ABCD).....	19
c- Amphotéricine B – cyclodextrines.....	20
d- Complexation aux lipoprotéines du sérum sanguin.....	20
3-1-2 Association Amphotéricine B – détergents ou lipides.....	21
a- Désoxycholate de sodium.....	21
b- Polyoxyéthylèneglycols.....	21
c- Esters de sucrose.....	21
d- Lécithine d'œuf-acide glycocholique.....	22
e- Poloxamères.....	22
3-1-3- Emulsions d'amphotéricine B.....	22
3-1-4- les liposomes de l'amphotéricine B.....	23



3-1-5- Modulation de l'environnement physico-chimique.....	25
3-2- Dérivés semi-synthétiques de l'amphotéricine B.....	26
4- Vectorisation des oligonucléotides antisens et thérapie génique.....	29
4-1- Les vecteurs non viraux.....	30
4-2- La stratégie antisens.....	32
4-3- Applications thérapeutiques des oligodésoxyribonucléotides antisens.....	34
4-3-1- Limitation de la méthode.....	35
4-3-2- Stabilité.....	36
4-4- Les vecteurs synthétiques des acides nucléiques.....	38
4-5- vectorisation des oligonucléotides.....	38
4-6- Potentialités des dérivés de l'amphotéricine B comme vecteur.....	39
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	43
1 ^{ère} Partie : Etude de la dormance des cellules de <i>Candida albicans</i> en présence d'amphotéricine B.....	43
1- Matériel et méthodes.....	43
1-1- Matériel.....	43
1-1-1- Milieu de culture.....	43
1-1-2- <i>Candida albicans</i>	43
1-1-3- Antifongique.....	44
1-1-4- Marqueur de la viabilité des cellules.....	44
1-2- Méthodes.....	44
1-2-1- Croissance des levures.....	44
a- Culture des levures sur tubes.....	44
b- culture des levures sur microplaques.....	45
1-2-2- Détermination des Unités Formant Colonies (UFC).....	45
1-2-3- Mesures en cytométrie en flux.....	45
a- Principe.....	45
b- Mode opératoire.....	47
1-2-4- Etude microscopique.....	47

1-2-5- Mise en évidence de la viabilité des cellules en présence du H2DCFDA par microscopie d'épifluorescence.....	48
2^{ème} Partie : Etude de l'effet de l'environnement ionique sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B.....	49
1- Matériel et méthodes.....	49
1-1- Matériel.....	49
1-1-1- Matériel biologique.....	49
1-2- Méthodes.....	49
1-2-1- Préparation de la suspension érythrocytaire.....	49
1-2-2- Préparation des solutions antifongiques.....	49
1-2-3-Préparation des sels.....	50
1-2-4- Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges.....	50
1-2-5- Evaluation de l'activité antifongique de l'amphotéricine B.....	50
3^{ème} Partie : Vectorisation d'oligonucléotides par un dérivé cationique de l'amphotéricine B, l'AMA chez des cellules de <i>Candida albicans</i>.....	52
1- Matériel et méthodes.....	52
1-1- Matériel.....	52
1-1-1-Cellules.....	52
1-1-2- Oligonucléotide.....	52
1-1-3- L'AMA.....	53
1-2- Méthodes.....	54
1-2-1- Formation des complexes AMA/ODN.....	54
1-2-2 -Traitement des cellules.....	56
1-2-3- Mise en évidence de l'internalisation cellulaire par cytométrie en flux.....	56
Chapitre 3 : Résultats et discussion.....	58
1^{ère} PARTIE : Dormance des cellules de <i>Candida albicans</i> sous l'effet de l'amphotéricine B.....	58
1 - Détermination de la concentration de l'inoculum.....	60
1-1- Mesure de la densité optique.....	60
1-2- Mesure en cytométrie en flux.....	61



2- Détermination de la concentration finale de l'antifongique.....	68
3- Mise en évidence de la dormance des cellules.....	71
3-1- Mesure de la croissance par turbidimétrie.....	71
3-2- Mesure en cytométrie en flux.....	74
3-3 Etude microscopique.....	79
3-4 Mesure des Unités Formants Colonies (UFC).....	83
4- Conclusion.....	85
5- Discussion.....	88
2^{ème} PARTIE : Effet de l'environnement ionique sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B.....	96
1- Effet des chlorures.....	97
2- Effet des sulfates.....	101
3- Conclusion.....	105
4- Discussion.....	106
3^{ème} PARTIE : Vectorisation d'oligonucleotides par un dérivé cationique de l'amphotéricine B, l'AMA chez <i>Candida albicans</i>.....	107
1- Détermination de la concentration en AMA.....	111
1-1- Conclusion.....	113
2- Effet du MgCl ₂ sur l'efficacité de l'AMA.....	115
2-1- Conclusion.....	119
3- Vectorisation d'un oligonucléotide par l'AMA.....	120
4- Mise en évidence de l'internalisation de l'ODN par imagerie de fluorescence.....	124
4-1- Conclusion.....	125
5- Mise en évidence de l'internalisation de l'ODN par cytométrie en flux.....	126
6- Mécanisme d'internalisation de l'ODN par l'AMA.....	128
7- Dormance des levures sous l'effet du complexe AMA/ODN.....	132
7-1- Conclusion.....	135
Chapitre 4 : Conclusion générale.....	136
Chapitre 5 : Références bibliographiques.....	141



Liste des abréviations

Pour des raisons de lisibilité, la signification d'une abréviation n'est souvent rappelée qu'à sa première apparition dans le texte d'un chapitre. Par ailleurs, puisque nous utilisons toujours l'abréviation la plus usuelle, il est fréquent que ce soit le terme anglais qui soit employé, auquel cas nous l'indiquons en italique ou nous présentons une traduction.

ABCD	Dispersion colloïdale de l'amphotéricine B
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMA	Amphotéricine B-3- (N'N'-diméthylamino) propylamide
AmB	Amphotéricine B
AME	Amphotéricine B méthyl-ester
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMF	Concentration minimale fongicide
Chol	Cholestérol
CMV	Cytomégalovirus
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DMPC	Dimyristoyl phosphatidyl choline
DMPG	Dimyristoyl phosphatidyl glycerol
DSPG	Distearoyl phosphatidyl glycérol
DO	Densité Optique
EPC	Phosphatidyl choline d'oeuf
FSC	<i>Forward scattering</i>
HDL	<i>Hight density lipoprotein</i>
HSPC	Phosphatidyl choline de soja hydrogénée
LUVs	<i>Large unilamellar vesicles</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LDH	Lactate déshydrogénase
MDR	<i>Multi drug resistance</i>
MLVs	<i>Multi lamellar vesicles</i>
ODN	Oligodésoxyribonucléotide
ODN-PS	Oligonucléotide phosphorothioate
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PS	Phosphatidylsérine

PLP	<i>Peptide nucleic acids</i>
PBS	<i>Phosphate buffer sodium</i>
SUVs	<i>Small unilamellar vesicles</i>
SA	<i>Stéarylamine</i>
SSC	<i>Side scattering</i>
UFC	<i>Unités formant colonies</i>
UA	<i>Unités arbitraires</i>
VIH	<i>Human deficiencie virus</i>
YM	<i>Yeast medium</i>
siRNA	<i>Small Interferring RNA</i>



Les candidoses systémiques ou profondes, dont la fréquence a augmenté, sont associées à une mortalité élevée. Cette mortalité reste lourde en raison du délai au diagnostic, et du terrain sur lequel elles surviennent. En effet, le nombre de ces infections a considérablement augmenté depuis 25 ans, en raison d'une extension de la population à risque, et de l'allongement de la survie des patients qui la constituent.

L'apparition de résistance aux antifongiques chez certains microorganismes et l'inefficacité d'une antifongothérapie pour protéger l'organisme contre l'envahissement de certaines souches pathogènes constituent un problème sérieux. Ainsi, depuis 1950, l'année de la découverte de la nystatine par HAZEN et BROWN, plusieurs antifongiques furent isolés, mais un nombre très restreint est utilisé à des fins thérapeutiques du fait de leur toxicité et/ou de leur inactivité *in vitro*.

C'est seulement depuis cette dernière décennie que la thérapeutique antifongique s'est réellement développée mais malgré plus de quarante ans d'utilisation, l'amphotéricine B reste encore l'antifongique polyénique de premier choix dans les infections fongiques profondes, en raison de son spectre très large, de son effet fongicide intense et de l'apparition de relativement peu de cas de résistance. La mise à disposition des dérivés azolés qui sont mieux tolérés que l'amphotéricine B a suscité de grands espoirs malheureusement déçus par l'apparition de cas de résistances de plus en plus fréquentes (SCHOLER et POLACK, 1984). De plus, les dérivés azolés, contrairement à l'amphotéricine B, sont plutôt des inhibiteurs de la croissance des cellules fongiques (CARBON et coll. 1994). Ce regain d'intérêt pour l'amphotéricine B a incité la renaissance des études concernant cette molécule. Pour mieux cibler la prise en charge des mycoses systémiques, une meilleure compréhension du mécanisme d'action de cette drogue qui rejoint son mécanisme de toxicité, tous deux basés sur une interaction de l'antifongique avec les stérols membranaires, s'impose.

Notre étude s'inscrit dans cette optique et consiste à étudier d'une part le phénomène de « dormance » des cellules de *Candida albicans* sous l'effet de l'amphotéricine B pour expliquer les échecs thérapeutiques liés à cette drogue. D'autre part, nous proposons une stratégie novatrice pour lutter contre la résistance des levures aux antifongiques, il s'agit de la thérapie antisens antifongique.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Les mycoses systémiques restent des affections graves et leur incidence est en progression significative ces vingt cinq (25) dernières années. Celles-ci se classent maintenant au quatrième rang des infections nosocomiales (BLANCHET et coll. 2004).

La pathologie fongique est associée à une augmentation significative de la morbidité et de la mortalité (40%) des patients hospitalisés (KETTANI et coll. 2005).

Si *Candida albicans* reste le principal agent responsable de ces mycoses (50 à 70 % des infections), on constate l'émergence d'espèces non-*albicans* qui sont souvent plus réfractaires aux traitements classiques, telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. lusitanae*. Ces maladies sont en forte recrudescence, en raison de l'extension de la population à risque immunodéprimés liés au virus du sida, aux avancées en transplantation et en oncologie, à l'utilisation de cathéters vasculaires, au recours fréquent à des antibiothérapies à large spectre et à une émergence de plus en plus fréquente des souches résistantes aux traitements antifongiques (CARLE et coll. 2003).

L'arsenal thérapeutique visant à lutter contre les mycoses systémiques s'est élargi durant les 30 dernières années. En effet, jusqu'aux années 70 le traitement des mycoses profondes reposait sur l'utilisation de l'amphotéricine B, chef de file des antifongiques polyéniques. Mais cette molécule présente un nombre important d'effets secondaires dont fièvre, vomissement, diarrhées, des toxicités pulmonaires, neurologiques et rénales qui restent la complication majeure du traitement dont elle limite souvent la durée [(BOURRIN et coll. 1993), (BOLARD et coll. 1997)].

Le début des années 80 a été marqué par l'apparition des azolés. Tout d'abord le miconazole dont l'utilisation a été limitée par la survenue fréquente d'effets secondaires, puis le kétoconazole et enfin les triazolés dont les deux molécules étudiées sont le fluconazole et l'itraconazole (BRYQUIER 1999).

Contrairement à l'amphotéricine B, les azolés sont mieux tolérés (CANIAUX et coll. 1984) ; ce qui a suscité de grands espoirs malheureusement déçus par l'apparition de cas de résistances de plus en plus fréquentes (SCHOLER et POLACK 1984). De plus, à la différence de l'amphotéricine B qui possède un caractère fongicide au

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

moins dans certaines mycoses, les azolés sont plutôt des inhibiteurs de la croissance des cellules fongiques (CARBON et coll. 1994).

Pour cette raison, les recherches s'orientent vers la synthèse de nouvelles molécules chimiques (dérivés azolés) et l'isolement d'autres antifongiques ayant une efficacité plus élevée et un mode d'action plus spécifique et plus sélectif avec moins d'effets indésirables.

Par ailleurs, ces 20 dernières années ont vu une complète renaissance des études concernant la molécule d'amphotéricine B malgré qu'elle soit à l'origine de phénomènes toxiques mettant en jeu parfois le pronostic vital.

C'est pourquoi, plusieurs stratégies visant à augmenter l'index thérapeutique de cet antifongique ont été développées. Il y a celles qui sont basées sur la modification de sa structure chimique et celles qui sont basées sur les nouvelles formulations où plusieurs solutions ont été préconisées pour moduler la solubilité de l'amphotéricine B.

Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec les formulations liposomales de l'amphotéricine B sans toutefois avoir de certitudes quant à la manière dont elles peuvent modifier le mécanisme d'action de cet antifongique.

En ce qui nous concerne, tenant compte des avantages qu'offre cet antifongique, nous avons opté pour l'élaboration d'une nouvelle stratégie permettant d'améliorer son index thérapeutique. Le large spectre d'action de cette molécule, la très faible fréquence d'apparition de souches résistantes et la large expérience clinique constituent ses atouts majeurs.

En effet, l'étude de la sensibilité des agents pathogènes aux antifongiques est délicate et insuffisamment codifiée. Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et ou de la concentration minimale fongicide (CMF), ont une valeur prédictive faible pour le succès ou l'échec clinique. La corrélation entre les données in vitro et les résultats in vivo n'est bonne que dans le cas des candidoses oropharyngées du sujet infecté par le virus de l'immunodéficience humaine (DATRY et coll. 2001).

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

De plus, l'incapacité des cellules de *Candida albicans* traitées aux antifongiques à former des colonies sur milieu gélosé sont généralement considérées comme signifiant la mort des cellules. Cependant, on admet que sous antifongique, une partie seulement des microorganismes viables se divisent, lorsqu'on les force à une réactivation, l'autre partie étant considérée comme constituée de cellules viables mais non cultivables.

Jusqu'à l'heure actuelle, on ne dispose pas d'explications claires à de telles observations. Une meilleure connaissance du mécanisme d'action des antifongiques polyéniques et notamment de l'amphotéricine B (qui constitue l'objet de notre travail) permettrait probablement de comprendre la logique de ces observations. C'est pourquoi, nous avons voulu vérifier si cela était le cas des cellules de *Candida albicans* traitées par l'amphotéricine B. La taille (pour faire la distinction entre les grandes et les petites cellules) et la prolifération des cellules seront appréciées par cytométrie en flux, un bon moyen pour quantifier l'hétérogénéité des microorganismes [(DAVEY et KELL 1996), (DAVEY et WINSON 2003)], en l'absence et en présence d'antifongique. La caractérisation quantitative et qualitative de la viabilité des cellules fongiques a été largement étudiée en utilisant la fluorocytométrie en flux [(GREEN et coll. 1999), (PFALLER 2005)], malheureusement, ces études n'ont pas été capables de faire le tri des populations rencontrées en présence de l'antifongique polyénique de référence, l'amphotéricine B.

Pour estimer l'effet de l'amphotéricine B sur des cellules de *Candida albicans*, LIAO et coll. ont en 1999 étudié la relation entre viabilité, mortalité des cellules et intégrité membranaire et activité intracellulaire. Il apparaît que des cellules de *Candida albicans* exposées à des concentrations d'amphotéricine B comprises entre 0,5 et 1 μM sont incapables de se multiplier mais peuvent ressusciter. En effet, plus récemment, les mêmes auteurs ont montré que les cellules fongiques traitées par l'amphotéricine B à une concentration de 0,5 μM peuvent ressusciter après un temps d'incubation de 15 heures à 22°C (LIAO et coll. 2003). Il semblerait qu'il est possible de mettre en évidence, dans ces conditions, la viabilité des cellules.

C'est pourquoi, dans la première partie de notre travail, nous avons abordé le problème de la réactivation de certaines levures et fongis soumises à un traitement

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

antifongique. Cet échappement d'une partie des cellules infectieuses à l'action des antifongiques constitue en effet, un handicap à l'efficacité thérapeutique. Pour quantifier la distribution des cellules de *Candida albicans* cultivées sur milieu Yeast Medium (YM) liquide en présence et en l'absence d'amphotéricine B, nous avons utilisé la diffusion de la lumière par mesure de l'absorbance et la cytométrie en flux (sans fluorescence).

Ensuite, les données de cytométrie en flux sur la dormance des cellules et sur leur viabilité ont été vérifiées d'une part, par les études microscopiques qui nous ont renseignées sur l'aspect des cellules, d'autre part, par des mesures d'unités formant colonies (UFC).

Dans la deuxième partie de notre travail, utilisant les données sur les mécanismes d'action de l'amphotéricine B, notamment son activité sur les membranes cellulaires, nous avons proposé une nouvelle stratégie de traitement contre les mycoses systémiques : il s'agit d'une approche antisens.

La démarche utilisée a consisté à savoir si un dérivé cationique de l'amphotéricine B, l'amphotéricine B-3- (N'N'-diméthylamino) propylamide (AMA), capable de former des pores transmembranaires (CHERON et coll. 1988) et potentiellement capable d'interagir par ses deux charges positives à pH physiologique (BLANC et coll. 2000a) avec les oligonucléotides polyanioniques était en mesure de vectoriser les oligonucléotides antisens.

L'AMA réunit, à notre avis, à la fois les qualités de l'amphotéricine B et les propriétés favorables à une vectorisation d'oligonucléotides. Les caractéristiques qui nous intéressent sont les suivantes :

- 1- L'AMA est capable de former des pores transmembranaires. Cette propriété s'observe dans la même gamme de concentration que pour l'amphotéricine B (CHERON et coll. 1988).
- 2- Elle est cationique, à raison de deux charges positives par molécule à pH physiologique. Elle pourra interagir avec les oligonucléotides polyanioniques. Le choix de l'AMA a été guidé par une étude comparative entre l'AME et l'AMA pour l'internalisation d'un oligonucléotide fluorescent. L'AME, autre dérivé de l'amphotéricine B, porteur d'une seule charge positive à pH

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

physiologique, s'est révélée moins efficace que l'AMA (GARCIA CHAUMONT et coll.2000a).

Avant de commenter les résultats de nos travaux, nous allons donner d'abord une revue bibliographique sur les domaines qui touchent de près le sujet de recherche sur lequel nous avons travaillé.

Nous commençons par un rappel sur les propriétés de l'amphotéricine B, des nouvelles préparations de cet antifongique et de son mécanisme d'action sur les levures et sur les cellules animales. Nous terminerons par l'apport de la vectorisation d'oligonucléotides antisens dans l'antifongithérapie dans le but d'augmenter l'index thérapeutique de ces drogues.

Après une présentation du matériel et des méthodes que nous avons utilisées, nous finirons par une présentation de l'essentiel des résultats que nous avons obtenus.

1- PROPRIETES DE L'AMPHOTERICINE B :

1-1- Propriétés physico-chimiques :

L'amphotéricine B est un antifongique polyénique produit naturellement par fermentation d'un champignon actinomycète (*Streptomyces nodosus*). Sa structure a été établie en 1970. Figure n°1

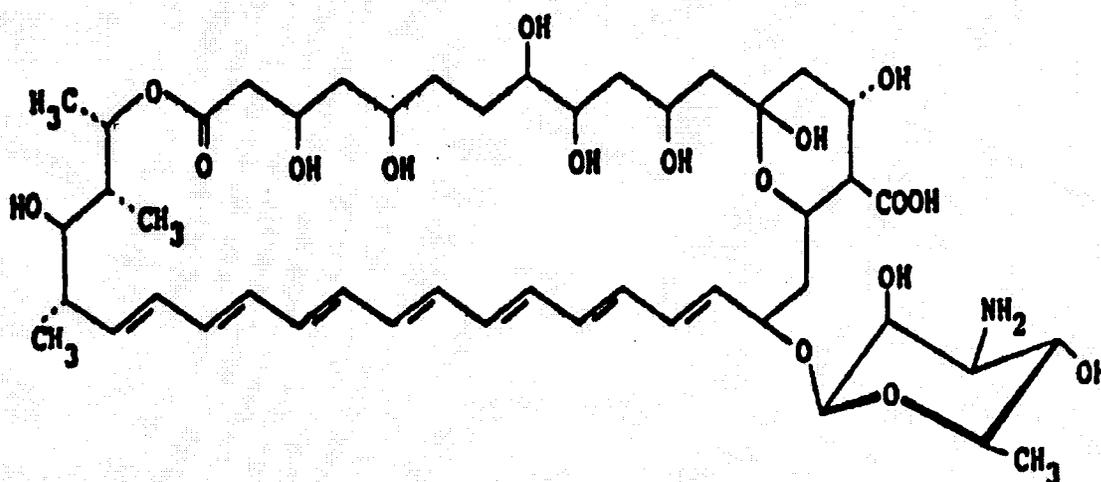


Figure n°1 : Structure de l'amphotéricine B (SCHOLER et POLACK, 1984)

Il s'agit d'une macrolactone (47 atomes de carbone) formée de :

- Une partie apolaire hydrophobe, essentiellement constituée d'un système rigide 7 doubles liaisons conjuguées en configuration trans.
- Une partie polaire hydrophile, caractérisée par un nombre important de groupes hydroxyle et d'une mycosamine.

La présence des ces groupements hydroxyle polaires et celles de doubles liaisons apolaires confère à l'amphotéricine B la propriété chimique d'amphiphile, qui limite considérablement sa solubilité en phase aqueuse.

La rigidité de la chaîne polyénique impose au macrocycle une forme allongée en bâtonnet.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

La présence des doubles liaisons conjuguées est responsable d'un intense spectre d'absorption U.V. dans la région 400-280 nm, ce qui permet de les étudier par spectroscopie.

De plus, la présence de deux groupements acido-basiques (COOH et NH₂) tous deux chargés au pH physiologique confère à cette drogue un caractère amphotère. Les pKa des fonctions COOH et NH₂ sont respectivement de 5,7 et 10 (HUNG et coll.1988).

Les nouveaux dérivés de l'amphotéricine B sont préparés à partir de modifications chimiques de ces deux groupements (SCHAFFNER 1987).

Elle se présente sous forme d'une poudre jaune, insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques telle que le diméthyl sulfoxyde (DMSO), le diméthyl formamide (DMF) et peu soluble dans les alcools.

En milieu aqueux, l'amphotéricine B est instable à la lumière, à l'oxygène, aux fortes températures et aux pH extrêmes [(HAMILTON-MILLER et coll. 1973), (HUNG et coll. 1988)], et se conserve sous forme sèche dans un dessiccateur à l'abri de la lumière à 4°C.

Son association au désoxycholate de sodium (Fungizone®) permet une préparation soluble dans l'eau ou le sérum glucosé sous forme colloïdale faite de micelles.

En solution aqueuse, l'amphotéricine B se répartit schématiquement en trois états : une forme agrégée responsable de la toxicité, une forme oligomère (essentiellement dimère) douée d'une moindre toxicité et une forme monomérique peu toxique responsable de l'activité antifongique. L'équilibre entre ces trois formes n'est pas figé. Il varie selon la concentration d'amphotéricine B et le solvant. Nous comprenons alors l'importance du choix du support de solubilisation pour réduire la proportion de forme toxique d'amphotéricine B, en se rappelant que cette molécule est amphotère. L'amélioration de la sélectivité de l'action de l'amphotéricine B en solution lipidique sera donnée en fonction du ou des lipides support [(BOLARD 1986), (LEGRAND et coll. 1992)].



1-2- Propriétés biologiques :

1-2-1- Spectre d'action :

Le spectre d'activité de l'amphotéricine B s'étend à la majorité des agents fongiques responsables d'infections humaines incluant les levures (*Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*), les champignons dimorphiques (*Histoplasma capsulatum* et *Coccidioides immitis*), les champignons filamenteux (*Aspergillus*) et les protozoaires (*Leishmania* et *Naegleria*).

1-2-2- Posologie et mode d'administration :

L'amphotéricine B à la posologie de 0,5 à 0,6 mg·kg⁻¹·j⁻¹ ou de 1 à 1,2 mg/kg un jour sur deux reste le traitement de référence de la plupart des mycoses systémiques, notamment chez les immunodéprimés (SUGAR et coll. 1990). Son efficacité est variable suivant la nature de l'agent fongique incriminé et du terrain sous-jacent : greffes de moelle, transplantations d'organe, hémopathies et cancer, infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), corticothérapie, diabète... Une réponse à l'amphotéricine B est ainsi observée dans 60 à 80 % des candidémies et seulement 50 % des candidoses chroniques disséminées [(REX et coll. 1994), (EDWARDS 1997)], 20 à 83 % des aspergilloses pulmonaires invasives (cette grande dispersion souligne l'importance du terrain) [(DENNING 1994), (ANDRES et coll. 1995)], 70 % des cryptococcoses (dans ces cas étant associée à la flucytosine) [(JOLY et coll. 1996), (VAN DER HORST et coll. 1997)], 10 à 50 % des mucormycoses [(MORRISON et Mc GLAVE 1993), (YOHAJ et coll. 1994)] et moins de 30 % des infections disséminées à *Trichosporon* (HERBRECHT et coll. 1993).

1-2-3- Autres activités :

- Activité immunostimulante de l'amphotéricine B observée par BLANKE et coll. (1977) sur des souris auxquelles ils avaient injecté de l'albumine sérique humaine trinitrophénylée.
- Activité de potentialisation de certains médicaments anticancéreux tels la lomustine, l'adriamycine, le méthotrexate, la vincristine, le melphalan et la cyclophosphamide [(MEDOFF et coll. 1981), (VALERIOTE et coll. 1984 et 1986)]. Bien que des études cliniques ne semblent pas confirmer l'existence

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

d'un effet potentialisateur de la chimiothérapie anticancéreuse par l'amphotéricine B (PRESANT et coll. 1984), il semblerait que cet antifongique soit susceptible de supprimer la résistance à une chimiothérapie (PRESANT et coll. 1987).

1-2-4- Pharmacocinétique :

L'amphotéricine B ne franchit pas la barrière intestinale même à des doses élevées. Elle se lie fortement aux protéines plasmatiques (91 à 95 %) après administration par voie intraveineuse et est largement distribuée dans les tissus avec un volume de diffusion de 4l/kg. Sa demi-vie plasmatique est de 24 à 48 heures, mais sa demi-vie d'élimination est proche de 15 jours. Sa distribution suit un modèle tricompartmental (ATKINSON et BENNETT 1978).

- Un compartiment central, vraisemblablement le sang total où l'antifongique est fixé en grande partie aux protéines et aux lipoprotéines plasmatiques ;
- deux (2) compartiments périphériques, s'équilibrant avec le compartiment central, l'un lentement ($t_{1/2}$ 15 j), l'autre rapidement ($t_{1/2}$ 20 h) suite à la lente libération de l'amphotéricine B à partir des tissus périphériques essentiellement le foie et la rate, et dans une moindre mesure les reins, les poumons, le cœur ainsi que de très faibles quantités au niveau du pancréas et du cerveau, du tissu adipeux et du muscle [(CHRISTIANSEN et coll. 1986) ; (COLETTE et coll. 1989)].

L'excrétion de l'amphotéricine B se fait par deux voies principales : la voie biliaire qui élimine au maximum 19% et la voie urinaire qui élimine 21% de la dose injectée (KHOO et coll. 1994).

1-2-5- Effets secondaires :

L'amphotéricine B présente des effets indésirables fréquents, directement liés à sa toxicité mais à côté des effets immédiats d'ordre général (nausées, diarrhées, douleurs abdominales, frissons, fièvre, céphalée et hypotension artérielle...), la toxicité rénale et les troubles métaboliques à type : d'hypokaliémie, d'hypomagnésémie et d'acidose métabolique sont les plus préoccupantes [(GALLIS et coll. 1990), (CLEMETS et PEACOCK 1990)].

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

La néphrotoxicité concerne 24 à 80 % des patients. Elle s'explique par une tubulopathie à l'amphotéricine B qui est constante et par une atteinte glomérulaire dans les stades tardifs. La responsabilité d'une vasoconstriction des artères rénales est envisagée (BRIGGS et coll. 1991). Il faut souligner le rôle aggravant ou favorisant de la déplétion sodée et de l'association à d'autres médicaments néphrotoxiques : aminosides, vancomycine, foscarnet, ciclosporine, cisplatine, furosémide [(GALLIS et coll. 1990), (CLEMETS et PEACOCK 1990)].

La prévention des désordres hydroélectrolytiques ainsi que l'apport de sodium (hydratation par 500 à 1 000 ml de sérum physiologique) réduisent la néphrotoxicité de l'amphotéricine B [(LIANOS et coll. 1991), (MAYER et coll. 1999)]. Une toxicité médullaire (anémie, leucopénie et/ou thrombopénie) est également rarement signalée (GALLIS et coll. 1990).

La toxicité rénale représente le facteur limitant de l'utilisation de l'amphotéricine B en clinique. Dans le but de réduire la toxicité de cette drogue, plusieurs recherches se sont développées rapidement ces dernières années. Celle-ci ont consisté soit en la synthèse de nouveaux dérivés, soit en la mise au point de nouvelles formulations.

2- MECANISME D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B :

Bien que le mécanisme d'action ne soit pas totalement élucidé, il reste généralement admis que la toxicité de l'amphotéricine B s'exerce principalement au niveau des membranes contenant des stérols (cellules fongiques et levures qui renferment de l'ergostérol et cellules de mammifère qui elles contiennent du cholestérol). L'amphotéricine B serait à l'origine d'une perméabilisation membranaire accrue qui initierait un gonflement cellulaire suivant les modifications du flux ionique, précédant la mort cellulaire. En effet, de nombreuses études ont montré une corrélation entre la fixation membranaire de l'antifongique et son action perméabilisante, précisant le rôle des lipides membranaires et plus particulièrement les stérols dans l'interaction AmB-membrane (BOLARD 1986).

Les travaux de SAFE et coll. (1977), ont montré que trois souches de *Candida* résistantes à l'amphotéricine B contiennent les mêmes stérols que les souches sensibles mais en concentration plus faible.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

De plus, l'inhibition de la synthèse du cholestérol par addition du kétoconazole, permet une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B envers les cellules rénales en culture (JOLY et coll. 1992b).

L'interaction amphotéricine B-stérol dépend de la composition membranaire en phospholipides (CLEJAN et BITTMAN 1985). Les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* enrichies en phospholipides de type phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE) et phosphatidylsérine (PS), acquièrent une résistance envers l'amphotéricine B (RAO et coll. 1985).

L'induction par l'amphotéricine B d'une perméabilisation transmembranaire aux ions est reliée à la formation de canaux d'un diamètre de 8Å. Ces derniers sont formés de 8 à 12 molécules d'antifongique agrégées. L'ensemble constitue un canal ancré à la surface membranaire par ses groupes chargés dont l'intérieur est tapissé de groupes hydroxyles. Le problème posé par ce modèle vient du fait que les canaux n'étaient pas assez longs pour s'étendre sur toute l'épaisseur de la bicouche lipidique, pour les longueurs de chaîne acyl des phosphatidylcholines rencontrés dans les membranes des cellules. Ils correspondent plutôt à un seul feuillet.

L'observation comme quoi l'amphotéricine B avait une activité sélective maximale vis à vis des anions quand ils étaient présent des deux côtés de la membrane lipidique et l'existence d'un groupement OH en C35 a suggéré que 2 demi-pores pouvaient se superposer au sein de la membrane par des liaisons hydrogène. C'est pourquoi le modèle proposé par DE KRUIJFF et DEMEL (1974), constitué de demi pores cations sélectifs et de double demi pores anions sélectifs est resté la référence en matière de mécanisme d'action de cet antifongique.

De plus, une étude faite par modélisation moléculaire à montré que 6 à 8 molécules d'amphotéricine B seraient impliquées dans la formation du canal, les interactions par liaisons hydrogène seraient indispensables pour que le canal reste à l'état ouvert (BAGINSKI et coll. 1997)

Cependant, la sélectivité de l'amphotéricine B envers les cellules fongiques est due à une plus grande affinité de cette drogue pour l'ergostérol membranaire. [(KITO et coll., 1987), (SEOANE et coll., 1998)]. Cette grande affinité pour l'ergostérol s'expliquerait par :

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

- La présence d'une double liaison en C22 sur l'ergostérol renforcerait l'interaction mettant en jeu la chaîne rigide (7 doubles liaisons) de l'amphotéricine B et la molécule de stérol
- La conformation plane de l'ergostérol serait plus propice à une interaction avec l'amphotéricine B que le cholestérol, dont la chaîne latérale sans double liaison en C22 est plus flexible (NORMAN et coll. 1972). (Figure n°2)
- Les travaux de BRAJTBURG et coll. (1981 et 1980b) ont montré que la toxicité cellulaire de l'amphotéricine B vis à vis des cellules fongiques et animales est dose dépendante.
- Effet stimulateur vis-à-vis des cellules de *Candida albicans* à des doses de l'ordre de 0,01 μM et vis-à-vis de lignées de cellules animales comme les lymphocytes à des doses $< 1\mu\text{M}$.
- Effet perméabilisant membranaire cationique (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) à des doses de l'ordre de 0,02 à 0,1 μM pour *Candida albicans* et entre 1 et 10 μM pour les lymphocytes. Les dommages membranaires à l'origine de la fuite des ions concernent aussi l'inhibition de l'ATPase à protons des cellules fongiques et de l'ATPase Na^+/K^+ des cellules animales.
- Effet létal après la perméabilisation irréversible de la membrane aux cations à des doses $> 0,3\mu\text{M}$ pour *Candida albicans* et de 20 μM pour les lymphocytes.

Ces différents phénomènes ne peuvent pas s'expliquer uniquement par la formation de pores transmembranaires et par des changements de perméabilité. D'autres mécanismes doivent intervenir si nous considérons que les doses d'amphotéricine B généralement nécessaires à la destruction des cellules sont nettement supérieures à celles qui provoquent une fuite des cations.

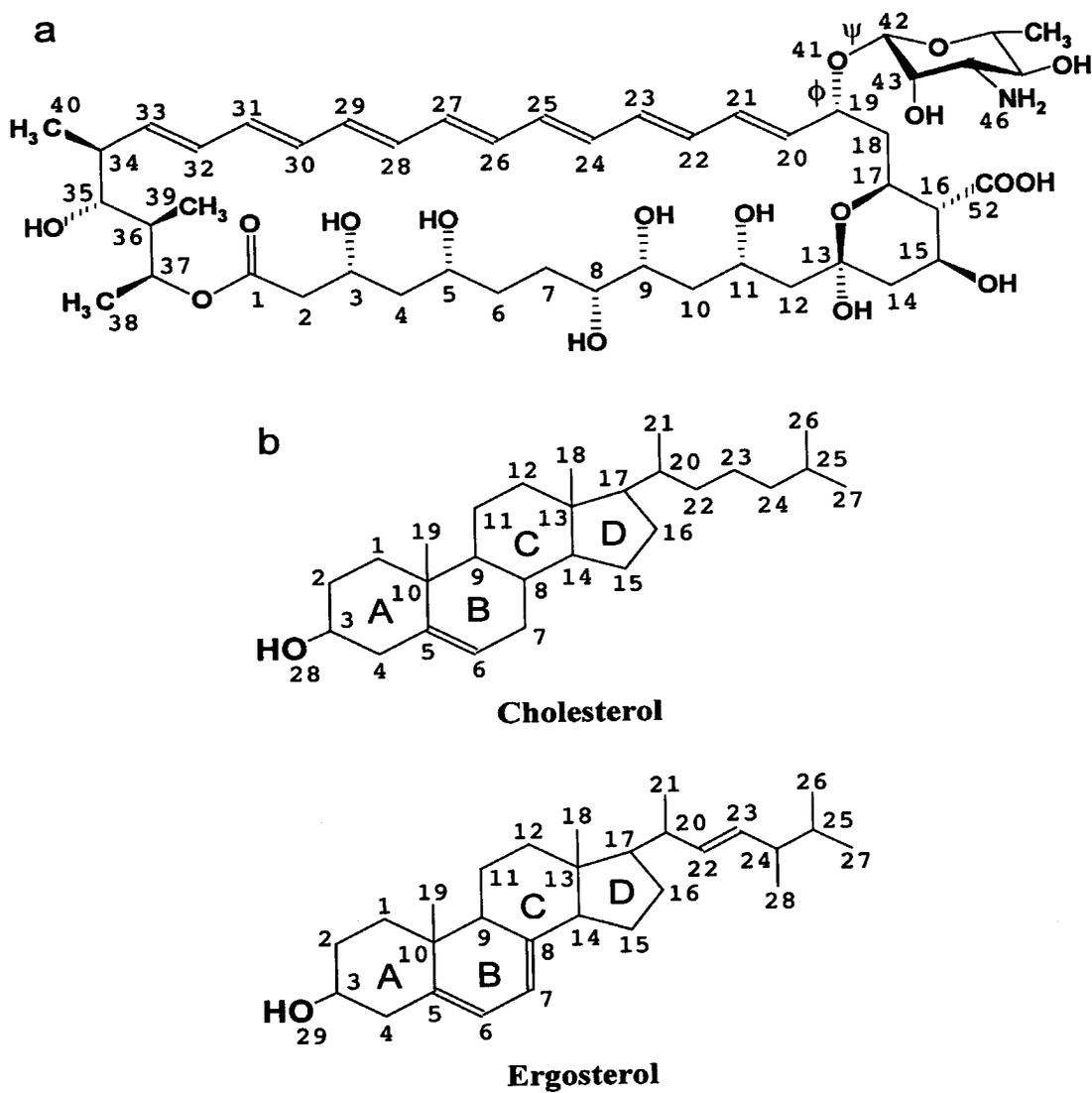


Figure n°2 : Interaction de l'amphotéricine B (a) avec le cholestérol et l'ergostérol (b) (GABRIELSKA et coll. 2006)

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Ainsi la peroxydation des lipides membranaires pourrait être un des phénomènes responsables de la destruction des cellules. Ce phénomène est déterminant dans l'effet toxique de l'amphotéricine B sur les sphéroplastes de *Candida albicans* (SOKOL-ANDERSON et coll. 1986) et les globules rouges (BRAJTBURG et coll. 1985). Selon SOKOL-ANDERSON et coll. (1986), la toxicité de l'amphotéricine B est fortement réduite en présence de la peroxyde dismutase et d'O₂ ou en absence d'O₂; nous pouvons supposer que l'amphotéricine B favorise la formation de radicaux libres d'O₂ responsables des peroxydations lipidiques et de la lyse cellulaire. De plus, l'induction de la perméabilité cellulaire aux cations ne serait aucunement influencée par la présence ou non d'O₂. (Figure n°3)

En 1994 VERTUT-DOÏ et coll. ont mis en évidence un autre mécanisme d'action de l'amphotéricine B, au niveau du processus d'endocytose chez une lignée cellulaire CHO. A fortes doses l'antifongique serait susceptible d'inhiber la fusion endosomes-lysosomes tout en stimulant son internalisation par la pinocytose.

La figure n°4 résume schématiquement les différents mécanismes d'action de l'amphotéricine B sur les cellules fongiques et animales.

En conclusion, le mécanisme d'action de l'amphotéricine B, même s'il n'est pas totalement élucidé, semblerait mettre en jeu une interaction de cet antifongique avec la membrane, suivie d'une formation de pores transmembranaires perturbant les équilibres ioniques.

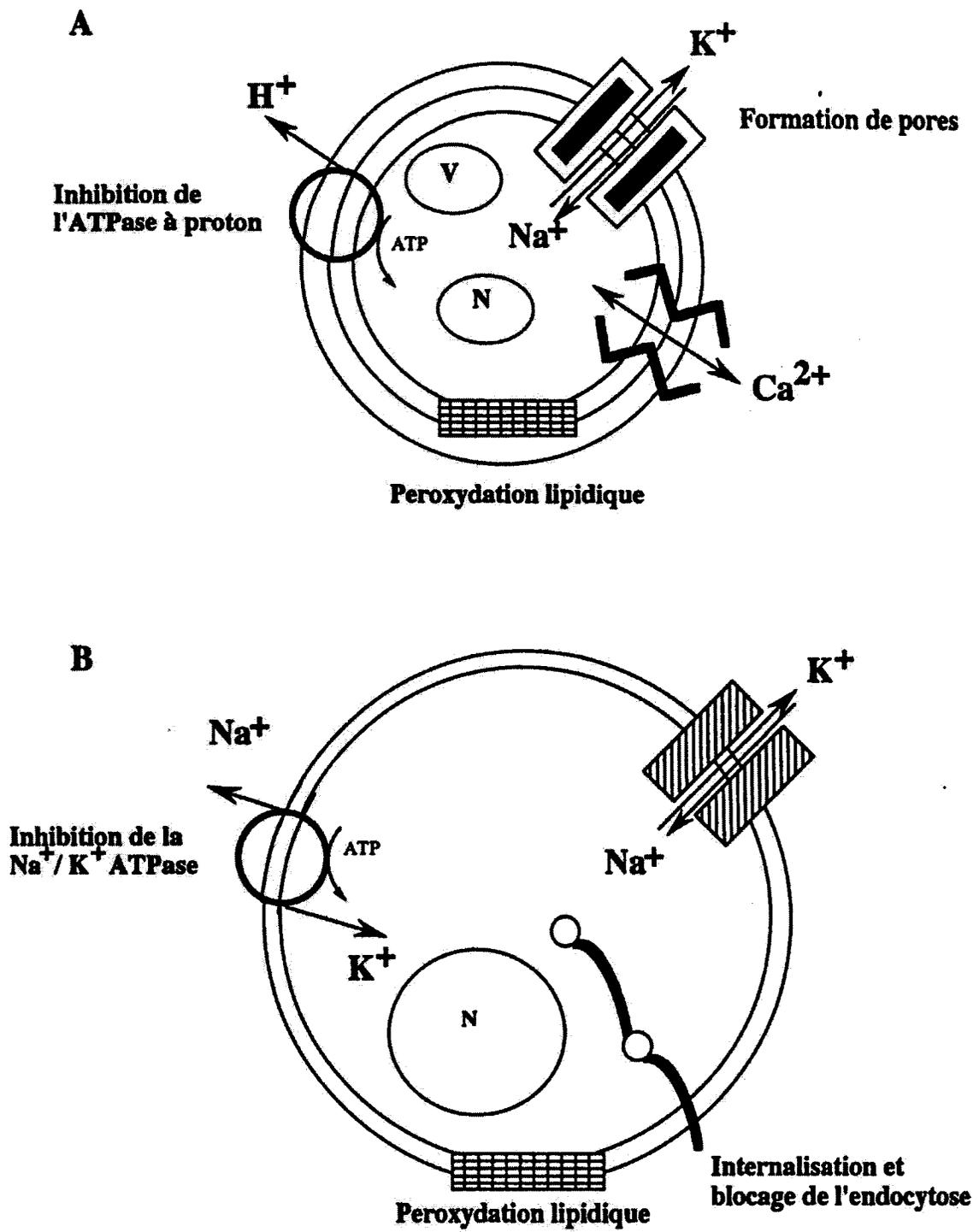


Figure n°3 : Toxicité cellulaire de l'amphotéricine B

A. Cellule fongique

B. cellule animale

Cellule hôte

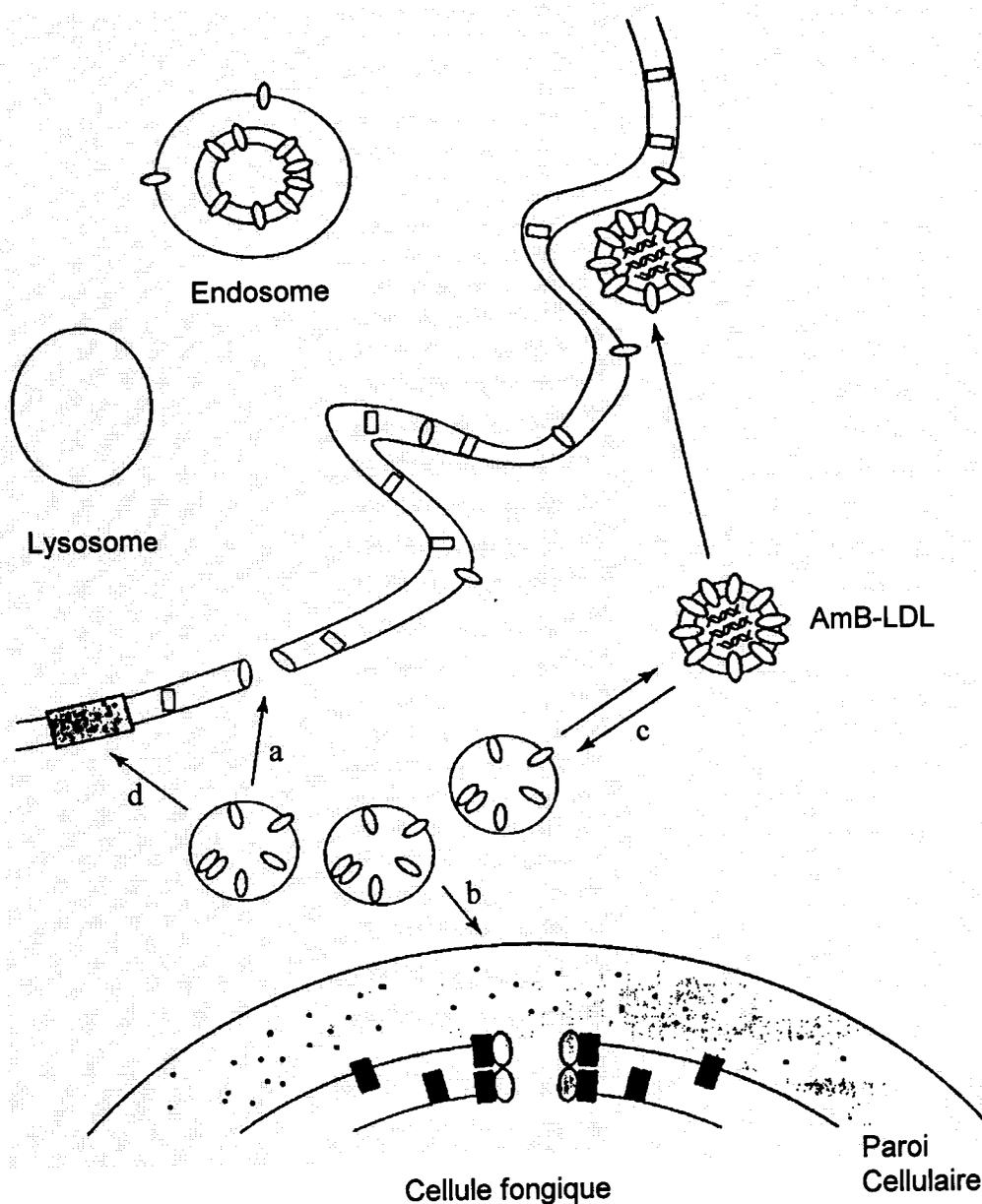


Figure N°4 : Mécanismes d'action anticellulaire de l'amphotéricine B.

- a- Formation de canaux transmembranaires avec les cellules animales.
- b- Formation de canaux transmembranaires avec les cellules fongiques.
- c- Internalisation de l'amphotéricine B par liaison aux LDL.
- d- Peroxydation des membranes (HARTSEL et BOLARD, 1996).

○, Amphotéricine B ; □ Cholestérol ; ■ Ergostérol

3- AMELIORATION DE L'INDEX THERAPEUTIQUE DE L'AMPHOTERICINE B : VOIES DE RECHERCHE :

L'amphotéricine B commercialisée (Fungizone®) a pallié au problème de solubilité de cette molécule dans l'eau, malheureusement, en usage parentéral, sa toxicité constitue un inconvénient majeur ce qui a conduit à la recherche et au développement de nouveaux dérivés hydrosolubles ou de vecteurs moins toxiques.

3-1- Formulations de l'amphotéricine B :

3 1-1 Complexes :

a- Amphotéricine B – Borate :

Le borate de sodium en excès est à l'origine d'une augmentation de la solubilité de l'amphotéricine B dans l'eau (jusqu'à 4,7 mg/ml), d'autant plus que le pH est alcalin (STRAUSS et KRAL 1982). Le borate réagit avec les groupements hydroxyles de la molécule d'AmB pour former un complexe alternant les deux molécules. L'activité biologique du complexe reste identique à celle de l'amphotéricine B pure, mais la toxicité parentérale augmente.

b- Amphotéricine B – Sulfate de Cholestérol (ABCD) :

Ce complexe de forme colloïdale de rapport molaire 1:1, basé sur l'affinité de l'amphotéricine B pour les stérols est particulièrement stable thermodynamiquement (GUO LUKE et coll. 1991). Lors d'études pharmacocinétiques effectuées chez le rat, les disques d'ABCD ont permis de réduire le pic plasmatique de l'amphotéricine B, de prolonger son temps de résidence dans la circulation sanguine et de diminuer sa concentration rénale au profit d'une accumulation au niveau hépatique (FIELDING et coll. 1991). Cette formulation se révèle moins néphrotoxique et moins hépatotoxique que la Fungizone® (MUFSON et coll. 1990). *In vivo* à doses égales, ABCD reste moins active que l'amphotéricine B conventionnelle, mais présente tout de même l'avantage d'une moindre toxicité dans des modèles d'aspergilloses chez des lapins immunodéprimés (PATTERSON et coll. 1989) ou dans des modèles de coccidioomycoses murine (CLEMONS et STEVENS 1991). Dans les deux cas, ABCD fait progresser l'index thérapeutique de l'amphotéricine B

c- Amphotéricine B – cyclodextrines :

Les cyclodextrines, oligosaccharides cycliques possédant une cavité hydrophobe interne permettent l'inclusion de molécules hydrophobes de taille adéquate. Le complexe AmB-cyclodextrine 1:1 ou 1:2 peut être obtenu avec de la γ -cyclodextrine (8 unités de glucose) (RAJAGOPALAN et CHOW 1986). La solubilité dans l'eau atteint 1mg/ml (VIKMON et SZEJTLI 1985). Des études spectroscopiques (dichroïsme circulaire) montrent que l'amphotéricine B incluse reste alors dans sa forme monomère à des concentrations où elle est déjà auto-associée en solution aqueuse. La γ -cyclodextrine solubilise donc l'amphotéricine B et lui confère un effet protecteur vis-à-vis des globules rouges humains.

d- Complexation aux lipoprotéines du sérum sanguin :

Les études *in vitro* sur les cellules rénales en culture (WASAN et coll. 1994), sur le globule rouge (BOUCHERIT 1995) et *in vivo* chez des souris Wistar (SOULIMANE 2001), mettent en évidence l'effet protecteur des lipoprotéines sériques contre l'effet toxique de l'amphotéricine B. Ce sont les lipoprotéines lourdes (HDL) qui protègent le globule rouge mieux que ne le font les lipoprotéines légères (LDL).

Ces lipoprotéines assurent la protection du globule rouge jusqu'à des concentrations très élevées en amphotéricine B (10 $\mu\text{g/ml}$; 10 fois la concentration minimale inhibitrice).

Cette différence de protection entre les deux classes de lipoprotéines est due au fait que les cellules animales (hormis les globules rouges) renferment des récepteurs membranaires spécifiques aux apoprotéines B (partie protéique majeure des LDL) absentes chez les HDL ce qui induit une internalisation de l'amphotéricine B liée aux LDL à l'intérieur des cellules animales (WASAN et coll., 1994).

Des ces mêmes conditions, l'efficacité de l'amphotéricine B pour les levures est maintenue (BEDRANE A. 1997).

3-1-2 Association Amphotéricine B – détergents ou lipides

a- Désoxycholate de sodium :

L'association de l'amphotéricine B à ce sel biliaire conduit à une dispersion colloïdale aqueuse neutre de l'antifongique. Malgré sa solubilisation, l'amphotéricine B reste auto-associée, au sein des micelles (RINNERT et coll. 1977). De plus l'interaction AmB-désoxycholate est faible ; ainsi, une dissociation du complexe au profit de l'amphotéricine B monomère apparaît quand la dispersion est diluée jusqu'à 0,1µM en amphotéricine B. Les expériences pharmacologiques menées par SCHAFFNER (1984) chez le singe sont aussi en faveur d'une dissociation immédiate de cette formulation après administration dans la circulation sanguine. Cette association AmB-désoxycholate, commercialisée sous le nom de Fungizone®, reste le traitement de première ligne des mycoses systémiques ou généralisées, malgré ses effets secondaires importants.

b- Polyoxyéthylène glycols :

Ces dérivés hydrosolubles du cholestérol permettent de solubiliser l'amphotéricine B et théoriquement étaient supposés diminuer l'activité de l'antifongique sur les cellules animales. Ainsi, le dérivé Myrj 59 est capable de supprimer l'hémolyse *in vitro* de l'amphotéricine B tout en conservant son activité antifongique. Par contre *in vivo*, il ne diminue pas la toxicité aiguë de l'antifongique bien que sa néphrotoxicité soit plus faible que la Fungizone® (TASSET et ROLAND 1992).

c- Esters de sucrose :

D'après GRUDA et coll. (1988), l'interaction AmB-monolaurate de sucrose permet de diminuer très significativement la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules de mammifères (globules rouges et fibroblastes de souris en culture), sans toutefois modifier son activité vis-à-vis des *Candida albicans*. En injection intraveineuse unique chez la souris ces esters augmentent significativement la DL50 de la Fungizone® (GRUDA et coll. 1991).

d- Lécithine d'œuf-acide glycocholique :

L'association de l'amphotéricine B dans des micelles mixtes de lécithine de jaune d'œuf et d'acide glycocholique semblerait potentialiser la diminution de la toxicité de cet antifongique vis-à-vis des cellules de mammifères (BRAJTBURG et coll. 1990). Ces mêmes auteurs ont montré que leurs formulations d'amphotéricine B augmentaient significativement l'index thérapeutique de cette drogue dans le cas de candidose et de cryptococcoses murines (BRAJTBURG et coll. 1994). En effet, ils ont observé une absence de toxicité des micelles mixtes à des doses d'amphotéricine B de l'ordre de 60-80 mg/kg, doses toujours plus actives que la dose maximale de Fungizone® tolérée.

e- Poloxamères :

Etudiés par FORSTER et coll. (1988), l'amphotéricine B liée à ces détergents hydrophiles s'avère aussi toxique vis-à-vis des globules rouges que la Fungizone®.

3-1-3- Emulsions d'amphotéricine B :

Trois types d'émulsions huile dans l'eau ont été étudiés :

- KIRSH et coll. (1988) et JOLY et coll. (1994) se sont intéressés à une émulsion constitués d'Intralipid® 20% dans laquelle ils ont ajouté de la fungizone® ; ils ont observé également une amélioration de l'index thérapeutique grâce une diminution de la toxicité chez la souris. D'autres essais cliniques ont confirmé que la solution lipidique permettait de réduire les effets toxiques de la fungizone® (CAILLOT et coll. 1993).

- FOSTER et coll. (1988) ont travaillé sur des émulsions dont les surfactifs étaient soit la lécithine de jaune d'œuf, soit des poloxamères (pluronic®). La diminution de la toxicité cellulaire (observée chez le globule rouge) est de loin la plus importante avec la lécithine d'œuf (la lyse intervient à des concentrations en amphotéricine B supérieures à 200µM), tout en restant efficace sur *Candida albicans*. Cette différence de toxicité entre ces deux émulsions différant uniquement par leur surfactif peut être expliquée par la constitution du détergent et son affinité pour l'amphotéricine B, et la position de cette drogue dans la couche de détergent.



Ainsi, pour ces auteurs, l'amphotéricine B plus fortement liée à la lécithine de l'œuf qu'à un poloxamère diffuserait moins facilement hors de la phase lipidique.

La même émulsion contenant de la lécithine de l'œuf comme surfactif a démontré son innocuité sur des cultures cellulaires rénales de chiens tout en conservant son activité antifongique sur des levures (LAMB et coll. 1991).

-TABOSA DO EGITO et coll. (1994) ont proposé deux méthodes performantes de préparation d'émulsions d'amphotéricine B à base d'huile (Migliol), de surfactants hydrophiles (Symperonic F68) et lipophiles (Epikuron 200 et Liopoid E80) et ont mis en évidence l'incorporation de cette antifongique au sein de la phase dispersée.

3-1-4- Les liposomes de l'amphotéricine B :

Les premiers essais d'incorporation de l'amphotéricine B dans des liposomes ont été réalisés en 1981 par l'équipe de NEW sur des cellules de *Leishmania*. Les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'index thérapeutique de cette molécule vis-à-vis de ce parasite ce qui a incité les chercheurs à développer ce vecteur et à le tester sur des cellules fongiques.

En effet, la forme liposomale présente un certain nombre d'avantages dans l'administration parentérale de l'amphotéricine B pour lutter contre les mycoses systémiques profondes ou généralisées :

- Une distribution devenue indépendante du principe actif, qui correspond à la localisation des levures et champignons (capture par les cellules du système réticulo-endothélial),
- Une facilité d'encapsulation en raison de la forte hydrophobicité de l'amphotéricine B (intercalation dans les couches lipidiques),
- Une biodégradabilité des constituants phospholipidiques,
- Une maniabilité d'utilisation (taille et composition des vésicules modulables suivant les caractéristiques pharmacocinétiques désirées).

Les études menées *in vitro*, sur des cellules animales, qu'il s'agisse de globules rouges humains, de macrophages en culture ou de cellules rénales (JOLY et coll. 1992a) ont montré que l'incorporation de l'amphotéricine B dans les liposomes réduisait significativement sa cytotoxicité. Quant à son efficacité antifongique, elle est

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

soit équivalente à celle de l'amphotéricine B libre d'après MEHTA et coll. (1984) et MIDEZ et coll. (1989) avec les MLVs d'amphotéricine B, de composition DMPC/DMPG (7:3), d'après ANAISSIE et coll. (1991) avec des SUVs HSPC/Chol/DSPG (2:1:0,8), ou d'après MEUNIER (1989) avec des SUVs composés d'EPC/Chol/SA (4:3:1), soit légèrement diminuée d'après JULLIEN et coll. (1989 et 1990).

Il est à noter que l'effet protecteur des liposomes observé chez les cellules animales dépend de plusieurs facteurs : la composition lipidique [(JULLIANO et coll. 1987), (JULLIEN et coll. 1990)], de la présence ou non de stérols [(MEHTA et coll. 1984), (SZOKA et coll. 1987)], du rapport amphotéricine B/lipides, [(MEHTA et coll. 1986), (PAYNE et coll. 1987), (JANOFF et coll. 1988), (JOLY et coll. 1992b)], de l'état physique des phospholipides (JOLY et coll. 1992a) et du mode de fabrication ainsi que du type de vésicules. En effet, le mode d'incorporation de l'AmB, en phase organique ou en phase aqueuse conditionne l'interaction AmB-lipides. WASHINGTON et coll. (1988) suggèrent que l'AmB incorporée en phase organique au cours de la fabrication des MLV est largement présente dans les bicouches phospholipidiques et absente des espaces aqueux internes ou externes. Ces espaces aqueux internes de différentes importances suivant qu'il s'agisse de MLV, de SUV ou de LUV, jouent aussi un rôle dans la liaison.

De plus, les études de toxicité/efficacité menées chez les souris ont montré que l'amphotéricine B liposomale administrée par voie intra veineuse a provoqué une diminution de la toxicité aiguë et une meilleure tolérance du produit. Ainsi, quel que soit le type de préparation liposomale administrée, les DL50 sont plus élevées que celles de l'amphotéricine B conventionnelle (ou Fungisone®). Des observations concernant les taux sériques de créatinine, d'urée ou d'enzymes hépatiques (LDH) normaux chez des souris traitées par des doses importantes d'amphotéricine B liposomale ont été rapportées [(GRAYBILL et coll. 1982), (JULIANO et coll. 1987), (LOPEZ-BERESTEIN et coll. 1983), (GONDAL et coll. 1989)].

Enfin, en 1997 l'AmBisome est commercialisée (WONG-BERINGER et coll. 1998).

Il apparaît donc que là où la réduction de toxicité permet d'augmenter la dose unitaire chez l'animal et d'améliorer la survie après une dose unique, le traitement des patients par l'amphotéricine B liposomale peut être prolongé bien au-delà de la

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

durée habituellement admise pour la fungizone®, sans apparition de toxicité rénale ou aggravation d'une insuffisance rénale préexistante.

Il faut signaler que schématiquement, quelque soit la formulation liposomale de l'amphotéricine B, sa toxicité est inférieure et son efficacité identique à celle de la fungizone® dans le traitement des mycoses systémiques (candidoses, aspergilloses, cryptococcoses...) et ceci pour des doses quotidiennes 3 à 6 fois plus élevées que celle de la fungizone®. (BOLARD et coll., 1997).

Cependant, ces formulations ont un coût de revient important, ce qui est un inconvénient majeur pour les pays pauvres ou en voie de développement comme le notre.

3-1-5- Modulation de l'environnement physico-chimique :

En solution aqueuse, l'amphotéricine B est sous trois formes : les monomères solubles, les oligomères solubles et les agrégats insolubles (MAZERSKI et coll. 1982).

Il est montré que les proportions relatives de ces formes conditionnent la toxicité de l'amphotéricine B (BOLARD et coll. 1991).

En effet, les travaux de WITZERBIN et coll. 1990 ont montré que les agrégats d'amphotéricine B se lient faiblement au cholestérol membranaire des cellules animales hôtes. De plus, c'est sous forme d'agrégats insolubles que l'amphotéricine B est de moindre toxicité pour les cellules animales [(LEGRAND et coll. 1992), (GABORIAU et coll. 1997a et b), (PETIT et coll. 1998)].

Comme l'environnement physico-chimique est susceptible de moduler l'équilibre entre ces différentes formes, des études menées *in vitro* (BELKHERROUBI L. 2001) et *in vivo* (SOULIMANE N. 2001) ont été entreprises pour vérifier si dans des conditions favorables à la formation des agrégats et des super agrégats, l'amphotéricine B maintenait son activité antifongique vis-à-vis de *Candida albicans*.

Ces études ont montré que la modulation de l'environnement physico-chimique de l'amphotéricine B (pH, température, nature du solvant, concentration de la solution mère...) permet d'obtenir des formulations aussi efficaces que la molécule mère vis-à-vis des levures mais présentent une toxicité moindre vis-à-vis des cellules hôtes.

3-2- Dérivés semi-synthétiques de l'amphotéricine B :

Différents dérivés hydrosolubles de l'amphotéricine B ont été préparés par l'équipe de BOROWSKI par des réactions sur son zwitterion. Celles sur le groupement amine ont conduit à des dérivés N-acyl, N-méthyl, N-glycosyl, N-aminoacétylés et N-guanidine de l'amphotéricine B. celles sur le groupement carboxylique libre ont donné naissance aux esters et aux amides.

Les travaux de CHERON et coll. 1988 ont montré que les N-acylations diminuaient significativement l'activité biologique et par conséquent la présence d'un atome d'azote est indispensable pour l'activité antifongique. Par ailleurs, les estérifications augmentaient l'index thérapeutique des composés synthétisés, donc le greffage du groupement carboxyle améliore la toxicité sélective des produits.

L'amphotéricine B méthyl ester semble être le dérivé le plus intéressant en raison d'une marge thérapeutique plus grande que la Fungizone®. Cependant, l'apparition d'une neurotoxicité sévère avec une démyélinisation du système nerveux central lors des essais cliniques à stopper son développement (SCHAFFNER 1987).

Les dérivés N-glycosylés et particulièrement le N-(1-désoxy-fructosyl)-AmB sont plutôt utilisés pour leurs propriétés immunomodulatrices intéressantes car elles ont montré une faible activité vis-à-vis des cellules fongiques. Cette molécule induit une forte activation polyclonale des lymphocytes B murins, au niveau de la prolifération et de la différenciation cellulaire. La toxicité de ce dérivé vis-à-vis des thymocytes murins est inférieure à celle observée avec l'AmB pure (HENRY-TOULME et coll. 1989).

Ces résultats ont ouvert la voie à des recherches de nouveaux dérivés conservant potentiellement la même cytotoxicité réduite mais présentant une activité antifongique plus importante. Le dérivé 1-désoxy-1-amino-4, 6-O-benzylidene-D-fructosyl AmB (MS-8209) présente ces propriétés avec une solubilité accrue (SEMAN, brevet européen 89-14922). Ce dérivé MS- 8209 possède en plus une activité antivirale observée par CEFAL et coll. (1991) sur des cellules en lignées infectées par le virus HIV-1_{BRU}. Il inhiberait la réplication du virus sans pour autant empêcher sa liaison ni sa pénétration dans la cellule cible.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Actuellement, il existe de nombreux composés, mais aucun d'entre eux n'a dépassé le stade des études expérimentales préliminaires.

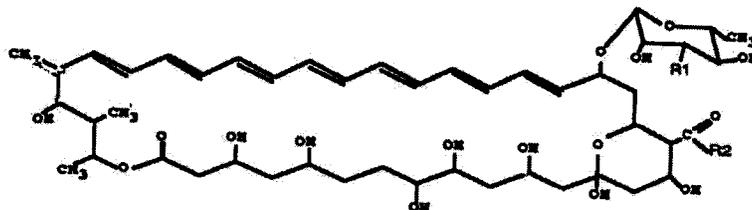
D'autres dérivés cationiques de l'amphotéricine B ont été préparés. Ces molécules possèdent des propriétés antifongiques plus ou moins importantes par rapport à l'amphotéricine B, elles sont généralement moins toxiques que la molécule mère ; ce sont toutes des molécules amphiphiles et certaines d'entre elles, à la différence de l'amphotéricine B, sont solubles dans l'eau [(SCHAFFNER et MECHLINSKI 1972), (JARZEBSKI et coll.1982)]. Quelques dérivés cationiques de l'amphotéricine B figurent sur le Tableau n°1.

Dans des conditions appropriées notamment de concentrations, ces dérivés possèdent d'une part, les capacités de l'amphotéricine B à perméabiliser la membrane de manière transitoire et réversible et d'autre part, des charges cationiques qui permettent une éventuelle interaction avec les acides nucléiques polyanioniques, propriétés utilisées pour vectoriser des oligonucléotides antisens.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau n°1 : Dérivés cationiques semi-synthétiques de l'amphotéricine B

(GARCIA-CHAUMONT 1999)



NOM	R ₁	R ₂
AmB : amphotéricine B	$-\text{NH}_3^+$	$-\text{O}^-$
AMA : amphotéricine B-3-(N,N'-diméthylamino)propylamide	$-\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$
HAMA : amphotéricine B-4-méthyl-pipérazine hydrazide.	$-\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$
AMPA : amphotéricine B-4-méthylpipérazine amide	$-\text{NH}_3^+$	$-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$
AMPEA : amphotéricine B-2-(2-pyridyl) éthylamide	$-\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+$
AMMEA : amphotéricine B-2-(4-morpholy) éthylamide	$-\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{H})$
SAME : N-(N'-3-diméthylaminopropyl-succinimido) amphotéricine B méthylester	$\text{NH}_2^+ \text{C}_4\text{H}_4\text{N}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$	$-\text{O}-\text{CH}_3$
PAME : N-(1-pipéridine propiyl)amphotéricine B méthylester	$-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_2-\text{N}^+(\text{H})$	$-\text{O}-\text{CH}_3$
ORN-AME : N-ornithyl amphotéricine B-méthylester	$-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_3^+$	$-\text{O}-\text{CH}_3$
ORN-AMA : N-ornithyl amphotéricine B-3-diméthylaminopropylamide	$-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_3^+$	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$
DMG-AMA : N-(N,N'-diméthylglycyl)amphotéricine B-3-diméthylaminopropyl-amide	$-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_3-\text{NH}^+(\text{CH}_3)_2$

4- VECTORISATION DES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS ET THERAPIE GENIQUE :

Le concept de la thérapie génique a été imaginé il y a une trentaine d'années : il s'agit de moduler l'expression d'une protéine en exerçant directement un effet sur le gène qui contrôle l'expression de cette protéine. Une première stratégie est celle d'un transfert de gène lequel remplacerait un gène défectueux par son homologue fonctionnel. La seconde, consisterait à ajouter un gène (exogène) au génome de la cellule permettant la production d'une protéine thérapeutique. Cette dernière serait capable de corriger des anomalies disséminées dans l'organisme. Dans ces stratégies, les gènes sont des médicaments ou des vaccins.

A l'heure actuelle, la principale difficulté réside dans le transport du gène d'intérêt dans les cellules cibles. L'ADN, macromolécule anionique et hydrophile, n'étant pas prédisposé à pénétrer les membranes hydrophobes, il est nécessaire de le vectoriser. Un vecteur idéal doit répondre aux critères suivants (SOMIA et VERMA 2000) :

- être facile à produire à des concentrations élevées sur une grosse quantité par des procédés sécurisés,
- être dénuée de toute toxicité,
- être stable c'est-à-dire non dégradable pendant le transfert mais biodégradable après son rôle de transport,
- entraîner une production stable ou régulée de la protéine d'intérêt,
- être non immunogène et permettre des administrations répétées,
- être spécifique d'un tissu ou d'un type de cellule, surtout si ces cellules sont disséminées dans l'organisme,
- transporter des acides nucléiques sans limitation de taille,
- avoir un devenir déterminé : il doit, soit rester en position épisomale, soit s'intégrer dans une région déterminée du génome mais surtout ne pas s'intégrer aléatoirement,
- « infecter » aussi bien les cellules en division que les cellules quiescentes.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Deux approches ont été développées : celles faisant appel à des virus et les autres appelées communément « approches non virales ».

Le transfert d'un oligodésoxyribonucléotide (ODN) par des vecteurs non viraux (ou synthétiques) est appelé *transfection*. La *transduction* correspond au transfert du matériel génétique par des vecteurs viraux.

La problématique diffère sensiblement pour les oligonucléotides. Ce sont des molécules anioniques mais de taille beaucoup plus petite que les gènes et qui ne nécessitent pas comme ces derniers d'être insérées dans les plasmides ni dans le génome humain pour être efficaces. Pour cette raison et compte tenu des problèmes de sécurité qu'ils posent, (NIIDOME et HUANG 2002), les vecteurs viraux ne présentent pas d'intérêt pour la vectorisation des oligonucléotides. Ce sont donc d'emblée, les vecteurs non viraux qui ont connu l'essor le plus remarquable et ce, d'autant plus rapidement qu'ils ont bénéficié des acquis réalisés pour la vectorisation de l'ADN.

4-1- Les vecteurs non viraux :

Alors que les virus possèdent déjà une structure bien définie qu'il suffit de modifier, les vecteurs non viraux doivent être construits de toutes pièces. Les éléments constitutifs d'un tel vecteur sont le gène thérapeutique, on parle de vecteur synthétique. Il faut alors trouver sous quelle forme il peut être transporté et le moyen de le vectoriser.

L'information génétique est véhiculée sous deux formes :

➤ Les plasmides :

Afin d'introduire un gène qui code pour une protéine donnée, la méthode la plus utilisée est l'utilisation de petites molécules d'ADN circulaires double brin appelées plasmides (MIDDAUGH et coll., 1998). Ces derniers peuvent être facilement produits, en grande quantité, par les bactéries, et modifiés par simple insertion du gène d'intérêt dans des plasmides « vides ».

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

➤ Les oligonucléotides :

Il est possible d'administrer des petits oligonucléotides. Leur but est souvent de stopper l'expression d'un gène, en bloquant une étape de sa transcription. Ils peuvent bloquer la maturation des ARN messagers, c'est la stratégie antisens, (KURRECK, 2003) ou même les dégrader grâce aux siRNA (Small Interfering RNA), petits oligonucléotides à double brin [(ELBASHIR et coll., 2001), (RYTHER et coll., 2005)]. Ces stratégies sont dites de pharmacologie génétique car elles utilisent des acides nucléiques pour induire une réponse thérapeutique ; mais elles ne sont pas porteuses d'information génétique proprement dite.

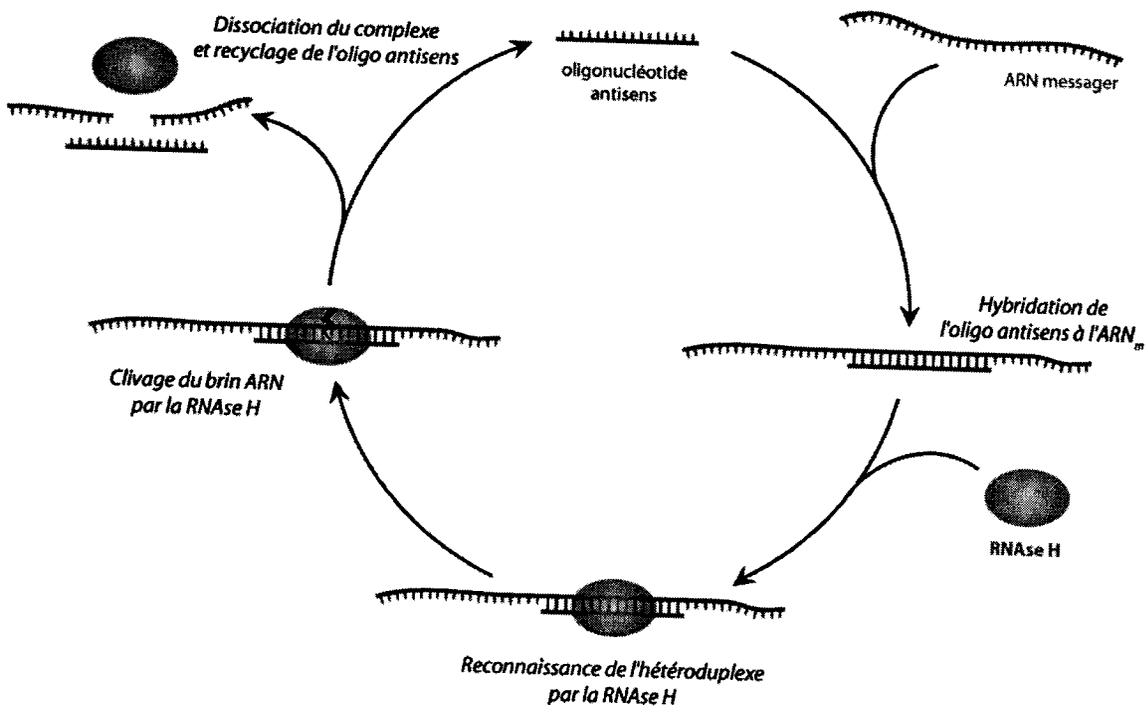
En ce qui nous concerne, nous avons évalué un dérivé cationique de l'amphotéricine B, l'AMA dans l'internalisation d'oligonucléotide antisens modifié chimiquement dans un modèle universel de levure, *Candida albicans*. Cet oligonucléotide cible l'ARNm du gène Multi Drug Resistance (MDR1) humain codant pour la P-glycoprotéine membranaire (P-gp), impliquée dans la résistance multiple aux médicaments (HUET et coll. 1998). Cette protéine de grande taille (170 KDa), appartenant à la superfamille des transporteurs actifs ABC, est responsable du phénotype MDR (Multi Drug Resistance, acronyme anglais de la résistance multiple aux médicaments), (JULIANO et LING, 1976), qui se traduit le plus souvent par l'efflux des médicaments hors de la cellule (KRISHAN et coll. 1997). Ceci a pour effet une diminution de leur concentration intracellulaire, et par conséquent une diminution de leur toxicité, et, de manière générale, l'échec de certaines chimiothérapies anticancéreuses.

La P-gp est codée par une famille de gènes appelés MDR, subdivisée en deux classes différentes 1 et 2. La classe 1 est elle-même divisée en deux sous classes (a et b). La désignation MDR1 (classe 1) et MDR (classe 2) est attribuée aux gènes humains. Seule l'expression des gènes MDR de la classe 1 engendre l'apparition du phénomène de résistance multiple aux médicaments.



4-2- La stratégie antisens :

L'objectif de cette stratégie est d'utiliser des oligonucléotides capables de s'associer spécifiquement à une séquence cible de l'ARNm par des liaisons de Watson-Crick afin que l'hétéroduplex formé par l'oligonucléotide antisens et l'ARNm perturbe la traduction de ce dernier en protéine. Ce phénomène, alors appelé « hybrid arrested translation » fut décrit pour la première fois en 1977 (PATERSON, et coll., 1977). Un an plus tard, des oligonucléotides étaient utilisés à des fins thérapeutiques contre le virus du Sarcome de Rous (ZAMECNIK et STEPHENSON, 1978). Si l'on pensait au départ que l'oligonucléotide agissait en bloquant physiquement la progression du ribosome sur l'ARNm, il a été démontré ultérieurement qu'après lancement de la traduction de l'ARNm (élongation du polypeptide), le ribosome était capable de dissocier le duplex et de continuer sa progression (LIEBHABER, et coll., 1984). D'autres études ont montré que l'effet antisens était plutôt la conséquence d'une activation enzymatique. En effet, il semblerait que l'appariement d'un oligodésoxyribonucléotide (ODN) à une séquence ARN complémentaire induit une dégradation du brin ARN par une ribonucléase : la RNase H (WALDER et WALDER, 1998) qui reconnaît spécifiquement les duplex ADN/ARN puis qui coupe le brin ARN (Figure n° 5). Cette coupure, au lieu de jouer directement sur l'élongation aurait plutôt pour effet de raccourcir la durée de vie de l'ARNm dont la dégradation rapide dans le cytoplasme provoque une diminution de l'expression génique.



**Figure n°5 : Mécanisme d'action de la thérapie génique antisens
(WALDER et WALDER 1998)**

4-3- Applications thérapeutiques des oligodésoxyribonucléotides antisens :

Les oligodésoxyribonucléotides (ODN) antisens ont suscité beaucoup d'intérêt comme outils potentiels dans le traitement de nombreuses maladies. Grâce à leur spécificité et leur facilité de conception, ils pourraient être utilisés dans le traitement des maladies virales, tel que le SIDA, et cancéreuses (CROOKE, 2002). Les cibles sont généralement des oncogènes, des protéines virales, des facteurs de transcription, des protéines de signalisation cellulaire etc...

Le premier essai clinique a été réalisé en 1997, sur l'hybridon GEM91, un composé antisens qui avait fait preuve d'une certaine efficacité contre le VIH (AGRAWAL et TANG, 1992). Le GEM91 a permis une suppression significative de la production virale *in vitro*. Pourtant, chez trois sujets d'un essai clinique de phase II, cet antisens a provoqué une chute tellement importante du taux de plaquettes que le traitement a dû être interrompu. En thérapie antitumorale, plusieurs essais cliniques visant à tester l'efficacité des ODN contre les lymphomes non hodgkiniens, sont en cours. (Tableau n°2).



Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Tableau n°2 : Essais cliniques de quelques ODN (BAKER et MONIA, 1999)

ODN	Cible	Indication clinique	Avancement des essais
Vitravene	CMV	rétinite	accepté
ISIS 5132	<i>c-raf</i>	cancer	abandonné
Gem 91	HIV	SIDA	abandonné
G 3139	BCL 2	cancer	Phase III
ISIS 2302	ICAM	Maladie de Crohn psoriasis	Phase III Phase II
ISIS 3521	PKCa	cancer	Phase III
ISIS 104838	TNF α	Arthrite rhumatoïde psoriasis	Phase II Phase II
ISIS 14803	HCV	Hépatite C	Phase II
Gem 92	HIV	SIDA	Phase II
Gem 231	PKA	cancer	Phase I/II

4-3-1- Limitation de la méthode :

Les ODN antisens possèdent un réel potentiel comme outils moléculaires et comme nouveaux agents thérapeutiques. Toutefois, plusieurs problèmes limitent leur utilisation, en particulier leur toxicité et leur faible internalisation cellulaire liée à la présence de charges négatives des groupements phosphate. De plus, il est apparu rapidement que les ODN naturels (phosphodiester) étaient sujets à des dégradations par des enzymes présentes dans le sérum et les cellules [(AKHTAR et coll. 1991), (AGRAWAL. 1999)]. Ces enzymes agissent en clivant spécifiquement les liaisons

inter-nucléotidiques. Certains produits issus de ces dégradations enzymatiques sont toxiques pour les cellules ; les 5'-monophosphates par exemple. Compte tenu de ces caractéristiques, les ODN naturels (sans modification chimique ou protection) sont de relativement mauvais candidats pour la stratégie antisens.

4-3-2- Stabilité :

Depuis les années 90, le squelette des ODN antisens a été modifié chimiquement pour augmenter leur solubilité, leur stabilité, leur efficacité, leur résistance aux nucléases et leur pénétration dans les cellules (RAVICHANDRAN et coll. 2004) (Figure n°6).

- **Les phosphorothioates** : sont les plus utilisés car ils sont relativement stables dans la circulation sanguine et capables d'atteindre quasiment tous les types cellulaires lors d'une injection intraveineuse, de plus, ils restent des substrats de la RNase H. Cependant, ils ont une haute affinité pour de nombreuses protéines cellulaires conduisant à des effets non spécifiques de la séquence. De plus, à forte dose, ils inhibent les polymérases et la RNase H pouvant ainsi les rendre inefficaces comme agent antisens. Ils sont par ailleurs toxiques.

- **Les modifications en 2'** : les dérivés O-méthyl, fluoro, O-propyl, O-allyl des ODN entraînent l'augmentation de la stabilité des duplex avec l'ARNm avec des effets antisens indépendants de la RNase H. Les premiers ODN modifiés furent des méthylphosphonates, qui se révélèrent cependant inefficace lors d'essais *in vivo*.

- **Les modifications du squelette** : une nouvelle génération a vu le jour avec les Peptide Nucleic Acids (PNA) dont le squelette est constitué d'acides aminés et sur lesquelles sont greffées les bases (KOPPELHUS et NIELSEN 2003). Ils sont donc chimiquement plus apparentés avec les protéines que les acides nucléiques, mais peuvent former avec les acides nucléiques (ADN ou ARN) des hybrides plus stables que les hybrides nucléiques. L'introduction dans les cellules de PNAs complémentaire à une séquence cible peut ainsi conduire à l'extinction d'un gène.

Les ODN phosphorothioates et méthoxyéthyl sont déjà utilisés dans des essais cliniques (DOVE 2002), par exemple l'ODN genasens (Genta, USA) qui cible les protéines oncogènes Bcl2 pour les mélanomes métastatiques, où sont même commercialisés comme le Vitravene (Isis Pharmaceuticals, USA) qui est un ODN



Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

phosphorothioate antisens utilisé pour traiter la rétinite à cytomégalovirus (CMV) chez certaines personnes infectées par le VIH.

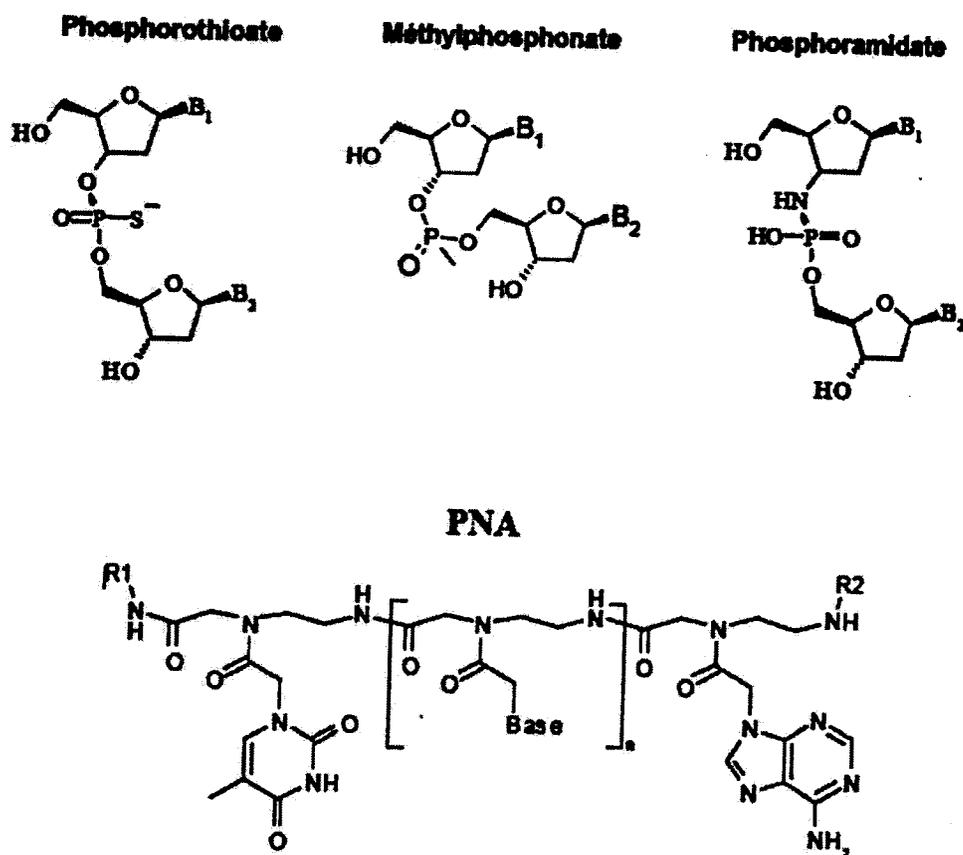


Figure n° 6 : Schéma de certaines des modifications structurales du squelette des ODN (GALLO et coll. 2003)

4-4- Les vecteurs synthétiques des acides nucléiques :

Les vecteurs non viraux de plasmides sont, le plus souvent, cationiques. Les molécules cationiques interagissant avec l'ADN par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques (entre les phosphates de l'ADN et les charges positives de la molécule vectrice), permettent en effet de condenser l'ADN. Cette association électrostatique induit la neutralisation des répulsions électrostatiques des groupements phosphate de l'ADN et conduit à un effondrement de la macromolécule, ainsi neutralisée, sur elle-même. La condensation de l'ADN est une réaction survenant spontanément lorsque 90% des charges de l'ADN sont neutralisées (WILSON et BLOOMFIELD, 1979). Le volume de l'ADN après sa condensation peut atteindre 10^{-4} à 10^{-6} fois celui de sa forme dépliée (BLOOMFIELD, 1991).

En revanche, les oligonucléotides possèdent un très grand nombre d'autres vecteurs potentiels. En effet, ils ne nécessitent pas d'être compactés, ainsi une simple interaction avec une molécule cationique ou une conjugaison peut parfois suffire à les vectoriser ; de plus leur taille bien inférieure à celle des plasmides facilite certains modes de vectorisation.

Afin de mieux situer le contexte de notre approche, nous allons décrire brièvement les systèmes de vectorisation non viraux propres aux oligonucléotides.

4-5- Vectorisation des oligonucléotides :

L'introduction d'oligonucléotides anioniques dans les cellules en culture est le plus souvent assurée par des vecteurs synthétiques de transfert de gènes comme les polymères cationiques (polyplexe) et les lipides cationiques (lipoplexe). En ce qui concerne les applications *in vivo*, la taille souvent très importante des particules formées par les complexes ADN/vecteur peut entraîner la retenue et l'élimination de ces complexes par les différents filtres de l'organisme. De ce fait, même si d'importants progrès ont été réalisés dans la conception de particules furtives ressemblant aux virus [(CHITTIMALLA, et coll., 2005), (ZUBER, et coll., 2003)], de nombreuses recherches ont pour but de permettre aux oligonucléotides d'entrer seuls dans les cellules et d'atteindre leur site d'action avec plus d'efficacité. La conjugaison de peptides cationiques à l'une des extrémités de l'oligonucléotide peut

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

être utilisée pour favoriser son hybridation à une séquence cible. Or lorsque certains peptides cationiques sont utilisés, il est possible de combiner des propriétés d'internalisation cellulaire avec une amélioration de l'affinité pour les acides nucléiques. Cette technique a été appliquée dès la fin des années 80 aux oligonucléotides à squelette anionique et en particulier à des oligodésoxyribonucléotides (ODN) antisens liés de façon covalente à une polyLysine linéaire (LEMAITRE et coll., 1987).

Par la suite, des peptides connus pour leur capacité à pénétrer à l'intérieur des cellules ont aussi été couplés à des oligonucléotides antisens pour leur permettre d'atteindre leur cible ARN jusque dans le noyau (ASTRIAB-FISHER et coll., 2002).

4-6- Potentialités des dérivés de l'amphotéricine B comme vecteur :

La capacité de l'amphotéricine B à augmenter la perméabilité des cellules de mammifères à des agents extérieurs sans effets toxiques sur les cellules est connu depuis longtemps [(MEDOFF et coll. 1983), (VALERIOTE et coll. 1979)]. Elle a été appliquée à diverses molécules d'intérêt thérapeutiques mais seulement à deux reprises, aux acides nucléiques [(KUMAR et coll. 1974), (HIDAKA et coll. 1985)].

La première étude réalisée par KUMAR et coll. en 1974, montre que l'amphotéricine B à forte concentration (200 μ M) permet d'augmenter l'entrée de l'ADN dans les cellules HeLa. Les auteurs montrent l'interdépendance du nombre de cellules, de la concentration en ADN et de la concentration en amphotéricine B sur le taux de capture. Le succès de l'expérience nécessite l'addition simultanée au contact des cellules de l'amphotéricine B et de l'ADN.

Un temps d'exposition court des cellules à une forte concentration en amphotéricine B ne serait pas toxique et aurait un effet réversible.

La deuxième étude (HIDAKA et coll. 1985) utilise quatre antifongiques polyéniques (amphotéricine B, filipine, pimarinine et nystatine) pour augmenter la transfection d'ADN par la technique classique mais peu efficace de coprécipitation avec le phosphate de calcium. L'amphotéricine B s'est révélée la plus efficace sur les deux lignées cellulaires testées (L et CHO). Il semblerait, d'après les structures des autres dérivés, que la longueur de la chaîne polyénique de l'amphotéricine B serait déterminante.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Ces deux études s'intéressent exclusivement à l'entrée d'acides nucléiques de type plasmidique, et dans des cellules de mammifères, ne contenant donc pas d'ergostérol dans leur membrane. D'autre part, elles exploitent les propriétés perméabilisatrices de membrane de l'amphotéricine B mais il n'y a pas de notion d'interaction entre l'agent perméabilisant et les acides nucléiques à faire rentrer. Cette stratégie est à rapprocher d'une étude plus récente qui utilise la streptolysine O. La capacité de cette toxine bactérienne à former des pores transmembranaires a en effet été mise à profit pour augmenter l'internalisation cellulaire d'oligonucléotides, sans que les auteurs n'évoquent d'éventuelles interactions streptolysine O/oligonucléotides (GILES et coll. 1997). Ces approches sont tout à fait différentes de la vectorisation d'acides nucléiques par des molécules déstabilisatrices de membrane à pH physiologique. Dans ce dernier cas, il existe une notion d'interaction entre l'acide nucléique et la molécule perméabilisante à pH neutre.

Le fait que l'amphotéricine B n'est pas chargée à pH physiologique, peut expliquer l'absence d'interaction avec les plasmides.

Par ailleurs, les travaux de GARCIA-CHAUMONT et coll. 2000a ont montré que d'une part, le dérivé cationique de l'amphotéricine B, AMA possède toutes les caractéristiques d'un vecteur potentiel pour les acides nucléiques :

- C'est une molécule unique,
- Elle se formule spontanément et très simplement avec les acides nucléiques,
- Elle porte une fonction amide chimiquement stable et biodégradable,
- C'est un dérivé d'une molécule couramment employée en clinique, l'amphotéricine B,
- Elle permet aux acides nucléiques d'être internalisés par une voie différente de l'endocytose, or cette dernière est souvent limitante pour l'efficacité des acides nucléiques.

D'autre part, l'étude de ciblage de l'AMA sur le système Leishmanie n'a pas pu mettre en évidence la stratégie antisens en raison de la très forte activité de l'AMA sur *Leishmania amazonensis*.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

Partant de ces résultats, et dans un souci d'augmenter l'index thérapeutique de l'amphotéricine B c'est-à-dire réduire sa toxicité vis-à-vis des cellules animales sans altérer son efficacité vis-à-vis des cellules fongiques et des levures, la deuxième partie de notre travail a contribué à tirer profit des capacités des dérivés cationiques de cette drogue en particulier l'amphotéricine B-3-(N'N'-diméthylamino) propylamide (AMA) à former un complexe avec les oligonucléotides, à promouvoir leur entrée cellulaire, à augmenter leur sélectivité cellulaire et augmenter leur efficacité antifongique.



**MATERIEL
ET
METHODES**

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Ce travail a été effectué aux laboratoires « antibiotiques antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » - Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen et « Biophysique Moléculaire Cellulaire et Tissulaire (BioMoCeTi)» – Universités Paris VI et Paris XIII.

1^{ère} Partie : ETUDE DE LA DORMANCE DES CELLULES DE *Candida albicans* EN PRESENCE D'AMPHOTERICINE B

1- MATERIEL ET METHODES :

1-1- Matériel :

1-1-1- Milieu de culture :

Les cultures de *Candida albicans* sont menées sur YM (difco) liquide dont la composition pour un litre de milieu est la suivante :

Extrait de malt	3g
Extrait de levure	3g
Peptone	5g
Dextrose	10g

Le pH est ajusté à $6,2 \pm 0,2$

Pour les cultures en milieu solide, le même milieu est additionné d'agar-agar à 2%. Les milieux ainsi préparés sont stérilisés par autoclavage à 120° C pendant 20 minutes.

1-1-2- *Candida albicans*:

Les expériences ont été menées sur une souche de levure, il s'agit de *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD., USA.) provenant de l'Institut Pasteur de Paris.

Les levures sont entretenues par repiquages réguliers et successifs sur Yeast Medium (YM) gélosé et conservées à 4°C

1-1-3- Antifongique :

Nous avons utilisé l'amphotéricine B pure qui nous a été fournie gracieusement par les laboratoires Bristol-Meyers-Squibb France (Reuil-Malmaison, France).

La solution mère d'antifongique est préparée en extemporané dans du Diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de $10^{-3}M$ puis ajustée à $10^{-4}M$ au spectrophotomètre à 416 nm selon la formule $A = \epsilon Cl$ ($\epsilon_{416} = 121\ 400$)

1-1-4- Marqueur de la viabilité des cellules :

Pour marquer les cellules viables, nous avons utilisé le 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H2DCFDA), provenant des laboratoires Molecular probes (Eugene, OR, USA). La solution mère est préparée dans le DMSO à une concentration de 10mM.

1-2- Méthodes :

1-2-1- Croissance des levures :

a- Culture des levures sur tubes :

Les cultures sont menées dans des tubes stériles de 50ml.

Les tubes sontensemencés aseptiquement par des levures provenant d'une préculture de 24 heures. Cette préculture est elle même obtenue dans les mêmes conditions par ensemencement des levures conservées sur le milieu YM gélosé à 4°C. Les précultures et les cultures sont incubées dans un incubateur de paillasse (Bioblock Scientific ROTATEST) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute.

La mesure de la croissance est réalisée par lecture de la densité optique toutes les heures sur spectrophotomètre UV/Visible (Cary 1E UV-visible) à une longueur d'onde de 595 nm dans une cuve de 1 cm et par numération cellulaire sur cellule de Malassez à l'aide d'un microscope binoculaire.



b- Culture des levures sur microplaques :

En parallèle, une microculture de *Candida albicans* est effectuée selon la technique de microtitration sur plaques stériles à fond plat (Bio-Rad), décrite par ELOFF (1998). Dans chaque puits (96 puits), nous introduisons 200µl de milieu de culture contenant une concentration cellulaire finale égale à 2.10^6 cellules/ml, auxquelles nous avons ajouté des concentrations croissantes d'amphotéricine B allant de 0,1 à 2µg/ml par pallier de 0,1µl. Les plaques sont scellées et placées dans un incubateur de type **Labsystem integrated EIA Management Systems**. L'incubation se fait à 30°C pendant 48 heures, une lecture de la densité optique est réalisée toutes les 30 minutes à une longueur d'onde de 595 nm. Avant chaque mesure de la densité optique, la plaque est agitée pendant 30 secondes à une très grande vitesse.

1-2-2- Détermination des Unités Formant Colonies (UFC)

A partir du temps zéro de la croissance, des aliquotes de 100µl sont prélevés toutes les heures de chaque culture et ensemencés sur des boîtes de Pétri contenant 10 ml de YM gélosé. La concentration cellulaire étant fixée à 10^6 cellules/ml (GRANGE et DEVERY, 1990). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 48 heures. Sont considérées positives, les cultures où il y a une croissance de levure visible à l'œil nu. L'expérience est réalisée en triplicata.

1-2-3- Mesures en cytométrie en flux :

a- Principe :

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer des distributions de paramètres (taille, granularité, fluorescence) sur des populations de cellules isolées. Les mesures de ces paramètres physico-chimiques et biologiques sont réalisées sur chaque cellule lorsque celle-ci, entraînée par un fluide au sein d'une gaine liquide, est excitée par une source lumineuse (laser). Différents paramètres peuvent être analysés simultanément grâce à un jeu de filtres optiques qui décomposent la lumière émise par les fluorochromes et oriente chaque signal lumineux vers un photomultiplicateur différent pour l'enregistrer. Les signaux optiques détectés sont convertis ensuite en signaux électriques puis en valeurs numériques stockées et analysées.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Cette interaction lumière-matière entraîne aussi la diffusion de la lumière par la cellule.

L'intensité de la lumière diffusée dans l'axe ou **FSC : forward scattering** est proportionnelle à la taille de la cellule. La diffusion de la lumière à 90° donne des informations sur le contenu cellulaire (granulosité) ou **SSC : side scattering**.

Le signal de fluorescence **FL1H**, correspond le plus souvent à l'émission de la carboxyfluorescéine. Le canal **FL2H** permet de détecter la fluorescence rouge.

Cette technique permet de faire individuellement et simultanément l'analyse quantitative et qualitative de plusieurs paramètres, selon des critères choisis, sur chaque élément mis en suspension dans un liquide.

Ces éléments peuvent être des cellules, des bactéries, mais aussi des constituants subcellulaires. **Greimers, R. Cytométrie en flux. 15 et 15 mai 2002. Namur.**

Les éléments constituant cet appareil sont représentés dans la figure suivante :

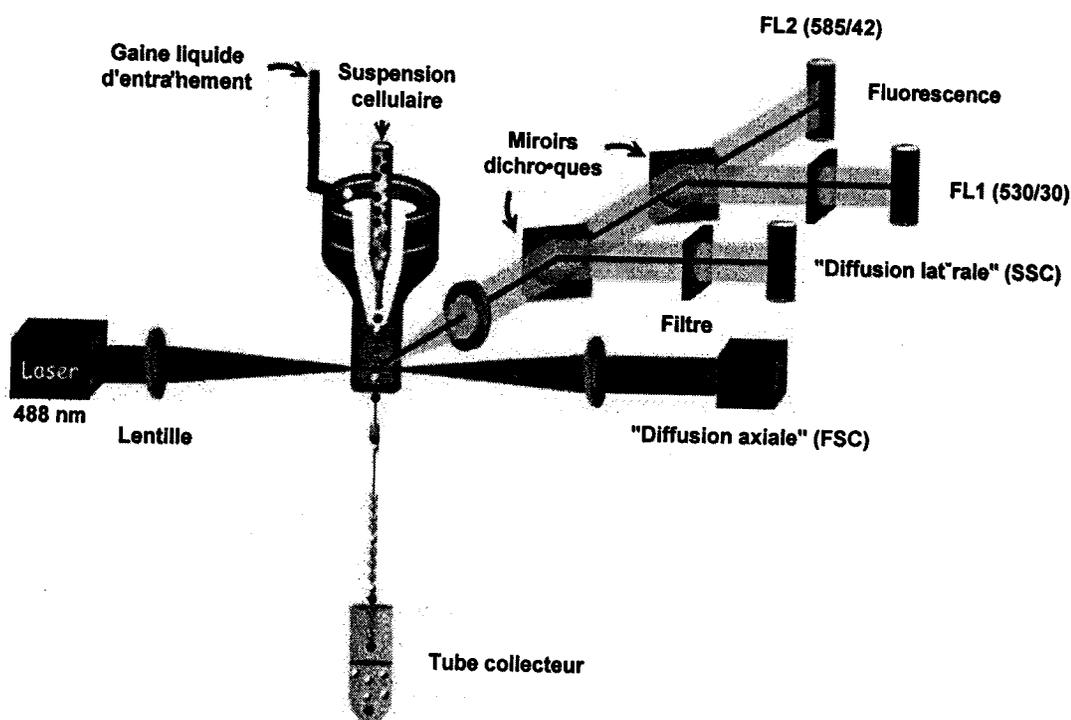


Figure n°6: Schéma d'un cytomètre en flux

b- Mode opératoire :

A partir de cellules conservées sur YM gélosé, nous avons préparé une préculture dans 15 ml de milieu. Après incubation à 30° C pendant 24 h sous agitation continue, nous ensemençons six (06) tubes stériles de 50 ml contenant 30 ml de YM liquide et des concentrations croissantes d'amphotéricine B (0 - 0,4µg/ml - 0,6µg/ml - 0,8µg/ml - 1µg/ml et 1,2µg/ml). La concentration cellulaire de départ est fixée à 2.10^6 cellules/ml. Il est à noter que l'antifongique est ajouté au milieu de culture en même temps que les levures, ce qui correspond au temps zéro de la croissance. Les solutions réactionnelles ainsi préparées sont incubées sous agitation continue à 30° C.

Depuis le temps zéro, nous prélevons 1ml de chaque échantillon, 200µl serviront pour les mesures en cytométrie en flux. 10000 cellules sont analysées par seconde en mesurant le FSC (forward angle light scattering). L'appareil que nous avons utilisé pour notre expérimentation est un **Beckton Dickinson FACSCalibur 3C** (argon laser à une longueur d'onde de 488 nm).

Les 800µl seront utilisés pour la numération cellulaire et la mesure de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda=595\text{nm}$.

L'analyse par cytométrie en flux permet d'obtenir des résultats statiques sur une population de levure (10 000 cellules). Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes de distribution de la FSC portée en abscisse. L'unité de mesure est arbitraire. Le nombre de cellules correspondant est porté en ordonnée. L'allure des histogrammes de la FSC est proche d'une gaussienne lorsque la distribution de la taille des cellules est homogène.

1-2-4- Etude microscopique :

Afin de vérifier la viabilité des cellules au cours de la croissance, nous avons effectué une étude microscopique en parallèle avec les mesures en cytométrie en flux. Nous avons utilisé un microscope **Nikon Optiphot-2 epifluorescence**. Une suspension de levure est déposée entre lame et lamelle, les cellules sont observées en utilisant un objectif Zeiss Ultrafluar x 32.

Les images sont prises par une caméra CDD (Micromax ; Princeton Instrument, Evry, France) équipée d'un détecteur 12 bits (RTEA-1317 K-1 ; Kodak).

Après stockage, les images sont triées et analysées par IPLab software (Scanalytics, Fairfax, VA).

La taille des cellules est mesurée directement sur l'image en utilisant une image de référence Zeiss standard (grille de 5mm), leur nombre est déterminé par numération sur cellule de Malassez.

1-2-5- Mise en évidence de la viabilité des cellules en présence du H2DCFDA par microscopie d'épifluorescence :

En l'absence et en présence d'amphotéricine B à différentes concentrations, des échantillons sont prélevés de chaque condition expérimentale et sont directement incubés en présence d'une concentration finale du 2',7'-dichlorodihydrofluorescein (H2DCFDA) égale à 250 μ M. les cellules sont ensuite photographiées d'une manière similaire à l'observation directe (chapitre précédent).

Nous avons utilisé des filtres optiques sélectionnés dans une longueur d'onde d'excitation à 492 nm ($\lambda_{exc} = 492$ nm), et la longueur d'onde d'émission à 530 nm ($\lambda_{em} = 530$ nm)



2^{ème} Partie : ETUDE DE L'EFFET DE L'ENVIRONNEMENT IONIQUE SUR L'AMELIORATION DE L'INDEX THERAPEUTIQUE DE L'AMPHOTERICINE B :

1- MATERIEL ET METHODES :

1-1- Matériel :

1-1-1- Matériel biologique :

Pour les tests sur la toxicité sélective de l'Amphotéricine B, nous avons d'une part utilisé le globule rouge humain, (modèle universel de cellules animales), provenant d'un donneur unique sain. D'autre part, nous avons utilisé la levure *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD., USA.) provenant de l'Institut Pasteur de Paris. Cette souche est maintenue par repiquages successifs sur gélose YM et conservée à 4°C.

1-2- Méthodes :

1-2-1- Préparation de la suspension érythrocytaire :

Du sang fraîchement prélevé sur tube hépariné est centrifugé à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot est lavé 2 fois avec du tampon phosphate salé de sodium (PBS) 10mM, pH 7,4 contenant 150mM de NaCl, puis suspendu à nouveau dans ce même tampon.

1-2-2- Préparation des solutions antifongiques :

Pour la préparation des solutions antifongiques, nous avons utilisé de l'amphotéricine B (AmB) pure provenant des laboratoires SIGMA.

La solution mère d'antifongique est préparée en extemporané dans du Diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de $10^{-3}M$ puis ajustée à $10^{-4}M$ au spectrophotomètre à 416 nm selon la formule $A = \epsilon CL$ ($\epsilon_{416} = 121\ 400$).

1-2-3- Préparation des sels :

Trois classes de sels préparées à une concentration mère de 1M ont été étudiées :

- les chlorures : chlorure de sodium (NaCl), chlorure de potassium (KCl), chlorure de magnésium (MgCl₂) et chlorure de calcium (CaCl₂).
- Les sulfates : sulfate de sodium (Na₂SO₄), sulfate de magnésium (MgSO₄) et sulfate tri sodé (Na₃SO₄).
- Les carbonates : carbonate de potassium (K₂CO₃), carbonate de lithium (LiCO₃) et hydrogénocarbonate de potassium (KHCO₃).

1-2-4- Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B vis à vis des globules rouges :

Les globules rouges sont suspendus dans du tampon PBS pH 7,4 10mM, à raison de 4000 cellules/ml.

La suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 90 minutes, dès l'addition de la solution antifongique à une concentration finale de 10⁻⁵M et des sels à une concentration finale de 10 mM.

Des prélèvements de 500µl à partir de la solution réactionnelle sont effectués à intervalle régulier, auxquels nous avons ajouté 2ml d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes, nous avons récupéré le surnageant sur lequel on dose le potassium (K⁺) intracellulaire qui fuit de la cellule par photomètre de flamme (JENWAY/PFP7), et l'hémoglobine par la densité optique à une longueur d'onde de 548nm.

1-2-5- Evaluation de l'activité antifongique de l'amphotéricine B :

Les cultures de *Candida albicans* sont menées en milieu YM liquide (pH 6,2 ± 0,2) en présence et en l'absence de la solution antifongique. La concentration cellulaire de départ est de 2x10⁶cellules/ml.

La solution antifongique est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 10⁻⁶M au même moment que l'inoculum, ce qui correspond au temps zéro de la

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

croissance. Les sels quant à eux sont ajoutés eux aussi au temps zéro de la croissance à une concentration finale de 10mM.

Les cultures sont menées sur YM dans des tubes stériles de 50 ml contenant 30 ml de milieu de culture.

L'incubation est réalisée dans un incubateur de pailleuse (**Bioblock Scientific ROTATEST**) à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes.

La mesure de la croissance se fait par numération cellulaire, sur cellule de Malassez, toutes les 90 minutes.



3^{ème} Partie : VECTORISATION D'OLIGONUCLEOTIDES PAR UN DERIVE CATIONIQUE DE L'AMPHOTERICINE B, L'AMA CHEZ DES CELLULES DE *Candida albicans*:

1- MATERIEL ET METHODES :

1-1- Matériel :

1-1-1- Cellules :

Nous avons utilisé des cellules fongiques de *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD., USA.) provenant de l'Institut Pasteur de Paris.

La concentration cellulaire de départ est fixée à 2.10^6 cellules /ml.

1-1-2- Oligonucléotide :

L'oligonucléotide (ODN) utilisé est un oligodésoxyribonucléotide (Genosys) lyophilisé.

Il s'agit d'un 20-mère antisens anti-MDR1 de type phosphorothioate, ayant montré son efficacité chez des fibroblastes murins lorsqu'il est vectorisé par des transporteurs cationiques : la lipofectine (ALAHARI et coll., 1996), et l'AMA un dérivé cationique de l'amphotéricine B [(GARCIA-CHAUMONT et coll., 2000a), (SEKSEK et BOLARD, 2004)]. Il a pour séquence :

5'-d (CCATCCCGACCTCGCGCTCC)-3'

A l'origine, l'introduction de liaisons phosphorothioates au sein des oligonucléotides était destinée à améliorer leur résistance contre la dégradation par les nucléases. En effet, les oligonucléotides phosphorothioates ont une plus grande stabilité dans les milieux biologiques, la demi-vie d'un ODN-PS dans du sérum humain étant d'environ 9-10 heures, soit presque dix fois plus qu'un oligonucléotide phosphodiester [(CAMPBELL et coll., 1990), (CROOKE, 2000), (PHILLIPS et ZHANG, 2000)].

Pour les expériences en imagerie de fluorescence et cytométrie en flux, cet ODN est marqué à son extrémité 5' par la fluorescéine.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Les solutions mères sont préparées dans de l'eau millipore à une concentration de 10^{-3} M. les concentrations ont été vérifiées par absorption UV. Les solutions ainsi préparées sont conservées à -20°C .

1-1-3- L'AMA :

Il s'agit de l'aspartate de l'amide de l'amphotéricine B. Elle est synthétisée par l'équipe du Pr Borowski au Département de Technologie Pharmaceutique et Biochimique de l'université Technologique de Gdansk (Pologne).

C'est une molécule amphiphile, soluble dans l'eau, possédant deux charges positives à pH neutre. Figure n°7

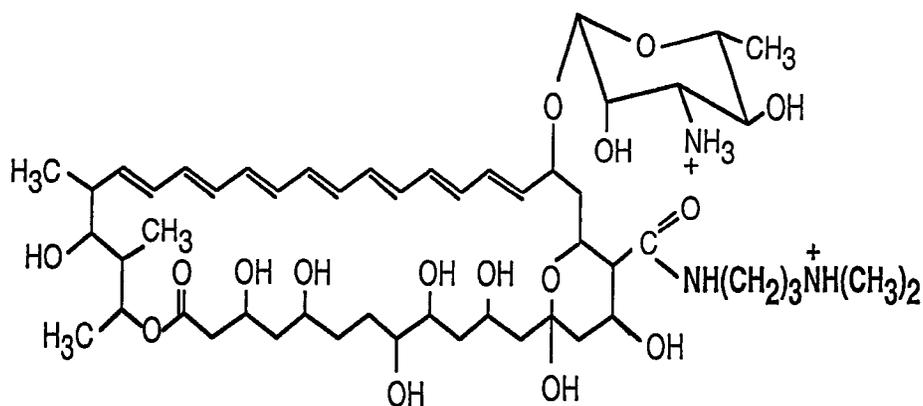


Figure N°7 : Structure chimique de l'AMA

La solution mère de l'antifongique est préparée dans de l'eau millipore et utilisée en extemporané à une concentration de $10^{-3}M$. La concentration est ajustée par spectroscopie d'absorption à 406 nm ($\epsilon=120000 M^{-1} \cdot cm^{-1}$). Pour cela, nous avons effectué une dilution de la solution mère au $1/1000^e$ environ dans du méthanol, ainsi l'AMA se trouve uniquement sous forme monomériques.

Les solutions d'AMA étant instables à la lumière et à la chaleur, elles sont utilisées dans les 4 heures qui suivent leur préparation.

1-2- Méthodes :

1-2-1- Formation des complexes AMA/ODN :

La formulation AMA/ODN est obtenue par un ajout successif de l'oligonucléotide et de l'AMA concentrés. Ce mélange est mis à incuber pendant 30 minutes à température ambiante, puis le volume approprié de milieu de culture (YM +MgCl₂) contenant les levures à une concentration finale de $2 \cdot 10^6$ cellules / ml, (la concentration de la solution mère de levure est de $12 \cdot 10^6$ cellules/ml), est ajouté.

Figure n°8

Les rapports des concentrations finales AMA/ODN-F formant les complexes ont été de $1\mu M/1\mu M$ et $5\mu M/1\mu M$ ce qui correspond à un ratio de charges (+/-) égale à 0,1 et 0,5.

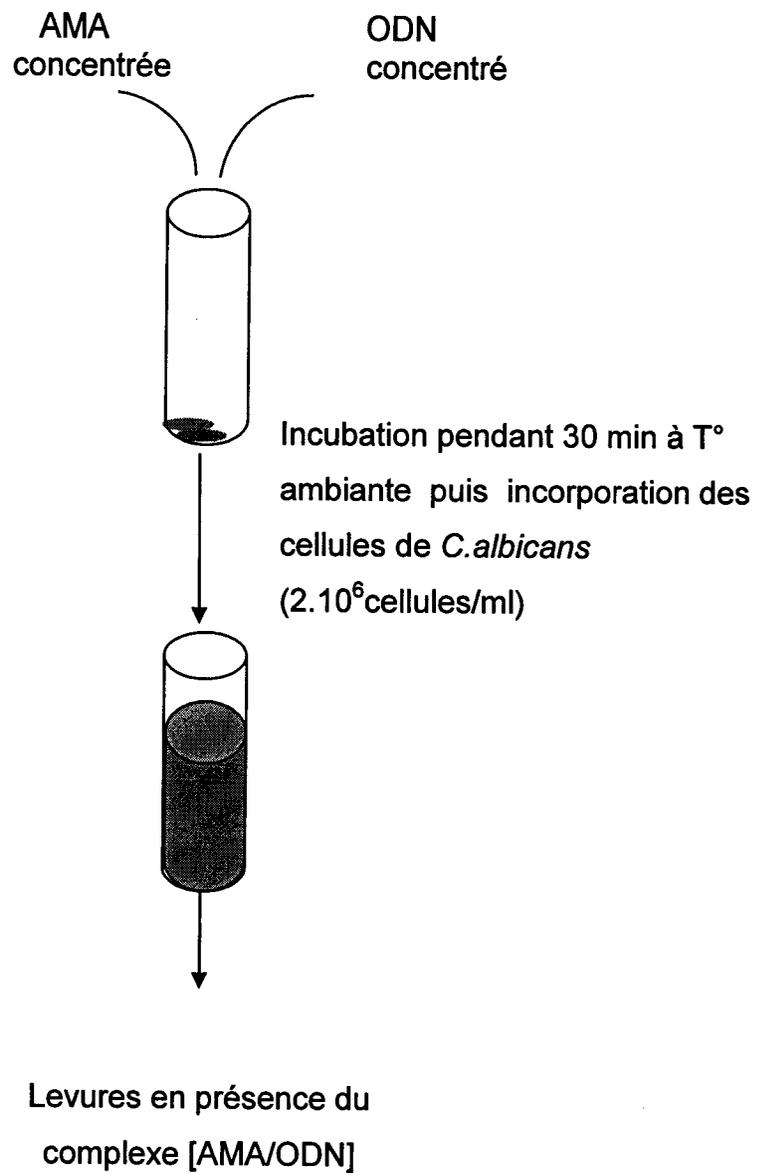


Figure n°8 : Protocole de préparation du complexe [AMA/ODN]



1-2-2- Traitement des cellules :

Les essais de transfection ont été réalisés sur des cellules de *Candida albicans* provenant d'une préculture de 24 heures. Les levures à raison de 2.10^6 cellules/ml sont incubées dans du YM contenant du $MgCl_2$ à une concentration finale de 10mM, en présence et en l'absence du complexe AMA/ODN.

A partir du temps zéro qui correspond à l'addition du milieu de culture et de la suspension levurienne au complexe AMA/ODN, 200 μ l sont prélevés toutes les heures pour suivre l'internalisation de l'oligonucléotide dans les cellules de *Candida albicans* par cytométrie en flux.

Les 200 μ l prélevés sont lavés puis centrifugés deux fois dans une centrifugeuse réfrigérée à 12000 tours/min pour éliminer l'ODN adsorbé au niveau de la paroi cellulaire et ne mesurer que la fluorescence à l'intérieure des cellules.

L'observation des levures au microscope à épifluorescence s'effectue soit avec l'objectif x 32, soit x 63 à immersion dans l'eau.

1-2-3- Mise en évidence de l'internalisation cellulaire par cytométrie en flux :

L'analyse par cytométrie en flux permet d'obtenir des résultats statiques sur une population de levure (10 000 cellules). Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes de distribution de cellules marquées à la fluorescéine fixée à l'ODN-PS. La fluorescence relative à la fluorescéine (FL1) est portée en abscisse. L'unité de mesure est arbitraire. Le nombre de cellules correspondant est porté en ordonnée. L'allure des histogrammes de fluorescence est proche d'une gaussienne lorsque la distribution des intensités de fluorescence est homogène.

Par ailleurs, les mesures de la diffusion aux petits angles, diffusion aux grands angles, et de la fluorescence une fois réalisées, permettent d'obtenir des informations respectivement sur la taille, la granularité (structure interne des cellules) et la localisation de l'ODN dans les levures. L'intensité de la fluorescence au-delà de laquelle les cellules sont considérées comme marquées (positives), est fixée par rapport au témoin.

**RESULTATS
ET
DISCUSSION**

1^{ère} PARTIE : DORMANCE DES CELLULES DE *Candida albicans* SOUS L'EFFET DE L'AMPHOTERICINE B

Depuis de nombreuses années, il est acquis que le traitement d'une infection bactérienne, doit dans la mesure du possible être guidé par l'isolement de la bactérie responsable et l'évaluation *in vitro* de sa sensibilité aux antibiotiques. En effet, le médecin dispose d'un large éventail d'antibiotiques et l'établissement de critères permettant d'orienter l'antibiothérapie s'est très tôt imposé, parmi lesquels la sensibilité *in vitro* de la bactérie en cause aux antibiotiques s'est montrée pertinente (LORIAN et BURNS, 1990).

Des techniques permettant de tester cette sensibilité en routine ont été mises au point. Les mécanismes d'action et de résistance et leurs implications cliniques ont été étudiés. Des données épidémiologiques ont été acquises. Cela a permis de proposer aux laboratoires de biologie des méthodes d'antibiogramme (ATB) standardisées et relativement robustes, ainsi que des règles d'interprétation permettant de prévoir à partir des résultats *in vitro*, l'efficacité *in vivo* d'une molécule d'antibiotique sur une bactérie donnée avec une fiabilité acceptable (REX et PFALLER, 2002).

Pour les antifongiques, la situation était, jusque dans les années 1980, totalement différente. En effet, le nombre d'antifongiques commercialisés était restreint à quelques molécules d'activité systémique et à un certain nombre de topiques destinés au traitement d'infections superficielles à dermatophytes ou à levures. L'infection fongique systémique était considérée comme rare et très rapidement mortelle, les résistances étaient peu connues et leur impact clinique n'était pas évalué. Les tentatives de développement de méthodes d'évaluation de la sensibilité des champignons *in vitro*, dont le besoin n'était donc pas apparent, se sont heurtées à des difficultés techniques spécifiques, liées au fait que les champignons sont des organismes eucaryotes plus complexes que les bactéries dans leur mode de réplication comme dans leur relation avec l'hôte qu'ils colonisent ou infectent (PLEMPEL et coll., 1987).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

A partir des années 1980, le nombre de patients immunodéprimés, constituant autant de patients à risque d'infection fongique, a considérablement augmenté [(EGGIMAN et coll. 2003), (PFALLER et WENZEL 1992), (RICHET et coll. 2002), (TORTORANO et coll. 2004)]. Ainsi, les candidémies occupent entre la quatrième et la septième position parmi les microorganismes responsables des infections nosocomiales [(KULLBERG et OUDE LASHOF 2002), (MARCHETTI et coll. 2004)].

De plus, même si *Candida albicans* reste l'agent le plus fréquemment impliqué au cours des infections fongiques systémiques, des espèces fongiques naturellement peu sensibles à certains antifongiques ont émergées [(DANNAOUI, 2004), (PFALLER et DIEKEMA, 2004), (TORTORANO et coll. 2004)].

Certaines souches naturellement sensibles ont acquis des résistances, ce qui dans certains cas a pu être corrélé avec l'évolution clinique [(REDDING et coll. 1997), (REX et coll. 1997), (RICHET et coll. 2002)]. Enfin, des variations de la distribution des espèces fongiques, tant sur la plan géographique que dans le temps [(OSTROSKY-ZEICHNER et coll. 2003), (PFALLER et DIEKEMA 2004)], ainsi que l'élargissement récent de l'arsenal thérapeutique (ARIKAN et REX 2000) compliquent le choix d'un traitement antifongique empirique et renforcent le besoin d'un outil de détection *in vitro* d'éventuelles résistances. Une meilleure compréhension du mécanisme d'action des antifongiques permet d'une part, d'améliorer la prise en charge des mycoses systémiques. D'autre part, de trouver une relation de cause à effet des échecs thérapeutiques.

Notre étude s'inscrit dans cet ordre d'idée et consiste à utiliser une nouvelle technique à savoir la cytométrie en flux pour suivre la croissance des levures en présence d'amphotéricine B, l'antifongique polyénique le plus utilisé en milieu clinique.

Dans cette première partie, nous nous sommes intéressés au tri des cellules mortes et viables sous l'effet de l'amphotéricine B, et vérifier également si les cellules viables sont aussi cultivables c'est-à-dire qu'elles sont capables de croître une fois transférées sur un milieu solide.

1- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION DE L'INOCULUM :

Dans un premier temps, et dans le but d'optimiser nos conditions expérimentales, nous avons voulu fixer la concentration cellulaire de départ. Pour ce faire, nous avons effectué des courbes de croissances en utilisant des concentrations initiales croissantes de levures.

Les concentrations de l'inoculum sont de $2 \cdot 10^3$ cellules/ml, $2 \cdot 10^4$ cellules/ml, $2 \cdot 10^5$ cellules/ml, $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et $2 \cdot 10^7$ cellules/ml.

La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 595 nm en spectroscopie et par des mesures de diffusion de la lumière en cytométrie en flux. La cytométrie en flux (sans marqueur fluorescent) sert à quantifier la distribution des populations cellulaires des cellules fongiques en culture en fonction de leur taille.

1-1- Mesure de la densité optique :

Les cellules de *Candida albicans* sont cultivées sur milieu Yeast Medium (YM) liquide, son pH est de $6,2 \pm 0,2$. Les cellules sont incubées dans un incubateur de paillasse à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes. Depuis le temps zéro qui correspond à l'addition des cellules, des prélèvements sont effectués toutes les heures pour suivre la turbidimétrie à une longueur d'onde de 595 nm.

Les concentrations cellulaires finales sont fixées à $2 \cdot 10^2$ cellules/ml, $2 \cdot 10^3$ cellules/ml, $2 \cdot 10^4$ cellules/ml, $2 \cdot 10^5$ cellules/ml, $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et $2 \cdot 10^7$ cellules/ml. Ces cellules proviennent d'une préculture de 24 heures. La concentration cellulaire de la solution mère est de $12 \cdot 10^7$ cellules/ml.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure n°9

Nous remarquons que :

- Quelque soit la concentration cellulaire de départ, nous retrouvons les trois (03) phases d'une courbe de croissance : i) la phase de latence ou la phase adaptative au cours de laquelle des biomolécules sont synthétisées, mais l'augmentation de la masse totale de la population cellulaire ne s'accompagne pas d'une augmentation du nombre de cellules. Nous parlons alors d'une croissance non équilibrée des cellules.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- ii) la phase exponentielle au cours de laquelle les cellules commencent à grandir et à se diviser à la vitesse maximum pour l'espèce dans les conditions offertes. Pendant cette phase, la population de cellules double en nombre et en masse à vitesse constante. Ceci est la marque d'une croissance équilibrée.
- iii) la phase stationnaire marquée par un ralentissement puis un arrêt de la croissance suite à l'épuisement des substances nutritives dans le milieu de culture et une production de déchets par les cellules.
- La durée de la phase de latence est inversement proportionnelle à la concentration cellulaire initiale. En effet, elle est de 8 h pour un inoculum de $2 \cdot 10^3$ cellules/ml, 6 h pour un inoculum de $2 \cdot 10^4$ cellules/ml, 4 h pour $2 \cdot 10^5$ cellules/ml, 2 h pour $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et est seulement de 1 h pour une concentration cellulaire initiale de $2 \cdot 10^7$ cellules/ml.
- Les courbes de croissances obtenues avec les inocula $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et $2 \cdot 10^7$ cellules/ml sont pratiquement similaires.

Sur la base de ces résultats, nous avons fixé l'inoculum de départ à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml pour la suite de notre expérimentation vu qu'avec une concentration cellulaire de départ équivalente à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml nous avons une masse cellulaire importante ce qui nous oblige à effectuer des dilutions dès les premières heures de la croissance.

1-2- Mesure en cytométrie en flux :

Les mesures en cytométrie en flux ont été effectuées en parallèles avec les mesures de la densité optique. En effet, depuis le temps zéro de la croissance, nous prélevons 500 μ l de chaque condition expérimentale (croissance en présence de concentrations cellulaires initiales croissantes allant de $2 \cdot 10^2$ cellules/ml à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml). Nous avons mesuré la diffusion de la lumière au grand angle, FSC (forward angle light scattering) qui nous renseigne sur les modifications relatives à l'aspect externe que subissent les cellules au cours de leur croissance.

La figure n° 10 représente les résultats relatifs aux histogrammes de distribution de la FSC pour une concentration cellulaire initiale de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml provenant d'une préculture de 24 heures. (Le nombre de levures déterminé par dénombrement des sur cellule de Malassez est égal à $12 \cdot 10^7$ cellules/ml).



Chapitre 3 : Résultats et discussion

Il est à noter que la FSC nous renseigne sur la taille des levures au cours de la croissance. De ce fait, le tri des cellules se fera en fonction de ce paramètre, c'est-à-dire entre les cellules de petite taille et les cellules de grande taille. L'aspect de l'histogramme selon qu'il suit une distribution gaussienne étroite ou plus ou moins étalée met en évidence les différentes populations qui existent dans le milieu de culture.

Les résultats obtenus pour les autres concentrations initiales ($2 \cdot 10^3$ cellules/ml, $2 \cdot 10^4$ cellules/ml, $2 \cdot 10^5$ cellules/ml) ne sont pas représentés car le temps nécessaire pour faire une mesure est très important ce qui présente un inconvénient majeur pour cette technique.

En revanche, les mêmes profils sont obtenus avec une concentration cellulaire de départ égale à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml.

Nous remarquons que :

- Au temps zéro de la croissance qui correspond à l'incorporation des levures dans le milieu de culture, deux pics sont retrouvés ce qui confirme l'hétérogénéité de la population de départ. Chaque pic correspond à une population de cellules, nous avons donc un mélange de vieilles et jeunes cellules. Ceci peut être expliqué par le fait que notre inoculum de départ provient d'une préculture de 20 heures, par conséquent nous avons un mélange de petites cellules, cellules bourgeonnantes et même quelque mycélium.
- Après 2 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min), les pics de départ disparaissent et un nouveau pic apparaît ce qui signifie que les levures commencent leur période d'adaptation au milieu.
- 4 heures après le début de la croissance, le pic est déplacé vers les valeurs élevées de la FSC, donc la diffusion de la lumière est plus importante et par conséquent les cellules grossissent et commencent à bourgeonner. Cela marque la fin de la phase de latence.
- A la 6^{ème} heure de la croissance, le pic disparaît et une distribution de type gaussienne est observée, les levures sont alors en pleine phase de croissance exponentielle.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Après 10 heures d'incubation, nous avons observé un retour de la distribution de la FSC vers le profil de départ (temps zéro), ce qui marque la fin de la croissance. Ce profil reste inchangé jusqu'à 32 heures d'incubation à 30°C.



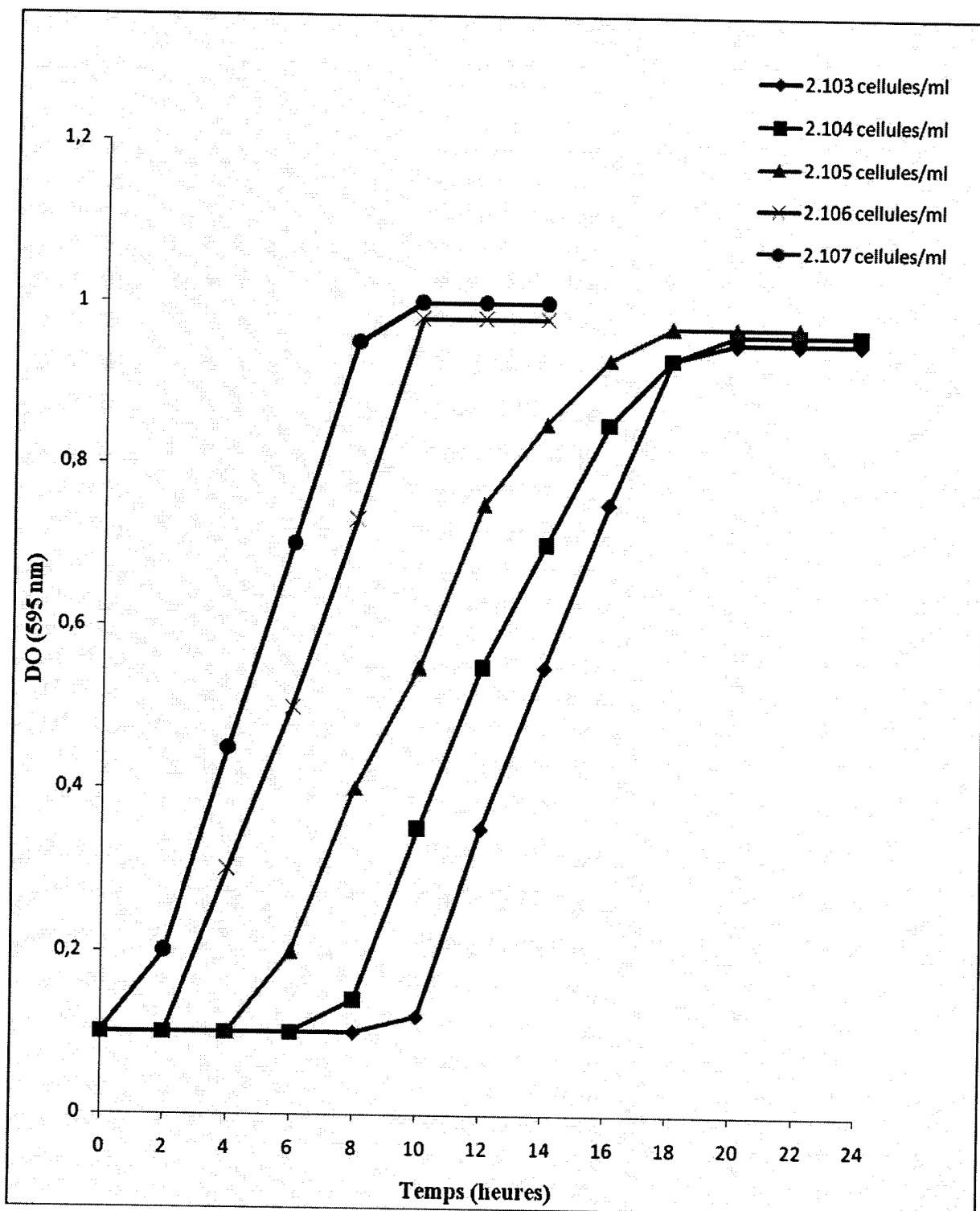


Figure n° 9 : Croissance des levures de *Candida albicans* à 30°C en présence de concentrations croissantes de l'inoculum de départ en l'absence d'amphotéricine B. Le volume final des cultures est de 30 ml.

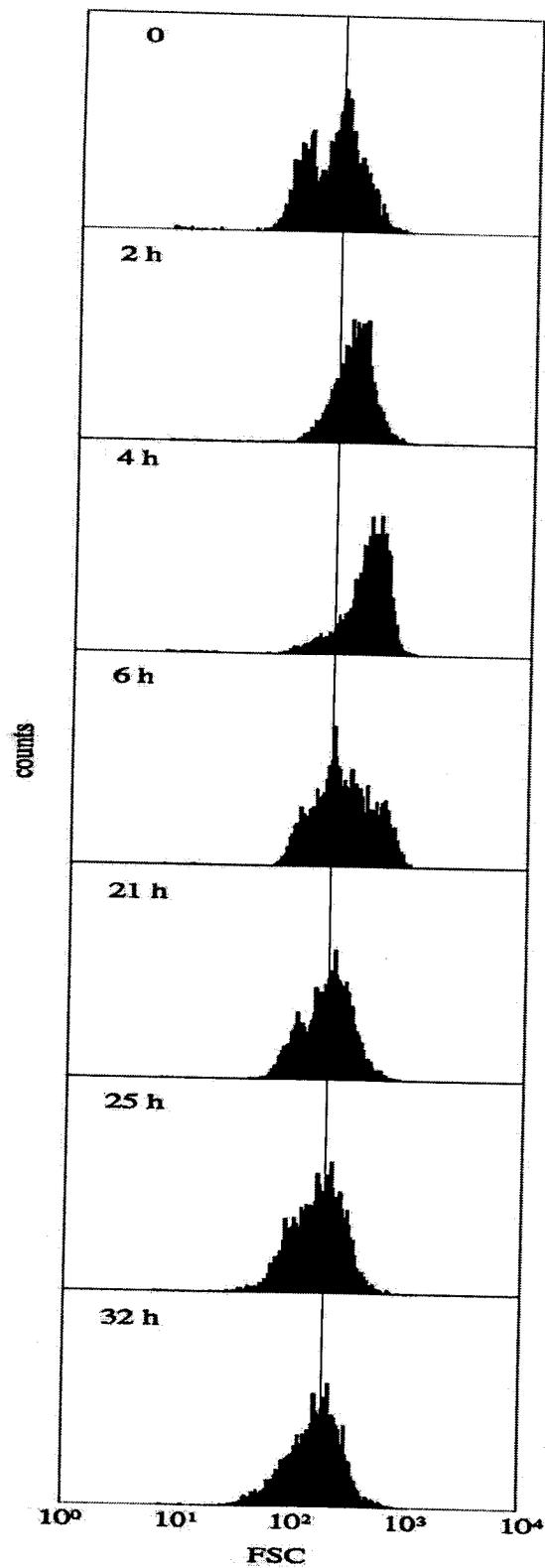


Figure n° 10 : Histogrammes de distribution de la FSC en fonction du temps en présence d'une concentration initiale de *Candida albicans* égale à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules sont incubées à 30°C.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

En figure n°11 est portée la variation de la médiane calculée à partir des histogrammes de distribution de la FSC (exprimée en unités arbitraires : UA) en fonction du temps pour les différentes concentrations initiales de l'inoculum.

Nous constatons que :

- Le même profil est retrouvé quelque soit la concentration de l'inoculum, mais avec des amplitudes différentes. En effet, au début de la croissance, les cellules ont une médiane de 180 UA pour toutes les concentrations initiales de l'inoculum. Ensuite, la valeur de la médiane augmente progressivement pour atteindre un maximum de 380 UA entre 4 heures et 5 heures de croissance, pour un inoculum de départ équivalent à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml et $2 \cdot 10^7$ cellules/ml, 310 UA pour une concentration de levure initiale de $2 \cdot 10^5$ cellules/ml, et 300 UA pour $2 \cdot 10^4$ cellules/ml et $2 \cdot 10^3$ cellules/ml comme concentrations cellulaires initiales.
- Cette augmentation de la valeur de la médiane qui est calculée à partir de la FSC, indique que les cellules grossissent avant de se diviser et donner les cellules filles.
- La valeur de la médiane diminue ensuite pour retrouver sa valeur initiale au bout de 10 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min). Cette valeur reste constante même après 32 heures d'incubation. C'est la fin d'un cycle cellulaire.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux trouvés par les mesures de la densité optique à 595 nm. Néanmoins, les mesures en cytométrie en flux sont beaucoup plus précises, et nous renseignent d'une manière fiable sur les modifications que subissent les cellules de *Candida albicans* au cours de leur croissance.

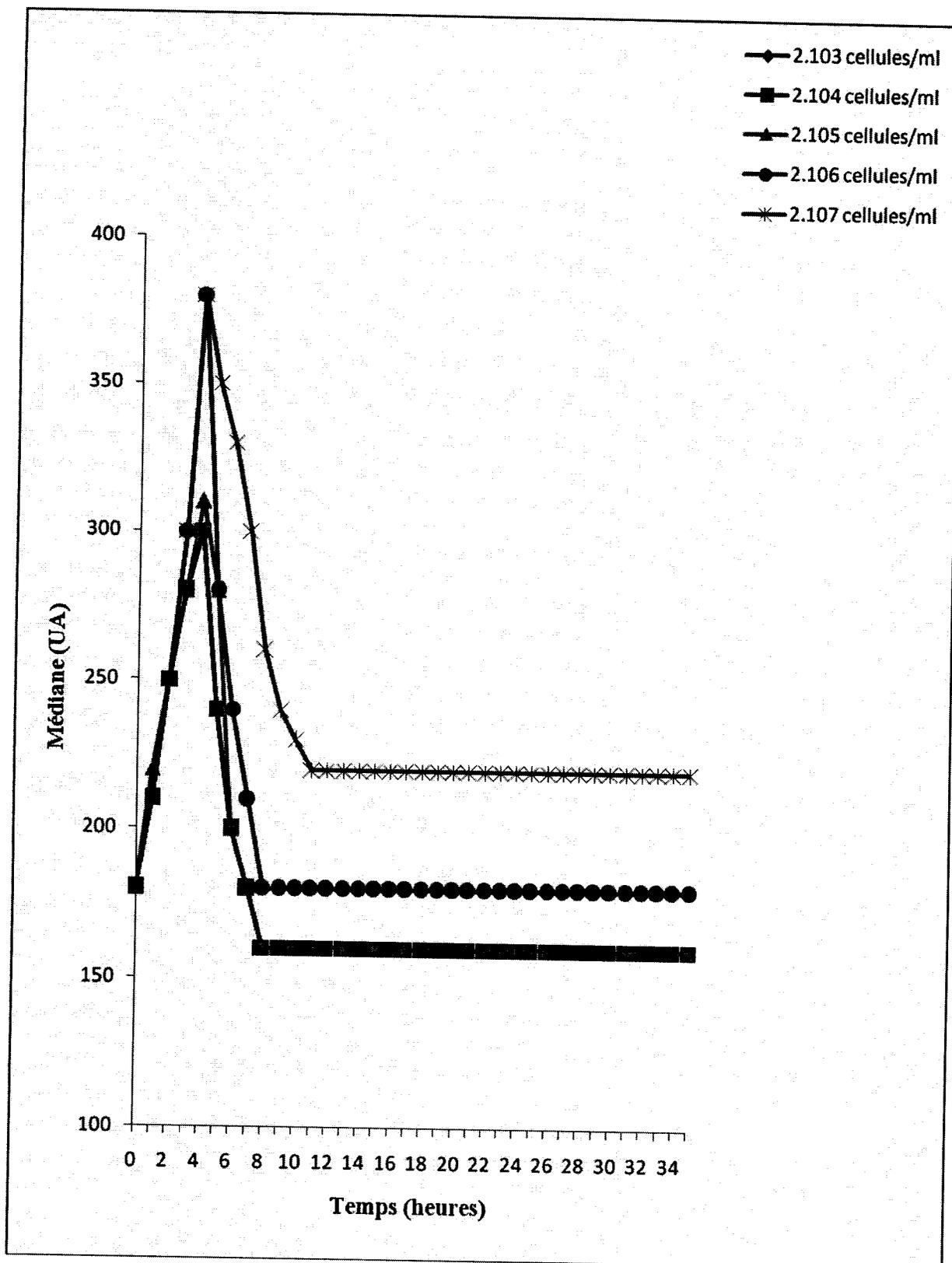


Figure n°11 : Variation de la médiane calculée à partir des histogrammes de distribution de la FSC en présence de différentes concentrations de l'inoculum de départ de *Candida albicans* en fonction du temps. Les cellules sont incubées à 30°C.

2- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION FINALE DE L'ANTIFONGIQUE :

Après avoir fixé la concentration cellulaire à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml, nous avons voulu déterminer la concentration finale de l'antifongique à utiliser.

Nous avons effectué une série de croissance de la levure de *Candida albicans* en l'absence et en présence de concentrations croissantes d'amphotéricine B. L'antifongique est préparé à une concentration mère de 10^{-3} M dans du diméthyl sulfoxide (DMSO) puis ajustée à 10^{-4} M par spectroscopie. Ce dernier est ajouté au milieu de culture au même moment que l'inoculum et est utilisé en extemporané.

Les concentrations de l'antifongique varient de 0,1 μ M à 2 μ M par palier de 0,1 μ M. La croissance est menée sur une microplaque 96 puits et suivie sur 48 heures. Après avoir déposé 200 μ l de milieu YM contenant une concentration cellulaire de départ de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml dans chaque puits, nous ajoutons des volumes croissants d'antifongique pour atteindre les concentrations finales souhaitées. La solution mère de l'amphotéricine B est préparée dans du DMSO à une concentration de 10^{-4} M.

La microplaque est scellée est mise à incuber à 30°C. Un prélèvement est effectué toutes les 30 minutes après une agitation d'environ 30 secondes.

Nous avons effectué deux contrôles, le premier correspond aux cellules de *Candida albicans* incubées en l'absence d'amphotéricine B, ce qui correspond à notre témoin et pour le second, les levures sont incubées en présence du DMSO seul. Cette condition nous permet de tester l'innocuité du solvant. Il faut noter que nous avons ajouté aux cellules le volume de DMSO qui correspond à la concentration la plus élevée en amphotéricine B (2 μ M). Le volume de DMSO ajouté est donc de 4 μ l.

Toutes les expériences sont réalisées en triplicata pour vérifier la reproductibilité de nos résultats.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure n°12.

Nous remarquons que :

- Le DMSO seul n'a aucun effet sur la croissance de *Candida albicans*, les cellules incubées en présence de 4 μ l de DMSO croissent de manière identique aux cellules témoins (courbe non représentée).
- Aucune inhibition de la croissance n'est observée pour des concentrations en amphotéricine B inférieures ou égales à 0,2 μ M, mais il existe de petites différences de vitesses de croissance en phase exponentielle. De plus, à 0,3 μ M, nous observons une différence significative du niveau de la croissance. Cette différence est de 5% par rapport au témoin (cellules cultivées en l'absence d'amphotéricine B). Par contre, une inhibition totale de la croissance de la levure est observée pour des concentrations finales de l'antifongique supérieures ou égales à 1 μ M. Ces résultats sont en accord avec les travaux de HAMMOND (1977) qui fixe la concentration minimale inhibitrice de l'amphotéricine B pour *Candida albicans* entre 0,2 et 4 μ M.
- Pour une concentration finale en amphotéricine B égale à 0,4 μ M, nous remarquons un prolongement de la phase de latence. Cette dernière passe de 2 heures en l'absence d'antifongique à 24 heures en présence de 0,4 μ M d'Amphotéricine B. Ensuite, les cellules reprennent leur croissance d'une manière similaire aux cellules témoins.
- Par ailleurs, une inhibition partielle de la croissance est observée pour des concentrations finales en Amphotéricine B allant de 0,5 μ M à 1,2 μ M. La durée de la phase de latence passe de 24h à 30h lorsque la concentration finale en Amphotéricine B varie de 0,5 μ M à 0,9 μ M. quant au degré d'inhibition, il est de 3% pour une concentration finale en antifongique égale à 0,5 μ M et atteint 85% pour 0,9 μ M d'amphotéricine B.

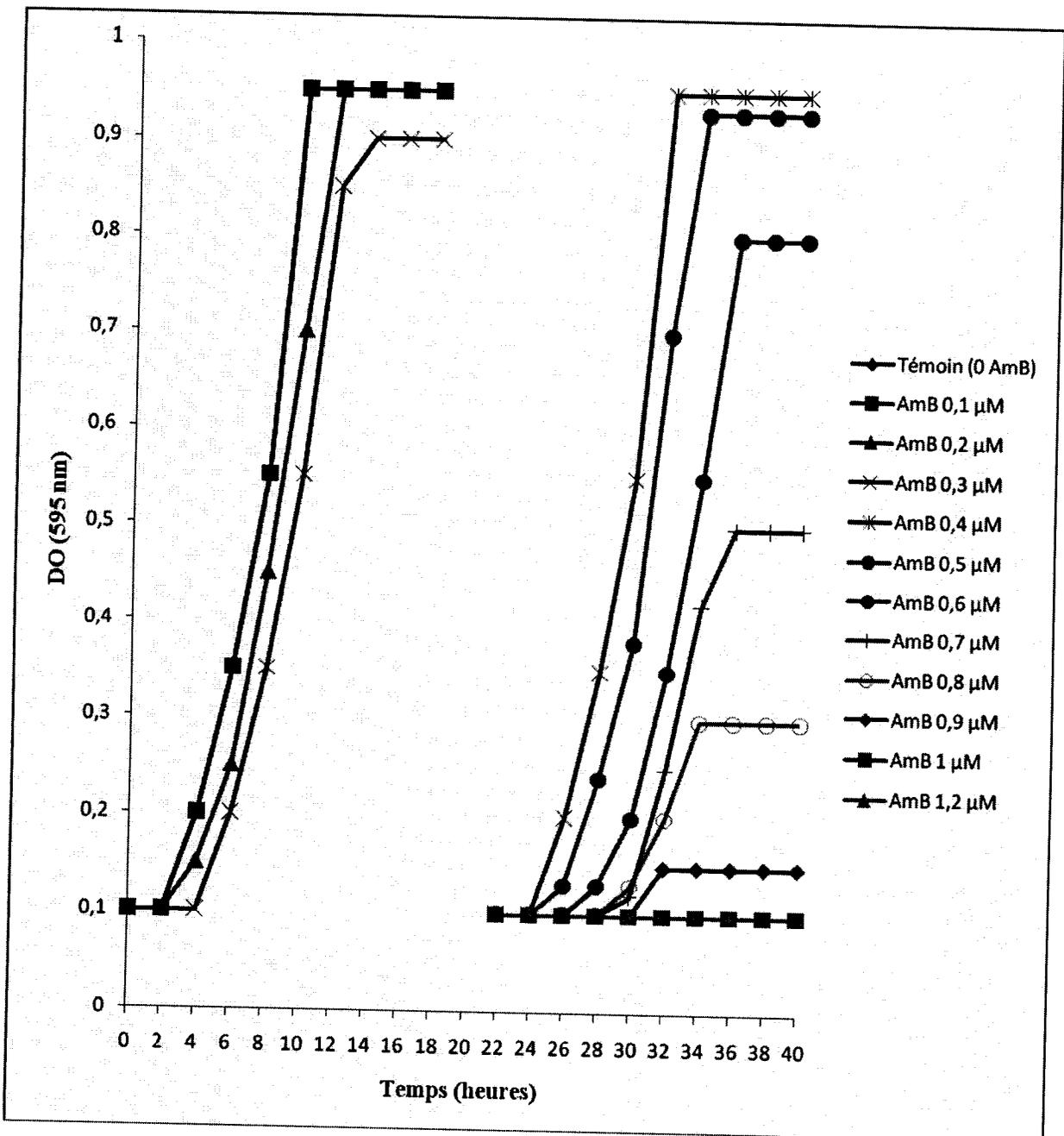


Figure n°12 : Croissance de *Candida albicans* en présence de concentrations croissantes d'amphotéricine B. La concentration cellulaire de départ est de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cultures sont menées sur YM dans un volume final de 30 ml. La température d'incubation est de 30°C.

3- MISE EN EVIDENCE DE LA DORMANCE DES CELLULES :

Partant de ces résultats, nous avons fixé les concentrations finales de l'antifongique à 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 et 1,2 μ M. La concentration de l'inoculum de départ étant de 2.10⁶ cellules/ml.

L'amphotéricine B est préparée en extemporané dans le DMSO à une concentration de 10⁻⁴M.

La croissance est suivie par mesure de la densité optique à 595 nm et par mesure de la FSC en cytométrie en flux.

3-1- Mesure de la croissance par turbidimétrie :

Les résultats relatifs à la croissance de *Candida albicans* suivie par mesure de la densité optique à 595 nm sont rassemblés sur la figure n°13

Nous constatons que :

- La courbe témoin, qui correspond aux cellules cultivées sur YM sans aucune addition, montre qu'après incorporation de l'inoculum au temps zéro à la concentration de 2.10⁶ cellules/ml, les levures passent par une phase de latence de 2 heures caractérisée par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, les cellules entrent en phase de croissance exponentielle pour atteindre un maximum de cellules au bout de 10 heures d'incubation. Ce taux reste inchangé durant une phase stationnaire allant jusqu'à 14 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min).
- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 μ M, nous constatons que la phase de latence se prolonge jusqu'à 24 heures, les cellules repartent ensuite d'une manière identique au témoin.
- En ce qui concerne les levures de *Candida albicans* cultivées en présence de concentrations finales d'amphotéricine B de 0,6 μ M, 0,8 μ M. Nous observons un allongement de la phase de latence de 27 heures et 29 heures respectivement. Les levures atteignent ensuite un maximum de croissance estimé à 85% par rapport au témoin pour 0,6 μ M d'amphotéricine B et seulement 30% en présence d'amphotéricine B à 0,8 μ M.



Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Une inhibition totale de la croissance de *Candida albicans* est observée en présence de deux concentrations finales d'amphotéricine B égales à $1\mu\text{M}$ et $1,2\mu\text{M}$ même après 40 heures d'incubation.



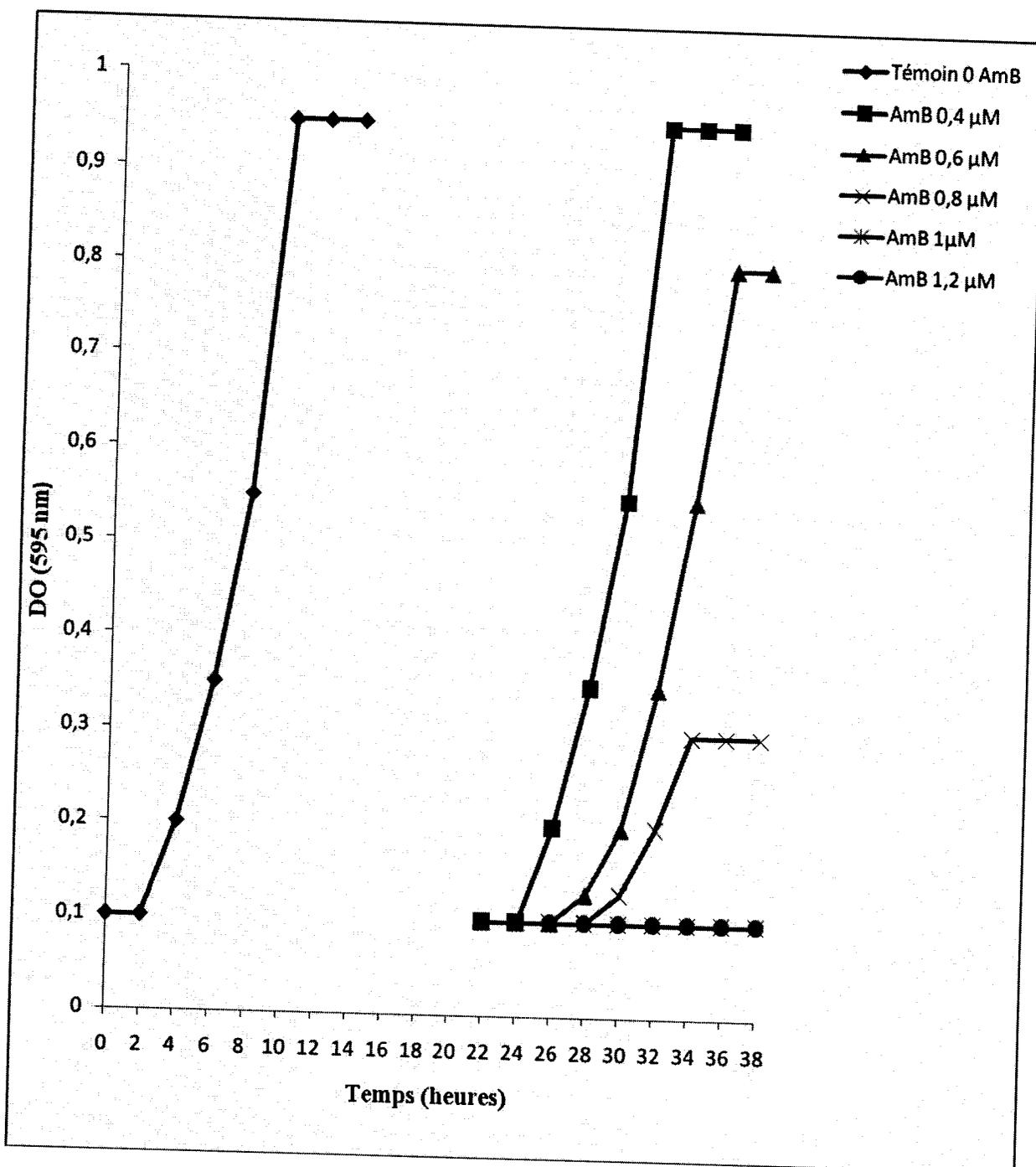


Figure n° 13 : Effet de la concentration finale d'amphotéricine B sur la croissance de *Candida albicans*. La croissance est menée sur YM liquide à 30°C. La solution mère de l'antifongique est préparée en extemporané dans du DMSO à 10⁻⁴M.

3-2- Mesure en cytométrie en flux :

La figure n° 14 a, b représente les résultats obtenus lors de l'analyse de la FSC en fonction du temps par cytométrie en flux en l'absence et en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de $0,4\mu\text{M}$ (les résultats obtenus en présence d'amphotéricine B aux concentrations finales de $0,6 - 0,8 - 1$ et $1,2\mu\text{M}$ ne sont pas représentés).

Il ressort de cette figure que :

- En l'absence d'amphotéricine B (cellules témoins figure n°14 a), l'évolution des histogrammes de la FSC est identique à celle décrite plus haut.
- En présence d'amphotéricine B (provenant d'une solution stock de 10^{-4}M) ajoutée au milieu de culture au même moment que l'inoculum à une concentration finale égale à $0,4\mu\text{M}$ (figure n°14 b), nous remarquons que les profils de distribution relatifs à la FSC restent inchangés pendant les 20 premières heures de la croissance, ce qui pourrait signifier que les cellules n'ont pas encore commencé leur cycle de division. A la 21^{ème} heure, l'histogramme est déplacé vers les valeurs élevées. Cette augmentation de la diffusion de la lumière pourrait suggérer que les cellules grossissent et se préparent à rentrer en phase de croissance équilibrée. Après 25 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours/min, le nouveau pic retrouve une distribution gaussienne. Si l'on se réfère aux courbes de mesures de croissance par densité optique, les cellules sont en phase de croissance exponentielle. Ensuite, le pic régresse vers la valeur initiale et le profil de distribution de la FSC correspondant à la 32^{ème} heure de croissance est identique à ceux obtenus aux premiers temps de la croissance. Les cellules sont en phase stationnaire et le cycle cellulaire est terminé.
- En présence d'une concentration finale d'amphotéricine B de $0,6\mu\text{M}$, nous constatons que les nouveaux pics apparaissent après 25 heures d'incubation à 30°C . Il reste à noter que l'amplitude des profils de distribution de la FSC en présence de $0,6\mu\text{M}$ d'amphotéricine B est similaire à celle obtenue à une concentration finale de $0,4\mu\text{M}$.



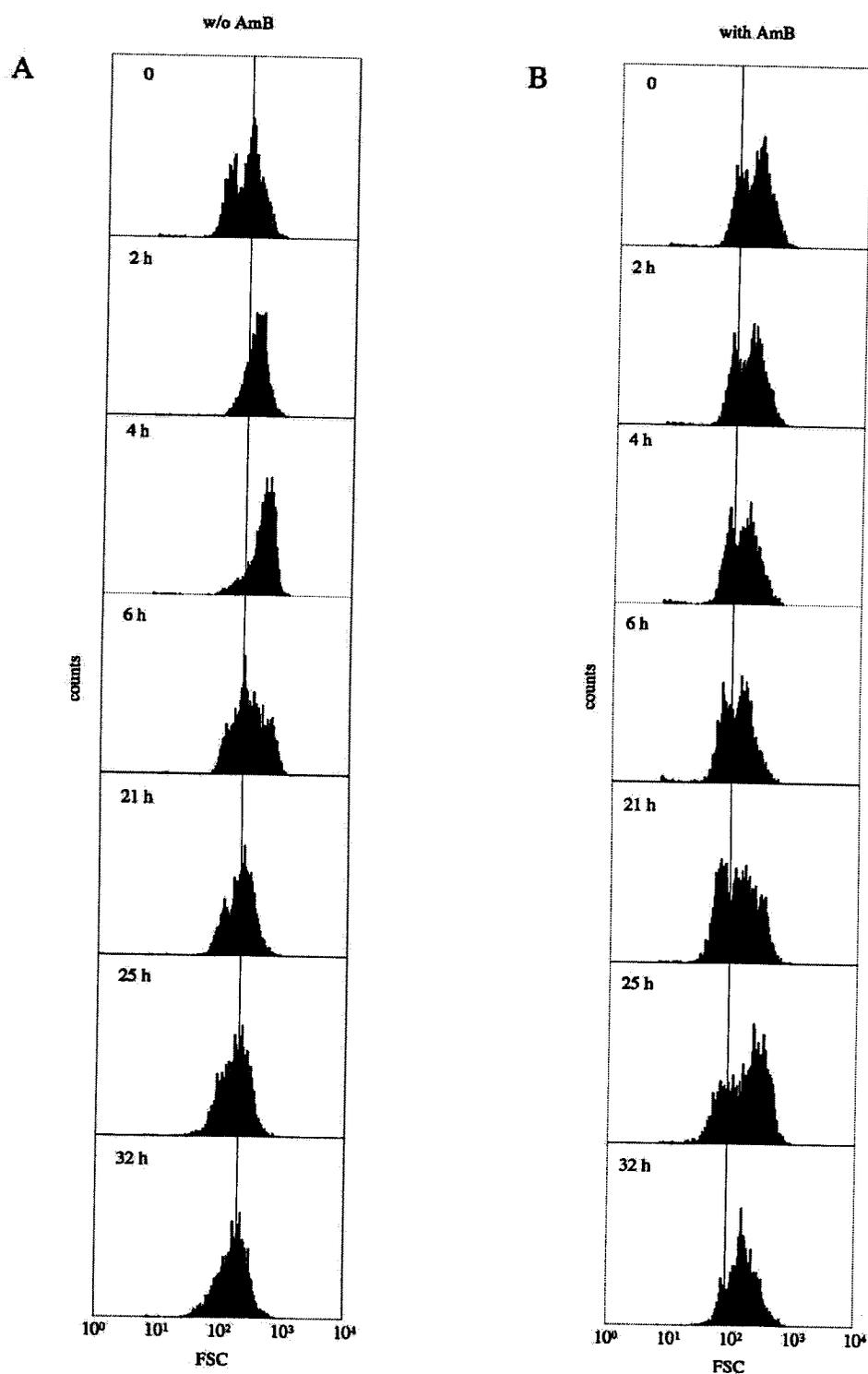


Figure n°14 : Histogrammes de fréquences de la FSC en fonction du temps en l'absence et en présence d'amphotéricine B à $0,4\mu\text{M}$. La température d'incubation est de 30°C .

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Nous avons calculé la variation de la médiane à différentes concentrations finales en antifongique (0 μ M - 0,4 μ M - 0,6 μ M - 0,8 μ M - 1 μ M et 1,2 μ M), en fonction du temps à partir de ces histogrammes de distribution de la FSC

L'antifongique est ajouté au milieu de culture au même moment que l'inoculum au temps zéro de la croissance. La concentration cellulaire de départ étant fixée à 2.10⁶ cellules/ml et la solution mère de l'antifongique étant de 10⁻⁴M.

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure n° 15

Les courbes obtenues en présence d'amphotéricine B à 1 μ M et 1,2 μ M n'ont pas été représentées, car d'une part, aucune variation dans les profils de distribution de la FSC n'a été observée. D'autre part, les résultats relatifs à la turbidimétrie, ont montré une inhibition totale de la croissance de la levure jusqu'à 48 heures de croissance (microculture).

Il ressort de cette figure que :

- En absence d'amphotéricine B, (courbe témoin) au temps zéro de la croissance, nous observons deux pics, un à 98 et un autre à 193 UA (unités arbitraires).

Après 2 heures de croissance les pics initiaux disparaissent et un nouveau pic apparaît à 306 UA. Ce dernier, se situe à 357 UA après 4 heures de croissance.

Nous constatons ensuite un retour progressif de la FSC vers le profil initial qui est atteint au bout de 7 heures de croissance. Ce profil reste inchangé jusqu'à 24 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue et est similaire à celui obtenu au temps zéro de la croissance.

- En présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 μ M, les profils de distribution de la FSC relatifs à la croissance de *Candida albicans*, passent par trois étapes : durant la première étape, les profils de distribution chutent vers des valeurs plus faibles et les pics observés à 98 et 193 U.A. en l'absence d'amphotéricine B, sont remplacés par deux pics à 63 et 152 U.A. Ces changements sont proportionnels à la concentration finale d'amphotéricine B.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

La régression des pics est due à un rétrécissement « shrinkage » des cellules. Cela est probablement dû à la fuite massive du potassium intracellulaire à travers les pores transmembranaires formés par l'interaction de l'amphotéricine B et l'ergostérol membranaire. Ce phénomène se produit dès les premières minutes d'incubation des levures en présence de cet antifongique.

La deuxième étape, débute au bout de la 21^{ème} heures d'incubation à 30°C en présence d'une concentration finale en antifongique égale à 0,4µM. Les profils de distribution évoluent vers les valeurs élevées et après 4 heures supplémentaires d'incubation, un pic apparaît à 286 U.A.

Si nous comparons ces profils avec ceux obtenus en l'absence de l'amphotéricine B, nous constatons que cette nouvelle distribution remplace partiellement la distribution initiale (cellules témoins) dont la position reste inchangée, mais le nombre de cellules est diminué. Ceci confirme les résultats de l'étude microscopique qui n'a montré aucune prolifération des cellules avant 24/25 heures de croissance. La troisième et dernière étape est caractérisée par l'apparition d'un pic à 286 U.A. après 27 heures de croissance ensuite les pics se déplacent vers les valeurs faibles de la FSC ce qui correspond au début de la prolifération des cellules. Après un temps d'incubation de 32 heures, les profils sont similaires à ceux obtenus après 21 heures d'incubation en l'absence d'amphotéricine B, le cycle de la croissance des levures est donc terminé.

- En présence d'amphotéricine B utilisée à 0,6µM, le temps de latence est plus important, il est de 28 heures environ, la médiane atteint un maximum de 140 UA au bout de 32 heures de croissance. Un retour à la valeur initiale de 100 UA est observé après 34 heures d'incubation. L'inhibition de la croissance de *Candida albicans* est d'environ 40%.
- En présence d'amphotéricine B utilisée à 0,8µM, aucune variation de la médiane n'est observée jusqu'à 35 heures de croissance à 30°C sous agitation continue (130 tours/minutes). Une inhibition totale de la croissance est observée.

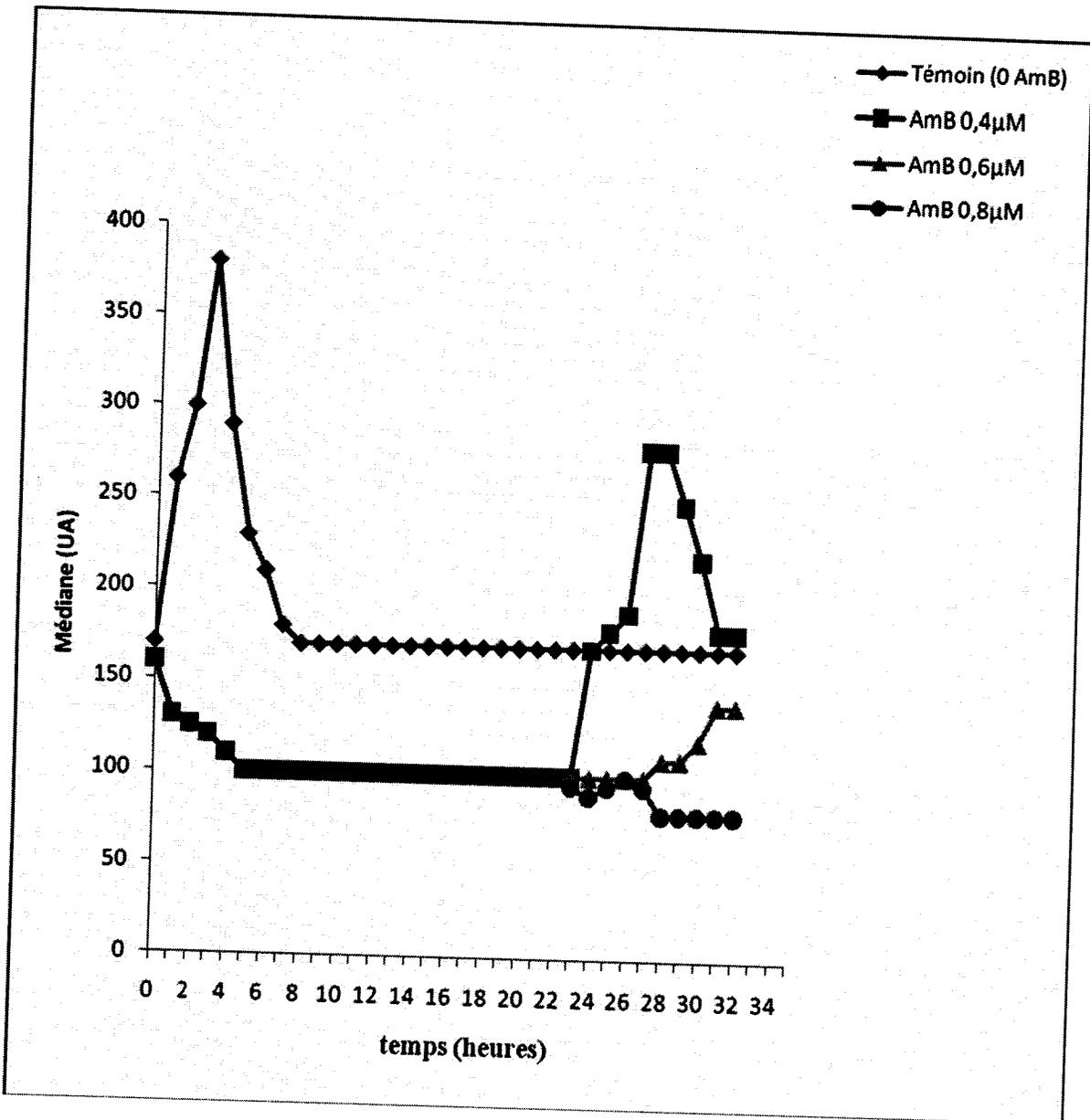


Figure n°15: Variation de la médiane des profils de distribution de la FSC en l'absence et en présence de différentes concentrations d'amphotéricine B en fonction du temps. Les cellules sont incubées à 30°C sous agitation continue.



Chapitre 3 : Résultats et discussion

Pour confirmer les hypothèses faites sur les observations en cytométrie en flux sur la dormance des cellules ainsi que la viabilité de ces dernières, nous avons effectué des microphotographies des cellules au cours de leur incubation en milieu de culture YM liquide en lumière blanche et en épifluorescence ainsi qu'une croissance sur milieu YM solide et aussi par numération des cellules sur cellules de Malassez et par détermination des UFC.

3-3- Etude microscopique :

A partir des cultures menées sur milieu liquide, la concentration cellulaire de départ étant fixée à 2.10^6 cellules/ml, nous avons prélevé des aliquotes pour suivre l'état des cellules pendant les premières heures de la croissance.

- En l'absence d'amphotéricine B : après une heure d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min), la taille des cellules commence à augmenter et les bourgeons apparaissent. Au bout de 3 heures d'incubation, toutes les cellules sont bourgeonnantes (nous avons également noté la présence de quelques agrégats cellulaires) figure n°16 (A et B). Il est important de signaler que pendant ces 3 premières heures de la croissance, le nombre de levures déterminé par numération sur cellules de Malassez, reste constant et égal à 2.10^6 cellules/ml.

4 heures après le début de la croissance, les observations microscopiques révèlent l'existence de cellules filles à côtés des cellules mères ce qui explique l'augmentation du nombre de cellules par ml. Le nombre de levure augmente alors d'une manière exponentielle jusqu'à 10 heures d'incubation. Cet état reste stationnaire, et les cellules ont la même apparence que les cellules de départ jusqu'à 24 heures d'incubation figure n°16 A.

En présence d'amphotéricine B : les micrographies ont été prises à une concentration finale d'amphotéricine B égale à $0,4\mu\text{M}$. L'inoculum de départ étant de 2.10^6 cellules/ml. Nous constatons une diminution de la taille des cellules (figure n°16 C) et leur nombre reste constant jusqu'à 25 heures d'incubation à 30°C . Nous remarquons qu'à partir de ce moment, les cellules commencent à grossir et après 27 heures d'incubation, la culture présente un mélange de petites et de grosses cellules (figure n°16 D). Si le temps



Chapitre 3 : Résultats et discussion

d'incubation est prolongé jusqu'à 32 heures, les grosses cellules deviennent majoritaires avec un aspect similaire à celui observé au temps zéro et 21 heures de la croissance en l'absence d'antifongique.

Cette observation microscopique révèle que les cellules de petites tailles ne sont pas marquées par le H2DCFDA, alors que, les cellules de grandes tailles sont fluorescentes et par conséquent elles sont viables.



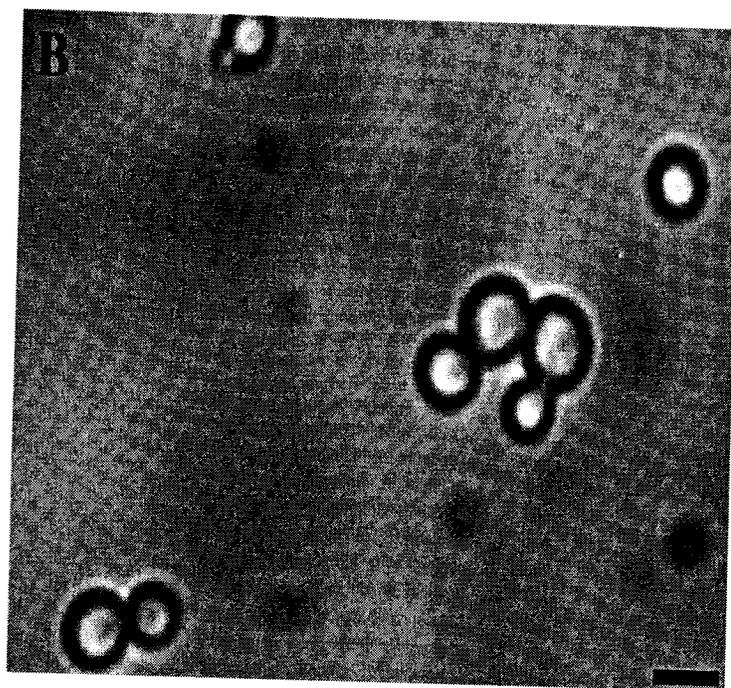
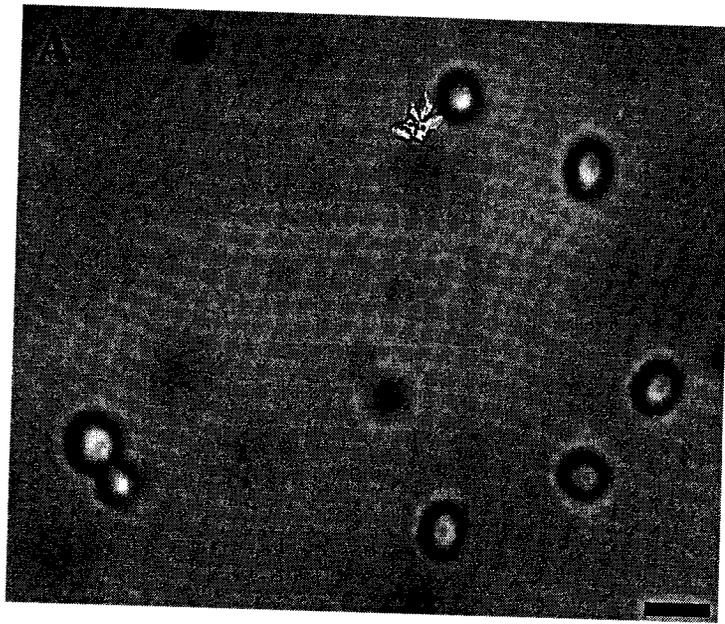
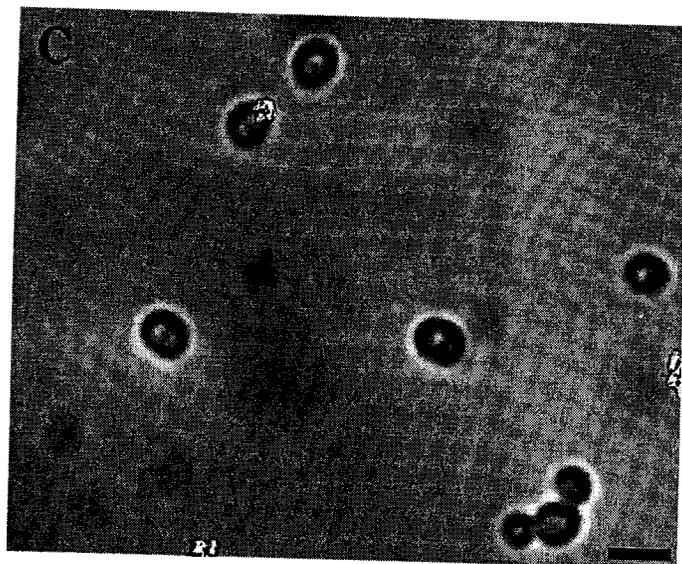


Figure n°16 : Microphotographies de *Candida albicans* ATCC 10231 en l'absence d'amphotéricine B

(A) Après 30 minutes d'incubation dans YM (moyenne relative du diamètre des cellules = $4,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$ (n=30)) barre = 5 μm

(B) Après 180 min d'incubation dans YM (moyenne relative du diamètre des cellules = $7,4 \pm 0,5 \mu\text{m}$ (n=30)) barre = 5 μm





D

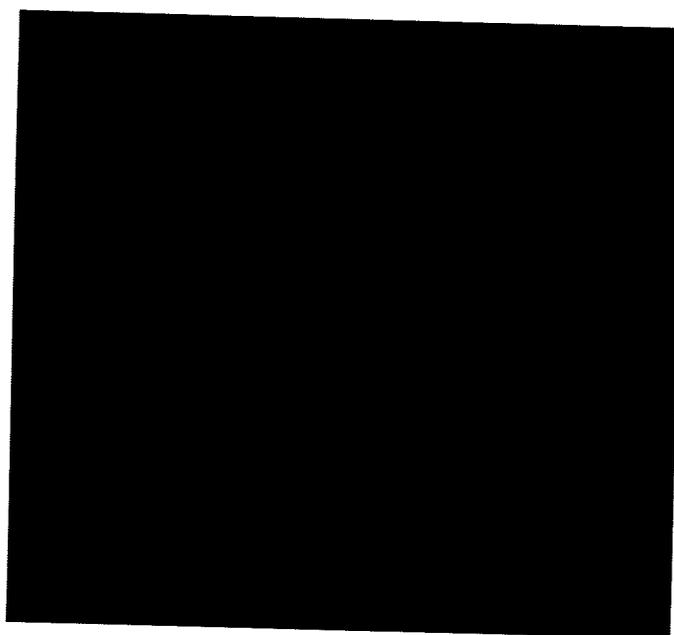


Figure n°16: Microphotographies de *Candida albicans* ATCC 10231 en présence d'amphotéricine B

- (C) En présence d'amphotéricine B à 0,4 µM après 300 min d'incubation dans YM (moyenne relative du diamètre des cellules = $3,3 \pm 0,5$ µm (n=30)). Barre = 5µm**
- (D) Microscopie de fluorescence en présence d'amphotéricine B à 0,4 µM après 27 heures d'incubation suivi de 2 heures d'incubation en présence de 250µM H2DCFDA. Barre=5µM**



3-4- Mesure des Unités Formants Colonies (UFC) :

Dans le but de confirmer les résultats de la croissance de *Candida albicans* mesurée par turbidimétrie à 595 nm, nous avons mesuré les UFC (Unités Formant Colonies) sur milieu YM gélosé toutes les heures. Ces tests nous permettent de vérifier si les cellules sont capables de se multiplier lorsque nous les transférons sur milieu solide. Nous estimons que le pourcentage de cellules capables de croître sur milieu YM gélosé représente le taux de cellules viables et cultivables.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure n°17 :

Nous observons que dans les conditions expérimentales utilisées:

- En l'absence de l'amphotéricine B, le nombre des UFC/ml reste constant et est égale à l'inoculum de départ ($2 \cdot 10^6$ UFC/ml) pendant les trois premières heures de la croissance. Ce taux atteint un maximum de $40 \cdot 10^6$ UFC/ml au bout de sept (07) heures d'incubation.
- En présence d'amphotéricine B, la croissance de *Candida albicans* est plus prolongée. En effet, quelque soit la concentration finale d'antifongique, aucune croissance n'est observée avant 25 heures d'incubation à 30°C. Des colonies commencent alors à apparaître après 25 heures et atteignent un maximum de $20 \cdot 10^6$ UFC/ml et $12 \cdot 10^6$ UFC/ml pour des concentrations respectives en amphotéricine B de 0,4 et 0,6 μ M.

Aucune croissance n'est observée en présence d'amphotéricine B aux concentrations équivalentes à 0,8 ; 1 et 1,2 μ M.



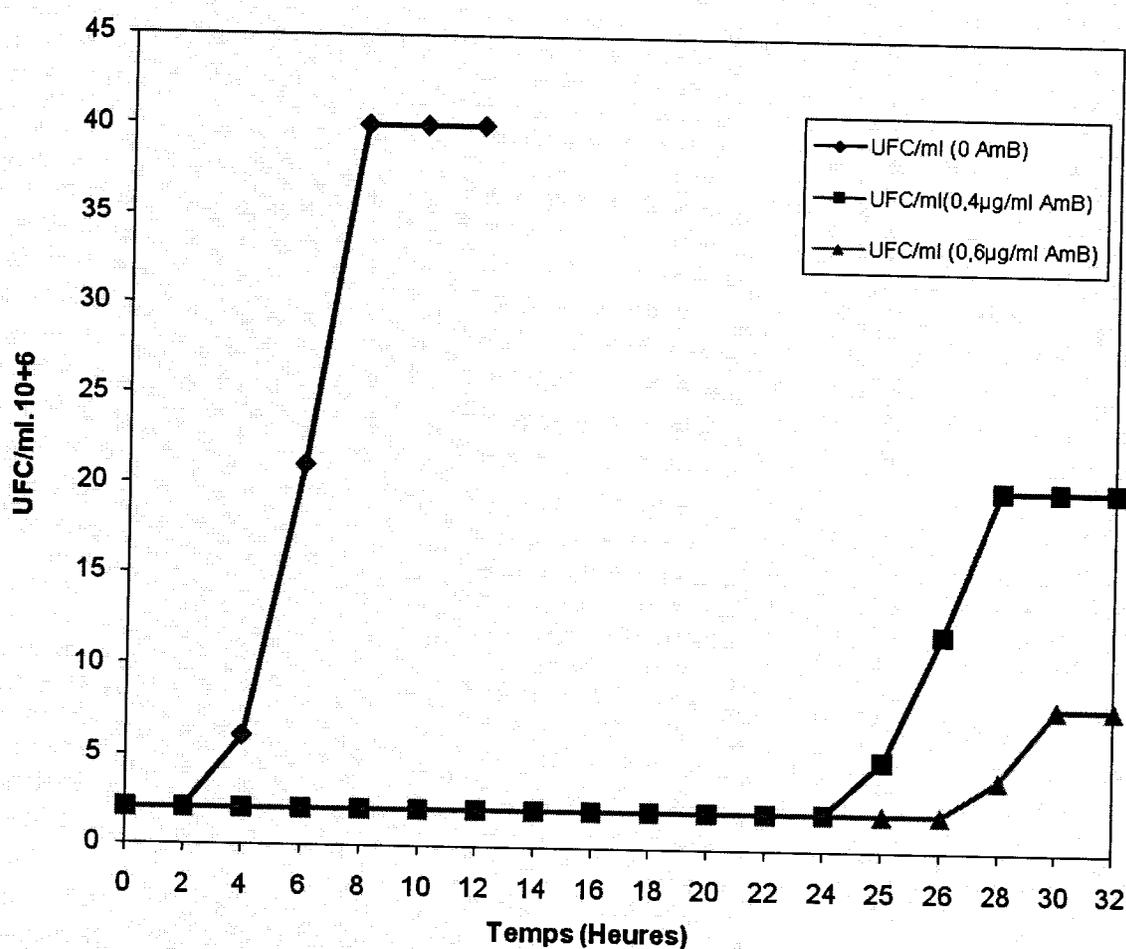


Figure n°17: Mesure des UFC de *Candida albicans* sur YM solide en fonction du temps en l'absence et en présence d'amphotéricine B



4- CONCLUSION :

En conclusion, nous pouvons dire que :

- Les mêmes phénomènes observés lors de la mesure de la croissance par turbidimétrie à une longueur d'onde égale à 595 nm, sont retrouvés en cytométrie en flux par mesure de la FSC.
- L'addition d'amphotéricine B dans le milieu à différentes concentrations, provoque une inhibition de la croissance de *Candida albicans*. Cette inhibition se traduit par un prolongement de la phase de latence qui est proportionnelle à la concentration de l'antifongique. En effet, elle est de 21 heures, 25 heures et 32 heures pour des concentrations finales d'antifongique respectives de 0,4 ; 0,6 et 0,8 μM .
- L'amphotéricine B utilisée à des concentrations finales équivalentes à 1 et 1,2 μM , induit une inhibition totale de la croissance. La croissance étant suivie pendant 40 heures (figure n°4).
- L'addition d'amphotéricine B au milieu de culture, induit une inhibition de la croissance de la levure. Cette inhibition est proportionnelle à la concentration de l'antifongique.
- En présence de 0,4 $\mu\text{g/ml}$, d'amphotéricine B, la courbe de croissance est identique à celle des cellules témoins avec un décalage du moment de démarrage de 24 heures.
- La cytométrie en flux nous informe d'une manière plus précise que la turbidimétrie sur l'évolution de la croissance des cellules en milieu liquide ainsi que la durée des trois (03) principales phases d'un cycle de division cellulaire.
- Grâce à la cytométrie en flux et à la microscopie optique, nous avons pu montrer que l'augmentation de la densité optique observée après 2 heures d'incubation à 30°C en l'absence d'antifongique correspond seulement à une augmentation de la taille des cellules ainsi que le début du bourgeonnement des cellules, mais pas à leur début de multiplication. Nous avons confirmé ces observations par un dénombrement des cellules. Ce n'est qu'à partir de ce

Chapitre 3 : Résultats et discussion

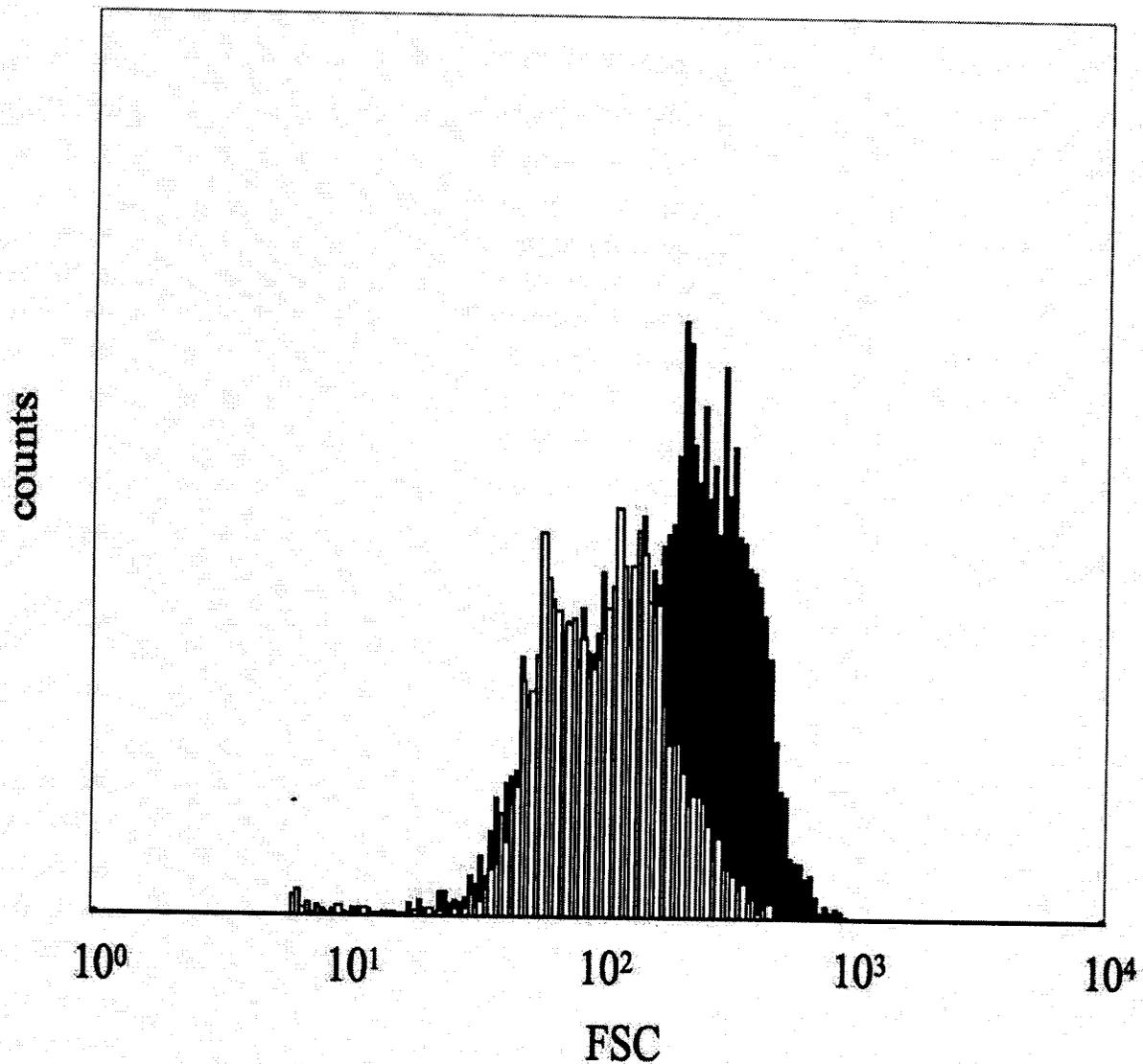
moment que les cellules vont commencer leur multiplication. Ces résultats sont confirmés par la mesure de la FSC.

- Les mêmes constatations ont été faites en présence d'amphotéricine B quelque soit la concentration finale utilisée.
- Nous avons pu calculer précisément la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale fongicide (CMF) de l'amphotéricine B vis-à-vis de la souche de *Candida albicans* ATCC10231 que nous avons utilisé dans ce travail. En effet, la CMI est de 0,4 μM , la CMF étant égale à 1 μM .
- L'addition de l'amphotéricine B dans le milieu de culture induit la formation de pores transmembranaires ce qui permet la libération de molécules de faible dimension dans le milieu extérieur. En effet, la perméabilisation membranaire est connue comme étant un très bon indicateur des premiers effets toxiques de l'amphotéricine B. BEGGS (1994) a mis directement en relation l'induction de la fuite du potassium intracellulaire et l'effet létal de l'amphotéricine B chez des *Candida albicans*, ces deux phénomènes étant concentrations-dépendantes.
- En utilisant des concentrations finales d'amphotéricine B de 0,4 et 0,6 μM , nous remarquons que l'on prolonge le temps d'incubation des levures dans le milieu de culture, la croissance et la division cellulaire reprennent de nouveau.
- Nous pouvons conclure que sous l'effet de l'amphotéricine B, les cellules perdent leurs constituants cellulaires et finissent par mourir. Néanmoins, un certain pourcentage de cellules échappe à l'effet toxique de cette drogue. Ces cellules capables de ressusciter si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 24 heures sont appelées les cellules dormantes. Ce pourcentage peut être calculé graphiquement par superposition des histogrammes de fréquence de la FSC au temps 6 heures, et celui de 24 heures pour la concentration finale de 0,4 μM en amphotéricine B. (figure n°18)

Nous avons pris en considération les profils de distribution de la FSC aux temps 6 et 24 heures pour les raisons suivantes :

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Au temps 6 heures de la croissance, le profil de l'histogramme de distribution de la FSC est similaire à celui obtenu au temps zéro de la croissance en l'absence d'antifongique.
- Au bout de 24 heures d'incubation, nous avons obtenu un déplacement positif du profil de distribution de la FSC ce qui nous amène à dire que c'est probablement le début du « réveil » des cellules.



▨ FSC au temps 6 h de la croissance ■ FSC au temps 24 h de la croissance

Figure n°18 : Détermination graphique du pourcentage de cellules dormantes sous l'effet de l'amphotéricine B à $0,4\mu\text{M}$



5- DISCUSSION :

L'incapacité des cellules de *Candida albicans* traitées aux antifongiques à former des colonies lors de leur ensemencement sur milieu gélosé est généralement considérée comme signifiant la mort des cellules. Cependant, on admet qu'une partie seulement des microorganismes viables se divisent lorsqu'on les force à une réactivation, l'autre partie étant considérée comme constituée de cellules viables mais non cultivables. Nous avons entrepris ce travail pour vérifier si cela était le cas des cellules de *Candida albicans* traitées par l'antifongique polyénique de référence à savoir l'amphotéricine B.

Pour ce faire, la taille et la prolifération de ces levures ont été appréciées par diffusion de la lumière à une longueur d'onde de 595 nm et par cytométrie en flux en présence et en l'absence d'amphotéricine B.

Il ressort de cette étude que :

En l'absence d'amphotéricine B :

Pendant les trois premières heures de la croissance de *Candida albicans* ATCC10231 sur YM liquide à 30 °C sous agitation continue (130 tours/min), d'importants changements ont été observés sur le profil de distribution de la FSC déterminés par la cytométrie en flux. En cytométrie en flux, la FSC est considérée comme étant liée à la taille des cellules. Pendant ce temps, le dénombrement des levures sur cellule de Malassez ainsi que la détermination des UFC révèlent que le nombre de cellules reste constant bien que l'aspect des cellules et l'absorption de la lumière à 595 nm aient indiqué des changements profonds : augmentation de la taille des cellules ainsi que l'apparition de bourgeons. Après un temps long d'incubation, il s'est produit une régression vers l'état initial.

Il faut noter que la description de ces événements pour un inoculum de départ égal à 2.10^6 cellules/ml s'applique également à des concentrations cellulaires initiales allant de 2.10^2 à 2.10^7 cellules/ml.

Après 4 heures d'incubation une augmentation significative de la FSC et par conséquent de la taille des cellules est observée. Cela se produit avec le début du bourgeonnement des cellules. Ce phénomène peut être expliqué si nous

Chapitre 3 : Résultats et discussion

considérons que le volume des cellules mères augmente avec chaque génération de bourgeons comme dans le cas avec les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* (DAVEY et KELL 1996). Or, il a été montré que pendant le cycle de division des cellules de *Candida albicans*, la taille de ces dernières augmente lentement pendant les périodes de bourgeonnement et de débougeonnement de telle sorte que les cellules de chaque génération soient sensiblement plus grandes que celles de la précédente (CHAFFIN 1980). Cependant, le nombre relatif de cellules filles augmente graduellement et devient prépondérant par rapport aux cellules mères. Pendant que les mesures en cytométrie en flux sont effectuées sur un nombre constant de cellules (10.000), le signal de dispersion des cellules mères devient éventuellement négligeable. Les résultats des observations microscopiques et de la cytométrie en flux ont montré que ces changements sont synchronisés. En effet, les cellules de *Candida albicans* que nous avons utilisé proviennent d'une préculture de 15 heures, elles commencent à bourgeonner dès la première heure de la croissance. Cette observation est en accord avec les travaux de SOLL et coll. (1981) qui ont montré que des cellules de *Candida albicans* ayant été préincubées pendant 24 heures sur le milieu de Lee, sont capables de se multiplier après leurs transferts sur le même milieu frais à 37°C.

En ce qui concerne les changements de volume, les études de distribution de la FSC combinée avec l'analyse au microscope des cellules de *Candida utilis*, ont montré que ces cellules grossissent seulement pendant la phase de latence de la croissance. Habituellement, les cellules cessent d'augmenter en taille environ 30 minutes avant l'apparition des bourgeons. Le processus de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* semble être beaucoup plus proche de celui que nous avons observé avec les cellules de *Candida albicans* qu'avec celui des cellules de *Candida utilis* (THOMAS et coll. 1980).

En 1993 WOLDRING et coll. ont présenté des résultats détaillés sur l'augmentation de l'absorbance, le nombre de cellules et de leur volume en fonction du temps par mesure d'image de cytométrie. Ces résultats sont en accord avec les nôtres.

Après l'inoculation des cellules de *S. cerevisiae* dans du YM, l'absorbance à 450 nm a commencé à augmenter tandis que le nombre de cellules mesuré par cytométrie est demeuré constant pendant les 100 premières minutes de la croissance. Ensuite,



Chapitre 3 : Résultats et discussion

les sous-populations formées de cellules de petites tailles apparaissent alors que les cellules mères continuaient à croître. De même, JOHNSTON et coll. (1979) ont montré que des cellules de *S. cerevisiae* anormalement petites, produites par croissance sur un milieu déficient en azote, ont été placées dans un milieu frais, n'ont commencé à bourgeonner qu'après avoir atteint une taille critique. D'autre part, une augmentation exponentielle de la taille de cellules individuelles de *S. cerevisiae* pendant le cycle cellulaire de populations asynchrones a été démontré par mesure de la FSC (PORRO et SRIENC 1995).

Avec des cellules de *C. albicans*, des événements semblables ont été observés. Selon BEDELL et coll. (1980) et SOLL et coll. (1981), à 100 min de la croissance, les bourgeons apparaissent, le poids sec et le taux de protéines augmentent. Il est intéressant de noter que nos observations confirment que des mesures d'absorption de la lumière peuvent être considérées avec précaution comme méthode pour dénombrer les cellules en croissance. L'augmentation initiale de l'absorption semble être liée à l'augmentation de la taille des cellules, et non à celle de leur nombre.

En présence d'amphotéricine B :

Le « rétrécissement » initial des cellules de *Candida albicans* en présence d'amphotéricine B, mis en évidence par l'examen microscopique et de la diminution de la dispersion de la lumière, est un phénomène bien connu, et la cytométrie en flux a été fréquemment employée pour le démontrer [(O'GORMAN et HOPFER 1991), (MARTIN et coll. 1992), (RAMANI et coll.), (GREEN et coll. 1999)]. Cet effet est probablement lié à la fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B (BOLARD 1991).

En revanche, le phénomène de la dormance qui n'a été mis en évidence que depuis relativement peu de temps est encore mal connu : pour faire la distinction entre les cellules mortes et les cellules viables, nous avons utilisé un marqueur fluorescent H2DCFDA,

L'observation originale de cette étude est l'augmentation transitoire de la dispersion de la lumière après environ un jour de croissance à 30°C sous agitation continue (21 h en présence d'une concentration finale d'amphotéricine B égale à 0,4 µM et 25 h pour 0,6 µM d'amphotéricine B), sans prolifération de cellules cela est observé



Chapitre 3 : Résultats et discussion

par dénombrement des levures sur cellule de Malassez et par détermination des UFC sur YM solide. Cependant, contrairement à ce qui a été observé en l'absence d'amphotéricine B, une partie du profil initial de distribution de la FSC correspondant aux cellules rétrécies demeure inchangée. L'observation microscopique révèle l'existence d'une part de cellules de petites tailles non marquées par le H2DCFDA et d'autre part, de cellules fluorescentes qui croissent en taille. Après un délai d'incubation supplémentaire de 3 à 4 heures, (24-25h et 28-29h après le début de la croissance en présence d'amphotéricine B à 0,4 et 0,6 μ M respectivement), la prolifération des cellules reprend et le profil de distribution régresse graduellement par rapport à celui observé en l'absence d'antifongique.

La séquence d'opérations que nous avons observée n'a pas été décrite précédemment pour différentes raisons : i) le but des études de cytométrie en flux était d'obtenir un essai rapide de susceptibilité, menant à des conditions expérimentales différentes des nôtres. Par exemple, le rétrécissement des cellules en présence d'amphotéricine B a été suivi seulement pendant 30 et 120 minutes après l'addition de l'antifongique dans le milieu réactionnel. ii) la plupart des études ont employé des sondes de viabilité et n'ont pas tenu compte de la FSC ou de la dispersion de la lumière latérale (SSC) (REX et coll. 2001) ; une étude dans laquelle l'incubation des cellules était prolongée jusqu'à 24 heures représente une exception (KIRK et coll. 1997). La représentation de la fluorescence de l'acridine orange en fonction de la SSC a montré que la SSC diminue en présence de concentrations d'amphotéricine B supérieure à 0,4 μ M.

L'interprétation la plus simple de cet éclatement de la dispersion, observé après approximativement un jour d'incubation en présence de concentrations d'amphotéricine B allant de 0,4 à 0,8 μ M, est qu'un certain pourcentage de cellules de *C. albicans* ATCC 10231 récupèrent des dommages de l'antifongique et prolifèrent, alors que d'autres ne récupèrent pas. En d'autres termes, un nombre non négligeable de cellules a échappé aux dommages très importants causés par l'amphotéricine B et est devenu « dormant ». Après 24 heures d'incubation, elles rompent cette dormance et sont suffisamment nombreuses pour être détectées au moyen de la dispersion de la lumière éclatée. L'éclatement de la lumière de la dispersion observée ne peut pas être le résultat de quelques cellules qui se sont multipliées dès le début de la croissance et ont atteint un niveau discernable : nous



Chapitre 3 : Résultats et discussion

avons vu qu'en l'absence d'amphotéricine B, la dispersion de la lumière et l'absorbance sont pratiquement constantes de 20 à 30 heures indépendamment de la concentration de l'inoculum de départ (de $2 \cdot 10^2$ à $2 \cdot 10^7$ cellules/ml).

D'autre part, la taille accrue des cellules n'est pas le résultat du gonflement des cellules mortes car elles sont détériorées : le bourgeonnement indique clairement leur vitalité aussi bien que leur morphologie sphérique et leur aspect blanchâtre. Par conséquent, nous apportons une réponse à une polémique également produite avec les bactéries : la renaissance observée *in vitro* représente la renaissance vraie des cellules viables plutôt que la croissance des cellules viables qui avaient échappé à la détection [(LEVIN et BROZEN 2006), (LEWIS 2007)]. Cela n'a pas été observé avec les cellules de *C. albicans* (LAFLEUR et coll. 2006) quoique les conditions expérimentales de ces derniers soient différentes des nôtres (concentrations très élevées en antifongique). De plus, le pourcentage important des cellules qui se réveillent (45% en présence de $0,4 \mu\text{M}$ d'amphotéricine B) que nous avons obtenu ne nous permet pas de les considérer comme des cellules persistantes. Habituellement il ne dépassait pas 1% au maximum.

En conséquence, nos résultats indiquent que l'activité de l'amphotéricine B se développe selon trois étapes. D'abord toutes les cellules subissent les perturbations fortes qui ont comme conséquence un rétrécissement marqué. Puis, pendant une longue période qui peut se prolonger plus de 24 heures, aucun changement n'apparaît dans cet état. Enfin, un certain nombre de cellules reprennent leur activité et la croissance, et sont dans un état « dormant ». Le reste des cellules qui demeurent rétrécies pourrait être considéré comme cellules mortes. Le terme « dormance » semble préférable à celui de « temps de latence » pour décrire la période intervenante parce que le rétrécissement peut être considéré plus qu'un temps de latence. En fait, la dormance est définie comme un état réversible de basse activité, dans lequel les cellules peuvent persister pendant des périodes prolongées sans division (KAPRELYANTS et KELL 1993), ce qui correspond exactement à ce que nous avons observé.

En ce qui concerne le dénombrement des UFC, les expériences ne sont généralement pas conduites au-delà de 24 heures et ont montré d'une manière générale une diminution des UFC pour des concentrations élevées



Chapitre 3 : Résultats et discussion

d'amphotéricine B. Cependant, BURGESS et coll. (2000) ont prolongé leur étude à 48 heures d'incubation et ont obtenu des résultats semblables aux nôtres. MEUNIER et coll. (1990) et KLEPSEK et coll. (1997) ont observé une diminution temporaire des UFC (25 fois et 10 fois respectivement) à une concentration d'amphotéricine B égale à $0,1\mu\text{M}$ et après 20 h d'incubation. D'autre part, une étude physico-chimique récente (LIAO et coll. 1999) a soigneusement analysé les différentes étapes concentrations-dépendantes de l'activité de l'amphotéricine B. Il a été clairement proposé que les cellules de *Candida albicans* exposées à des concentrations d'amphotéricine B comprises entre $0,5$ et $1\mu\text{M}$ (la gamme de concentration de notre étude) ne montrent pas de prises de sondes spécifiques de la viabilité ou de la mortalité et ont une réplication incompétente, mais peuvent présenter des cellules capables de ressusciter. En 2003, LIAO et coll., ont observé également que le nombre des UFC diminue de 99,5% après une incubation de 10h à 35°C en présence de $0,5\mu\text{M}$ d'amphotéricine B, une réduction qu'ils ont considérée ne pas résulter de la mort des levures. En effet, les cellules ont été ressuscitées par une incubation supplémentaire de 15 heures à 22°C et étaient 3 fois plus nombreuses cela après l'inoculation initiale ; leur nombre aurait certainement continué à augmenter avec des temps d'incubation plus longs. Nos résultats sont en conformité avec ces observations, avec une différence importante : nous n'avons pas présenté une étape de « ressuscitation » (incubation supplémentaire à 22°C).

Les questions concernant le réveil de la dormance sont à prendre en compte s'il résulte de la production par des cellules d'un facteur de survie qui stimule la renaissance des cellules dormantes (ARSENY et coll. 1994), ou s'il est la conséquence du rétablissement des dommages induits par l'amphotéricine B au niveau de la membrane des cellules comme il a été montré pour les cellules des mammifères (BINET et BOLARD 1988) ou les modèles membranaires par la dissociation possible des canaux transmembranaires formés par les complexes amphotéricine B-ergostérol (KASUMOV et BOLARD 2004).

D'un point de vue clinique, les résultats obtenus par LIAO et coll. (2003) et les nôtres peuvent avoir des conséquences importantes : ces auteurs ont noté que la concentration d'amphotéricine B utilisée dans la thérapie antifongique est de $2\mu\text{M}$, mais cette dernière diminue rapidement à $0,5\mu\text{M}$ suite à la liaison de cette drogue aux constituants du sérum. Cette concentration tombe exactement dans la gamme



Chapitre 3 : Résultats et discussion

ou la dormance et le réveil sont observés. Cela pourrait expliquer les échecs thérapeutiques dans les traitements antifongiques. De plus, ce phénomène nous permet d'expliquer l'échec thérapeutique observé lors des essais *in vivo* dans lesquels les souris Wistar infectées par *C. albicans* ont été traitées par injection d'une formulation d'amphotéricine B répétée toutes les 24 h. En revanche, quand l'injection était répétée toutes les 48 heures, les résultats étaient plus satisfaisants (SOULIMANE et coll. 2001).

D'un point de vue technique, notre approche qui est basée sur l'utilisation de la cytométrie en flux (qui pourrait être appliquée à d'autres levures et à d'autres drogues) présente les avantages d'être rentable à long terme. En revanche, la numération des UFC est longue et n'est pas très pratique si de nombreuses analyses sont exécutées. Comme indiqué plus tôt, il s'avérerait également que la turbidimétrie (qui a été mesurée par absorption de la lumière) devrait être employée avec prudence comme méthode de dénombrement de cellule : elle est valide dans la phase exponentielle mais pas dans la phase de latence où elle n'est pas strictement corrélée avec le nombre de cellules.

Un autre problème pour lequel notre approche pourrait être intéressante est celui de l'effet post-antifongique (PAFE : post-antifungal effect). Le PAFE est généralement défini comme étant le temps requis pour les cellules fongiques pour récupérer des dommages estropiant passagers soutenus par l'organisation en raison d'une brève exposition à l'antifongique. Par conséquent, la mesure du PAFE peut être considérée comme indicateur de l'état physiologique des cellules pour des concentrations d'antifongique et des temps d'incubation bien précis. Le PAFE dans les cellules de *Candida albicans* en présence d'amphotéricine B a été examiné en utilisant différentes approches, telles que l'absorbance [(ELLEPOLA et SAMARANAYAKE 1998), (SCARLONE et coll. 1991), (Shu et coll. 2001)], la détermination des UFC [(TURNIDJE et coll. 1994), (GARCIA et coll. 2000), (ERNST et coll. 2000)], la détection colorimétrique du CO₂ (CHRYSSANTHOU et coll. 2002) et l'accumulation d'acides aminés marqués au carbone 14C (MANAVATHU et coll. 2004). La cytométrie en flux n'a pas été appliquée à l'effet post-antifongique mais son application aux bactéries (détermination de la FSC) a semblé être tout à fait prometteuse (GOTTFREDSSON et coll. 1998).



Chapitre 3 : Résultats et discussion

Nous employons actuellement notre approche pour évaluer la vitalité des cellules de *Candida albicans* ATCC 10231 chargées d'oligonucléotides antisens en présence de dérivés cationiques de l'amphotéricine B. Ceci a fait l'objet de la deuxième partie de notre travail.



2^{ème} PARTIE : EFFET DE L'ENVIRONNEMENT IONIQUE SUR L'AMELIORATION DE L'INDEX THERAPEUTIQUE DE L'AMPHOTERICINE B

Isolée de *Streptomyces nodosus*, l'amphotéricine B (commercialisée sous le nom de Fungizone®) est utilisée depuis plus de trente ans dans le traitement des infections fongiques systémiques. Elle reste encore un antifongique majeur malgré sa toxicité, étant le plus efficace dans de nombreuses situations cliniques de mycoses systémiques. Les effets de l'amphotéricine B sur les cellules fongiques ou animales restent encore mal compris. L'étape initiale d'efficacité ou de toxicité consiste en une interaction avec les stérols des membranes plasmiques, dans lesquelles cet antifongique forme des pores. Ce phénomène entraîne une fuite des constituants cytoplasmiques, en particulier les ions potassium (K^+). Ces pores résultent de l'agrégation de plusieurs molécules d'amphotéricine B à l'intérieur de la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique, de manière à former une sorte de cylindre creux par lequel peuvent fuir les ions et les constituants cellulaires essentiels.

Il est connu que les ions métalliques divalents affectent l'interaction des antifongiques polyéniques avec les cellules. En effet des travaux antérieurs ont montré que le magnésium et le calcium perturbent l'effet de la nystatine ou de l'amphotéricine B sur *Saccharomyces cerevisiae* [(LIRAS et LAMPEN, 1974) ; (BRAJTBURG et coll., 1980b) ; (BEEZER et CHOWDRY, 1981)], et les érythrocytes (BRAJTBURG et coll., 1980a).

Comme nous l'avons déjà vu, l'amphotéricine B possède deux groupements fonctionnels COO^- et NH_3^+ ainsi que des groupements hydroxyle (OH) qui peuvent se lier pour former des complexes avec les ions métalliques.

Partant de cela, nous avons voulu étudier l'effet de l'environnement ionique sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B.

Pour les tests de cytotoxicité de l'amphotéricine B, les expériences ont été menées sur le globule rouge humain (modèle universel de cellules animales), quant à l'étude de l'efficacité de cette drogue, nous avons utilisé *Candida albicans* ATCC10231. L'amphotéricine B est dissoute dans du DMSO à une concentration de $10^{-3}M$ puis ajustée par spectroscopie à $10^{-4}M$. Elle est utilisée à une concentration finale de

10 μ M pour les tests de cytotoxicité vis-à-vis des globules rouges humains et à 0,4 μ M pour l'étude de son efficacité chez les levures.

Les sels sont ajoutés au milieu réactionnel à une concentration finale de 10mM. La concentration cellulaire de départ est de 4000 cellules/ml pour les érythrocytes et de 2.10⁶cellules/ml pour les levures.

L'antifongique et les sels sont additionnés au milieu réactionnel au même moment que les cellules, ce qui correspond au temps zéro des expériences.

Pour les tests sur les levures, nous remarquons que l'addition des carbonates au milieu de culture Yeast Medium (YM), induit un shift important de pH, ce dernier passe de 6,2 à 8.

Par ailleurs, l'addition de ces sels au milieu réactionnel (PBS) des érythrocytes n'induit ni hémolyse ni fuite de K⁺ (résultats non représentés).

1- EFFET DES CHLORURES :

Les courbes relatives à l'effet des chlorures sur la fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B en fonction du temps chez le globule rouge humain sont regroupées sur la figure n°19.

Les chlorures que nous avons utilisés sont : MgCl₂, NaCl, KCl, CaCl₂ et ZnCl₂.

Nous constatons que :

- En l'absence ou en présence de chlorures, la fuite potassique atteint un maximum au bout de 5 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue.
- Les globules rouges incubés sans amphotéricine B gardent la totalité de leur contenu potassique.
- En présence d'amphotéricine B seule, les globules rouges se vident complètement de leur potassium après 5 minutes d'incubation.
- L'addition des chlorures, réduit l'effet toxique induit par l'amphotéricine B chez le globule rouge. néanmoins la meilleure protection est obtenue en présence de MgCl₂ ou les globules rouges gardent environ 70% de leur contenu en potassium après 90 minutes d'incubation.

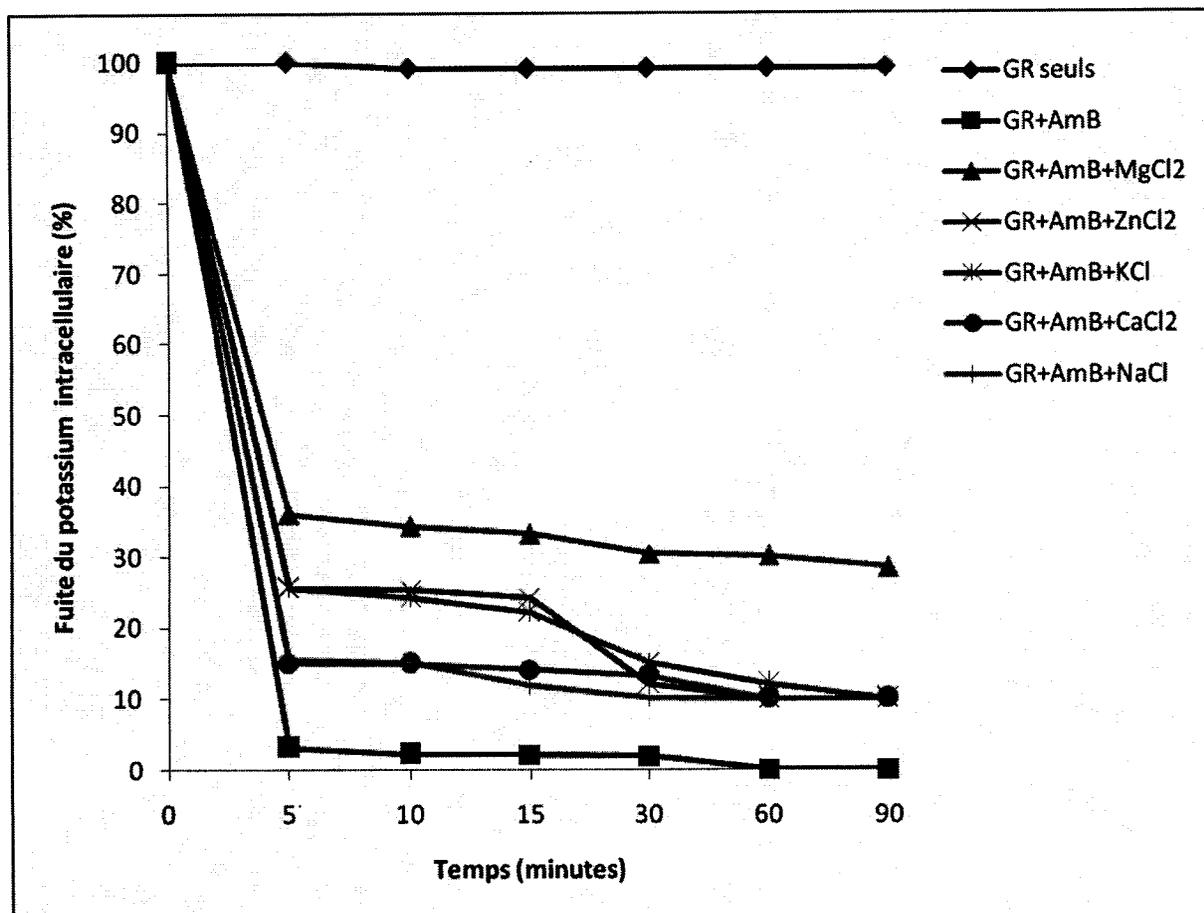


Figure n°19 : Effet de l'addition des chlorures sur la fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge (GR) humain. La concentration finale d'amphotéricine B est de $10\mu\text{M}$. Les cellules sont incubées à 37°C sous agitation continue.

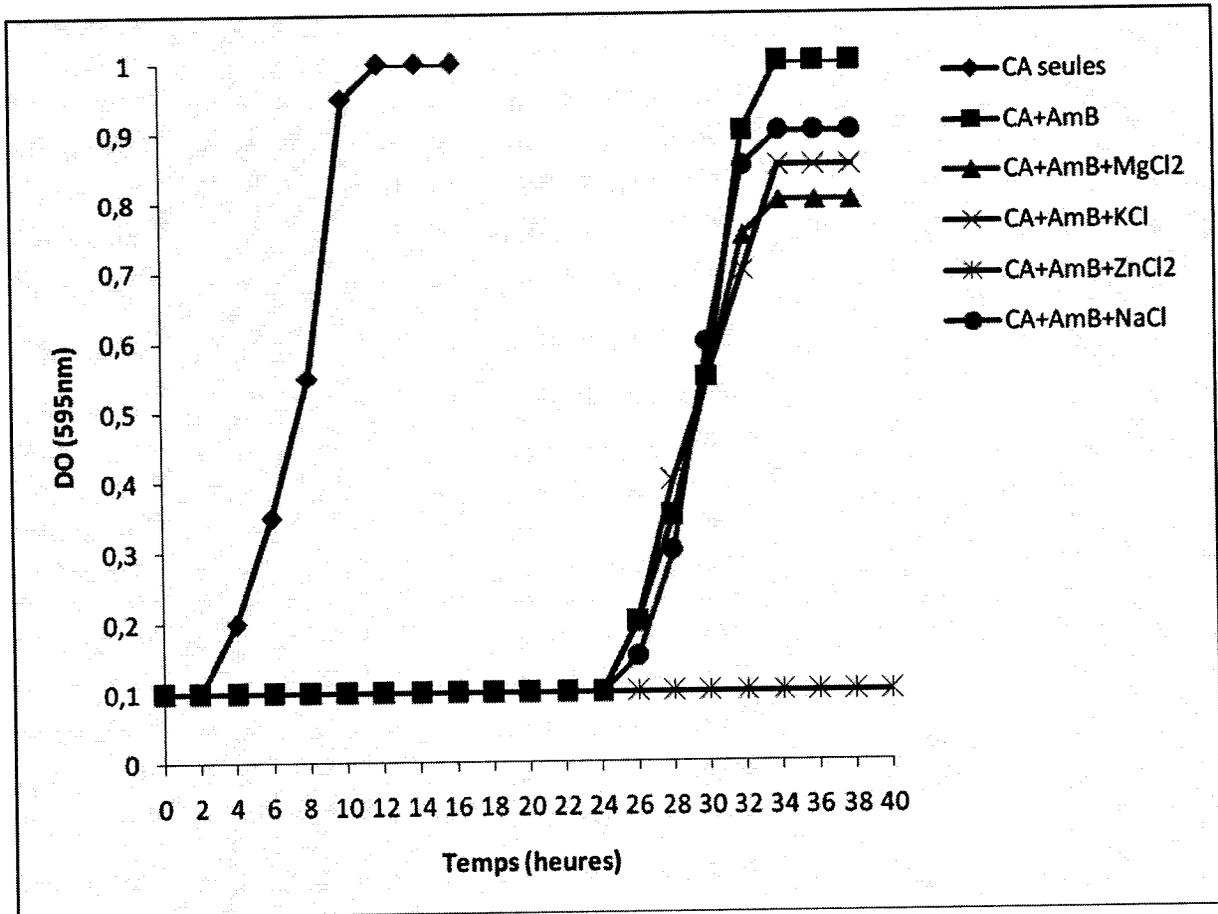


Figure n°20 : Effet des chlorures sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B chez *Candida albicans* (CA). L'amphotéricine B est utilisée à une concentration de 0,4 μ M. Les sels sont ajoutés à une concentration finale de 10mM. La concentration cellulaire de départ est de 2.10⁶ cellules/ml. Les cultures sont menées sur YM liquide. Les levures sont incubées à 30°C.

2- EFFET DES SULFATES :

Nous avons également étudié l'effet des sulfates sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B. Notre choix a porté sur les sulfates suivants : $MgSO_4$, Na_2SO_4 , K_2SO_4 et $ZnSO_4$. Les tests de cytotoxicité ont été effectués sur le globule rouge humain. La cytotoxicité a été suivie par la fuite du potassium intracellulaire. Quant à l'effet des sulfates sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B, nous avons utilisé la levure *Candida albicans* ATCC10231. L'efficacité de cette drogue a été mesurée par turbidimétrie à une longueur d'onde de 595nm.

La figure n°21 regroupe les résultats relatifs à l'effet des sulfates sur la fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B en fonction du temps chez le globule rouge.

Il ressort de cette figure que :

- Les globules rouges incubés en présence d'amphotéricine B seule, perdent la quasi-totalité de leur contenu potassique au bout de 5 minutes d'incubation à 37°C sous agitations continue.
- L'addition des sulfates au milieu réactionnel induit une légère protection des globules rouges contre l'effet toxique de l'amphotéricine B. L'effet protecteur le plus intéressant est obtenu en présence de $MgSO_4$ et de Na_2SO_4 puisque après 90 minutes d'incubation les cellules gardent 10% environ de leur potassium intracellulaire.
- Le $ZnSO_4$ donne un effet similaire à celui observé avec les cellules incubées en présence d'amphotéricine B seule.

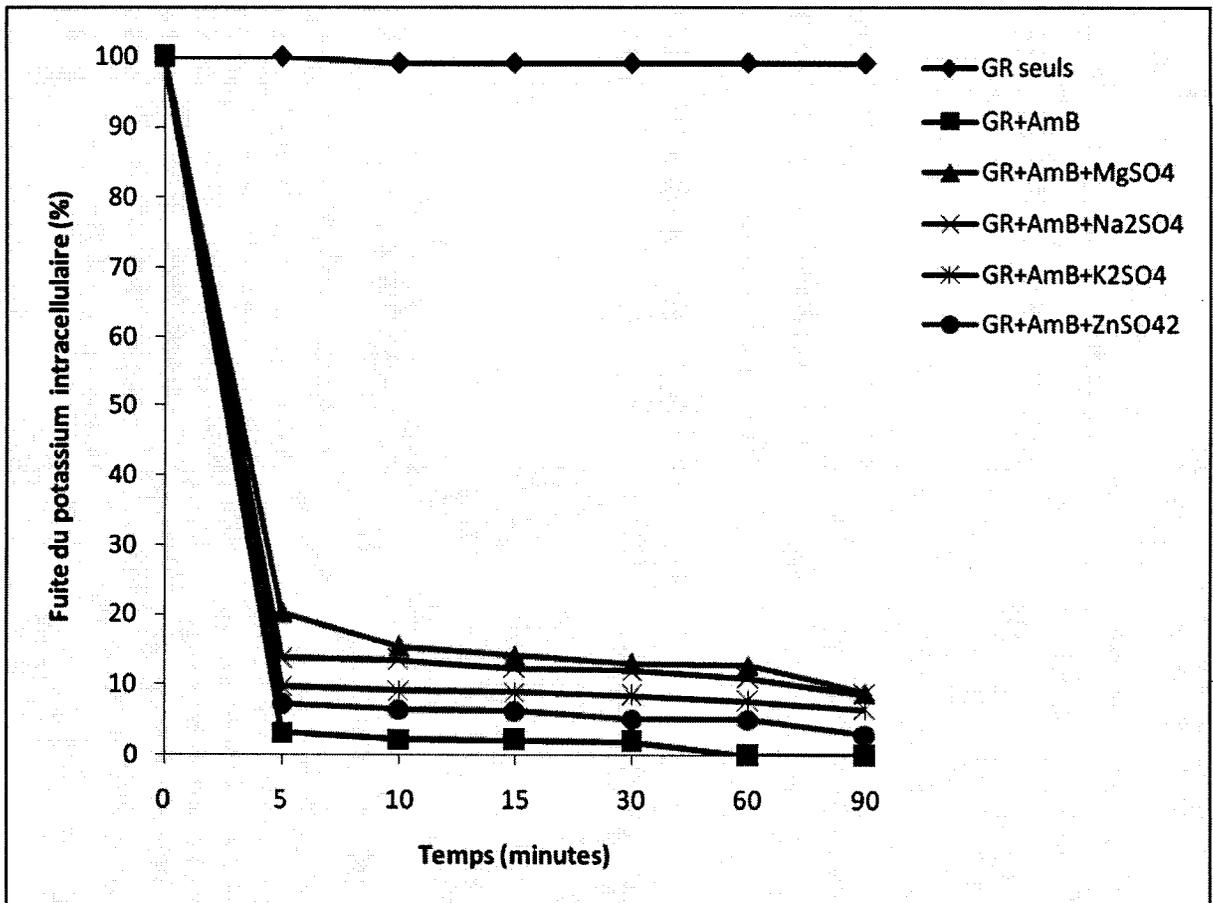


Figure n°21 : Effet de l'addition des sulfates sur la fuite du potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B chez le globule rouge humain (GR). La concentration finale d'amphotéricine B est de 10 μ M. les globules rouges sont incubés à 37°C.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

L'étude de l'effet des sulfates sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis à vis de *Candida albicans* ATCC10231 a donnée les résultats représentés sur la figure n°22.

La croissance est suivie sur 40heures. Les cellules sont incubées à 30°C sous agitation continue (130 tours/minutes).

Nous constatons que :

- Les sulfates sont moins efficaces que les chlorures en ce qui concerne l'amélioration de l'efficacité de l'amphotéricine B vis à vis de *Candida albicans*.
- Les sulfates que nous avons utilisés, hormis le $ZnSO_4$, ne réduisent pas l'efficacité de cet antifongique pour les levures.
- Le $MgSO_4$ induit une augmentation significative de l'efficacité de l'amphotéricine B chez les levures. Cette amélioration est de 10%.
- En présence de $NaSO_4$ et de K_2SO_4 , l'amélioration de l'efficacité de cet antifongique pour les levures ne dépasse pas les 5%.

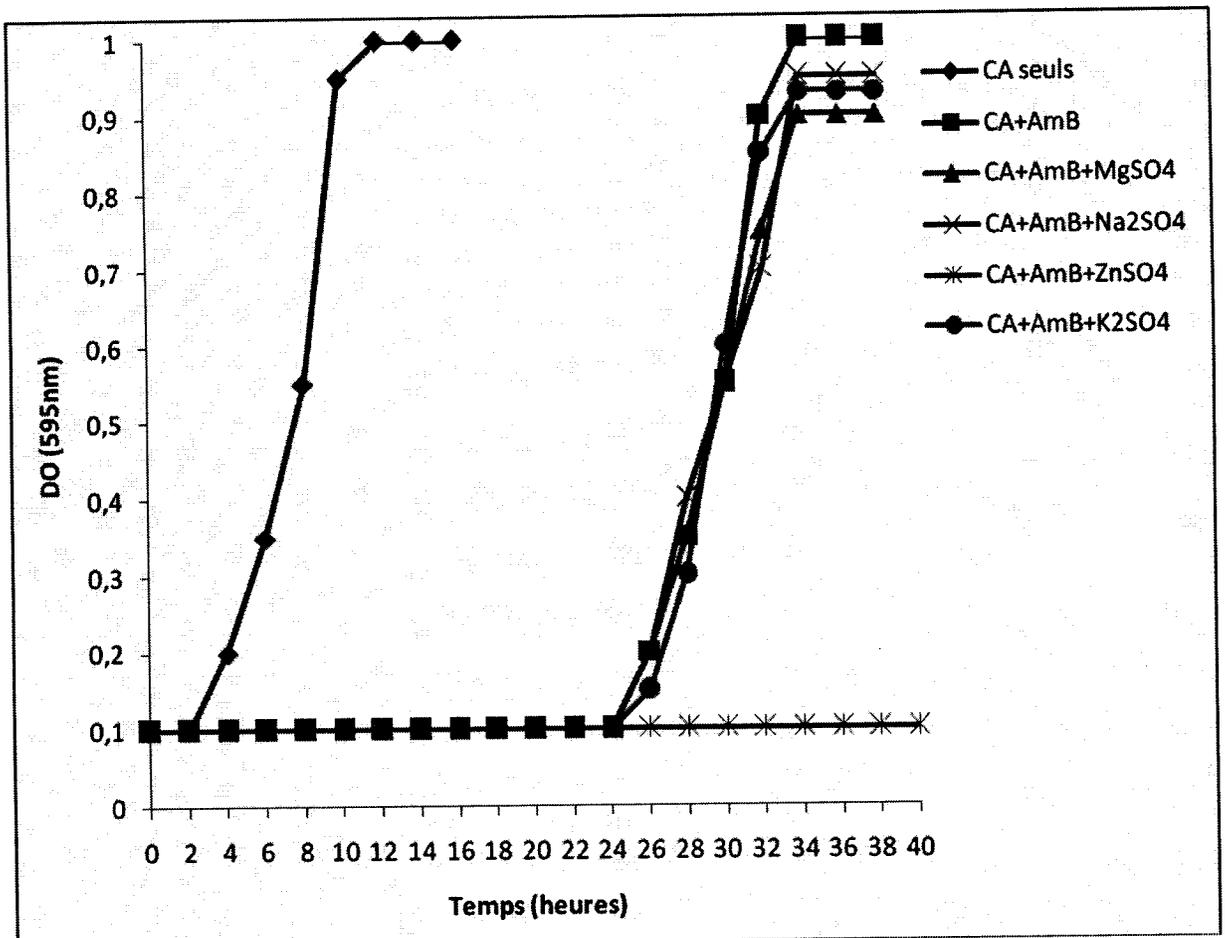


Figure n°22 : Effet des sulfates sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B chez *Candida albicans* (CA). L'amphotéricine B est utilisée à une concentration de 0,4 μ M. Les sels sont ajoutés à une concentration finale de 10mM. La concentration cellulaire de départ est de 2.10⁶ cellules/ml. Les cultures sont menées sur YM liquide à 30°C.

3- CONCLUSION :

D'après les résultats que nous avons obtenus, il semblerait que la modulation de l'environnement ionique de l'amphotéricine B ne modifie pas sa toxicité sélective aussi bien vis à vis des globules rouges (modèle de cellules animales) que vis à vis des levures.

Les carbonates, malgré qu'ils aient induit une amélioration significative de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, ne sont pas représentés car ils provoquent un shift du pH qui pourrait être à l'origine de cette amélioration (Travail en cours de Mme SARI-BELKHERROUBI L.).

Quelque soit les sels utilisés, l'efficacité de l'amphotéricine B vis à vis des levures est maintenue.

Le $MgCl_2$ utilisé à une concentration finale de 10mM protège le globule rouge humain de l'effet toxique de l'amphotéricine B jusqu'à des concentrations très élevées (20 μ M environ 20 fois la CMI).

Cette amélioration est estimée à 40%. De plus, ce même sel augmente l'efficacité de l'amphotéricine B de 10% vis-à-vis des levures de *Candida albicans*.

Les résultats obtenus en présence de zinc sous forme de chlorures ou de sulfates, ne nous semblent pas être intéressants du fait que le zinc est toxique pour les cellules animales et les levures.

4- DISCUSSION :

Le but qui a été défini pour cette partie de notre étude a été la détermination in vitro de l'effet de quelques sels sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B. Pour les tests de cytotoxicité, nous avons utilisé un modèle universel de cellules animales, il s'agit du globule rouge humain provenant d'un donneur unique sain. L'efficacité de cet antifongique a été évaluée sur *Candida albicans* ATCC10231, levure responsable de 80% des infections fongiques.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

- L'incorporation des carbonates dans le milieu réactionnel à une concentration finale de 10mM induit une alcalinisation du milieu de culture ce qui est à l'origine d'une inhibition irréversible de la croissance de la levure. Ceci est en accord avec les travaux de BELKHERROUBI (2001), qui a montré qu'au pH basique, il y a une dégradation partielle du milieu de culture.
- L'utilisation du $ZnCl_2$ et de $ZnSO_4$ n'est pas souhaitable car le zinc est fortement toxique pour les cellules animales (HACHET, 1989).
- Le $MgCl_2$ et de $MgSO_4$ ont permis une amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B. mais c'est le $ZnCl_2$ qui a donné les meilleurs résultats, une amélioration de la protection du globule rouge contre l'effet toxique de cette drogue de 40% avec une augmentation d'environ 20% de son efficacité vis à vis de *Candida albicans*.
- La différence entre le $ZnCl_2$ et le $ZnSO_4$ viendrait du fait que les ions SO_4^{2-} sont moins perméables que les ions Cl^- (HARSTEL et coll., 1994).

3^{ème} PARTIE : VECTORISATION D'OLIGONUCLEOTIDES PAR UN DERIVE CATIONIQUE DE L'AMPHOTERICINE B, L'AMA CHEZ

Candida albicans

Candida albicans est un champignon pathogène associé aux humains ou à d'autres animaux à sang chaud. Il fait partie de la flore commensale de la bouche et de l'appareil digestif et vaginal, où il ne cause généralement aucun problème. Cependant, en présence d'un déséquilibre de la flore microbienne ou d'un affaiblissement du système immunitaire, il peut entraîner des pathologies (candidoses) parfois très sévères. Celles-ci vont de la simple infection superficielle (buccale et vaginale) à la propagation systémique pouvant aller jusqu'à la mort (SHEPHERD et coll., 1985).

La virulence de *Candida albicans* est sans contredit le fruit d'un ensemble complexe de facteurs dont seule l'action concertée peut réussir à déjouer le système immunitaire. Bien entendu, *Candida albicans* possède des caractéristiques basales communes à tous les microorganismes pathogènes, tels que la capacité de croître rapidement à 37°C ou bien la possession d'une paroi cellulaire résistante aux enzymes de dégradation de l'hôte (CUTLER, 1991). Mais, il possède également des caractéristiques propres dont quatre ont une importance majeure : i) l'attachement aux muqueuses (adhésion); ii) la production d'enzymes cytotolytiques (protéinases et phospholipases); iii) l'invasion des tissus en créant une brèche dans la couche épithéliale (pénétration); et iv) la transition entre une forme levure et une forme mycélienne (dimorphisme) (DUPONT, 1995).

Les mycoses systémiques sont actuellement en forte progression du fait de la multiplication des facteurs provoquant des états d'immunodépression (chimiothérapie, traitements immunodépresseurs, SIDA...). Leur recrudescence et leur gravité posent un réel problème de santé publique car malheureusement dans ce domaine, on est dépourvu de médicaments tout à la fois efficace et non toxique. De plus, la majorité des agents antifongiques ont entraîné le développement de résistance, mais c'est véritablement la résistance aux azolés qui est la plus fréquente et la plus problématique pour le traitement des infections fongiques systémiques. Le traitement de plus en plus fréquent de patients immunodéprimés avec les azolés a

Chapitre 3 : Résultats et discussion

largement contribué à la forte émergence de souches résistantes (WHITE et coll., 1998).

L'amphotéricine B, antifongique polyène, qui a fait l'objet de notre étude, figure parmi les agents antifongiques les plus utilisés pour tous les types de candidoses [(ODDS, 1988); (ODDS, 1996); (RINALDI, 1992)], peut aussi entraîner l'apparition de souches résistantes, bien que ceci n'ait pas vraiment causé de problème clinique jusqu'à maintenant (VANDEN BOSSCHE et coll., 1994). En effet, Le principe de la résistance à l'amphotéricine B repose sur un système de disparition de cible en deux étapes : une première étape consiste en un blocage de la voie de biosynthèse de l'ergostérol de façon à soustraire la cible à l'action de l'antifongique ; une deuxième étape est alors nécessaire pour remplacer l'ergostérol dans les membranes par d'autres stérols viables. La résistance à l'amphotéricine B ne résulte donc que des seules mutations des gènes de biosynthèse de l'ergostérol. Par ailleurs, peu de stérols méthylés peuvent remplacer de façon équitable l'ergostérol. Enfin, la voie de biosynthèse de l'ergostérol est complexe et ramifiée. Lorsqu'une branche métabolique conduisant à l'ergostérol est bloquée, il peut y avoir sauvetage ou compensation par une autre branche. Cette complexité explique que les mécanismes de résistance sont plutôt rares.

Chez les levures, deux familles de transporteurs (appelés aussi pompes) sont impliquées dans la résistance aux antifongiques. Elles se distinguent par l'énergie nécessaire à leur fonctionnement (c'est un transport actif), et par leur spectre vis à vis des substrats antifongiques. Les transporteurs de type MF (Major Facilitator), codés par le gène *MDR1* chez *Candida albicans* [(SANGLARD et coll., 1995); (ACCOCEBERRY, 2006)] fonctionnent avec un gradient électrochimique de protons, et ont un spectre réduit vis à vis des azolés. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette), codés par les gènes *CDR1* et *CDR2* chez *Candida albicans* (SANGLARD et ODDS 2002) fonctionnent grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP), ont un spectre large vis à vis de la plupart des antifongiques. En situation normale, les transporteurs de type *MDR* ou *CDR* sont exprimés à un niveau de base dans la cellule fongique, même quand elle n'est pas exposée à un antifongique. La résistance résulte de la surexpression des gènes codant et de l'accumulation des pompes dans la membrane.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Une faible accumulation des médicaments a été observée chez de nombreuses souches résistantes de *C. albicans*, et ceci pourrait vraisemblablement être dû à une augmentation de la quantité de pompes d'exportation (WHITE et coll., 1998).

Il est clair que le traitement des infections à *Candida* serait basé dans un proche avenir sur la combinaison de médicaments ou synergie (déjà en usage) et à long terme sur le développement de nouveaux agents antifongiques. Seule une meilleure compréhension des mécanismes d'action des antifongiques d'une part, et de la biologie générale de ce pathogène, d'autre part, pourra mener au développement de nouveaux agents antifongiques efficaces et sécuritaires et aussi à l'amélioration des molécules déjà existantes. C'est pourquoi, nous proposons une nouvelle approche pour le traitement des mycoses systémiques. Cette dernière est basée sur la vectorisation d'oligonucléotides antisens antifongiques anti-MDR1. Le vecteur proposé est une molécule originale dérivée de l'antifongique le plus étudié et le plus utilisé en milieu clinique : l'amphotéricine B, molécule possédant la capacité de perméabiliser transitoirement les membranes plasmiques, avec une affinité particulière pour les membranes contenant de l'ergostérol (cellules fongiques), et une activité moindre, mais non négligeable, vis à vis des cellules renfermant du cholestérol (cellules animales). Pour une vectorisation efficace, le vecteur doit former avec l'oligonucléotide un complexe stable. L'oligonucléotide étant de nature anionique, nous avons choisi de tester un dérivé cationique de l'amphotéricine B, l'AMA. C'est une molécule qui possède deux charges positives au pH physiologique et peut par conséquent former un complexe avec l'ODN. En effet, l'AMA, comme l'amphotéricine B, possède des propriétés spectroscopiques qui permettent de déterminer son état d'agrégation. Grâce à ces propriétés, il a été montré que : i) les acides nucléiques ont un effet agrégateur sur l'AMA, ii) cette agrégation dépend de la force ionique et du pH, indiquant une liaison électrostatique dans le complexe formé. De plus, l'AMA protège les acides nucléiques de l'hydrolyse enzymatique, sérique pour les ODN et par la DNase I pour les plasmides (BLANC et coll. 2000a et 2000b).

L'efficacité de la pénétration d'un ODN antisens anti-MDR1 complexé à l'AMA dans des fibroblastes NIH/3T3 d'origine murine a été étudiée. Il a été mis en évidence que la complexation à l'AMA permet à l'ODN de pénétrer avec un meilleur rendement dans les cellules NIH/3T3 transfectées par le gène MDR-1 ou pas, par comparaison avec l'ODN seul ou vectorisé par la lipofectine[®], un système lipidique commerciale.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats obtenus ont montré que l'ODN vectorisé par l'AMA diminue presque totalement l'expression de la P-glycoprotéine (P-gp) dans les cellules exprimant MDR-1, jusqu'à un niveau similaire aux cellules n'exprimant pas naturellement la P-gp. L'antisens vectorisé par la lipofectine® diminue également l'expression de la P-gp, mais avec moins d'efficacité que l'AMA. Enfin, l'AMA est capable de transfecter des cellules de *Leishmania amazonensis* (GARCIA-CHAUMONT et coll. 2000b).

Partant de ces résultats, nous avons étudié l'effet antisens du complexe AMA/ODN dans la thérapie antifongique sur un modèle de levure, *Candida albicans* ATCC10231. L'originalité de cette étude viendrait du fait de la complexité des levures par rapport au système *leishmania* (présence d'une enveloppe cellulaire)

Notre travail consiste à déterminer si l'AMA, du fait de son affinité pour l'ergostérol membranaire, peut être utilisé comme vecteur de désoxyribonucléotide pour cibler spécifiquement ces levures. Dans cette approche, nous aurons un effet antifongique cumulatif lié d'une part à l'action propre de l'AMA qui est aussi efficace que l'amphotéricine B vis à vis des levures et fongis mais avec une moindre toxicité vis à vis des cellules animales, et d'autre part, à l'effet antisens de l'oligonucléotide.

1- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION EN AMA :

Dans un premier temps, nous avons testé la sensibilité de la levure *Candida albicans* ATCC10231 à différentes concentrations de l'AMA.

Les croissances sont menées sur milieu YM liquide, la concentration cellulaire de départ étant fixé à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les levures proviennent d'une préculture de 24 heures. Les solutions de l'AMA proviennent d'une solution mère à 10^{-4} M préparée dans de l'eau ultra pure millipore.

L'antifongique est ajouté au milieu de culture au même moment que les levures au temps zéro de la croissance à des concentrations croissantes allant de 1 à $20 \mu\text{M}$.

A partir du temps zéro de la croissance, nous avons mesuré la densité optique à une longueur d'onde $\lambda=595$ nm. La culture est suivie sur 40 heures. Les cellules sont incubées à 30°C sous agitation continue (130 tours/min).

Les résultats obtenus sont rassemblés sur la figure n°23.

Nous constatons que :

- En absence d'AMA (courbe témoin), les cellules croissent normalement. Nous retrouvons les trois (03) phases caractéristiques d'une courbe de croissance à savoir, la phase de latence qui dure 2 heures, suivie de la phase exponentielle et au bout de 10 heures d'incubation, les levures rentrent en phase stationnaire.
- L'addition de l'AMA dans le milieu de culture provoque une inhibition plus ou moins importante de la croissance de *C.albicans*. Cette inhibition est proportionnelle à la concentration finale en AMA incorporée au milieu de culture.
- Il est à noter que pour obtenir le même effet inhibiteur de la croissance, les concentrations d'AMA sont nettement supérieures à celles de l'amphotéricine B.
- Ainsi, à une concentration finale de $1 \mu\text{M}$, l'AMA n'a que peu d'effet sur la croissance de la levure alors qu'à la même concentration, l'amphotéricine B est fongicide vis à vis de cette même levure (*C. albicans*)

Chapitre 3 : Résultats et discussion

ATCC10231). Un léger shift de la courbe de croissance obtenue à une concentration finale de $1\mu\text{M}$ est observé par rapport à la courbe témoin (cellules incubées en l'absence d'AMA). Cette différence d'efficacité viendrait probablement du fait que l'AMA est soluble dans l'eau alors que le problème majeur de la toxicité de l'amphotéricine B vis à vis des cellules animales est lié à son insolubilité dans un milieu aqueux.

- Un effet toxique significatif de l'AMA vis à vis des cellules de *Candida albicans*, apparait à partir d'une concentration finale égale à $2\mu\text{M}$.
- La durée de la phase de latence est proportionnelle à la concentration en antifongique. Elle varie de 10 heures à 30 heures, lorsque la concentration finale en AMA varie de $2\mu\text{M}$ à $9\mu\text{M}$.
- L'AMA inhibe plus ou moins la croissance de *C.albicans* en fonction de sa concentration finale. Cette inhibition est de 5% ; 31.5% ; 33.5% ; 37% ; 42% ; 47% ; 52.5% ; 63% ; 68.5% et atteint un maximum de 100 % pour des concentrations finales respectives en AMA de 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 et $20\mu\text{M}$.
- Une inhibition totale de la croissance de la levure est observée pour des concentrations finales en AMA égales à 10 et $20\mu\text{M}$ même après 40 heures de croissance à 30°C sous agitation continue (130 tours/min). la CMF de l'AMA pour la souche de *C.albicans* utilisée dans cette étude est de $10\mu\text{M}$ (soit 10 fois la CMF de l'amphotéricine B).

1-1- CONCLUSION :

Comme l'amphotéricine B, la molécule mère, son dérivé cationique l'amphotéricine B-3-(N'N'-diméthylamino) propylamide (AMA) possède une activité antifongique importante vis à vis des levures. Ce dérivé est moins toxique que l'amphotéricine B du fait de sa solubilité dans l'eau. De plus, il possède une grande affinité pour les membranes qui renferment de l'ergostérol (CHERON et coll. 1988).

A ces deux propriétés, s'ajoute le fait que ce dérivé porte deux charges positives au pH physiologique, cela lui permettra d'interagir avec les oligonucléotides qui eux sont chargés négativement.

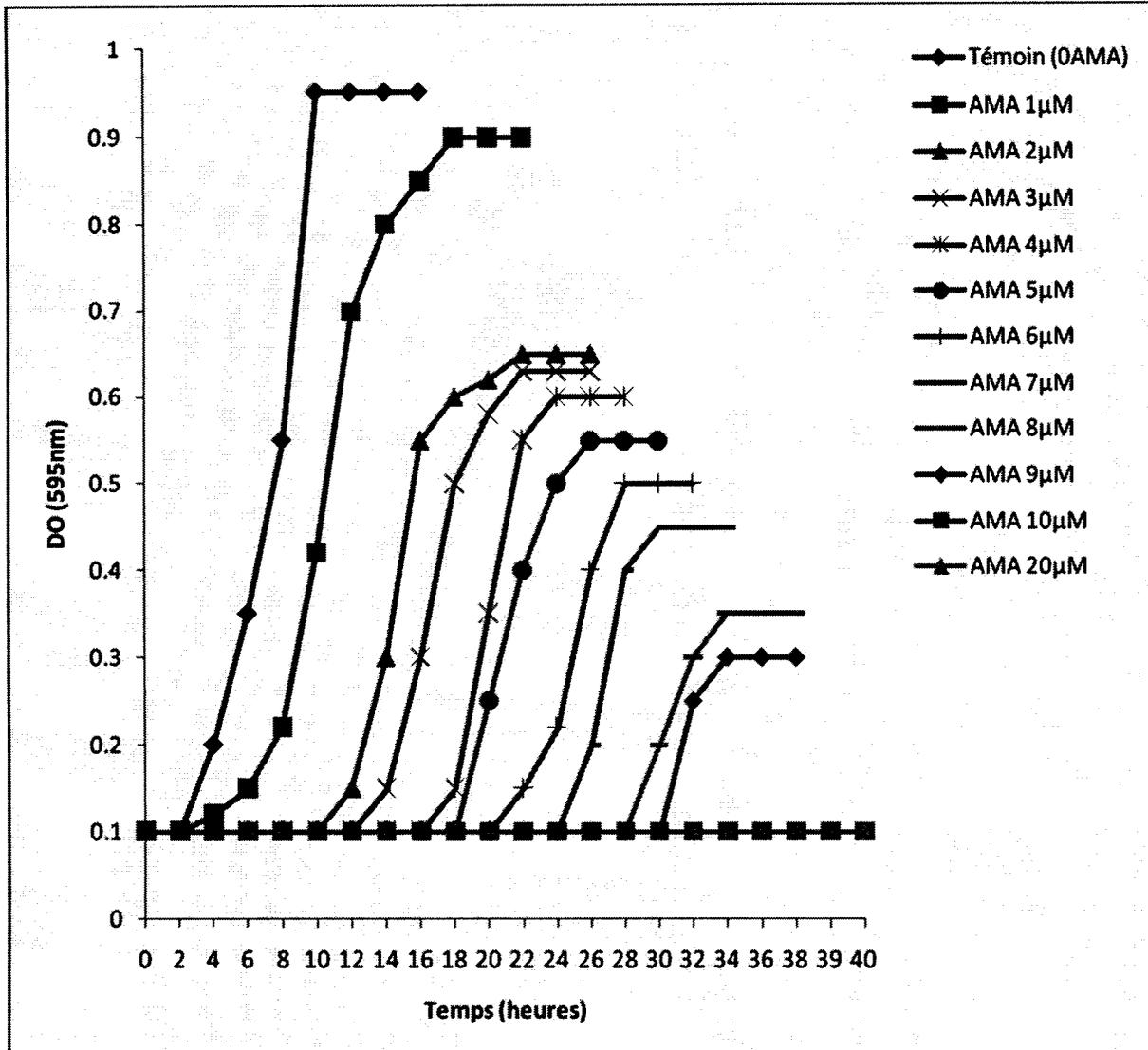


Figure n°23 : Effet de concentrations croissantes d'AMA sur la croissance de *Candida albicans*. L'AMA est préparé dans de l'eau ultra pure à une concentration de 10^{-4} M. Les cultures sont menées sur milieu YM. La concentration cellulaire de départ est de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cellules sont incubées à 30°C .

2- EFFET DU MgCl₂ SUR L'EFFICACITE DE L'AMA :

Dans le but d'augmenter l'efficacité de l'AMA vis à vis de *Candida albicans* et sur la base des résultats de notre étude sur l'effet de l'environnement ionique sur l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B qui ont montré que d'une part, le MgCl₂ utilisé à une concentration de 10mM, protège le globule rouge humain contre l'effet toxique de cette drogue jusqu'à une concentration de 20µM (environ 20 fois sa CMI), d'autre part, ce même sel augmente l'efficacité de cette molécule chez *Candida albicans* d'environ 20%, nous nous sommes intéressés à étudier l'effet que pourrait avoir le magnésium sur l'activité antifongique de l'AMA pour une éventuelle vectorisation d'ODN. Pour ce faire, nous avons effectué une série de courbes de croissance des cellules de *C.albicans* sur YM liquide contenant du MgCl₂. Le magnésium est ajouté au milieu de culture au cours de sa préparation. Il est à noter que l'addition du magnésium seul à une concentration finale de 10mM au milieu de culture n'a aucun effet sur la croissance de *Candida albicans*.

Nous avons testé différentes concentrations de MgCl₂ (10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM et 70mM) Figure n°24.

Nous avons constaté que pour des concentrations finales en MgCl₂ inférieures ou égales à 50mM, le magnésium induit une augmentation significative de l'efficacité de l'AMA pour les levures. Cette amélioration de l'efficacité est proportionnelle à la concentration en antifongique utilisée. Elle passe de 45% pour une concentration finale de magnésium égale à 10mM et atteint un maximum de 60% lorsque le magnésium est ajouté à une concentration finale de 50mM. En revanche, pour des concentrations en MgCl₂ supérieures à 50mM, le degré d'inhibition reste inchangé et est égal à celui obtenu avec 50mM de MgCl₂. Nous avons probablement un effet de saturation.

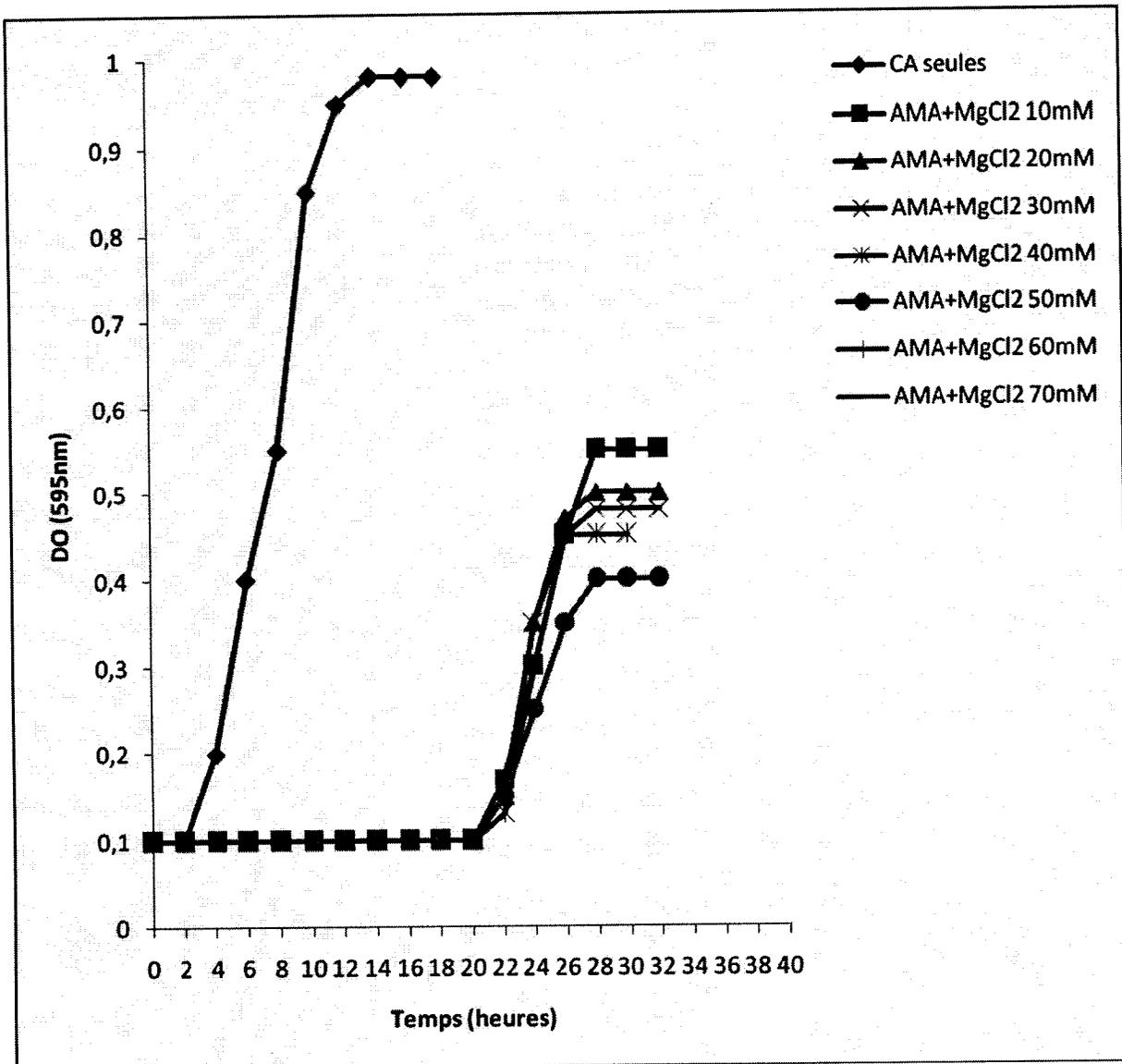


Figure n°24 : Effet de concentrations croissantes de $MgCl_2$ sur l'activité antifongique de l'AMA vis à vis de *Candida albicans*. La concentration finale de l'AMA est de $5\mu M$. Les cultures sont menées sur milieu YM à $30^\circ C$. La concentration cellulaire de départ est de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Pour la suite de notre étude, et sur la base des résultats obtenus avec le globule rouge humain, nous avons utilisé le chlorure de magnésium à la concentration finale de 10mM qui correspond à la concentration tolérée par l'organisme.

Les cellules sont incubées à 30°C sous agitation continue pendant 40 heures, la croissance est suivie par mesure de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda=595$ nm.

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure n°25.

Nous constatons que :

- L'addition du magnésium au milieu de culture à une concentration finale de 10mM, augmente l'efficacité de l'AMA vis à vis de *Candida albicans* d'environ 10% quelque soit la concentration en antifongique.
- La concentration minimale fongicide (CMF) de l'AMA pour *Candida albicans* est de 9 μ M au lieu de 10 μ M en l'absence de magnésium.
- Le degré d'inhibition est proportionnel à la concentration finale de l'AMA, il varie de 20% à 75% lorsque la concentration en AMA passe de 1 μ M à 8 μ M. Une inhibition totale de la croissance est observée à partir d'une concentration finale d'antifongique équivalente à 9 μ M.
- Cette inhibition reste inchangée même après 40 heures d'incubation à 30°C.

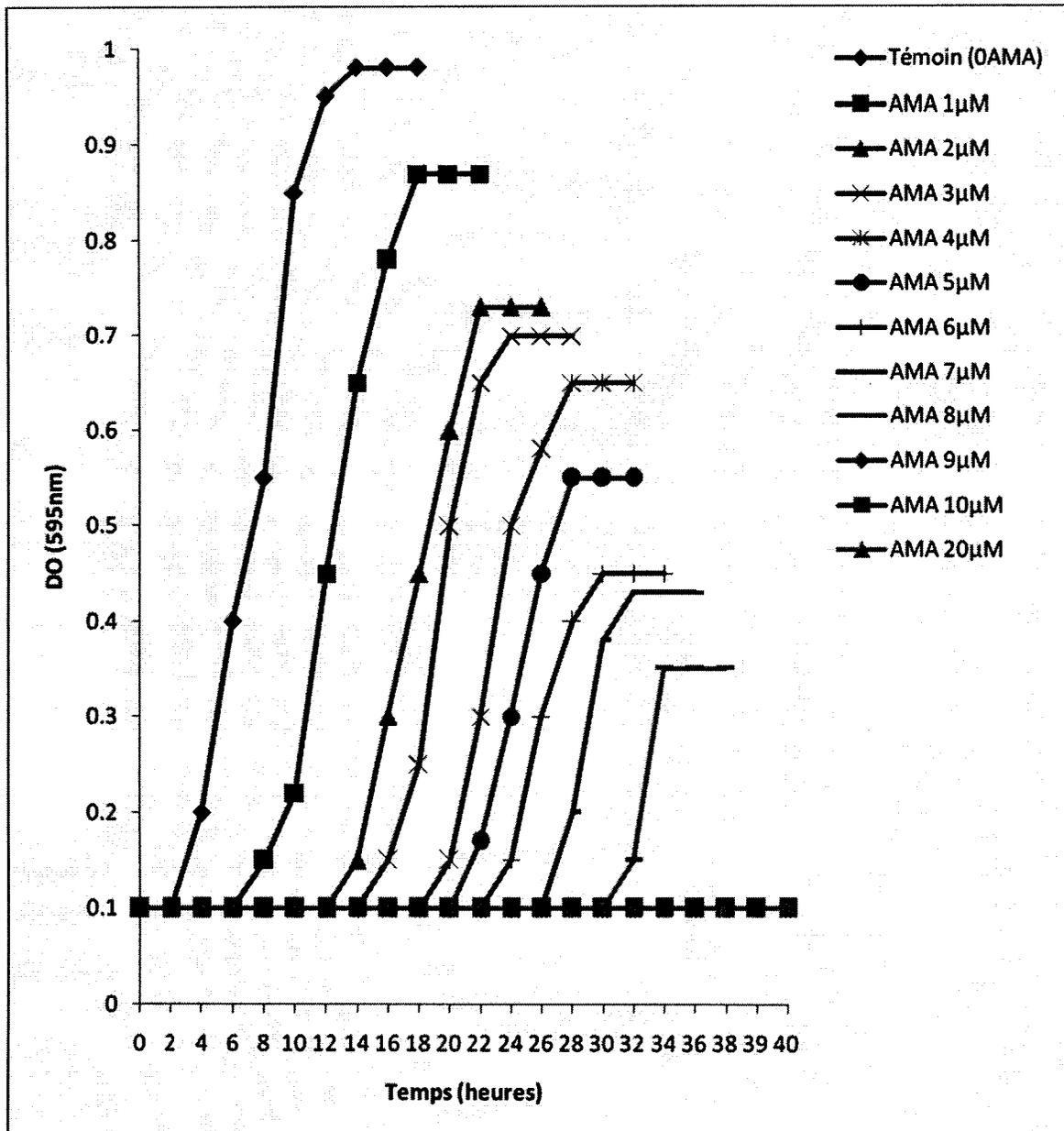


Figure n°25 : Effet de $MgCl_2$ à une concentration finale de 10mM sur l'efficacité de l'AMA vis à vis de *Candida albicans*. L'AMA est préparé dans de l'eau ultra pure à une concentration de $10^{-4}M$. Les cultures sont menées sur milieu YM à 30°C. La concentration cellulaire de départ est de 2.10^6 cellules/ml.

2-1- Conclusion :

L'utilisation d'un milieu de culture supplémenté en $MgCl_2$ à une concentration finale de 10mM permet l'amélioration de l'index thérapeutique de l'AMA. Cela va en partie dans le même sens que les travaux de plusieurs auteurs. En effet, LIRAS et LAMPEN (1974) ont fait remarquer que les manifestations de la toxicité des antifongiques polyéniques tels que l'amphotéricine B sont la fuite des ions K^+ suivie de celle des ions Mg^{2+} à partir des cellules. Les mêmes observations ont été faites par BRAJTBURG et coll. (1980b) chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour une meilleure compréhension du rôle du magnésium dans l'amélioration de l'efficacité de l'AMA, nous pouvons nous reporter au modèle décrit par MILLIE et coll. 1999. Ces auteurs ont montré que l'auto-association de deux molécules de polyène se fait par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes entre les chaînes insaturées de chaque molécule. Le dimère ainsi formé se présente comme un rectangle, les têtes polaires étant situées de part et d'autre en position tête-bêche. D'après ces mêmes auteurs, les oligomères de l'amphotéricine B résultent de l'empilement de ces dimères. Transposé à l'AMA, ce modèle hélicoïdal est peu favorable dans l'eau du fait de la répulsion entre les têtes polaires chargées positivement. Au contraire, dans une solution de $MgSO_4$ ou de $MgCl_2$, les ions Cl^- ou SO_4^{2-} « écrantent » une partie des charges positives de l'AMA, limitant ainsi la répulsion entre molécules ; d'où une importante multiplication des espèces auto-associées en présence de $MgCl_2$ corrélée à la disparition progressive des monomères. Ces résultats sont en accord avec les travaux de BLANC et coll. (2000b) qui ont montré que l'augmentation de la concentration de l'AMA dans l'eau n'affecte pas l'intensité de la bande d'absorption à 409 nm attribuée aux monomères en solution. Par contre, la solubilisation de l'AMA dans du NaCl provoque une diminution de l'intensité de cette bande. Ils ont donc émis une hypothèse selon laquelle les dimères et/ou les oligomères pourraient participer à cette bande.

3- VECTORISATION D'UN OLIGONUCLEOTIDE PAR L'AMA :

Nous nous sommes intéressés à l'AMA pour la vectorisation d'oligodésoxynucléotides (ODN) car il possède deux charges positives au pH physiologique ce qui lui permettra d'interagir avec l'ODN chargé négativement d'une part. D'autre part, plusieurs auteurs [(CHERON et coll. 1988), (BAGINSKI et coll. 1997)] ont montré que si les dérivés de l'amphotéricine B conservent les propriétés perméabilisatrices de cette dernière, du fait que la chaîne polyénique est conservée intacte dans ces dérivés, certains d'entre eux en particulier l'AMA ont une toxicité cellulaire nettement réduite.

Par ailleurs, des études *in vitro* sur les cellules NIH/3T3 (fibroblastes murins) ont démontré l'internalisation des ODN par l'AMA, de même qu'une protection de ces derniers par le polyène contre les dégradations par les nucléases sériques par le polyène GARCIA-CHAUMONT et coll. 2000a).

Les essais de vectorisation de l'oligonucléotide par l'AMA en vue d'une nouvelle approche thérapeutique pour les mycoses systémiques ou généralisées ont été menés sur des cellules de *Candida albicans* ATCC10231 en culture dans du milieu YM additionné de MgCl₂ à une concentration finale de 10mM.

Outre la faculté d'améliorer l'efficacité de l'AMA sur les levures, le magnésium peut interagir avec l'oligonucléotide chargé négativement.

L'oligonucléotide utilisé cible le codon d'initiation de l'ARNm du gène MDR-1 présent chez *Candida albicans* qui inhibe les protéines MF (facilitateurs majeurs) [(GOLDWAY et coll. 1995); (WHITE et coll., 1998)]. Il s'agit d'un 20-mère phosphorothioate, ayant montré son efficacité chez les fibroblastes murins lorsqu'il est vectorisé par des vecteurs cationiques tels que la lipofectine® (ALAHARI et coll. 1996), ou l'AMA [(GARCIA-CHAUMONT et coll.2000b), (SEKSEK et BOLARD 2004)]. L'ODN est préparé dans de l'eau millipore à une concentration de 10⁻³M et est utilisée à une concentration finale de 1µM. Quant à l'AMA, la solution mère est préparée par dissolution de l'antifongique dans de l'eau ultra pure millipore à une concentration de 10⁻⁴M et est utilisée à une concentration finale de 5µM.

Après détermination par spectroscopie, la concentration de la solution mère de l'AMA est ajustée à la valeur souhaitée.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Ces deux concentrations ont été fixées sur la base des résultats obtenus par CHAUMONT-GARCIA et coll. (2000a). Ces auteurs ont montré qu'un meilleur rendement de la vectorisation de l'ODN par l'AMA est obtenu pour un rapport de charges positives et négatives équivalent à 0,5.

A cette concentration, nous allons tirer profit essentiellement de l'effet perméabilisant des membranes biologiques de l'AMA du fait que le degré d'inhibition observé à 5 μ M d'AMA n'est que de 60% par rapport aux cellules témoins cultivées en l'absence d'antifongique.

L'AMA et l'ODN sont préincubés pendant 30 minutes à 30°C avant leur addition au milieu de culture. Le temps zéro de la croissance, correspond à l'incorporation de la suspension cellulaire à une concentration finale de 2.10⁶cellules/ml.

L'incubation se fait à 30°C sous agitation continue (130 tours/min).

La croissance est suivie depuis le temps zéro par lecture de la densité optique à une longueur d'onde $\lambda=595$ nm.

Les résultats relatifs à l'effet du complexe AMA/ODN sur la croissance de *Candida albicans* sont rassemblés sur la figure n°26. Il faut noter que la concentration finale de l'ODN est fixée à 10⁻⁶M et que le rapport (R) des charges positives et négatives (R_{+/-}) est de 0,5.

Nous remarquons que :

- En l'absence d'AMA et d'ODN (courbe témoin) les cellules suivent une croissance normale. Elles atteignent la phase stationnaire au bout de 10 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue.
- La croissance des cellules incubées en présence de l'oligonucléotide seul à une concentration finale de 1 μ M est identique à celle des cellules témoins. L'ODN seul na donc aucun effet sur la croissance de la levure.
- La complexation de l'ODN avec différentes concentrations d'AMA induit une inhibition de la croissance. Cette dernière dépend de la concentration finale de l'antifongique.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

- Le degré d'inhibition varie de 25% à 75% pour des concentrations finales en AMA allant de 1 μ M à 7 μ M.
- A partir d'une concentration finale en antifongique de 8 μ M, nous avons observé une inhibition totale de la croissance de *Candida albicans* par le complexe AMA/ODN, même si nous prolongeons la durée de la croissance à 40 heures.
- A la concentration finale de 5 μ M d'AMA, la concentration de l'ODN étant de 1 μ M, les cellules sont capables de ressusciter si leur incubation à 30°C sous agitation continue est prolongée au-delà de 22 heures. Ce phénomène déjà observé avec les mêmes cellules sous l'effet de l'amphotéricine B est appelé la dormance des cellules sous l'effet de l'antifongique.

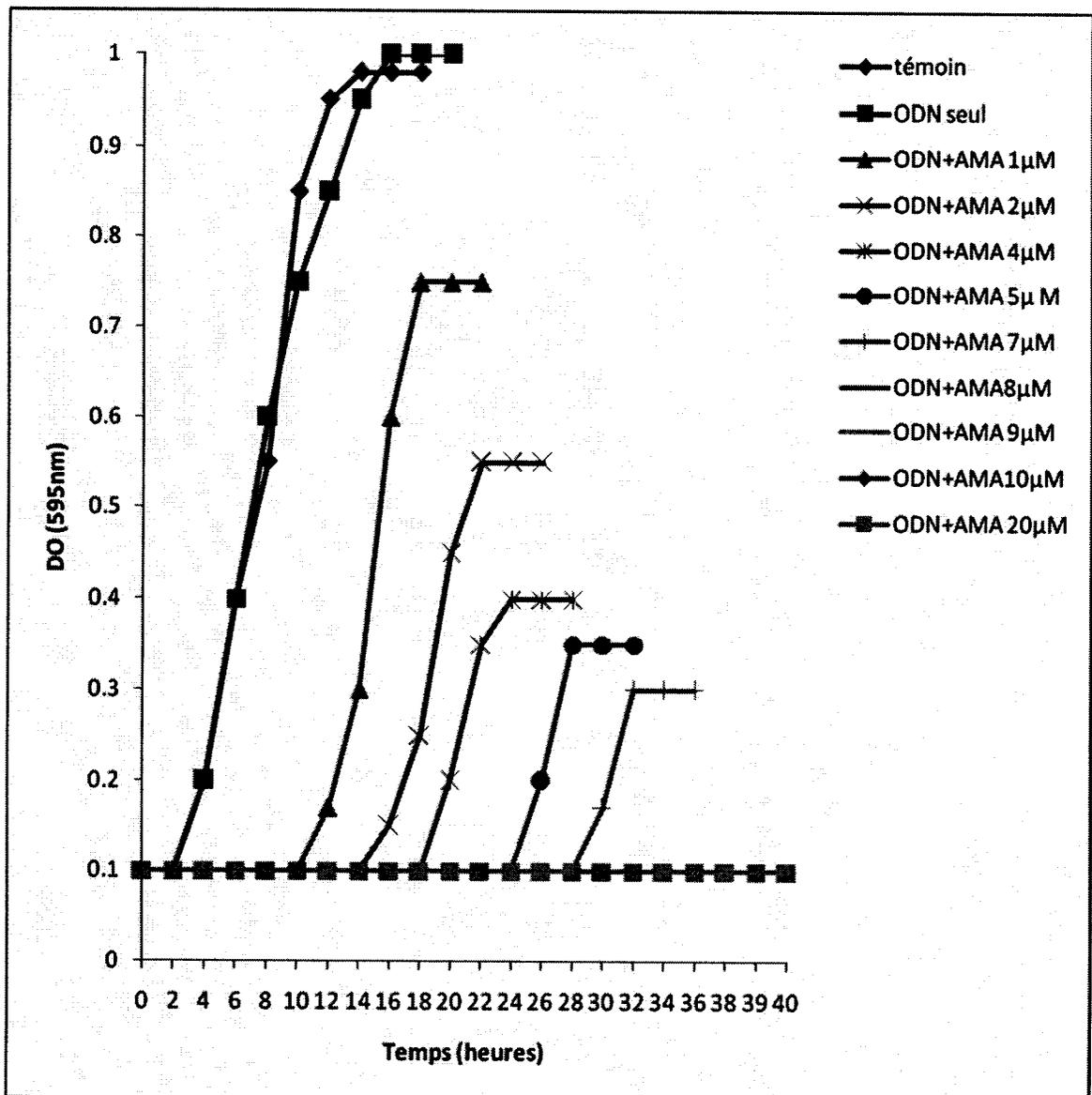


Figure n°26 : Effet de l'addition de l'ODN sur la croissance de *Candida albicans* en présence de concentrations croissantes d'AMA. Les cultures sont menées sur milieu YM additionné de $MgCl_2$ à 10mM. L'AMA est l'ODN sont préparée dans de l'eau ultra pure millipore à des concentrations mères respectives de $10^{-4}M$ et $10^{-3}M$. la concentration finale de l'ODN est de 1µM. La concentration cellulaire de départ est de 2.10^6 cellules/ml.

4- MISE EN EVIDENCE DE L'INTERNALISATION DE L'ODN PAR IMAGERIE DE FLUORESCENCE :

Afin de vérifier l'internalisation de l'oligonucléotide par l'AMA, une étude microscopique a été effectuée après 3 heures d'incubation à 30°C en milieu YM additionné de 10mM de MgCl₂.

Pour les expériences en imagerie de fluorescence, les oligonucléotides sont marqués à leur extrémité 5' par la fluorescéine.

La microphotographie représentée sur la figure n°27, nous permet de voir clairement que l'oligonucléotide a bien été internalisé par les cellules de *Candida albicans*. Presque la totalité des levures sont fluorescentes. De plus, une culture mixte de cellules de *Candida albicans* ATCC10231 en présence de fibroblastes NIH/3T3 réalisée en collaboration avec le Dr SEKSEK a montrée que le complexe AMA/ODN possède une sélectivité très importante pour les levures. En effet, aucune cellule animale ne fluoresce alors que la plus part des levures le sont.

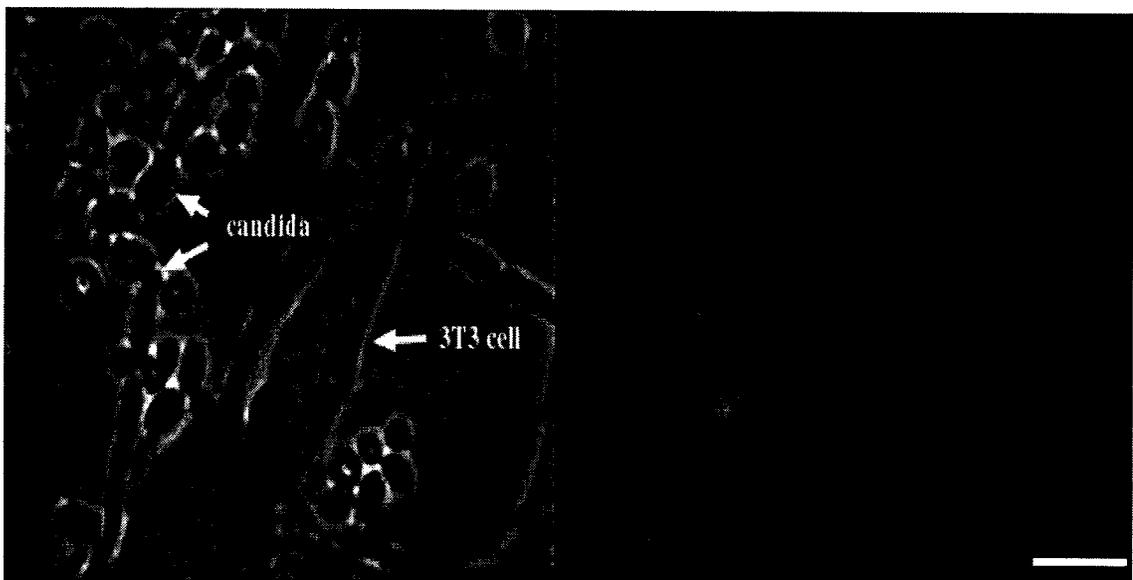


Figure n°27 : Microphotographie de *Candida albicans* incubées pendant 3h à 30°C en présence d'AMA à 5µM et d'ODN fluorescent à 1µM. Les cellules sont ensuite lavées et ressuspendues dans du milieu de culture neuf. Champ observé en épifluorescence (63X) Barre=8µm.

4-1- Conclusion :

Nous avons pu démontrer au cours de cette étude que le dérivé cationique de l'amphotéricine B, l'AMA est un bon candidat à la vectorisation d'oligonucléotides. L'efficacité du complexe AMA/ODN est significativement supérieure à celle de l'AMA seule. Le degré d'inhibition passe de 45% en présence d'AMA seule à 65% en présence du complexe AMA/ODN. Une amélioration de 25% de l'efficacité antifongique vis à vis de la levure *Candida albicans* par l'oligonucléotide. Cela peut être expliqué par une possible inhibition du niveau d'expression des facilitateurs majeurs (MF) protéines membranaires retrouvées chez *Candida albicans* responsables de la répulsion des médicaments à l'extérieur des cellules (WHITE et coll., 1998). Nos résultats vont dans le même sens que ceux de BRIGUI et coll. 2003, qui ont montré l'existence de l'effet antisens d'oligonucléotides naturels vectorisés par l'AMA ou conjugués à du cholestérol chez des cellules NIH-3T3R.

Dans notre approche, nous avons constaté que la complexation de l'AMA avec l'oligonucléotide augmente l'efficacité de cette drogue d'environ 20% chez les cellules de *Candida albicans*. En effet, l'AMA seule inhibe la croissance de *Candida albicans* à 45%, sa complexation avec l'ODN fait passer cette dernière à 65%. Cette amélioration de l'efficacité de l'AMA serait probablement liée à l'effet antisens de l'oligonucléotide.

Dans la suite de notre étude, nous avons voulu vérifier si en prolongeant le temps d'incubation au-delà de 22 heures, les cellules de *Candida albicans* qui ressuscitent contiennent toujours l'oligonucléotide.

Pour ce faire, nous avons suivie la croissance des levures par cytofluorométrie en l'absence et en présence du complexe AMA/ODN.

5- MISE EN EVIDENCE DE L'INTERNALISATION DE L'ODN PAR CYTOMETRIE EN FLUX :

L'oligonucléotide utilisé pour ces expériences est marqué à son extrémité 5' par la fluorescéine. Il est solubilisé dans de l'eau millipore à une concentration de 10^{-3} M. Sa concentration finale est fixée à 1μ M.

Nous avons utilisé une concentration finale en AMA égale à 5μ M obtenue par dilution d'une solution mère de 10^{-4} M.

L'oligonucléotide et l'antifongique concentrés sont incubés pendant 30 minutes à 30°C avant leur incorporation au milieu de culture contenant les levures à une concentration finale de 2.10^6 cellules/ml.

L'incubation se fait à 30°C sous agitation continue (130 tours/minutes). Depuis le temps zéro qui correspond à l'addition de la suspension de levure, les cellules transfectées sont lavées puis ressuspendues dans du milieu de culture neuf. Nous avons mesuré la FSC qui nous renseigne sur la variation de la taille des cellules au cours de la croissance et de la fluorescence.

La cytométrie en flux permet d'obtenir des résultats statiques sur une population de 10.000 cellules.

Seuls les résultats en présence d'une concentration finale en AMA égale à 5μ M seront représentés car c'est à cette concentration que nous avons obtenu une meilleure internalisation de l'ODN par les levures.

La figure n°28 présente les résultats obtenus lors de l'analyse par cytométrie en flux des cellules de *Candida albicans* incubées avec l'ODN phosphorothioate seul et le complexe AMA/ODN. L'ensemble des histogrammes de fréquence, représentant le nombre de cellules marquées en fonction de l'intensité de fluorescence de l'ODN phosphorothioate, est décalé positivement par rapport à l'histogramme des cellules témoins (cellules incubées seules c'est-à-dire sans ODN et sans AMA). Ceci montre que l'ODN a bien été internalisé par le vecteur polyénique. Toutefois, l'allure de la courbe de distribution de fluorescence un peu étalée traduit des intensités de fluorescence provenant de différentes populations cellulaires.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

La courbe de distribution du complexe AMA/ODN est décalée par rapport à l'ODN seul. Ce dernier n'étant pas capable de rentrer seul dans les cellules, d'où la faible intensité des levures transfectées.

En ce qui concerne l'efficacité de l'AMA vis à vis des cellules de *Candida albicans*, il apparait que sa complexation à l'oligonucléotide améliore son activité antifongique. De plus, les mesures de la fluorescence par cytométrie en flux (FL1), met en évidence la viabilité des cellules.

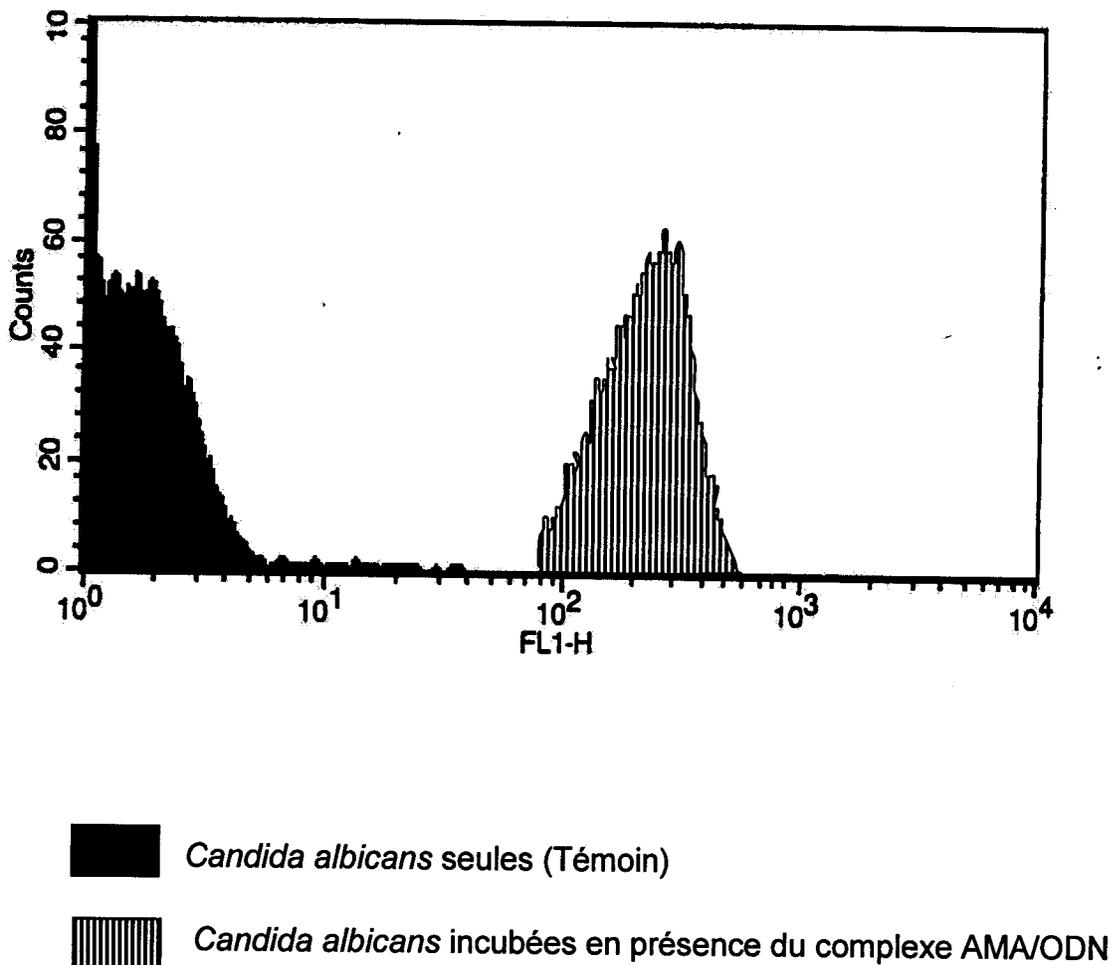


Figure n°28 : Mise en évidence par cytométrie en flux de l'internalisation de l'oligonucléotide par l'AMA dans les cellules de *Candida albicans* ATCC10231.

6- MECANISME D'INTERNALISATION DE L'ODN PAR L'AMA :

L'oligonucléotide chargé négativement interagit avec l'AMA qui lui est chargé positivement et forment un complexe stable. Ce résultat a été confirmé par les travaux de CHAUMONT-GARCIA et coll. (2000 a et b) qui ont utilisé des techniques spectroscopiques (absorption électronique et dichroïsme circulaire), pour mettre en évidence l'existence d'une interaction entre la molécule d'AMA et l'oligonucléotide, ce qui n'était pas le cas de l'amphotéricine B ou aucune interaction n'a été décelée. Ceci est probablement lié au fait que l'amphotéricine B est zwitterionique. Ces mêmes auteurs ont suggéré que les interactions entre l'AMA et l'ODN sont essentiellement électrostatiques.

En ce qui concerne l'internalisation du complexe AMA/ODN dans les cellules fongiques, et sur la base des propriétés perméabilisatrice de l'AMA pour les membranes plasmiques, nous pouvons émettre une hypothèse selon laquelle ce complexe pénètre dans la cellule à travers les pores formés par cette drogue au niveau de la membrane. Il s'agit donc d'une voie autre que l'endocytose. En effet, sur la base des travaux de DE KRUIJFF et DEMEL (1974) qui ont montré que la taille des pores transmembranaires formés par l'amphotéricine B et par conséquent par l'AMA dans les cellules de mammifères était d'environ de 8 Å. Cette taille serait compatible avec la taille d'un polynucléotide simple brin. Par ailleurs, la possibilité d'une translocation de polynucléotides simple brin au travers des pores de cette taille à été démontré pour le canal ionique de l' α -hémolysine de *Staphylococcus aureus* (KASIANOWICZ et coll. 1996) et analysé théoriquement par LUBENSKY et NELSON 1999. De plus, les travaux de BLANC et coll. (2000a), réalisées en microscopie électronique, ont montré que deux types de complexe AMA/ODN coexistent. Il s'agit soit d'un complexe simple ou une molécule d'ODN est entourée d'AMA auto-associées ou bien de l'association de plusieurs complexes simples.

Ce mécanisme d'action du complexe AMA/ODN et par conséquent de son internalisation dans les levures de *Candida albicans* est en parfait accord avec celui proposé par CHAUMONT-GARCIA 1999. Ces auteurs ont émis deux hypothèses pour expliquer le mécanisme d'action cellulaire du complexe AMA/ODN (figure n°29, schémas A, B et C). La première est que l'oligonucléotide, suite à la perturbation membranaire exercée par l'AMA, rentre directement au travers de la membrane

Chapitre 3 : Résultats et discussion

plasmique. La deuxième possibilité est un passage de l'oligonucléotide au travers des pores transmembranaires formés par l'AMA. D'autres auteurs, en utilisant d'autres vecteurs, tels que les peptides KALA ou MPG, ont suggéré la possibilité de passage des acides nucléiques directement au travers de la membrane plasmique de fibroblastes humains. Cependant, s'ils apportent des preuves permettant d'exclure la voie de l'endocytose, le passage direct n'est jamais démontré [(MORRIS et coll. 1997), (WYMAN et coll. 1997)]. En ce qui concerne, le passage direct dans les cellules de l'ODN complexé à l'AMA, le schéma A de la figure n°29, montre la formation de pores transmembranaires par l'AMA selon le mécanisme décrit pour l'amphotéricine B. Les molécules d'AMA sous forme d'oligomères solubles, s'insèrent dans la bicouche lipidique, puis diffusent latéralement et forment les pores transmembranaires.

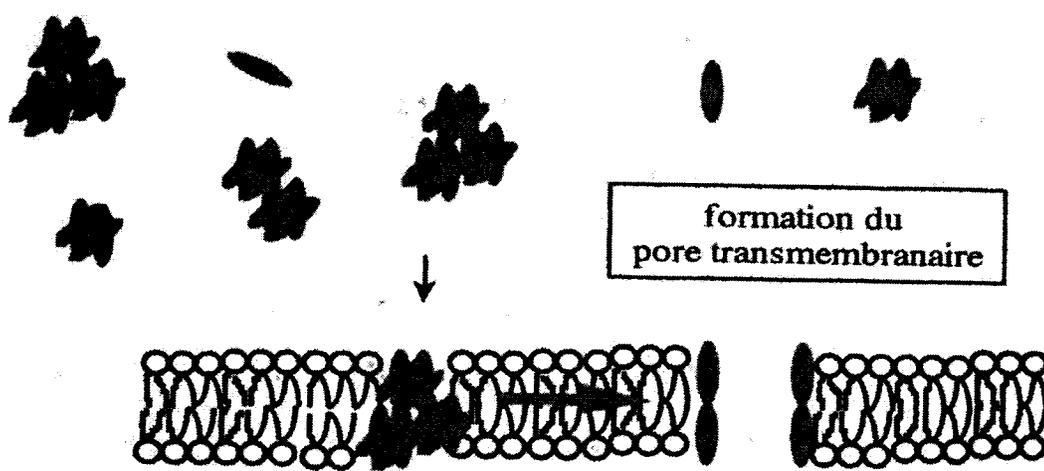


Schéma A: Formation du pore transmembranaire par l'AMA seule.

Le schéma B de la même figure, montre que l'AMA (auto-associée libre ou engagée dans le complexe AMA/ODN) forme des pores transmembranaires selon le schéma A. Ces pores constituent la voie de passage de l'oligonucléotide dans la cellule. La taille des pores étant de 8 Å par contre la taille des complexes estimée par microscopie électronique est de 650 nm (BLANC et coll. 2000a). Cette voie ne permettrait donc que le passage de l'ODN. L'AMA engagée initialement dans le complexe serait alors soit retenu à la surface externe de la membrane soit au sein même de la membrane.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Le schéma C quand à lui propose que suite à l'interaction de l'AMA (auto-associée libre ou engagée dans le complexe) avec la membrane cytoplasmique, cette dernière est déstabilisée. Le complexe AMA/ODN passe alors directement au travers de la membrane déstabilisée. L'ODN est ensuite relâché dans le cytosol. Il s'y trouve soit encore complexé à l'AMA soit libre.

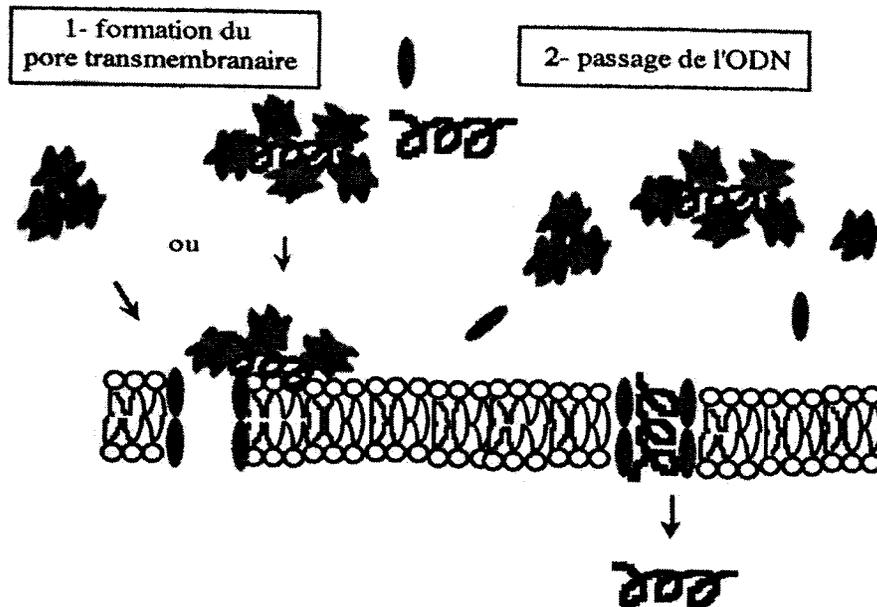


Schéma B: Passage de l'ODN par les pores transmembranaires formés par l'AMA.

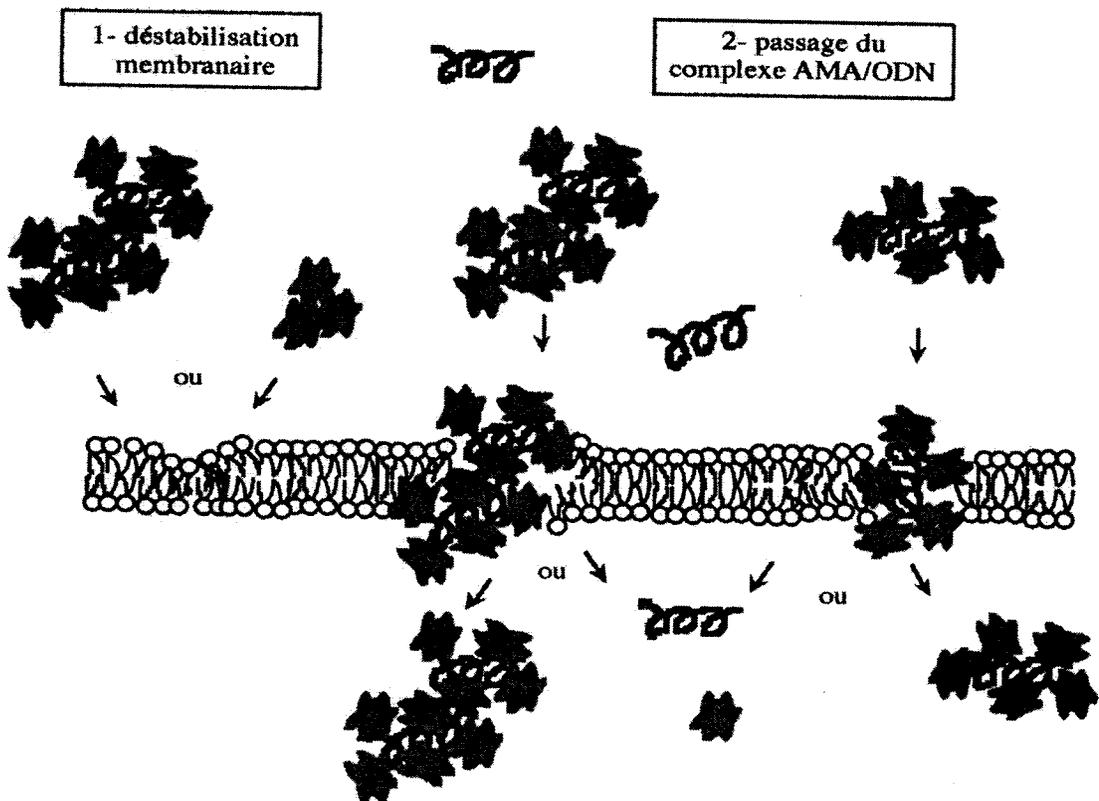


Schéma C: Passage direct de l'ODN au travers de la membrane plasmique.

Figure n°29 : Internalisation du complexe AMA/ODN au travers d'une membrane plasmique



7- DORMANCE DES LEVURES SOUS L'EFFET DU COMPLEXE AMA/ODN :

La dormance des cellules sous l'effet du complexe AMA/ODN à été étudiée par cytométrie en flux. Nous avons mesuré la FSC qui nous renseigne sur la taille des cellules au cours de leur croissance.

La croissance est menée su milieu YM additionnée de MgCl₂ à une concentration finale de 10mM. La concentration cellulaire de départ étant fixée à 2.10⁶ cellules/ml.

L'oligonucléotide provenant d'une solution mère de 10⁻³M est utilisé à une concentration finale de 1µM. L'AMA est utilisé à une concentration finale de 5µM (la concentration de la solution mère est de 10⁻⁴M).

L'AMA et l'ODN sont préincubés pendant 30 minutes à 30 °C, ensuite nous avons ajouté le milieu de culture contenant la suspension levurienne.

La croissance est menée à 30°C sous agitation continue. Depuis le temps zéro de la croissance qui correspond à l'addition de la suspension de levures, des mesures de la FSC en cytométrie en flux ont été effectuées à des intervalles de temps réguliers jusqu'à 48 heures de croissance.

A partir des histogrammes de distribution de la FSC, nous avons calculé la variation de la médiane en l'absence et en présence du complexe AMA/ODN en fonction du temps. Les résultats obtenus avec l'AMA seul à la concentration finale de 5µM, sont identiques à ceux retrouvés avec l'amphotéricine B à la concentration finale de 0,4µM. Il faut noter qu'à cette concentration en AMA, nous tirons profit uniquement des propriétés perméabilisantes de cette drogue. Cette courbe n'est pas représentée, car nous nous sommes intéressés au phénomène de dormance des cellules de *Candida albicans* ATCC10231 en présence du complexe AMA/ODN.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure n°30.

Il ressort de cette figure que :

- Les cellules incubées en présence de l'oligonucléotide seul, se comportent de la même manière que les cellules témoins (cellules incubées sans aucune addition).
- En l'absence du complexe AMA/ODN (courbe témoin) au temps zéro de la croissance, nous observons un pic 170 UA (unités arbitraires).
Après 2 heures de croissance ce pic disparaît et un nouveau pic apparaît à 300 UA. Ce dernier, se situe à 469 UA après 4 heures de croissance.
Nous constatons ensuite un retour progressif de la FSC vers le profil initial qui est atteint au bout de 7 heures de croissance. Ce profil reste inchangé jusqu'à 30 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue.
- En présence du complexe AMA/ODN, nous constatons que dans un premier temps, une régression du pic initial vers une valeur d'environ 69 UA. A partir de la 22^{ème} heure de la croissance, un nouveau pic apparaît et atteint une valeur maximale de 430 UA à la 24^{ème} heure de la croissance.
- Ces résultats mettent en évidence l'existence du phénomène de « dormance » des cellules de *Candida albicans* en présence du complexe AMA/ODN. Il est important de signaler que les cellules qui ont repris leur croissance sont encore fluorescentes.

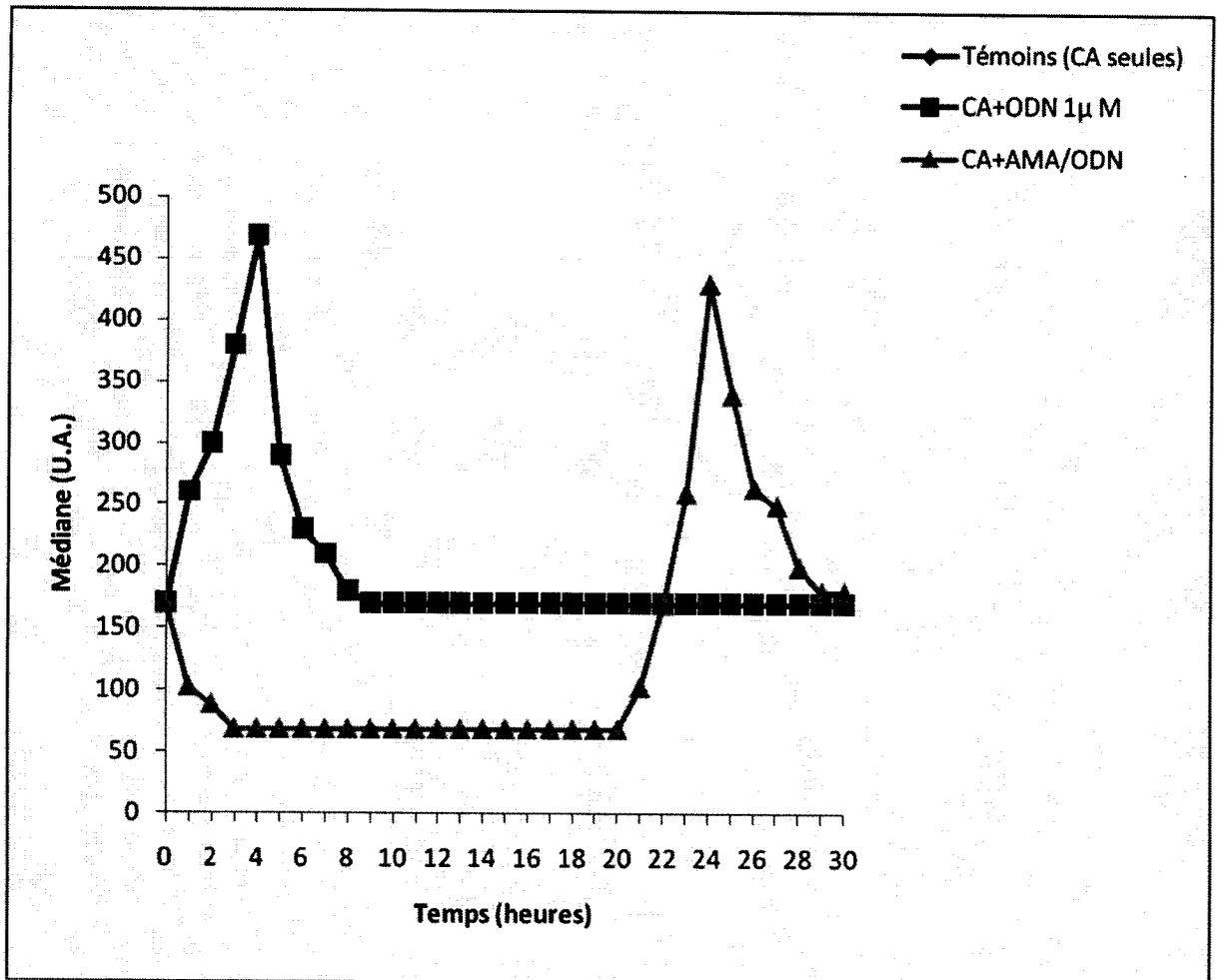


Figure n°30: Variation de la médiane des profils de distribution de la FSC en l'absence et en présence du complexe AMA/ODN. Le rapport des charges +/- est égale à 0,5 (Concentration finale en AMA est de 5µM, celle de l'ODN est de 1µM) en fonction du temps. La concentration cellulaire de départ est de $2 \cdot 10^6$ cellules/ml. Les cultures sont menées sur YM+MgCl₂ (10mM) à 30°C sous agitation continue.

7-1- Conclusion :

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que dans le but de la recherche de nouvelles stratégies qui ont pour objectif l'amélioration de l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, l'antifongique de première ligne dans le traitement des mycoses systémiques ou généralisées, la thérapie antisens antifongique que nous proposons semble être une approche novatrice. Les résultats que nous avons obtenus ainsi que les résultats des autres auteurs [(CHAUMONT –GARCIA et coll. 2000 a et b), (BLANC et coll. 2000 a et b), (SEKSEK and BOLARD 2004), (SEKSEK et coll et 2003)], permettent de présenter l'AMA comme un nouveau vecteur d'acides nucléiques. En effet, elle présente un certain nombre d'avantages : i) c'est une molécule unique, ii) elle se formule spontanément et simplement avec les acides nucléiques, iii) elle porte une fonction amide chimiquement stable, iv) c'est un dérivé d'une molécule très utilisée en milieu clinique, l'amphotéricine B, v) elle permet aux oligonucléotides d'être internalisés dans les cellules cibles par une voie autre que l'endocytose, qui est souvent limitante pour l'efficacité des acides nucléiques.

L'intérêt de l'AMA dans cette nouvelle stratégie tient, à notre avis, à sa très grande affinité pour les membranes qui renferment de l'ergostérol.

**CONCLUSION
GENERALE**

Chapitre 4 : Conclusion générale

Ce travail se situe dans la suite de ceux réalisés au laboratoire « antibiotiques antifongique : physico-chimie, synthèse et activité biologique » [(BOUCHERIT Z. 1995) ; (BEDRANE A. 1997) ; (BELKHERROUBI L. 2001) ; (SOULIMANE N. 2001)] et consiste d'une part à approfondir nos connaissances du mode d'action des antifongiques polyéniques et particulièrement leur chef de file l'amphotéricine B qui malgré sa forte toxicité reste le traitement de première ligne des mycoses profondes ou généralisées. D'autre part, nous avons proposé une nouvelle stratégie pour palier au problème de résistance posé par certains pathogènes à l'antifongothérapie d'une manière générale, il s'agit de la thérapie antifongique antisens.

La cytométrie en flux a été un outil de choix dans la mesure des variations que subissent les cellules cultivées en l'absence et en présence d'amphotéricine B. Nous n'avons pris en considérations que la FSC (Forward Scattering) qui nous renseigne sur les changements de la morphologie des levures au cours de la croissance.

Nos travaux concernant le mécanisme d'action nous ont permis de tirer les conclusions suivantes :

En l'absence d'amphotéricine B, pendant les 3 premières heures de la croissance, nous avons observé des changements importants du profil de distribution de la FSC, déterminé par cytométrie en flux. Pendant ce temps, le nombre de cellules reste approximativement constant, bien que l'aspect des cellules et l'absorption à 595 nm aient révélé des changements profonds : augmentation de la taille et bourgeonnement. Après des temps d'incubation plus longs, il s'est produit une régression de la FSC vers l'état initial. Nous avons donc pu montrer que pendant chaque cycle de division cellulaire, la taille des cellules de *Candida albicans* augmente lentement pendant les périodes de bourgeonnement et de débougeonnement de telle sorte que chaque génération soit significativement plus grande que la précédente. En effet, le nombre relatif de cellules fille augmente graduellement et devient prépondérant par rapport au nombre de cellules mères. Pendant que les mesures de la FSC sont effectuées sur un nombre constant de cellules (10.000), le signal de dispersion des cellules mères devient éventuellement négligeable. L'examen microscopique et la dispersion de la lumière mesurée par cytométrie en flux ont indiqué que ces changements sont synchronisés. La formation

Chapitre 4 : Conclusion générale

de bourgeons, observée sous microscope, a débuté après approximativement une heure de croissance en milieu frais suivant une incubation de 15 h dans YM.

Cette synchronisation est compatible avec une ancienne observation des cellules de *Candida albicans* développée dans une phase stationnaire en milieu de Lee et maintenues dans la phase stationnaire au moins 24 heures avant le dégagement dans le milieu frais à 37°C (SOLL et coll. 1981).

Nos observations confirment que les mesures d'absorption de la lumière peuvent être considérées mais avec précaution comme une méthode d'évaluation du nombre des cellules en milieu liquide. Il faut noter que l'augmentation initiale d'absorption semble liée à une croissance de taille des cellules, plutôt qu'à une augmentation du nombre de cellules.

En présence d'amphotéricine B, pendant les premières heures qui suivent le transfert des cellules sur un nouveau milieu de culture, nous avons un rétrécissement des levures qui a été mis en évidence par une diminution de la FSC et par examen microscopique. Ceci est probablement lié à une fuite du potassium intracellulaire des levures (BOLARD 1991). Après environ un jour (21 h en présence de 0,4µM d'amphotéricine B ; 25 heures en présence de 0,6µM d'amphotéricine B), nous avons observé une augmentation transitoire dans le profil de distribution de la FSC sans prolifération de cellules. Cependant, contrairement à ce qui a été observé en absence d'amphotéricine B, une partie du profil initial de distribution de dispersion correspondant aux cellules rétrécies demeure sans changement. Après un délai supplémentaire de 3 à 4 h, la prolifération redémarre comme cela est montré par les observations microscopiques et le profil de distribution de dispersion revient graduellement à un profil similaire à celui que l'on a observé en l'absence d'amphotéricine B.

L'interprétation la plus simple de cet éclat de la dispersion, observé après approximativement un jour d'incubation avec 0,4µM d'amphotéricine B, est qu'un certain pourcentage des cellules de *C.albicans* récupèrent des dommages de cette drogue et prolifèrent, alors que d'autres ne récupèrent pas. En d'autres termes, un nombre non négligeable de cellules s'est échappé de l'action létale de l'amphotéricine B et est devenu « dormant ». Après un jour elles « cassent » cette dormance et sont suffisamment nombreuses pour être détectées au moyen de la

Chapitre 4 : Conclusion générale

dispersion de la lumière éclatée. La dispersion éclatée qui a été observée ne peut pas être le résultat de quelques cellules qui se sont multipliées dès l'incubation initiale et qui ont atteint un niveau détectable : nous avons vu qu'en l'absence d'amphotéricine B, la dispersion et l'absorbance sont pratiquement constantes de 20 à 30 h indépendamment de la concentration d'inoculum (de 2.10^2 à 2.10^7 cellules/mL). D'autre part, l'augmentation de la taille des cellules n'est pas le résultat du gonflement des cellules mortes car elles se détériorent : le bourgeonnement indique clairement leur vitalité ainsi que leur morphologie sphérique et leur aspect blanchâtre et crémeux.

En conséquence, nos résultats indiquent que l'activité de l'amphotéricine B se développe en trois étapes. D'abord, toutes les cellules subissent des perturbations importantes qui ont pour conséquence un rétrécissement marqué. Puis, pendant une longue période qui peut se prolonger plus de 24 h, aucun changement de cet état n'a été mis en évidence. Enfin, un certain nombre de cellules reprennent activité et croissance, et peuvent être supposées avoir été dans un état « dormant ». Nous pouvons assumer que le reste des cellules, qui demeurent rétrécies, peuvent être considérées comme des cellules mortes.

Les résultats que nous avons obtenus ainsi que ceux de LIAO et coll. (2003) peuvent expliquer un certain nombre d'échecs thérapeutiques dans les traitements antifongiques. En effet, la concentration d'amphotéricine B utilisée en antifongothérapie est de $2\mu\text{M}$ mais la concentration diminue rapidement à $0,5\mu\text{M}$ en raison de la liaison de cette drogue aux composants du sérum. Cette concentration tombe exactement dans la gamme où la dormance et le réveil sont observés. En ce qui concerne la lutte contre la résistance des levures et fongis aux traitements habituels, la stratégie antisens que nous avons proposé semble être très originale. Cette originalité viendrait du fait que nous avons vectorisé un oligonucléotide antisens par le biais d'une dérivé cationique de l'amphotéricine B à savoir l'AMA (amphotéricine B-3-(N'N'-diméthylamino) propylamide).

Chapitre 4 : Conclusion générale

C'est une approche novatrice car elle utilise un vecteur qui permet d'internaliser les oligonucléotides dans les cellules cibles par une voie autre que l'endocytose qui constitue une phase limitante dans la thérapie antisens.

La complexation de l'AMA à ODN induit une amélioration significative de son activité antifongique vis à vis des levures de *Candida albicans*. Cette amélioration est estimée à environ 20%.

Les levures de *Candida albicans* qui internalisent le complexe AMA-ODN avec un rapport de charges (+/-) égal à 0,5, sont capables de reprendre leur croissance si le temps d'incubation est prolongé au-delà de 24 heures. Nous pouvons dire que le phénomène de « Dormance » et de « Réveil » ne concerne pas uniquement la molécule mère qui est l'amphotéricine B mais également son dérivé cationique l'AMA.

De plus, nous avons pu mettre en évidence l'influence de l'environnement ionique et essentiellement les ions magnésium sur l'activité biologique de l'amphotéricine B et aussi dans la vectorisation des oligonucléotides antisens par l'AMA.

Les résultats obtenus sont prometteurs car ils nous permettent d'une part d'expliquer les échecs thérapeutiques dans la prise en charge des mycoses systémiques pour améliorer le traitement de ces infections qui constituent un réel problème de santé publique. D'autre part, la vectorisation d'oligonucléotides par un dérivé cationique de l'amphotéricine B constitue une nouvelle approche thérapeutique pour pallier au problème de résistance aux antifongiques qui réduit l'arsenal antifongique utilisé en clinique à quelques molécules seulement.

En fin et pour compléter ce travail, il serait intéressant de :

- Etudier la dormance d'autres levures et fongis sous l'effet de l'amphotéricine B
- Effectuer des études spectroscopiques des interactions des sels avec l'amphotéricine B et l'AMA
- Tester le système de vectorisation AMA-ODN *in vivo*
- Etudier la capacité d'autres dérivés cationiques de l'amphotéricine B dans la thérapie antifongique antisens

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Accoceberry I. and Noel T. (2006) Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* ; 61 N°3: 1-5
- Akhtar S., Kole R. and Juliano R.L. (1991) Stability of antisens DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera. *Life Sci.*; 49: 1793-1801
- Agrawal S. and Tang J.Y. (1992) GEM 91-an antisens oligonucléotide phosphorothioate as a therapeutic agent for AIDS. *Antisens Res. Dev.*; 2: 261-266
- Alahari S.K., Dean N.M., Fisher N.H., Delong R., Manoharan M., Tivel K.L. and Juliano R.L. (1996) inhibition of the expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein of by phosphorothioate and 5' cholesterol-conjugated phosphorothioate antisens oligonucléotides. *Mol. Pharmacol.*; 50: 808-819
- Alvarez-Barrientos A, Arroyo J. and Canton R. (2000) Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*; 13: 167-195
- Anaissie E., Paetznick V., Proffitt R., Adler-Moore J. and Bodey G.P. (1991) Comparison of the *in vitro* antifungal activity of free and liposomal-encapsulated amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* ; 10 : 665-668
- Andrès E., Courouau F., Kurtz JE., Limacher JM. and Quoix E. (1995) Traitement curatif de l'aspergillose pulmonaire invasive. *Rev Pneumol.Clin* 51: 228-31
- Arawal S. (1999) Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of antisens oligonucléotide. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1489: 53-68
- Arikan S. and Rex JH. (2000) New agents for treatment of systemic fungal infections. *Emerg Drugs* , 5:135-60
- Arseny S. Kaprelyants A.S. and Mukamolova G.V. (1994) Estimation of dormant *Micrococcus luteus* cells by penicillin mysis and by resuscitation in cell-free spent culture medium at high dilution. *FEMS Microbiol. Lett*; 115: 347-352
- Astriab-Fisher A., Sergueev D., Fisher M., Shaw B. R. and Juliano R. L. (2002) Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm. Res.*; 19: 744-54
- Atkinson A.J.Jr. and Bennett J.E. (1978) Amphotericin B pharmacokinetics in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 13: 271-6
- Baginski M., Resat H. and Mc Sammon J.A. (1997) Molecular properties of amphotéricine B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Mol. Pharmacol.* (52):560-570
- Baker B.F. and Monia B.P. (1999) Novel mechanisms for antisens-mediated regulation of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*;1489: 3-18
- Bedell G.W., Werth A. and Soll D.R. (1980) The regulation of nuclear migration and division during synchronous bud formation in released stationary phase culture of the yeast *Candida albicans*. *Exp. Cell Res.*; 127: 103-113

Références bibliographiques

Bedrane M.A. (1997) Effet des lipoproteins sériques sur la cytotoxicité des antifongiques polyéniques exemple de l'amphotéricine B chez les cellules de *Saccharomyces cerevisiae*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.

Beezer A.E. and Chowdry (1980) Flow microcolorimetric bioassay of polyene antibiotics: interaction with growing *Saccharomyces cerevisiae*. *Experientia*; 37:828

Belkherroubi L. 2001 Amphotéricine B: Environnement physico-chimique et activité chez *Candida albicans*. Thèse de Magister. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.

Binet A. and Bolard J. (1988) Recovery of hepatocytes from attack by the pore former amphotericin B. *Biochem. J.*; 253: 435-440.

Blanc I., Bueno Da Costa M.H., Bolard J. and Saint-Pierre Chazalet M. (2000a) Oligonucleotide delivery by a cationic derivative of the polyene antibiotic amphotericin B. I: Interaction oligonucléotide/vector as studied by optical spectroscopy and electron microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*; 77828 :1-10

Blanc I. and Saint-Pierre Chazalet M. (2000b) Oligonucleotide delivery by a cationic derivative of the polyene antibiotic amphotericin B. II: Study of the interactions of the oligonucléotide/cationic vector complexes with lipid unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*; 77829:1-13

Blanchet B., Huet E., Astier A. and Hulin A. (2004) Suivi thérapeutique des médicaments antifongiques. *Pharmacocinétique des médicaments anti-infectueux*; 365: 39-47

Blanke T.J., Little J.R., Shirley S.F. and Lynch R.G. (1977) Augmentation of murine responses by amphotéricine B. *Cell. Immunol.*; 33: 180-190

Bloomfield V.A. (1991) Condensation of DNA by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers*; 31: 1471-1481

Bolard J. (1986) How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim Biophys Acta* 864:257-304

Bolard J. (1991) Mechanism of action of an anti-Candida drug: amphotericin B and its derivatives. In R. Prasad ed. *Candida albicans. Cellular and Molecular Biology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.* ; 214-238

Bolard J., Joly V. and Yeni P. (1997) Amphotéricine B : ancien médicament, nouveaux concepts. *Médecine thérapeutique* (3). N°3 :207-213

Boucherit Z. 1995 Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associée aux lipoproteins du serum sanguine chez des cellules de globules rouges humaines. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.

Bourin M., Lievre M. and Allain H. (1993) Cours de pharmacologie. Ed. Ellipses : 327-331

Références bibliographiques

- Brajtburg J., Medoff G., Kobayashi G.S., Elberg S. and Finegold C. (1980a) Permeabilizing and hemolytic action of large and small polyene antibiotics on human erythrocytes. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 18: 586-592
- Brajtburg J., Medoff G., Kobayashi G.S. and Elberg S. (1980b) Influence of extracellular K⁺ or Mg²⁺ on the stages of antifungal effects of amphotericin B and filipin. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 18: 593-597
- Brajtburg J., Elberg S., Medoff J. and Kobayashi G.S. (1981) Increase in colony-forming units of *Candida albicans* after treatment with polyene antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 19: 199-205
- Brajtburg J., Elberg S., Medoff J., Kobayashi G.S., Schlessinger D. and Medoff G. (1984) Stimulatory, permeabilizing, and toxic effects on amphotericin B on L cells *Antimicrob. Agents Chemother.*; 26:892-897
- Brajtburg J., Elberg S., Schwartz D.R., Vertut-Croquin A., Schlessinger D., Kobayashi G.S., and Medoff G. (1985) Involment of oxidative damage in erythrocytes lysis induced by amphotericin B. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 27: 172-176
- Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G.S., and Medoff G. (1990) Inhibition of amphotericin B (Fungizone). Toxicity to cells by egg lecithin-glycocholic acid mixed micelles. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 34: 2415-2416
- Brajtburg J., Elberg S., Travis S. and Kobayashi G.S. (1994) Treatment of murine candidiasis and cryptococcosis with amphotericin B incorporated into egg lecithin bile salt mixed micelles. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 38: 294-299
- Brigui I., Djavanbakht-Samani T., Jolles B., Pigaglio S and Laigle A. (2003) Minimally modified phosphodiester antisens oligodeoxynucleotide directed against the multidrug resistance gene MDR1. *Biochem. Pharmacol.*; 65: 747-754
- Briggs JP, et al. (1991) Direct vasoconstriction as a possible cause for amphotericin B-induced nephrotoxicity in rats. *J Clin Invest.* ; 87: 2097-107
- Bryskier A. (1999) Antibiotiques: agents antibactériens et antifongiques. *Ed. Ellipses*: 1104-1132
- Burgess D.S., Hastings R.W. and Summers K.K. (2000) Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*; 36: 13-18
- Caillot D., C.P., Casasnovas O., Solary E., Zanetta G., Buisson M. Wagner O., Cuisenier B., Bonnin A., Camerlinck P., Portier H. and Guy H. (1993) Clinical evaluation of a new lipid-based delivery system for intravenous administration of amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infec. Dis.* ; 11 : 722-724
- Campbell J.M., Bacon T.A. and Wickstrom E. (1990) Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J. Biochem. Biophys. Methods* ; 20 : 259-267
- Caniaux I., Villard J., Porte M. and Oddoux L. (1984) Les antifongiques utilisés en thérapeutique humaine. *Lyon Pharmaceutique* ; 35 :131-141

Références bibliographiques

- Carbon C., Regnier B., Saimot G., Valide J.L. and Yeni P. (1994) Antifongiques : données générales. *Ed. Médecine Science Flammarion*: 449-461
- Carle S. (2003) Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*; 36 N°1: 25-41
- Carter E., Paul F. and Hunter P. (1993) Cytometric evaluation of antifungal agents. In: D. Loyd, ed. *Flow cytometry in microbiology, London: Springer Verlag.* ; 111-120
- Céfai D., Hadida F., Jung M., Debre P., Vernin J.G and Seman M. (1991) MS-8209, a new amphotericin B derivative that inhibits HIV-1 replication in vitro and restores T-cell activation via the CD3/TcR in HIV-infected CD4⁺ cells. *AIDS*; 5: 1453-1461
- Chaffin W.L. (1980) The relationship between yeast cell size and cell division in *Candida albicans*. *Can. J. Microbiol.*; 30: 192-203
- Chéron M., Cybulska B., Mazerski J., Grzybowska J., Czerwinski A. and Borowski E. (1988) Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. *Biochem. Pharmacol.*; 37: 827-836
- Chittimalla C., Zammuto-Italiano L., Zuber G. and Behr J. P. (2005) Monomolecular DNA nanoparticles for intravenous delivery of genes. *J. Am. Chem. Soc.*; 127: 11436-41.
- Christiansen K.J., Bernard E.M., Gold J.W. and Armstrong D. (1985) Distribution and activity of amphotericin B in humans. *J Infect Dis.*; 152 : 1037-43
- Chryssanthou E., Cars O., Sjölin J. (2002) New automated method for determining postantifungal effect of amphotericin B against *Candida* species: effects of concentration, exposure time, and area under the curve. *Antimicrob Agents Chemother.* ; 46, 4016-4018.
- Clejan S. and Bittman R. (1985) Rates of amphotéricine B and filipin association with sterols: a study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *The journal of biological chemistry*; 260 N°5: 2884-2889
- Clements J.S. Jr. and Peacock J.E Jr. (1990) Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity. *Am. J. Med.*; 88 Suppl: 2-7
- Clemons K.V. and Stevens D.A. (1991) Comparative efficacy of amphotericin B colloidal dispersion and amphotericin B deoxycholate suspension in treatment of murine coccidioidomycosis. *Antimicrob Agents Chemother.*; 35: 1829-1833
- Colette N., Van Der Auwera P., Lopez A.P., Heymans C. and Meunier F. (1989) Tissue concentration and bioactivity of amphotéricine B in cancer patients treated with amphotéricine B desoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother.* ; 33:362-368
- Crooke, S. T. (2002). Progress in antisense technology: the end of the beginning. *Methods Enzymol.*; 313: 3-45
- Cutler J.E. (1991) Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annr. Rev. microbio.*; 45: 187-218

Références bibliographiques

- Dannaoui E. (2004) Intérêt des tests de sensibilité in vitro dans la prise en charge des candidoses et aspergilloses invasives. *In: conférence de consensus commune SFAR, SPILF. Paris: SRLF, Elsevier Ed. ; p. 52-9*
- Datry A., Thellier M., Traoré B., Alfa Cissé O. and Danis M. (2001) Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques: Antifongigramme, point sur les résistances, données pharmacologiques. *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation; 20 N°4:389-393*
- Davey H.M and Kell D.B. (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microb. Rev.;* 60: 641-696
- Davey H.M. and Winson M.K. (2003) Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. *Cur. Issues Mol. Microbiol.;* 5: 9-15
- De Kruijff B. and Demel R.A. (1974) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acoleplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim Biophys Acta;* 339: 57-70
- Denning D.W. (1994) Treatment of invasive aspergillosis. *J. Infect.* 28 Suppl 1: 25-33
- Dove A. (2002) Antisense and sensibility. *Nat. Biotechnol.;* 20: 121
- Dupont P.F. (1995) *Candida albicans*, the opportunist: a cellular and molecular perspective. *J. Am. Pediatr. Med. Assoc.;* 85: 104- 115
- Edwards J.E., Bodey G.P., Bowden R.A., Buchner T., De Pauw B.E. and Filler S.G (1997) International conference for the development of a consensus on the management and prevention of severe candidal infections. *Clin Infect Dis,* 25 : 43-59
- Eggiman P., Garbino J. and Pittet D. (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.;* 3: 685-702
- Elbashir S. M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. and Tuschli T. (2001) Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature;* 411: 494-498.
- Ellepola A.N. and Samaranyake L.P. (1998) The postantifungal effect (PAFE) of antimycotics on oral *C. albicans* isolates and its impact on candidal adhesion. *Oral Dis.;* 4: 260-267
- Eloff J.N.A. (1998) Sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.;* 64: 711-713
- Ernst E.J, Klepser M.E. and Pfaller M.A. (2000) Postantifungal effects of echinocandin, azole and polyene antifungal agents against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.;* 44: 1108-1111

Références bibliographiques

- Fielding R.M., Smith P.C., Wang L.H., Porter J. and Guo L.S.S. (1991) Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats. *Antimicrob Agents Chemother.*; 35: 1208-1213
- Forster D., Washington C. and Davis S.S. (1988) Toxicity of solubilized and colloidal amphotericin B formulations to human erythrocytes. *J. Pharm. Pharmacol.*; 40: 325-328
- Gaboriau F., Cheron M., Leroy L. and Bolard J. (1997a) Physico-chemical properties of heat-induced superaggregates of amphotéricin B. *Biophysical Chemistry*; 66: 1-12
- Gaboriau F., Cheron M., Petit C. and Bolard J. (1997b) Heat-induced superaggregation of amphotéricin B reduces its *in-vitro* toxicity : a new way to improve its therapeutic index. *Biochem. Agents and Chemother.*; 41 N°11: 2345-2351
- Gabrielska J., Gagos M, Gubernator J. and Gruszecki W.I. (2006) Binding of antibiotic amphotericin B to lipid membranes: A ¹HNMR study. *FEBS letters*; 580: 2677-2685
- Gallis HA., Drew RH. and Pickard W. (1990) Amphotericin B: 30 years of clinical experience. *Rev Infect Dis.*; 12: 308-29
- Gallo M., Monserrat J.M. and Irabarren A.M. (2003) Design and applications of modified oligonucléotides. *Braz. J. Med. Biol. Res.*; 36: 143-151
- Garcia M.T., Llorente M.T. and Minguez F. (2000) Influence of temperature and concentration on the postantifungal effect and the effects of sub-MIC concentrations of four antifungal agents on previously treated *Candida* species. *Chemotherapy*; 46: 245-252
- Garcia-Chaumont C. (1999) Etude in vitro de la vectorisation d'acides nucléiques par AMA, un dérivé cationique de l'amphotéricine B. Thèse de Docteur de l'Université Paris XI
- Garcia-Chaumont C. Seksek O. and Grzybowska J. (2000a) Delivery systems for antisense oligonucleotides. *Pharmacol Ther.*; 87: 255-277
- Garcia-Chaumont C. Seksek O. Jolles B. and Bolard J. (2000b) A cationic derivative of amphotericin B as a novel delivery system for antisens oligonucléotides. *Antisens Nucleic Acid Drug Dev.*; 10:177-184
- Giles R.V., Grzybowski J., Spiller D.G. and Tidd D.M. (1997) Enhanced antisense effects resulting from an improved streptolysin-O protocol for oligodeoxynucleotide delivery into human leukemia cells. *Nucleos Nucleot.*; 16: 1155-1163
- Goldway M., Teff D., Schmidt R., Oppenheim A. B. and Koltin Y. (1995) Multidrug resistance in *Candida albicans*: disruption of the *BEN* gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 39:422-426
- Gondal J., Swartz R. and Rahman (1989) Therapeutic evaluation of free liposome-encapsulated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 33: 1544-1548

Références bibliographiques

- Gottfredsson M., Erlendstottir H. and Sigfusson A. (1998) Characteristics and dynamics of bacterial populations during postantibiotic effect determined by flow cytometry. *Antimicrob. Ag.Chemother.* ; 42: 1005-1111
- Grange J.M. and Devey R.W. (1990) *J. R. Soc. Hyg.*; 83: 159-160
- Graybill J.R., Craven P.C., Taylor R.L., Williams D.M. and Magee W.E. (1982) Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. *J. Infect. Dis.*; 145: 748-752
- Green L.J., Marder P. and Mann L.L. (1999) LY303366 exhibits rapid and potent fungicidal activity in flow cytometric assays of yeast viability. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 43: 830-835
- Gruda I., Gauthier E., Elberg S., Bratjburg J. and Medoff G. (1988) Effects of the detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; (154): 954-956
- Gruda I., M.D., Brother M., Kobayashi G.S., Medoff G. and Bratjburg J. (1991) Structure-activity study of inhibition of amphotericin B (Fungizone) binding to sterols, toxicity to cells, and lethality to mice by esters of sucrose. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 35: 24-28
- Guo Luke S.S., F.R.M., Lasic D.D. Hamilton R.L. and Mufson D. (1991) Novel antifungal drug delivery: stable amphotericin B-cholesteryl sulfate discs. *International Journal of Pharmaceutics*; 75: 45-54
- Hachet J. CH. (1989) Toxicologie d'urgence. Ed; Masson
- Hamilton-Miller J.M.T. (1973) The effect of pH and temperature on the stability of nystatine and amphotéricine B. *J. Pharm. Pharmacol.*; 25: 401-407
- Hammond S.M. (1977) Biological activity of polyene antibiotics. *Progress in medical chemistry (14)*. Edd. G. P. BLLIS and G. R. WEST: 106-164
- Harstel S.C., Benz S.K. Ayenew W. and Bolard J. (1994) Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotéricine B and other polyene antibiotics. *Biophys. Acta*; 23: 125-132
- Henry-Toulmé N., Seman M. and Bolard J. (1989) Interaction of amphotericin B and its N-fructosyl derivative with murine thymocytes: a comparative study using fluorescent probes. *Biochimica Biophysica Acta*; 980: 245-252
- Herbrecht R., Koenig H., Waller J., Liu KL. and Gueho E. (1993) *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. *J Mycol. Med.*; 3: 129-36.
- Hidaka K., An. G., Ip. P., Kuwana M. and Siminovitch L. (1985) Amphotercicin B enhances efficiency of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells. *Somatic Cell. Mol. Genet.*; 11: 109-115
- Huet S. Marie J.P., Gualde N and Robert J (1998) Reference method for detection of Pgp mediated multidrug resistance in huèman hematological malignancies: a method validated by the laboratories of French Drug Resistance Network. *Cytometry*; 34: 248-256

Références bibliographiques

- Hung C.T., Lan F.C., Perrier D.G. and Souter A. (1988) A stability study of amphotéricin B in aqueous media using factorial design. *Int. J. Pharm.*; 44: 117-123
- Janoff A.S., Boni L.T., Popescu M.C., Minchey S.R., Cullis P.R., Madden T.D., Tarashi T., Gruner S.M., Shyam-Sunder E., Tate M.W., Mendel-Sohn R. and Bonner D. (1988) Unusual lipid structures selectivity reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*; 85: 6122-6126
- Jarzebsky A., Falkowski L. and Borowski E. (1982) Synthesis and structure-activity relationships of amides of amphotéricine B. *J. Antibiot.*; 35: 220-229
- Joly V., Bolard J., Saint-Julien L., Carbon C. and Yeni P. (1992a) Influence of the phospholipid/amphotericin B ratio and the phospholipid type on the in vitro renal toxicity and fungicidal activity of lipid associated-amphotericin B formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 36: 262-266
- Joly V., Saint-Pierre-Chazalet M., Saint-Julien L., Bolard J., Carbon C. and Yeni P. (1992b) Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and the toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. *J. Infect. Dis.*; 165:337-343
- Joly V., Farinotti R., Saint-Julien L., Cheron M., Carbon C. and Yeni P. (1994) *In vitro* renal toxicity and *in vivo* therapeutic efficacy in experimental murine cryptococcosis of amphotericin B (Fungizone) associated with Intralipid. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 38: 177-183
- Joly V., Aubry P., Ndayiragide A., Carriere I., Kawa E. and Mlika-Cabanne N. (1996) Randomized comparison of amphotericin B deoxycholate dissolved in dextrose or Intralipid for the treatment of AIDS-associated cryptococcal meningitis. *Clin Infect Dis.*; 23: 556-62
- Johnston G.C., Ehrhardt C.W. and Lorincz A. (1979) Regulation of cell size in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*; 137: 1-5
- Juliano R.L., Grant C.W.M., Barber K.R. and Kalp N.A. (1987) Mechanism of the selective toxicity of amphotericin B incorporated into liposomes. *Mol. Pharmacol.*; 31: 1-11
- Juliano R.L. and Ling V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica Biophysica Acta*; 455: 152-162
- Jullien S., Contrepolis A., Sligh J.E., Domart Y., Yeni P., Brajtburg J., Medoff G. and Bolard J. (1989) Study of the effect of liposomal amphotericin B on *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and erythrocytes by using small unilamellar vesicles prepared from saturated phospholipids. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 33: 345-349
- Jullien S., Brajtburg J., and Bolard J. (1990) Affinity of amphotericin B for phosphatidylcholine vesicles as determinant of the in vitro cellular toxicity of liposomal preparations. *Biochimica Biophysica Acta*; 1201: 39-45
- Kaprelyants A.S. and Kell D.B. (1993) Dormancy in stationary-phase culture of *Micrococcus luteus*: flow cytometric analysis of starvation and resuscitation. *Appl. Env. Microbiol.*; 59: 3187- 3196

Références bibliographiques

- Kasianowicz J.J., Brandin E., Branton D. and Deamer D.W. (1996) Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 26: 13770-13773
- Kasumov K. and Bolard J. (2004) Transient permeability induced by cationic derivatives of amphotericin B in lipid membranes. *Polish J Chem.*; 78: 1057-1065
- Kettani A., Belkhadir Z.H., Mosadik A., Faroudy M., Ababou A., Lazreq C. and Sbihi A. (2005) Antifungal treatment of systemic candidosis in intensive care unit. *Journal de Mycologie Médicale*; 16:16-25
- Khoo S.H., Bond J. and Denning D.W. (1994) Administering amphotéricine B: a practical approach. *J Antimicrob Chemother.*; 33: 203-13
- Kirk S.M, Callister S.M. and Lim L.C. (1997) Rapid susceptibility testing of *Candida albicans* by flow cytometry. *J Clin Microbiol.*; 35: 358-363
- Kirsh R., Goldstein R., Tarloff J., Parris D., Hook J., Hanna N., Bugelski P. and Poste P. (1988) An emulsion formulation of amphotericin B improves the therapeutic index when treating systemic murine candidiasis. *J. Infect. Dis.*; 158: 1065-1070
- Kito M., Akutsu H., Sugeta H., Kyogoku Y., Sohn D.H. and Sulyu B. (1987) Association of polyene antibiotics with sterols. *Chem. Biol. Interactions* 64:61-70
- Klepser M.E., Wolfe E.J. and Jones R.N. (1997) Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. *Antimicrob. Ag. Chemother* ; 41:1392-1395
- Koppelhus U. and Nielsen P. E. (2003) Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA). *Adv. Drug Deliv. Rev.*; 55: 267
- Krishan A., Fitz C.M. and Andritsch I. (1997) Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry*; 29: 279-285
- Kullberg B.J. and Oude Lashof A.M. (2002) Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *Eur J Med Res.*, 7:183-91
- Kumar B., Medoff G., Kobayashi G. and Schessinger D (1974) Uptake of *Escherichia coli* DNA into Hela cells enhanced by amphotericin B. *Nature*;250: 323-325
- Kurreck J. (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications, *Eur. J. Biochem.*, 270 N°8: 1628-1644
- La Fleur M.D., Kumamoto C.A. and Lewis K. (2006) *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. *Antimicrob Ag Chemother*, 50: 3839-3946.
- Lamb K.A., W.C., Davis S.S. and Denyer S.P. (1991) Toxicity of amphotericin B emulsion to cultured canine kidney cell monolayers. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*; 43: 522-524
- Lasic D. (1992) Mixed micelles in drugdelivery. *Nature* 355: 279-280
- Legrand P., Romero E., Cohen B. and Bolard J. (1992) Effects of aggregation and solvent on the activity of amphotericin B on human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother.*; 36:25 18-22

Références bibliographiques

- Lemaitre M., Bayard B. and Lebleu B. (1987) Specific antiviral activity of a poly(L-lysine)-conjugated oligodeoxyribonucleotide sequence complementary to vesicular stomatitis virus N protein mRNA initiation site. *Proc. Nat. Acad Sci. U S A*; 84: 648-652
- Levin B.R. and Rozen D.E. (2006) Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Rev Microbiol*; 4: 556-562
- Lewis K. (2007) Persister cell, dormancy and infectious disease. *Nature Rev Microbiol*; 5: 48-56
- Lianos A., Cieza J., Bernardo J., Echevarria J., Biaggioni I. and Sabra R. (1991) Effect of salt supplementation on amphotericin B nephrotoxicity. *Kidney Int.*; 40: 302-8
- Liao R.S., Rennie R.P. and Talbot J.A. (1999) Assessment of the effect of amphotericin B on the vitality of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* ; 43: 1034-1041
- Liao R.S., Rennie R.P. and Talbot J.A. (2003) Sublethal injury and resuscitation of *Candida albicans* after amphotericin B treatment. *Antimicrob. Ag. Chemother* ; 47: 1200-1206
- Liebhaber, S. A., Cash, F. E. and Shakin, S. H. (1984). Translationally associated helix-destabilizing activity in rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.*; 259 N°15: 597-602
- Liras P. and Lampen J.O. (1974) Protection by K^+ and Mg^{2+} of growth and macromolecular synthesis in candididin treated yeasts. *Biochimica Biophysica Acta*; 374:159-163
- Lopez-Berestein G., Mehta R., Hopfer R.L., Mills L., Kasi L., Mehta K., Fainstein V. Hersh E.M. and Juliano R. (1983) Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. *J. Infect. Dis.*; 147: 939-945
- Lorian V. and Burns L. (1990) Predictive value of susceptibility tests for the outcome of antibacterial therapy. *J Antimicrob Chemother.*; 25:175-81
- Lubensky D.K. and Nelson D.R. (1999) Driven polymer translocation through a narrow pore. *Biophys. J.*; 77: 1824-1838
- Manavathu E.K., Ramesh M.S. and Baskaran I. (2004) A comparative study of the post antifungal effect (PAFE) of amphotericin B, triazoles and echinocandins on *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.*; 53: 386-389
- Marchetti O., Bille J., Fluckiger U., Eggiman P., Ruef C. and Garbino J. (2004) Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis* ; 38:311-20
- Martin E, Schlasius U, Bhakdi S. (1992) Flow cytometric assay for estimating fungicidal activity of amphotericin B in human serum. *Med. Microbiol. Immunol.*; 18: 117-126.

Références bibliographiques

- Mayer J., Doubek M. and Vorlicek J. (1999) Must we really fear toxicity of conventional amphotericin B in oncological patients? *Support Care Cancer* 7: 85-9
- Mazarski J., Bolard J. and Borowski E. (1982) Self association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media. *Biochimica Biophysica Acta*; 719: 11-17
- Medoff G., Valeriote F. and Diekman J. (1981) Potentiation of anticancers agents by amphotéricine B. *J. Nat. Canc. Inst.*; 67: 131-135
- Medoff G., Brajtburg J. and Bolard J. (1983) Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 23:303-330
- Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mills K. and Juliano R.L. (1984) liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochimica Biophysica Acta*; 770: 230-234
- Mehta R., Hsu M.J., Juliano R., Jurgen Krause H. and Regen S.L. (1986) Polymerized phospholipid vesicles containing amphotericin B: evaluation of toxic and antifungal activities in vitro. *J. Pharm. Sci.*; 75: 579-581
- Meunier F. (1989) New methods for delivery of antifungal agents. *Rev. Infect. Dis.*; 11 (suppl. 7): 1605-1612
- Meunier F., Lambert C. and Van der Auwera P. (1990) *In-vitro* activity of SCH 39304 in comparison with amphotericin B and fluconazole. *J Antimicrob Chemother.*; 25: 227-36
- Middaugh C. R., Evans R. K., Montgomery D. L. and Casimiro D. R. (1998) Analysis of plasmid DNA from a pharmaceutical perspective, *J. Pharm. Sci.*; 87 N° 2: 130-146
- Midez J., Hpferr R.L., Lopez-Berestein G. and Mehta R. (1989) Effect of free and liposomal amphotericin B and gramicidin S alone and in combination on potassium leakage from human erythrocytes and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.*; 33; 152-155
- Millié P., Bergès J., Caillet J. and Demaret J.P. (1999) Self-association of amphotericin B in water. Theoretical energy and spectroscopy studies. *J. Phys. Chem.*; 103: 10883-10891
- Morris M.C., Vidal P., Heitz F. and Divita G. (1997) A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucl. Acid. Res.*; 25: 2730-2736
- Morrison VA. and McGlave BP. (1993) Mucormycosis in the BMT population. *Bone Marrow Transplant*; 11: 383-8.
- Mufson D., Guo L.S.S. and Fielding R.M. (1990) Amphotericin B-cholesteryl sulfate complex (ABCD): stability and tissue distribution of a novel dosage form. *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*; 17: 81-82
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Document M27-A. NCCLS, Wayne, PA, USA, 1997*

Références bibliographiques

- New R.R.C., Chance M.L. and Heath S. (1981) Antileishmanial activity of amphotericin B and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J Antimicrob Chemother.*; 8: 371-381
- Niidome T. and Huang L. (2002) Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene ther.*; 9: 1647-1652
- Norman A.W., Demel R.A., De Kruijff B., Geurts Van Kessel W.S. and Van Deenen L.L. (1972) Studies on the biological properties of polyene antibiotics: comparison of other polyene with filipin in their ability to interact specifically with sterol. *Biochim. Biophys. Acta*; 290: 1-14
- Odds F.C. (1988) *Candida and Candidosis : A Review und Bibliography. 2e édition, Baillière Tindall, London*
- Odds F.C. (1996) Epidemiological shifts in opportunistic and nosocomial Candida infection: mycological aspects. *Int. J. Antimicrob. Agents*; 6: 141-144
- O'Gorman M.R. and Hopfer R.L. (1991) Amphotericin B susceptibility testing of Candida species by flow cytometry. *Cytometry*; 12: 743-747
- Ostrosky-Zeichner L., Rex J.H., Pappas P.G., Hamill R.J., Larsen R.A. and Horowitz HW. (2003) Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* ;47:3149-3154
- Paterson B.M., Roberts B.E. and Kuff E.L. (1977) Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 74: 4370-4374
- Patterson T.F., Miniter P., Dijkstra, Szoka F., Ryan J. and Andriole V.T. (1989) Treatment of experimental invasive aspergillosis with novel amphotericin B/cholesterol-sulfate complexes. *J. Infect. Dis.*; 159:717-719
- Payne N., Cosgrove R.F., Green A. and Liu L. (1987) *In vivo* studies of amphotericin B liposomes derived from proliposomes: effects of formulation on toxicity and tissue disposition of the drug in mice. *J. Pharmacol.*; 39: 24-28
- Petit C., Cheron M., Joly V., Rodrigues J.M., Bolard J. and Gaboriau F. (1998) *In-vivo* therapeutic efficacy in experimental murine mycosis of a new formulation of deoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating. *Journal of antimicrobial chemotherapy*; 42: 779-785
- Pfaller M. and Wenzel R. (1992) Impact of the changing epidemiology of fungal infection since the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11:287-91.
- Pfaller M.A. and Diekema D.J. (2004) International fungal surveillance participant group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* ; 10(Suppl.1):11-23.
- Pfaller M.A. (2005) Antifungal susceptibility testing methods. *Curr Drug Targets* 6: 929-943

Références bibliographiques

- Phillips M.I. and Zhang Y.C. (2000) Basic principles of using antisense oligonucleotides *in vivo*. *Methods Enzymol.*; 313: 46-56
- Pina-Vaz C., Sansonnety F. and Rodriguez A.G. (2001) Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clin. Microbiol. Infect.*; 7: 609-618
- Plempel M., Berg D., Büchel K.H. and Abbink D. (1987) Test methods for antifungal agents – a critical review. *Mykosen*; 30:28-37
- Porro D. and Srienc F. (1995) Tracking of individual cell cohorts in asynchronous *Saccharomyces cerevisiae* populations. *Biotechnol.*; 11: 342-347
- Presant C.A., Metter G., Multhauf P., Bertrand M., Chang F.F., Klein L., Rappaport D., Kenoregan B. and Mackie A. (1984) Effects of amphotericin B with combination chemotherapy on response rates and on survival in non-small cell carcinoma of the lung. *Cancer Treat. Rep.*; 68: 651-654
- Presant C.A., Multhauf P. and Metter G. (1987) Reversal of cancer chemotherapeutic resistance by amphotericin B- A broad phase I-II pilot study. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*; 23: 683-687
- Rajagopalan N., C.S.C. and Chow W.S. (1986) A study of the inclusion complex of amphotericin B with gamma-cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*; 29:161-168
- Ramani R., Ramani A. and Wong S.J. (1997) Rapid flow cytometric susceptibility testing of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*; 35: 2320-2324
- Rao T.V.G., Trivedi A. and Prasad R. (1985) Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. *Can. J. Microbiol.*; 31:322-326
- Ravichandran L. V., Dean N. M. and Marcusson E. G. (2004) Use of antisense oligonucleotides in functional genomics and target validation. *Oligonucleotides*; 14: 49
- Redding S.W., Pfaller M.A. and Messer S.A. (1997) Variations in fluconazole susceptibility and DNA subtyping of multiple *C. albicans* colonies from patients with AIDS and oral candidiasis suffering from one or more episodes of infection. *J Clin Microbiol.*; 35:1761-1765
- Rex J.H., Bennett J.E., Sugar A.M., Pappas P.G., Van der Horst C.M. and Edwards J.E. (1994) A randomized trial comparing fluconazole with amphotericin B for the treatment of candidemia in patient without neutropenia. *N Engl J Med* 331: 1325-30
- Rex J.H., Pfaller M.A., Galgiani J.N., Bartlett M.S., Espinel-Ingroff A. and Ghannoum M.A. (1997) Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. Development of interpretative breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infection. *Clin Infect Dis.*; 24:235-47

Références bibliographiques

- Rex J.H., Pfaller M.A. and Walsh T.J. (2001) Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* ; 14: 643-658
- Rex J.H. and Pfaller M.A. (2002) Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis.*; 35:982-9
- Richet H., Roux P., Des Champs C., Esnault Y. and Andremont A. (2002) French Candidemia Study Group. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. *Clin Microbiol. Infect.*; 8:405-412
- Rinaldi M.G. (1992) Laboratory evaluation of antifungal agents: a brief overview. *Clin. Infect. Dis.*; 14: 130-133
- Rinnert H., T.G., Dupond G. and Lematre J. (1977) Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of a polyene antibiotic: amphotericin B. *Biopolymers*; 16:2419-2427
- Ryther R. C., Flynt A. S., Phillips III J. A. and Patton J. G. (2005) siRNA therapeutics : big potential from small RNAs. *Gene Ther.*; 12, 5-11
- Safe L.M., Safe S.H., Subden R.E. and Morris (1977) Sterol content and polyen antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei* and *Candida tropicalis*. *Can. J. Microbiol.*; 23 : 398-401
- Sanglard D. Kuchler K. and Ischer F. (1995) Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother.*; 39 : 2378-86
- Sanglard D. and Odds F.C. (2002) Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.*; 2: 73-85
- Scalarone G.M., Mikami Y. and Kurita N. (1991) Turbidometric characterization of the postantifungal effect: comparative studies with amphotericin B, 5-fluorocytosine and miconazole on *Candida albicans*. *Mycoses*; 34: 297-302
- Schaffner C.P. and Melchinki W. (1972) Polyene macrolide derivatives I. N-acylation and esterification reactions with amphotéricine B. *J. Antibiot.*; 25: 256-260
- Schaffner C.P. (1984) Polyene macrolides in clinical practice: pharmacology and adverse and other effects; in *Macrolide antibiotics, chemistry, biology and practice*. Edited by Academic Press Inc. 457-507
- Schaffner C.P. (1987) Amphotericin B derivatives. *In recent trends in the discovery development and evaluation of antifungal agents*. Edited by Fromtling, R.A. 595-918
- Shepherd M.G., Poulter R.T.M. and Sullivan P.A. (1985) *Candida albicans*: biology, genetics and pathogenecity. *Ann. Rev. Microbiol.* 39; 579-614
- Scholer H.J. and Polak A. (1984) Resistance to systemic antifungal agents. Antimicrobial Drug Resistance. *Academic Press Inc.*; 23: 398-401

Références bibliographiques

- Seoane R., Minones J., Conde O., Casas and Iribarnergaray E. (1998) Molecular organisation of amphotericin B at the air-water interface in the presence of sterols: a monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta* 1375:73-83
- Seksek O. Garcia C., Pouëssel A., Crzybowska A., Borowski E and Bolard J. (1999) A cationic derivative of amphotericin B for the delivery of oligonucléotides into fungal cells. *Trends in invasive fungal infections 5. Malte 14-16 October, communication*
- Seksek O. and Bolard J. (2004) Delivery agents for oligonucléotides. *Methods mol. Biol.*; 252: 545-568
- Shu M., Ellepola A.N.B. and Samaranayake L.P. (2001) Effects of two different growth media on the postantifungal effect induced by polyenes on *Candida* species. *J Clin Microbiol.*; 39: 2732-2735
- Sokol-Anderson M.L., Brajtburg J. and Medoff G. (1986) Amphotericin B induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J. Infect. Dis.*; 154:76-83
- Soll D.R., Bedell G. and Thiel J. (1981) The dependency of nuclear division on volume in the dimorphic yeast *Candida albicans*. *Exp. Cell Res.*; 133: 55-62
- Somia N. and Verma M. (2000) Gene therapy: trials and tribulations, *Nature Rev. Genetics*; 1: 91-99.
- Soulimane N. (2001) Etude in vivo de quelques nouvelles formulations de l'amphotéricine B chez les souris Wistar. Thèse de Magister. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.
- Strauss G. and Kral F. (1982) Borate complexes of amphotericin B: polymeric species and aggregates in aqueous solutions. *Biopolymers*; 21: 459-470
- Sugar A. (1990) Empiric treatment of fungal infections in the neutropenic host. *Arch. Intern. Med.*; 150: 2258-2264
- Szoka F.C., Milholland D. and Barza M. (1987) Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and in vitro fungicidal activity of liposome-intercalated amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.*; 31: 421-429
- Tabosa Do Egito E.S., Fessi H., Appel M., Puisieux F., Bolard J. and Devissaguet J.P. (1994) New techniques for preparing submicronic emulsions: application to amphotericin B. *S.T.P. Pharma Sciences*; 4: 155-162
- Tasset C., P.V. and Roland M. (1992) comparison of nephrotoxicities of different polyoxyethyleneglycol formulations of amphotericin B in rats. *Antimicrob. Agents and Chemother.*; 36: 1525-1531
- Thomas K.C., Dawson P.S. and Gamborg B.L. (1980) Differential growth rate of *Candida utilis* mother and daughter cells under phase cultivation. *J. Bacteriol.*; 141: 1-9
- Thomas A. E., Ehrhardt A. and Kay M. A. (2003) Progress and Problems with the Use of Viral Vectors for Gene Therapy. *Nature Rev. Genetics*; 4 : 346-358

Références bibliographiques

- Tortorano A.M., Peman J., Bernhardt H., Klingspor L., Kibbler C.C. and Faure O. (2004) Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month european confederation of medical mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*; 23:317-22
- Turnidge J.D., Gudmundsson S. and Vogelmann B. (1994) The postantibiotic effect of antifungal agents against common pathogenic yeasts. *J Antimicrob Chemother.*; 34: 83-92
- Valeriote F., Medoff G. and Dieckman J. (1979) Potentiation of anticancer agents cytotoxicity against sensitive and resistant AKR leukemia by amphotericin B. *Cancer Res.*; 39: 2041-2045
- Vanden Bossche H., Marichal P. and Odds F.C. (1994) Molecular mechanisms of drug resistance in fungi. *Trends Microbiol.*; 2: 393-400
- Van der Horst C.M., Saag M.S., Cloud S.A., Hamill R.J., Graybill J.R. and Sobel J.D. (1997) Treatment of cryptococcal meningitis associated with the acquired immunodeficiency syndrome. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group and AIDS Clinical Trials Group. *N. Engl. J. Med.*; 337: 15-21
- Vertut-Doi A., Ohnishi S.I. and Bolard J. (1994) The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.*; 38 N°10 : 2373-2379
- Vikmon M., S.S.A. and Szejtli J. (1985) Solubilisation of amphotericin B with gamma-cyclodextrin. *The journal of Antibiotics*; 38: 1822-1824
- Walder, R. Y. and Walder, J. A. (1998). Role of RNase H in Hybrid-Arrested translation by Antisense Oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 85: 5011
- Wasan K.M., Rosenblum M.G. Cheung L. and Lopez-Berestein G. (1994) influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.*; 38: 223-227
- Washington C., Taylor S.J. and Davis S.S. (1988) The structure of colloidal formulation of amphotericin B. *Intern. J. Pharm.*; 46: 25-30
- Wilson R.W. and Bloomfield V.A. (1979) Counterion-induced condensation of deoxyribonucleic acid. A light-scattering study. *Biochemistry-USA*; 18: 2192-2196
- Witzerbin J., Szponarski W. and Gary-Bobo C.M. (1990) Kinetic study of Interaction between [¹⁴C] Amphotericin B derivatives and human erythrocytes: relationship between binding and induced K⁺ leak. *Biochim. Biophys. Acta*; 1026: 93-98
- White T.C. Marr K.A. and Bowden R. (1998) Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*; 11: 382-402
- Woldringh C.L., Huls P.G. and Vischer N.O. (1993) Volume growth of daughter and parent cells during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae* a/_ as determined by image cytometry. *J. Bacteriol.*; 175: 3174-3181

Références bibliographiques

Wong-Beringer A., Jacobs R.A. and Guglielmo B.J. (1998) Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities. *Clin Infect Dis.*; 27: 603-18

Wyman T.B., Nicol F., Zelphati O., Scaria P.V., Plank C. and Szoka F.C. (1997) Design, synthesis, and characterization of cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers. *Biochemistry-USA*; 36: 3008-3017

Yohai R.A., Bullock J.D., Aziz A.A. and Markert R.J. (1994) Survival factors in rhino-orbital-cerebral mucormycosis. *Surv Ophthalmol.*; 39: 3-22

Zamenick P.C. and Stephenson M.L. (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 75: 280-284

Zuber G., Zammuto-Italiano L., Dauty, E. and Behr J. P. (2003) Targeted gene delivery to cancer cells: directed assembly of nanometric DNA particles coated with folic acid. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*; 42; 2666-9

ملخص

الهدف من العمل الذي قمنا به هو دراسة ظاهرة الخميرة النائمة تحت تأثير الـ AmB باستعمال الـ *cytométrie en flux* و عرض إستراتيجية جديدة في مجال المضادات الفطرية. نستخلص من هذه الدراسة ان:

استعمال الـ FSC يمكننا من فرز الخلايا الميتة من النائمة لخميرة الـ *Candida albicans* ATCC10231 تحت تأثير الـ AmB. في غياب الـ AmB نلاحظ ارتفاع تدريجي للـ FSC خلال الأربع ساعات الأولى لنمو الخميرة. بعد هذا تنخفض الـ FSC إلى المؤشرات الأولى، و تبدأ الخلايا في التضاعف. في وجود الـ AmB يتوقف تضاعف الخميرة خلال ظرف زمني محدد. لكن بتركيز نهائي الـ AmB والذي يقدر بـ $0,4\mu\text{M}$ نفس التطور التدريجي للـ FSC المحصل عليه في غياب الـ AmB يلاحظ بعد 21 ساعة. هذا يعني أن الخلايا النائمة في الساعات الأولى، استيقظت و بدأت في النمو.

من جهة أخرى تمكنا من إدخال متعدد النوكليوتيدات قصير (ODN) في خميرة *Candida albicans* عن طريق مشق شاردني للـ AmB و هو الـ AMA. النتائج المحل عليها تبين أن الـ ODN يمكننا من استعمال كميات قليلة من الـ AMA يقدر بـ $5\mu\text{M}$ و ان هناك تضاعف فعالية بين الـ AMA و الـ ODN ضد الفطريان و الخمائر. بالإضافة إلى ذلك نفس ظاهرة الخلايا النائمة تلاحظ مع الـ AMA.

RESUME

Notre travail a pour objectif d'étudier, par *cytométrie en flux*, le phénomène de dormance des levures sous l'effet de l'amphotéricine B et de proposer une nouvelle stratégie dans le domaine de l'antifongithérapie. Il ressort de cette étude que : L'utilisation de la diffusion de la lumière axiale (FCS) en *cytométrie en flux*, permet de faire le tri entre les cellules mortes et les cellules dormantes de *Candida albicans* ATCC10231 sous l'effet de l'AmB. En l'absence d'AmB, une augmentation progressive de la FSC est observée pendant les 4 premières heures de la croissance sans prolifération des cellules. Après cette période, le profil de distribution de la FSC régresse vers les valeurs initiales et la multiplication des levures débute. En présence d'AmB, pendant les 4 premières heures de la croissance, les levures rétrécissent et la prolifération est temporairement interrompue. Cependant, en présence de l'AmB à une concentration finale de $0,4\mu\text{M}$, une augmentation progressive de la FSC est observée à partir de la 21^{ème} heure de la croissance. Ce profil est similaire à celui obtenu à la 4^{ème} heure de la croissance des levures sans antifongique. La prolifération des levures reprend après 24 h d'incubation. Cette observation montre que cette croissance est due au « réveil » des cellules « dormantes » sous l'effet de l'Am B (45% en présence de $0,4\mu\text{M}$ d'AmB) et non pas à la multiplication de quelques cellules ayant échappées à la détection. Par ailleurs, dans le cadre de la stratégie antifongique antisens, nous avons pu internaliser un oligonucléotide dans les cellules de *Candida albicans* par le biais d'un dérivé cationique de l'AmB, l'AMA. Les résultats obtenus ont montré que cette nouvelle approche permet d'une part d'utiliser de faibles doses d'AMA ($5\mu\text{M}$), d'autre part, d'avoir un effet antifongique synergique entre l'AMA et l'ODN. Le même phénomène de « dormance » des levures est observé également en présence d'AMA au-delà de 24h de croissance.

Mots clés : *Candida albicans*, dormance, amphotéricine B, antisens, oligonucléotide, vecteur, AMA

SUMMARY

The objective of our work has been, to study the phenomenon of yeast dormancy, by flow *cytométrie*, under the effect of amphotericin B (AmB), and to propose a new strategy in the field of antifungal therapy. This study showed that: Flow cytometry light scattering (FSC) was used to monitor size increase of *Candida albicans* ATCC 10231 in the presence or absence of the antifungal drug AmB. This non-invasive and descriptive method allowed for the differentiation of dead and dormant sub-populations of cells. Without AmB, a progressive increase in light scattering was observed over a period of approximately 4 h, but without proliferation of the yeast. After this period, the FSC regressed to baseline level, whereas cell proliferation started. In the presence of AmB, all the cells shrank in size within approximately 4 h and proliferation was temporarily halted. However, in the presence of $0.4\mu\text{M}$ AmB, a progressive increase of FSC occurred after 21 h which was similar to that observed within the first 4 h in the absence of the antifungal. After approximately 24 h of incubation at this concentration of AmB, proliferation resumed. These observations indicate that this renewed cell proliferation was due to the reawakening of dormant cells in the presence of AmB (45% in the presence of $0.4\mu\text{M}$ AmB) rather than the result of the development of viable cells that had escaped detection. In addition to this, under the antifungal antisense strategy, we were able to internalize an oligonucleotide in the cells of *Candida albicans* through a cationic derivative of the AmB, AMA. The results showed that this new approach allows, on the one hand, to use of very low doses of antifungal, of the order of $5\mu\text{M}$ of AMA. On the other hand, to have a synergic antifungal effect between AMA and the ODN. Furthermore, the same phenomenon of yeast "dormancy" is also observed in the presence of AMA after 24h of growth.