

MASTER 210 - 255 / 03

Republique Algerienne Democratique et Populaire  
Ministere de l'Enseignement Superieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen  
Faculte des Sciences de la Nature et de la Vie,  
des Sciences de la Terre et de l'Univers



Departement de Biologie  
Laboratoire

Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique

(Lapsab)

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master  
en Biologie Cellulaire

Option : Biochimie Appliquée

Inscrit Sous le N°: 6462  
Date le: 2012  
Code:

Thème

**Evaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B  
complexée aux acides gras libres vis-à-vis de  
*Candida albicans***

Présenté par : M<sup>lle</sup> Lahfa Imane

Soutenu le 12 Juillet 2012

Promoteur	M <sup>me</sup> Boucherit- Otmani Z.	MCA	U. Tlemcen
Président	Mr Boucherit K.	Professeur	C. U. Naâma
Examineur	Mr Rahmoun M.N.	MAB	U. Tlemcen

Année universitaire : 2011-2012

# *Dédicaces*

*Je dédie ce travail à mes très chers parents, à la mémoire de ma mère Allah Yerhamha qui m'a toujours encouragée dans mes études et à mon père qui m'a donné un modèle de persévérance.*

*A mon cher frère Chakib*

*A mes grands-mères*

*A la mémoire de mes grands-pères*

*A mes tantes Farida et Nadia et leurs maris*

*A mes tantes Fouzia et Ilhem ainsi qu'aux autres.*

*A mes oncles en particulier à Abdellah*

*A tous mes cousins et cousines, et en particulier à mes sœurs Nadjet et Rima.*

*A ma meilleure amie et sœur Hana qui a toujours été là pour moi.*

*A mes amies les plus proches : Ferial, Amel, Kawther, Nesrine, Farah, Imane, Selma, Nanou, Narimane, Sabiha, Farah, Amel, Leyla, Rachida. Ainsi qu'à tous les autres qui se reconnaîtront...*

*A ma co-encadreur et amie Wafaa qui m'a toujours épaulée dans mon travail.*

*A tous les membres du Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, Synthèse et Activité Biologique, pour leur soutien.*

*A tous les étudiants de la promotion 2011-2012 Biochimie appliquée*



# Remerciements

Je remercie Allah tout puissant pour la patience qu'il m'a donné pour effectuer ce travail et atteindre mon objectif.

Je tiens tout d'abord à remercier mon encadreur Mme Boucherit-Otmani Zahia, Maître de Conférences (A) au Département de Biologie pour ses conseils, son aide précieuse, sa disponibilité, et son soutien.

J'exprime également ma reconnaissance à Mr Bouchrit Kebir, Professeur au Centre Universitaire de Naâma, d'avoir accepté de présider le jury.

Mes remerciements à Mr Rahmoun Najib, Maître-assistant B au Département de Biologie pour avoir bien voulu juger ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent également à tous mes enseignants durant mon cursus universitaire, en particulier

A Mme Bendimerad N., Mme Benyelles L., Mme Sari A., Mme Bouanane, Mlle Didi A., Mme Kazi Z., Mlle Benariba N., Mlle Damardji, Mlle Saker M., Mme Berrahoui S., Mme Dali M., Mme Loukidi B., Mme Boublenza, Mme Hassaine H., Mme Benmansour M., Mr Gaour S., Mr Baghdad C., Mr Djaziri R., Mr Abdelwahed., Mr Drissi M., Mr Mahdjoub T., Mr Bouabdellah H., Mr Azzouni, Mr Bixi.



## Résumé

L'amphotéricine B est un antifongique de la famille des polyènes, elle est utilisée depuis plus de trente ans dans le traitement des infections fongiques systémiques. Malgré la mise au point de nouveaux médicaments, cette molécule garde sa place, grâce à son excellente activité et son large spectre, provoquant cependant une toxicité élevée, ce qui justifie les recherches visant à formuler des antifongiques aux performances améliorées.

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'effet de l'addition des acides palmitique, myristique et linoléique sur l'efficacité de l'amphotéricine B utilisée à 0.4µg/ml vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231.

Les résultats obtenus montrent que l'addition des acides gras libres seuls augmente considérablement la population de *Candida albicans*.

En présence d'amphotéricine B et des acides gras, la population de *Candida albicans*, augmente encore plus après achèvement de la phase de dormance jusqu'à arriver à 150%.

De plus, la période de dormance est réduite lors de l'ajout des acides gras libres.

Mots clés : Amphotéricine B, acides gras, *Candida albicans*

## Abstract

Amphotericin B is an antifungal polyene, it is used for over thirty years in the treatment of systemic fungal infections. Despite the development of new drugs, this molecule keeps its place, thanks to its excellent activity and its broad spectrum, it has high toxicity, however, justifies the research to formulate antifungals with improved performance

Our work focused on evaluating the effect of the addition of palmitic, myristic and linoleic acids on the efficacy of amphotericin B used at 0.4µg/ml vis-à-vis *Candida albicans* ATCC 10231.

The results show that the addition of free fatty acids alone considerably increased the population of *Candida albicans*.

In the presence of amphotericin B and fatty acids, the population of *Candida albicans*, further increases after completion of the dormancy phase.

In addition, the dormancy period is reduced when adding free fatty acids.

Keys words: amphotericin B, fatty acids, *Candida albicans*.

## ملخص

الأمفوتريسين B ينتمي إلى عائلة بولييين، مضاد للفطريات، وتماستخدمها الأكثر من ثلاثين عامًا في علاج التهابات الفطرية الجهازية. على الرغم من تطوير عقاقير جديدة، هذا الجزيء يحتفظ بمكانة، وذلك بفضل نشاطها الممتاز والطيف الواسع ضد الفطريات، و لكن لهسمية عالية، ومع ذلك، تبرر بحثًا لصياغة مضادات الفطريات لتحسين الأداء

عملنا يتركز على تقييم تأثير إضافة الأحماض الدهنية: الحمض البالميتي، الحمض الميرستي والحمض اللينولييك على فعالية الأمفوتريسين B المستخدمة بـ 0.4 ميكروغ/مل ضد *Candida albicans* ATCC 10231.

أظهرت النتائج أن إضافة الأحماض الدهنية الحرة وحدها زيادة كبيرة في عدد في حضور الأمفوتريسين B والأحماض الدهنية، فإن عدد *Candida albicans* يزيد بعد الانتهاء من مرحلة السكون. وبالإضافة إلى ذلك، يتم تقليل فترة السكون عند إضافة الأحماض الدهنية الحرة.





# SOMMAIRE

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	5
1. Structure et propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B.....	6
2. Nouvelles formulations de l'amphotéricine B.....	8
3. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B .....	11
Matériel et méthodes.....	16
1. Matériel.....	17
2. Méthodes.....	18
Résultats et discussion.....	20
1. Effet des acides gras libres sur la croissance de <i>Candidaalbicans</i> ATCC10231.....	21
2. Effet des acides gras libres sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de <i>Candidaalbicans</i> ATCC10231.....	27
3. Calcul de la vitesse de croissance et du degré d'accroissement.....	32
4. Etude microscopique.....	34
5. Conclusion.....	36
Conclusion générale.....	37

## ABREVIATIONS

ABCD	Amphocil
ABLC	Abelcet
AmB	Amphotéricine B
Cho	Choline
D-AmB	Amphotéricine B désoxycholate
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DOPC	Chol–dioleoylphosphatidylcholine
MP-AmB	Amphotéricine B micro-encapsulé
NADC	Désoxycholate de sodium
P-AmB	Polyagrégats d'Amphotéricine B
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PLGA	Poly(D,L-Lactide-Co-glycolide)
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycéro-3 phosphocholine
PS	phosphatidylsérine

# INTRODUCTION

---



La pathologie fongique a connu une forte progression au cours de ces dernières années. En effet, le taux de morbi-mortalité dû à ces infections est très important ; 40% depuis 2004 (**Bertagnolio, 2004**). Elles sont dues à des champignons très répandus dans la nature habituellement saprophytes, ne devenant pathogènes que dans certaines conditions telles que l'usage croissant des antibiotiques à large spectre, les greffes d'organes, et les patients immunodéprimés (malade du sida) ; on parle alors de mycoses iatrogènes. Elles sont causées par des champignons dits opportunistes qui sont soit levuriformes (*Candida*, *Cryptococcus*), soit filamenteux (*Aspergillus*, *Cephalosporum*).

Trois grands groupes de mycoses profondes peuvent être individualisées: les candidoses disséminées (sévères) dont le premier agent responsable est *Candida albicans*, les aspergilloses; la plus répandue des mycoses pulmonaires; le champignon le plus abondant est *Aspergillus fumigatus*, et les cryptococcoses causées par l'espèce *Cryptococcus neoformans*. Plus d'une centaine d'espèces ont été décrites, chacune pouvant théoriquement être impliquée en pathologie humaine en cas de rupture de l'équilibre naturel entre levure et défense de l'organisme (pathogénicité par opportunité).

Malgré l'émergence des levures de type *Candida* non *albicans* (*Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, et *Candida Krusei*), *Candida albicans* demeure l'espèce la plus incriminée dans les mycoses systémiques. Elle est responsable de 51% des cas en Europe (**Gellen-Dautremer et coll., 2009**). Les infections mycosiques systémiques occupent la quatrième place des infections nosocomiales (**Wilsplinghoff et coll., 2004**).

Plusieurs stratégies ont été mises au point pour lutter contre les mycoses profondes ou généralisées. En effet, des antifongiques ont été mis sur le marché, et l'arsenal antifongique s'est considérablement enrichi ces dernières années.

L'amphotéricine B, antifongique polyénique, reste l'agent le plus utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. Son effet fongicide, son large spectre d'action et la rare manifestation de résistance à son égard et son activité fongicide sont ses atouts majeurs. Cependant, sa toxicité rénale très sévère limite son utilisation et surtout la durée du traitement (**Deroure et coll., 2006**).

Le mécanisme d'action traditionnel de l'amphotéricine B est basé sur une interaction avec les stérols membranaires ; l'ergostérol pour les levures et les fongis et le cholestérol pour les cellules animales. Rappelons que l'amphotéricine B a une plus grande affinité pour l'ergostérol ( $K_d = 0.145 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ ) que pour le cholestérol ( $K_d = 0.192 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ ) (**Readio et Bittman., 1982**).

En **1977**, **Safe** et ses collaborateurs ont montré que les souches de *Candida albicans* résistantes à cet antifongique avaient moins d'ergostérol membranaire que les souches sensibles. Un peu plus tard, l'inhibition de la synthèse du cholestérol par le kétoconazole qui est un dérivé azolé, permet une diminution de la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules rénales en culture (**Joly et coll., 1992**).

La composition en phospholipides membranaires joue aussi un rôle dans l'interaction amphotéricine B/Stérol (**Clejan et Bittman, 1985**). En effet, des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* enrichies en phospholipides de type phosphatidylcholine (PC) (**Cybulska et coll., 2002**), phosphatidylsérine (PS) ou en phosphatidyléthanolamine (PE), deviennent résistantes vis-à-vis de l'amphotéricine B (**Rao et coll., 1985**). De même, les travaux de **Matsuoka** et ses collaborateurs en **2003**, ont montré que l'augmentation de la longueur de la chaîne acyle des phospholipides est inversement proportionnelle à la fuite du potassium ( $\text{K}^+$ ) intracellulaire .

Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence un autre phénomène par lequel certaines levures en culture en présence d'amphotéricine B, ressuscitent après un temps de contact supérieur à 24 heures. Il s'agit du phénomène de dormance (**Boucherit Z. et coll., 2007**)

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui porte sur :

- L'évaluation de l'effet de l'addition d'acides gras libres (saturés et insaturés) dans le milieu de culture sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231.
- La mise en évidence du phénomène de dormance des levures dans les conditions expérimentales précédentes

## **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---



## 1. Structure et propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B

Isolée depuis près d'un demi-siècle dans « The Orinoco River in Tembladora (Venezuela) » à partir de *Streptomyces nodosus* (Challis et coll., 2003), l'amphotéricine B demeure l'antifongique le plus puissant parmi 200 polyènes antimycosiques (Lemke et coll., 2005).

Structurellement, l'amphotéricine B est composée de deux parties (figure N°1) ;

- Une partie hydrophile avec une fonction lactone, composée de sept groupements hydroxyle OH, un groupement carboxyle COOH et un sucre aminé (la mycosamine) contenant un groupement NH<sub>2</sub>.
- Une partie aux fragments lipophiles polyéniques, qui se compose de sept doubles liaisons conjuguées [(Bolard et coll., 1986) ; (Bonilla et coll., 1991)]. La présence d'une partie hydrophile et d'une partie lipophile confère à la molécule un caractère amphiphile.

La présence des groupements NH<sub>3</sub><sup>+</sup> et COO<sup>-</sup> confère à la molécule un caractère amphotère.

En raison de la nature amphiphile de la molécule et sa faible solubilité dans l'eau, l'amphotéricine B est capable de s'auto-associer dans des milieux aqueux et former des agrégats supramoléculaires (Gagos et coll., 2008). Toutefois, dans les milieux aqueux, les monomères et les agrégats solubles et insolubles de l'amphotéricine B coexistent, ces derniers lui confère une certaine toxicité; ces agrégats se forment à une concentration au-delà de  $2 \times 10^{-7}$  M [(Milhaud et coll., 2002) ; (Loredana et coll., 2009)]

Elle est également peu soluble dans les alcools et soluble dans les solvants organiques tels que le Diméthylsulfoxyde (DMSO) et le Diméthylformamide (DMF) (Brittain, 1994).

L'amphotéricine B est instable en solution aqueuse et sensible à la lumière et aux températures supérieures à 10°C (Rabkwan et coll., 2011).

Sur le plan pharmacologique sa posologie est de 0.5 à 1 mg/Kg en cas d'insuffisance cardio-pulmonaire, et jusqu'à 1 mg/Kg/24h ou 1.5 mg/Kg tous les 2 jours pour les infections sévères causées par les germes les moins sensibles, et ceci pour une durée de traitement de 6 à 12 semaines ou plus (**Chevrel, 2009**).

Quand l'amphotéricine B est administrée oralement, nous observons une faible absorption intestinale et donc une efficacité négligeable en raison de sa partie hydrophobe. Le mécanisme d'action de cet antifongique et son efficacité sont dus à sa forte affinité pour l'ergostérol.

L'amphotéricine B solubilisé avec le désoxycholate de sodium(NaDC) ou mise sur le marché sous le nom de Fungizone<sup>®</sup> est utilisée pour le traitement invasif d'infections fongiques (**Georgopapadakou et coll., 1996**). Son insolubilité en milieu aqueux conduit à sa faible prescription par voie orale. Elle est donc habituellement administrée par application locale ou par perfusion lente diluée dans du glucose à 5%. Cependant cette formulation est associée à l'administration d'une dose limitée, pour éviter l'apparition de lésions rénales irréversibles donc de néphrotoxicité (**Bolard, 1997**).

D'autres approches ont pour but de réduire la toxicité de l'amphotéricine B en modifiant sa formulation. En effet, des formulations lipidiques ont été mises au point après de nombreuses tentatives.

Cependant, ces formulations restent très onéreuses ce qui est un réel problème pour un pays en développement comme le nôtre.

## 2. Nouvelles formulations de l'amphotéricine B

L'amphotéricine B est actuellement le traitement de référence des mycoses systémiques. Diverses formulations lipidiques d'amphotéricine B ont été développées pour réduire sa toxicité et augmenter son index thérapeutique : l'amphotéricine B en complexe lipidique (ABLC), l'amphotéricine B liposomale (Ambisome), où l'amphotéricine B est associée à des phospholipides, et l'amphotéricine B en dispersion colloïdale (ABCD), où elle est associée à du sulfate de cholestérol (**Jung, 2009**). Des travaux ont également été réalisés avec un mélange extemporané d'amphotéricine B [(**Andrés et coll., 2001**); (**Chandrasekar, 2006**)].



### 2. 1. Abelcet®

L'amphotéricine B en complexe lipidique commercialisée sous le nom d'Abelcet, est une suspension d'amphotéricine B et de phospholipides (dimyristoylphosphatidylcholine et dimyristoylphosphatidylglycérol, selon un ratio de 1 : 3).

Elle est dégradée par les phospholipases cellulaires des macrophages et par celles des agents fongiques, ce qui permet une libération progressive de l'amphotéricine B. Les concentrations rénales d'amphotéricine B sont réduites avec l'ABLCL par rapport à l'amphotéricine B conventionnelle (**Belmann et coll., 2004**).

### 2. 2. Ambisome®

L'AmBisome est composée de phosphatidylcholine hydrogénée, de cholestérol et de distéaroylphosphatidylglycérol, et d'amphotéricine B, il est fait de petites vésicules unilamellaires composées de lipides qui donnent une bicouche très stable, à l'état de gel à la température physiologique. L'AmB est incorporée dans cette bicouche à 10% en moles. La taille des liposomes est d'environ 80 nm, ils ont une longue demi-vie circulante et une bonne pénétration dans les tissus. La composition stable de la bicouche devrait permettre de réduire les échanges avec les lipoprotéines et de contribuer à la très faible toxicité de cette formulation (**Adler-Moore et coll., 2002**).

### 2. 3 Amphocil®

L'amphotéricine B en dispersion colloïdale (amphotericin B colloidal dispersion [ABCD]), commercialisée sous le nom d'Amphocil® en Europe et d'Amphotec® aux États-Unis, est composée d'amphotéricine B liée au sulfate de cholestérol, selon un mélange équimolaire (**Herbrecht et coll., 1999**). Les particules ont une forme de disques de 120 à 140 nm de diamètre et de 4 nm d'épaisseur. Son avantage est que les concentrations d'amphotéricine B dans les reins, les poumons et le cerveau sont plus faibles avec l'ABCD qu'avec l'amphotéricine B conventionnelle (**Andrès et coll., 2001**).



#### 2. 4.L'amphotéricine B en nano suspension

Elle a été produite par une technique de nanopréciipitation. Poly(D,L-Lactide-Co-glycolide) PLGA nanoparticule (**Van de ven et coll., 2012**). Alors que toutes les autres formulations testées; amphotéricine B liposomale (Ambisome®), micronisé et Fungizone®, n'ont montré aucun effet curatif par administration orale, l'AmB en nano suspension orale a significativement réduit le nombre de parasites. En outre, elle s'est avérée stable sur au moins 3 semaines, en indiquant de bonnes caractéristiques dans la durée de conservation, mais son pH acide reste encore un problème qui doit être résolu à l'avenir afin d'améliorer encore l'efficacité par voie orale. En ce qui concerne la pharmaco-économie, cette molécule présente un système rentable de délivrance du médicament pour l'AmB qui est facile à préparer et a un potentiel de développement (**Kayser et coll., 2003**).

#### 2. 5. Les poly agrégats d'amphotéricine B

Il a été démontré qu'il existe une relation claire entre l'état d'agrégation de l'amphotéricine B et de sa toxicité. Les formulations de poly-agrégats (P-AmB et MP-AmB) ont un meilleur indice thérapeutique que la formulation classique (D-AmB) (l'amphotéricine B désoxycholate) en raison de leur faible toxicité, sans sacrifier l'efficacité. Ce fait devrait encourager les scientifiques dans la recherche de nouvelles préparations de moindre toxicité que la formulation conventionnelle de l'amphotéricine B (Fungizone®) et moins coûteuses que les formulations lipidiques récemment commercialisées (Ambisome®, Abelcet® et Amphotec®), qui sont d'une utilité limitée en raison de leur coût onéreux (**Espada et coll., 2008**). Par conséquent, ces formulations de poly-agrégats d'amphotéricine B peuvent être très prometteuses pour l'amélioration de la prise en charge des infections systémiques à *C. albicans* et probablement pour d'autres espèces de *Candida* (**Mariné et coll., 2009**).

### 3. Mécanisme d'action de l'amphotéricine B

Depuis plus de cinq décennies, l'amphotéricine B a été placée au premier rang des antifongiques utilisés contre les infections fongiques systémiques (**Datry, 2001**). Le mécanisme d'action de cette molécule a connu plusieurs essors, mais ce qui a été le plus prouvé c'est son interaction avec les lipides membranaires (phospholipides et stérols). Elle interagit avec les stérols (ergostérol pour la cellule fongique et le cholestérol pour la cellule animale), pour former des complexes polyène-stérol qui sont transmembranaires et qui induisent un changement local de l'état physique de la membrane, et ceci en formant des pores avec ces derniers, et/ou la fuite excessive d'ions mène à la mort cellulaire. Cette liaison amphotéricine B-stérol se fait par le biais de la liaison 3  $\beta$ -hydroxyl du stérol, elle agit directement au niveau de l'ergostérol en réalisant des liaisons de type Vander Waals ou hydrogènes(**Datry, 2001**).

Les données disponibles à ce jour soulignent le fait que le mécanisme lytique de l'amphotéricine B est basé sur la génération de canaux ioniques dans la membrane de la cellule cible, composés d'un nombre différent de monomères allant de 4 à 12 (**Gruszecki et coll., 2003**) (Figure N°2), où par le blocage de monomères de l'amphotéricine B (**Baginski et coll., 1997**). Ces canaux induisent à la fuite des ions potassium et des petites molécules organiques à partir des cellules, provoquant des perturbations graves au niveau de la physiologie de la cellule.





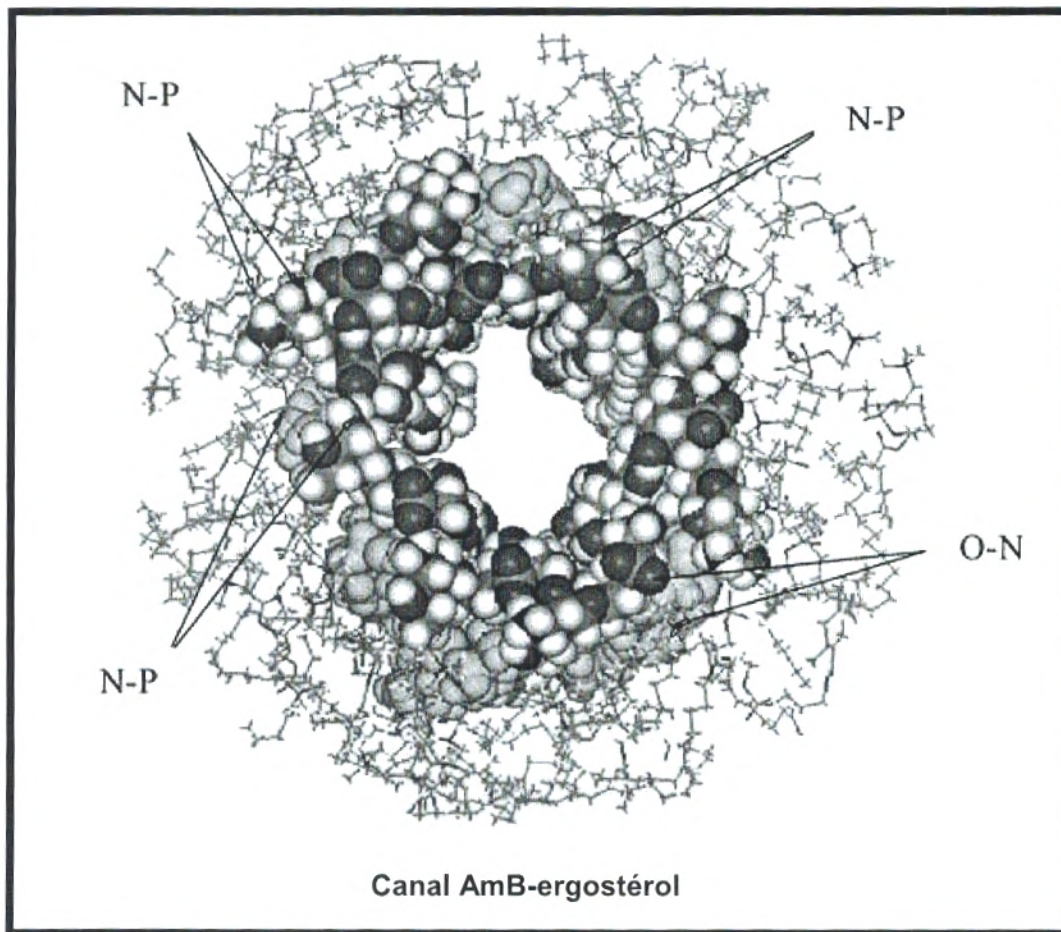


Figure N°2 : Simulation de la dynamique de formation d'un pore issu du complexe amphotéricine B /ergostérol. (Les molécules d'ergostérol y sont représentées en jaune et les flèches noires sont les liaisons établies entre les molécules d'amphotéricine B et les phospholipides. N-P, interactions entre l'atome d'azote (bleu) de l'amphotéricine B et le phosphore (rose) du phospholipide; O-N, entre l'oxygène (rouge) du groupement carboxyl de l'amphotéricine B et l'azote (bleu) du groupement amine du phospholipide) (Baginsky *et coll*, 2002).





---

Les stérols sont essentiels pour maintenir la structure et la fonction des membranes cellulaires eucaryotes. Leur présence dans la membrane modifie de façon significative sa fluidité. En outre, en conformité avec les expériences, les calculs montrent que, par rapport à celle du cholestérol, l'ergostérol a plus d'effet de commande sur les chaînes acyles des phospholipides. Cette influence est différente sur les propriétés de la bicouche lipidique dans la liberté de conformation de chaînes latérales des stérols **(Czub et coll., 2006)**.

Il existe une controverse dans la littérature concernant le rôle des stérols dans la membrane. Deux mécanismes ont été proposés selon le 1<sup>er</sup> modèle l'action des stérols est indirecte **(Marty et coll., 1975)** et ils sont supposés modifiant l'arrangement des phospholipides de la membrane facilitant par conséquent l'incorporation de la molécule antifongique **(Ruckwardt et coll., 1998)**. L'autre modèle suggère l'existence des complexes amphotéricine B/stérols qui sont responsables de la formation des canaux dans les membranes cellulaires **(Dynarowick-Latka et coll., 2002)**

Récemment, l'existence de fortes interactions entre l'amphotéricine B et différents stérols a été démontrée. Ces interactions existent entre les groupements polaires des deux composés ainsi qu'entre leurs groupements apolaires, en raison de la formation des liaisons hydrogène et hydrophobes, et attraction des forces de Vander Waals, respectivement.

Des études ont montré l'existence d'interactions attractives entre les phospholipides et le cholestérol. Les mélanges avec l'ergostérol se comportent très différemment, c'est à dire soit les interactions sont répulsives (mélanges avec la DPPC) ou le système est idéal (mélanges avec DOPC). Les résultats obtenus ont des répercussions dans le mode d'action du polyène. Ce dernier interagit plus facilement avec l'ergostérol, dans les cellules fongiques, que le cholestérol **(Minones et coll., 2009)**.

Les propriétés des canaux membranaires, les associations de l'amphotéricine B et les aspects moléculaires des interactions entre l'amphotéricine B et la surface d'une membrane ont été étudiés. Il a été postulé que les dimères amphotéricine B, plutôt que les monomères, formaient des canaux membranaires. Deux mécanismes ont été proposés. Tout d'abord, « le mécanisme séquentiel » dans lequel les molécules monomères d'amphotéricine B pénètrent dans la membrane cellulaire puis forment



des canaux. Dans ce cas, les molécules d'amphotéricine B peuvent interagir avec des stérols ou d'autres lipides et former des complexes avant la formation de canaux. Lorsque les molécules d'amphotéricine B forment des monocouches dans l'air ou dans l'eau, un autre mécanisme de formation d'un canal appelé « l'étape one » suppose que l'amphotéricine B peut également former des agrégats sur la surface de la membrane. Ces associations plus formées sur la surface de la membrane peuvent pénétrer la membrane en une seule étape et former le canal (**Vijan et coll., 2009**).

Dans un autre contexte, des études ont montré des interactions importantes entre l'amphotéricine B et les phospholipides. Les interactions entre les phospholipides et les stérols jouent un rôle important dans l'efficacité de l'incorporation de l'amphotéricine B dans la monocouche (**Dynarowick-Latka et coll., 2002**).

La sélectivité de l'amphotéricine B pour la cellule fongique par rapport à la cellule hôte, est la conséquence d'une affinité beaucoup plus marquée pour l'ergostérol que pour le cholestérol. Cette affinité est seulement de 10 fois (**Matsumori et coll., 2004**), ce qui est probablement responsable des effets secondaires graves de la drogue [(**Jones et Bartlett 2010**), (**Maltezou 2010**)].

Cette différence d'affinité pour ces deux stérols peut se distinguer par :

- La présence de doubles liaisons supplémentaires dans l'ergostérol ; une dans le noyau stéroïdien en C<sub>7-8</sub> et l'autre dans la chaîne alkyle en C<sub>22-23</sub>, ce qui augmente la densité d'électron (**Baran et coll., 2009**), et diminue sa flexibilité (**Norman et coll., 1972**).
- La présence d'un groupement méthyle additionnel dans la chaîne alkyle en C<sub>24</sub> (**Mannock et coll., 2010**).
- **Baran et coll.**, en **2009** ont montré que les interactions électroniques de type ( $\pi$ - $\pi$ ) entre les constituants du complexe, sont la conséquence de la stabilité de celui-ci. Cette situation ne se produit pas dans le cas du cholestérol et donc la stabilité du complexe Amphotéricine B/cholestérol est inférieure.
- La miscibilité de l'ergostérol dans les bicouches lipidiques est inférieure à celle du cholestérol, ce qui influe sur la dynamique conformationnelle du complexe (**Mannock et coll., 2010**).
- En 2008, **Umegawa** et ses collaborateurs ont pu montrer au cours de leurs études sur les interactions POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-Glycéro-3

phosphocholine)/Stérols/AmB que dans les membranes à POPC, les interactions AmB-AmB nécessaires pour l'assemblage des canaux ioniques sont prédominantes dans les membranes contenant l'ergostérol comme dans les membranes contenant le cholestérol. En revanche, les interactions AmB-POPC sont observées seulement dans les membranes contenant l'ergostérol, ceci peut s'expliquer par l'influence significative de l'ergostérol sur ces interactions (AmB-POPC), ce qui augmente la distance intermoléculaire dans ces membranes et facilite la formation des canaux d'ions.

- le diamètre du canal AmB/Erg est plus large que celui du canal AmB/Cho qui est dans l'intervalle de 7-10 Å (**Baginski et coll., 2002**).

Beaucoup d'études ont porté sur l'interaction de l'amphotéricine B avec les phospholipides et les stérols.

Les phospholipides étant constitué d'acides gras ces derniers peuvent interagir avec la molécule d'amphotéricine B, ce qui a été montré par **Iannitelli, et Ikawa en 1980** est que l'amphotéricine B interagit avec les acides gras insaturés des phospholipides membranaires

## **MATERIEL ET METHODES**

---



Cette étude a été réalisée au laboratoire «Antibiotiques, Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (Lapsab) », Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen.

### 1. Matériel et méthodes

#### 1.1. Matériel

##### 1.1.1. Milieu de culture

Les cultures de *Candida albicans* sont menées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu Sabouraud liquide, dont la composition pour 1 litre est la suivante :

Glucose 20 g

Peptone 10 g

Extrait de levure 3 g

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

Pour le milieu Sabouraud gélose, nous ajoutons 20% d'agar.

La stérilisation des milieux, se fait par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

##### 1.1.2. *Candida albicans*

Pour évaluer l'efficacité de l'amphotéricine B complexée aux acides gras libres, nous avons utilisé comme modèle de levure *Candida albicans* ATCC 10231 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA).

Cette souche est entretenue par repiquages successifs et conservée 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 le Diméthyl sulfoxyde (DMSO) à une concentration de  $10^{-3}$  M puis ajustée à  $10^{-4}$  M à l'aide d'un spectrophotomètre.

L'antifongique est utilisé à une concentration finale de 0,4 µg/ml qui correspond à la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) pour la souche utilisée.

### 1.1.4. Acides gras

Notre choix a porté sur deux acides gras saturés (l'acide myristique et l'acide palmitique) et un acide gras insaturé (l'acide linoléique).

Avant leur utilisation, les acides gras sont saponifiés avec du KOH. La saponification est effectuée par chauffage à 70°C pendant 20 à 30 minutes.

## 2. Méthodes

### 2.1. Croissance des levures en milieu liquide

Les cultures sont menées dans des Erlenmeyers stériles de 250ml.

Les Erlenmeyers sont ensemencés 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 Sabouraud gélosé à 4°C. Les précultures et les cultures sont incubées dans un incubateur de paillasse (**Orbital Shaker, Thermo-Forma**) à 30°C sous agitation continue à une vitesse de 130 tours/minute.

La mesure de la croissance est réalisée par numération cellulaire sur cellule de Thoma à l'aide d'un microscope binoculaire.

### 2.2. Evaluation de l'efficacité de l'amphotérine B en présence d'acides gras libres

Les cultures de *Candida albicans* sont menées en milieu Sabouraud liquide en présence et en l'absence de la solution antifongique. La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml.

La solution antifongique est ajoutée au milieu de culture à une concentration finale de 0,4 µg/ml au même moment que l'inoculum, ce qui correspond au temps zéro de la croissance. Les acides gras quant à eux sont ajoutés eux aussi au temps zéro de la croissance à une concentration finale de 0,5 µg/ml.

La mesure de la croissance se fait par numération cellulaire, sur cellule de Thoma, toutes les 60 minutes. La croissance est suivie sur une durée de 36 heures.



### 2.3. La vitesse Spécifique

La vitesse spécifique de la croissance, correspond à l'augmentation de la population de levure par unité de temps. Elle est calculée lors de la phase exponentielle et est exprimée selon l'équation de Withing et Buchanan 1993 :

$$\mu = \frac{\ln N_2 - \ln N_1}{t_2 - t_1}$$

t : temps exprimé en h

N : nombre de cellules par/ml

$\mu$  : vitesse spécifique exprimé en h<sup>-1</sup>

### 2.4. Etude microscopique

Dans le but d'étudier la morphologie des cellules au cours de la croissance, 50  $\mu$ l de la culture sont prélevés et les levures sont observées en utilisant un microscope binoculaire avec un objectif Zeiss x40/0,65.

Les images sont prises avec un appareil photo numérique Sony, SteadyShot DSC-W310, avec 12,1 mégapixels.



## **RESULTATS ET DISCUSSION**

---

Notre travail a porté sur l'évaluation de l'efficacité de l'amphotéricine B en présence d'acides gras libres vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231. Notre choix a porté sur trois acides gras, deux acides gras saturés (l'acide palmitique et l'acide myristique) et un acide gras insaturé, l'acide linoléique.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet des acides gras libres sur la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231. Pour cela, des croissances sont menées en l'absence et en présence de chacun des acides gras testés.

La concentration cellulaire de départ est fixée à  $2 \times 10^6$  cellules/ml.

Les acides gras estérifiés sont ajoutés au milieu de culture au même moment que l'inoculum, ce qui correspond au temps zéro de la croissance.

La croissance est suivie sur une période de 36 heures.

Cette partie de l'étude s'articule autour de trois points :

- Effet de l'acide myristique et de l'acide palmitique
- Effet de l'acide linoléique
- Effet des mélanges acide myristique/acide linoléique et acide palmitique/acide linoléique sur la croissance de *Candida albicans*.

### **1. Effet des acides gras libres sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231**

#### **1.1. Effet de l'acide myristique et de l'acide palmitique sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231**

Les résultats relatifs à l'effet des acides gras saturés (acide myristique et acide palmitique) sur la croissance de *Candida albicans* sont représentés sur la **figure N°4**

Nous remarquons que :

- La courbe témoin (courbe a), qui correspond aux cellules cultivées sur Sabouraud liquide sans aucune addition, montre qu'après incorporation de l'inoculum au temps zéro à la concentration de  $2 \times 10^6$  cellules/ml, les levures passent par une phase de latence de 2 heures caractérisée par un nombre constant de cellules de départ. Ensuite, les cellules entrent 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 12 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue (130 tours/min).

- L'addition de l'acide palmitique au milieu de culture (courbe b) provoque une activation de la croissance de *Candida albicans*. En effet, le nombre de cellules commence à  $2 \times 10^6$  cellules/ml pour atteindre un maximum de  $5 \times 10^8$  cellules/ml au cours de la phase stationnaire. Le taux de croissance des levures est multiplié par un facteur d'environ 2,5 par rapport à la culture témoin.
- L'incorporation de l'acide myristique au milieu de culture (courbe c) induit une activation de la croissance des levures. Le nombre de cellules passe de  $2 \times 10^6$  cellules/ml en phase de latence à  $4.5 \times 10^8$  cellules/ml en phase stationnaire. Le taux de croissance est multiplié par un facteur de 2.

### 1.2. Effet de l'acide linoléique sur la croissance de *Candida albicans* ATCC10231

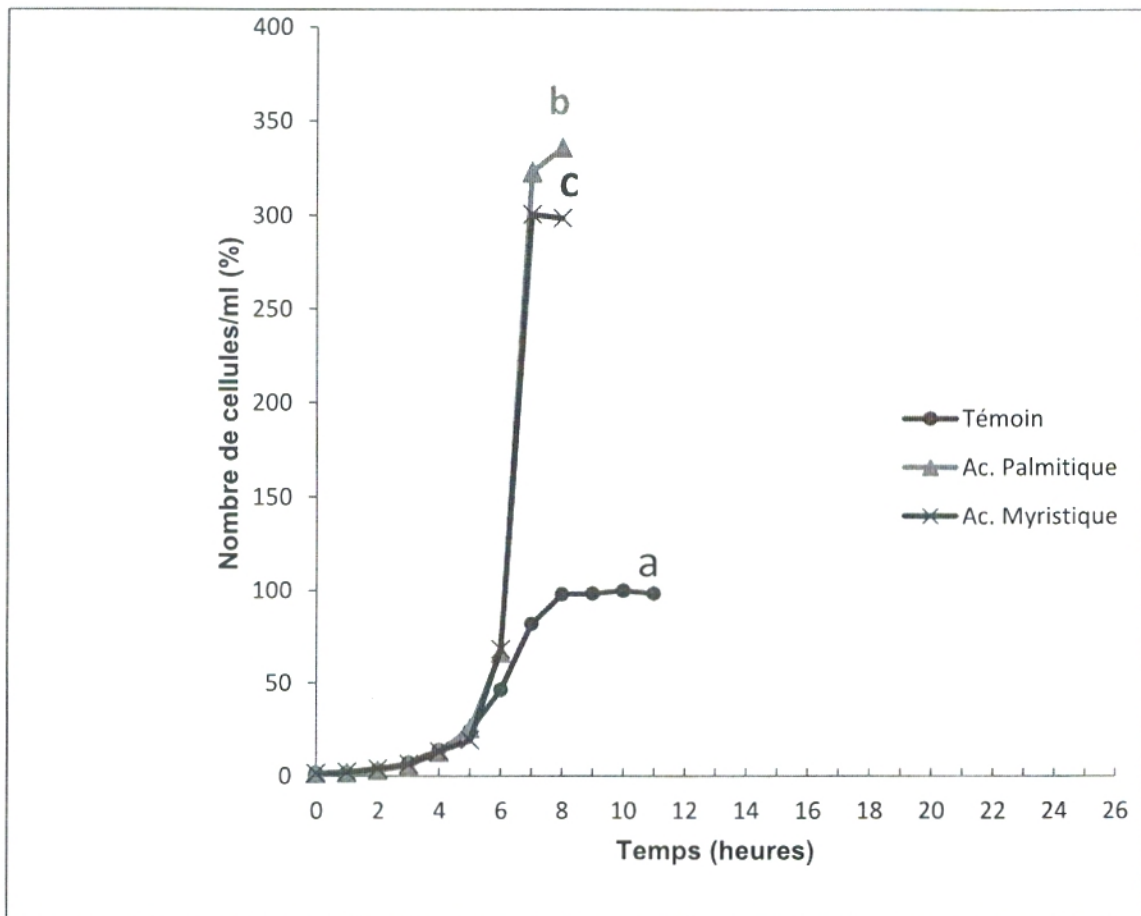
La **figure N°5** représente les résultats relatifs à l'effet de l'addition de l'acide linoléique sur la croissance de *Candida albicans*.

Nous constatons que :

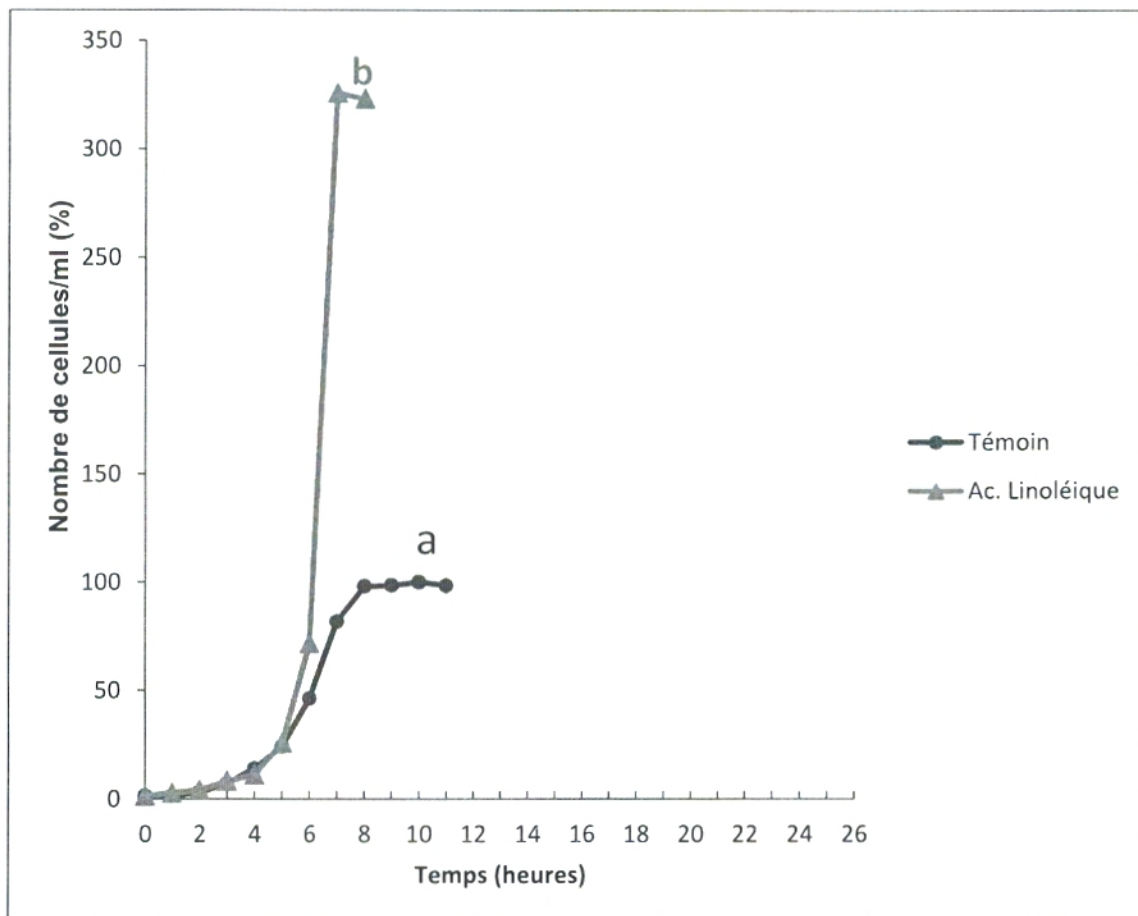
- Pour la culture témoin qui correspond aux cellules incubées sans aucune addition (courbe a), les cellules passent par les trois phases d'une courbe de croissance. Les cellules atteignent un maximum de  $2 \times 10^8$  cellules/ml en phase stationnaire après 10 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes.
- La courbe b représente la croissance de *Candida albicans* en présence de l'acide linoléique. Le nombre de cellules atteint une valeur maximale de  $5 \times 10^8$  cellules/ml après seulement 8 heures d'incubation.
- Le taux de croissance est multiplié par un facteur de 2.



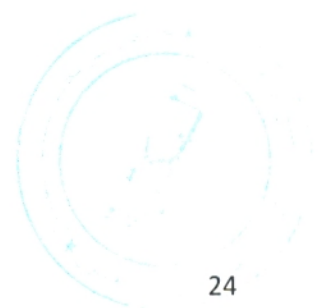




**Figure N°4 :** Croissance de *Candida albicans* en présence de l'acide palmitique et l'acide myristique. Les acides gras sont ajoutés à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont menées sur Sabouraud liquide. Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/min.



**Figure N°5 :** Croissance de *Candida albicans* en présence de l'acide linoléique. L'acide linoléique est ajouté à une concentration finale de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont menées sur Sabouraud liquide. Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/min.



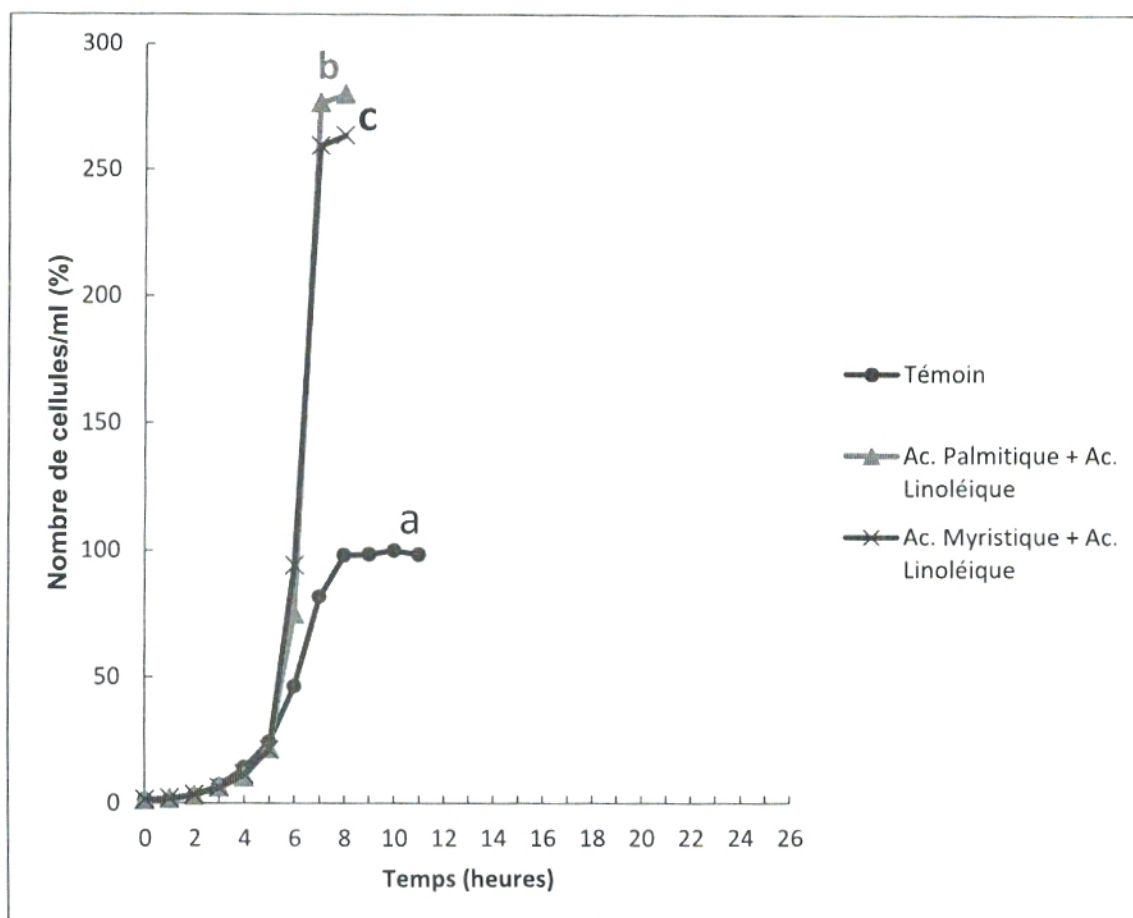
### **1.3. Effet des mélanges acide palmitique/acide linoléique et acide myristique/acide linoléique sur la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231**

La figure N°6 regroupe les résultats de l'effet de l'addition des mélanges d'acides gras sur la croissance de *Candida albicans*.

Nous constatons que quel que soit le mélange d'acide gras utilisé, un accroissement du taux de croissance des levures est observé. Ce dernier, est estimé à 90% pour le mélange acide palmitique/acide linoléique et à environ 80% pour le mélange acide myristique/acide linoléique.

Sur la base des résultats de cette première partie de l'étude, nous pouvons dire que quel que soit la nature de l'acide gras utilisé, une activation de la croissance de *Candida albicans* est observée. Le taux de croissance est multiplié par un facteur de 2.5 pour l'acide palmitique, 2 pour l'acide myristique et de 2 pour l'acide linoléique. Il est à noter que l'incorporation des mélanges d'acide gras induit une augmentation de la croissance des levures qui reste inférieure à celle obtenue avec les acides gras seuls.





**Figure N°6 :** Croissance de *Candida albicans* en présence du mélange acide palmitique/acide linoléique et le mélange acide myristique/acide linoléique. Les acides gras sont ajoutés à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont menées sur Sabouraud liquide. Les levures sont incubées à 30°C sous agitation continue à 130 tours/min.

La deuxième partie de notre étude a porté sur l'évaluation de l'effet des acides gras sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231

### **2. Effet des acides gras libres sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231**

#### **2.1. Effet de l'acide myristique et de l'acide palmitique sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231**

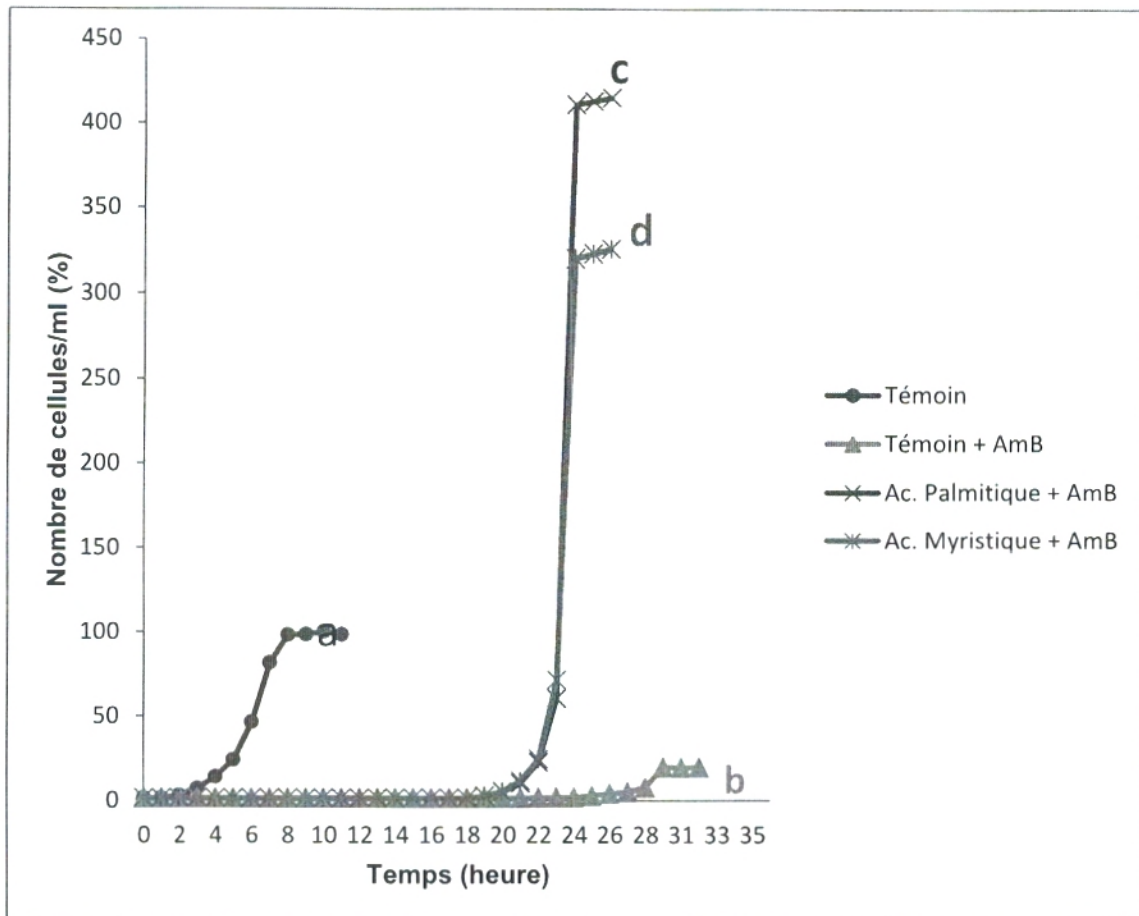
Les résultats relatifs à l'effet de l'acide myristique et l'acide palmitique sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* sont représentés sur la **figure N°7**.

Il ressort de cette figure que :

-L'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 µg/ml au milieu de culture (courbe b) provoque un prolongement de la phase de latence qui passe de 2 heures pour la culture témoin (courbe a) à 25 heures. Les cellules reprennent ensuite leur croissance pour atteindre un maximum de  $3 \times 10^7$  cellules/ml après 30 heures d'incubation à 30°C sous agitation continue à 130 tours/minutes. C'est le phénomène de dormance des levures sous l'effet de l'amphotéricine B.

-L'utilisation de l'amphotéricine B en présence des acides gras (acide myristique et acide palmitique) induit une réduction de la durée de la phase de latence qui passe de 25 à 18 heures.

-L'addition de l'acide palmitique (courbe c) et de l'acide myristique (courbe d) en présence d'amphotéricine B provoque une perte de l'efficacité de cette drogue. Le taux de croissance passe de 20% en présence d'amphotéricine B seule à 225% en présence de l'acide myristique et à 300% en présence de l'acide palmitique.



**Figure N°7 :** Effet de l'acide myristique et de l'acide palmitique sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B chez *Candida albicans*. L'amphotéricine B est utilisée à une concentration de 0,4 µg/ml. Les acides gras sont ajoutés à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont menées sur milieu Sabouraud liquide à 30°C.





### **2.2. Effet de l'acide linoléique sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231**

L'étude de l'effet de l'acide linoléique sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* a donné les résultats représentés sur la figure N°8.

La croissance est suivie sur 36 heures.

-La courbe témoin (a) représente la culture témoin de *Candida albicans*, 100% de croissance.

-En présence d'amphotéricine B seule, la phase de latence est de 25 heures et le taux de croissance est estimé à 20%.

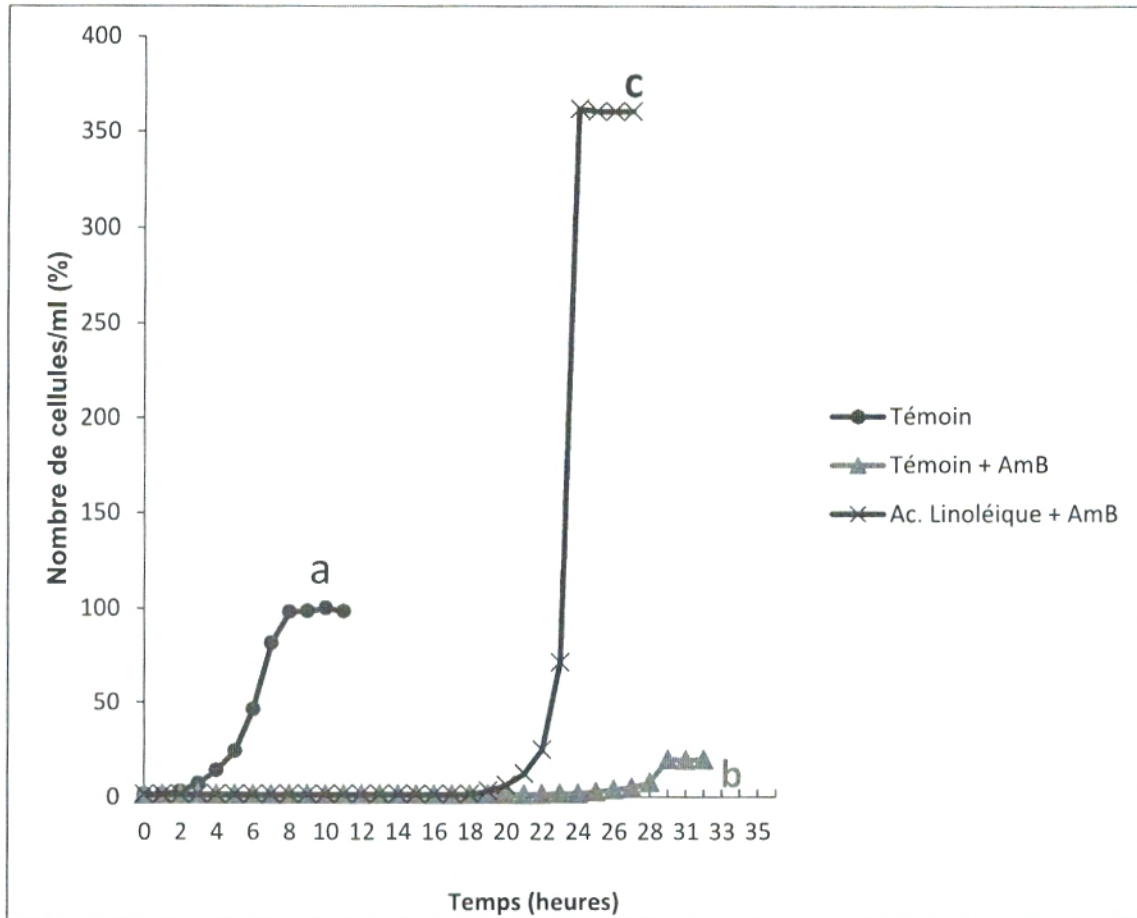
-En présence du complexe amphotéricine B-acide linoléique, la phase de latence est de 18 heures et le taux de croissance est de 260% environ. Une nette perte de l'efficacité l'amphotéricine B est observée.

### **2.3. Effet des mélanges acide palmitique/acide linoléique et acide myristique/acide linoléique sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231**

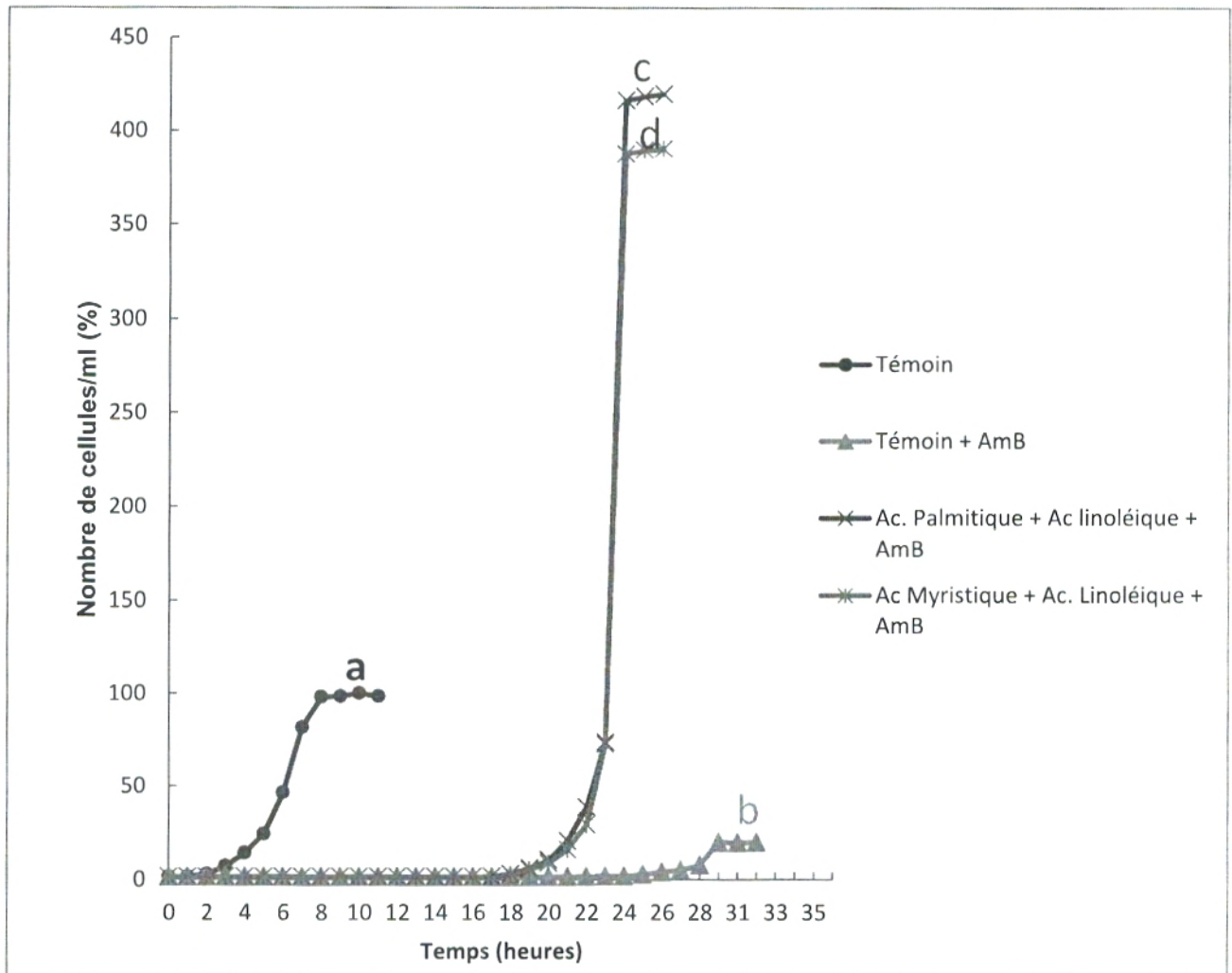
La figure N°9 regroupe les résultats de l'effet de l'addition des mélanges d'acides gras sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

Une nette perte de l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* est observée. Le taux de croissance passe de 20% en présence de l'antifongique seul à 300 % environ pour les complexes AmB-(acide palmitique/acide linoléique) et AmB-(acide myristique/acide linoléique).

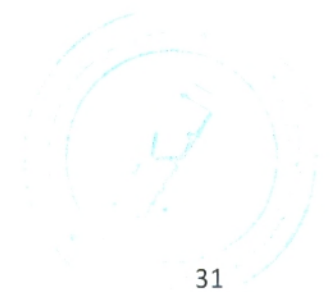
En conclusion de cette partie, nous pouvons dire que l'incorporation des acides gras libres est à l'origine d'une perte non négligeable de l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*.



**Figure N°8** : Effet de l'acide linoléique sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B chez *Candida albicans*. L'amphotéricine B est utilisée à une concentration de 0,4 µg/ml. Les acides gras sont ajoutés à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont menées sur milieu Sabouraud liquide à 30°C.



**Figure N°9 :** Effet des mélanges acides gras sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B chez *Candida albicans*. L'amphotéricine B est utilisée à une concentration de 0,4 µg/ml. Les acides gras sont ajoutés à une concentration finale de 0,5 µg/ml. La concentration cellulaire de départ est de  $2 \times 10^6$  cellules/ml. Les cultures sont menées sur milieu Sabouraud liquide à 30°C.





### 3. Calcul de la vitesse de croissance et du degré d'accroissement

Dans le but de mieux comprendre le phénomène de dormance des cellules de *Candida albicans* en présence d'amphotéricine B et des acides gras libres saturés et insaturés, il nous a paru intéressant de calculer la vitesse de croissance et le degré d'accroissement dans les différentes conditions expérimentales.

La vitesse de croissance  $\mu$ , est calculée dans la phase exponentielle

Les résultats obtenus sont regroupés dans les tableaux N°2 et N°3

La courbe C<sub>0</sub> correspond aux cellules de *Candida albicans* seules (c'est le témoin).

La vitesse de croissance spécifique de la culture en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4  $\mu\text{g/ml}$  représente à peu près le double des cellules témoin.

En présence des acides gras, nous remarquons que la vitesse de croissance pour l'acide palmitique est plus importante que celle de l'acide myristique, quant à l'acide linoléique, il se classe entre les deux. Ceci peut s'expliquer par le nombre d'atomes de carbone pour les acides gras saturés mais aussi par les insaturations pour l'acide gras insaturé. Les mélanges par contre, ont une vitesse de croissance moins importante que celle des acides gras seuls.

En présence d'AmB, les vitesses de croissance augmentent pour tous les échantillons, selon le même ordre que quand il contenait les acides gras seuls.

En effet, 1.91  $\text{h}^{-1}$  pour l'acide palmitique, suivi de 1.62  $\text{h}^{-1}$  pour l'acide linoléique et 1.50  $\text{h}^{-1}$  pour l'acide myristique, le mélange de l'acide palmitique et myristique avec l'acide linoléique est plus important que l'acide linoléique seul et moins important que l'acide palmitique ou l'acide myristique seul.

A partir du calcul de la vitesse de croissance, nous pouvons dire que la cinétique de croissance des levures est conditionnée par les caractéristiques du milieu de culture dans lequel ces dernières se trouvent.

Tableau N°2 : Mesure de la vitesse spécifique de la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 en présence des différents acides gras

	$C_0$	$C_P$	$C_M$	$C_L$	$C_{P+L}$	$C_{M+L}$
<b>Ac. Gras</b>	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>AmB</b>	0	0	0	0	0	0
$\mu^{(h-1)}$	0.56	1.58	1.48	1.51	1.30	1.01

Tableau N°3 : Mesure de la vitesse spécifique de la croissance de *Candida albicans* ATCC 10231 en présence d'amphotéricine B à 0,4  $\mu\text{g/ml}$  et des différents acides gras

	$C_0$	$C_{AmB}$	$C_{P+AmB}$	$C_{M+AmB}$	$C_{L+AmB}$	$C_{P+L+AmB}$	$C_{M+L+AmB}$
<b>Ac.Gras</b>	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>AmB</b>	0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
$\mu^{(h-1)}$	0.56	0.94	1.91	1.50	1.62	1.73	1.67

### 4. Etude microscopique

Pour suivre le comportement des cellules ; le changement de leurs tailles ainsi que leurs formes, nous avons effectué une étude microscopique des levures.

Des photos ont été prises au cours de la croissance des levures à différents moments.

Nous constatons que :

En l'absence d'amphoétéricine B, après une heure d'incubation à 30°C à 130 tours/min, la taille des cellules commencent à augmenter. Au bout de 3 à 4 heures, le nombre de cellules augmentent ; les cellules ont le même aspect que celles du début (**Photo N°1**).

En présence d'amphotéricine B, le nombre de cellules diminue et la taille des cellules reste inchangée (**Photo N°2**).

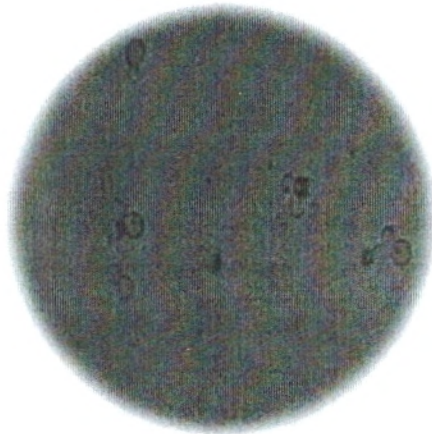
En présence des acides gras la taille des cellules reste inchangée, mais le nombre de cellules augmente. (**Photo N°3**).

En présence des complexes AmB-acides gras, la taille reste inchangée mais le nombre de cellules diminue durant les premières heures pour augmenter à partir de 18<sup>ème</sup> heures. (**Photo N°4**).

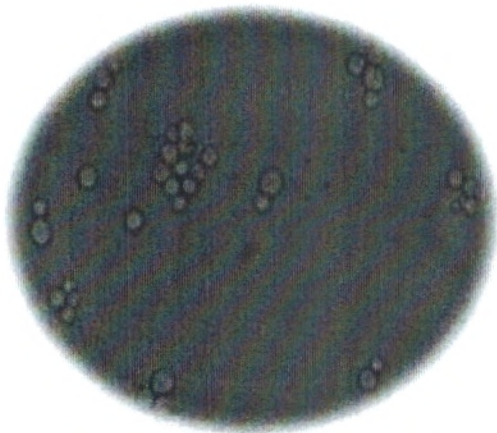




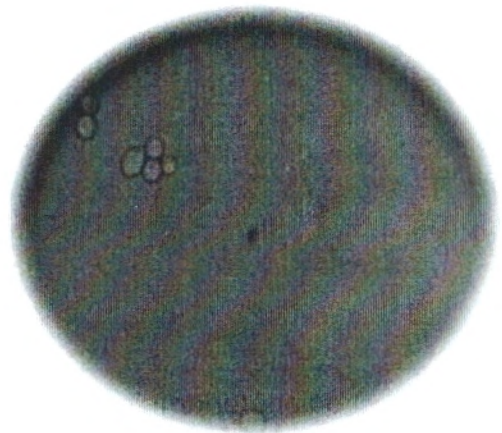
**Photo N°1 :** *Candida albicans* seule



**Photo N°2 :** *Candida albicans* en présence de l'amphotéricine B



**Photo N°3 :** *Candida albicans* en présence des acides gras



**Photo N°4 :** *Candida albicans* en présence des acides gras et de

### 5. Conclusion

Il ressort de notre étude que :

-En présence d'amphotéricine B, la courbe de croissance ne démarre pas durant les 22 premières heures. Et ceci s'explique par le phénomène de dormance.

-L'addition des acides gras libres, permet d'augmenter significativement le nombre des levures.

-L'ajout de l'amphotéricine B avec les acides gras raccourci la phase de dormance à 18 heures ce qui diminue l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans*.

Par conséquent, quel que soit l'acide gras ajouté, nous avons augmentation de la population de *Candida albicans* ATCC 10231.

Et enfin la taille des cellules reste inchangée après l'addition des acides gras libres.



## **CONCLUSION GENERALE**

---



Le but qui a été fixé pour cette partie a consisté à évaluer l'effet de l'addition des acides gras libres sur l'efficacité de l'amphotéricine B vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC 10231.

Pour ce faire, la croissance des levures a été suivie pendant 36 heures à 30°C sous agitation continue à 130 tours/min en présence des différents acides gras libres saponifiés ainsi qu'en présence d'amphotéricine B à une concentration finale de 0,4 µg/ml.

Les résultats obtenus, nous montrent que :

En présence d'amphotéricine B seule, les études microscopiques ont révélé un rétrécissement des cellules lors des premières heures d'incubation. Ceci est probablement dû à la fuite des ions potassium intracellulaire induite par l'amphotéricine B. Ces observations sont en accord avec ceux de **Boucherit et coll., 2007**.

En revanche, en présence des différents acides gras, la taille des cellules reste inchangée, mais leur nombre se multiplie significativement en fonction du temps, ceci peut s'expliquer par l'intégration de ces derniers dans la membrane de *Candida albicans*. L'ajout des acides gras ne perturbe pas l'homéostasie cellulaire.

La vitesse à laquelle les cellules prolifèrent est probablement liée à la capacité de réparation des dommages métaboliques et cellulaires, subis par l'action toxique de l'amphotéricine B (**Benmansour, 2010**)

L'ajout des acides gras seuls saturés et insaturés (l'acide palmitique, l'acide myristique et l'acide linoléique) a montré une augmentation du nombre cellulaire en se basant sur les études de **Bedr-Dine et Khelkhal** en 2003, *Candida albicans* n'utilise pas les acides gras comme source de carbone, cette augmentation est probablement dû au renouvellement membranaire favorisant la croissance cellulaire et utilisant les acides gras comme constituants fondamentales de la membrane (**Bibb and Young, 1974**), avec une augmentation de la vitesse de croissance.

De plus, le mélange d'acides gras saturés et insaturés tel que (l'acide palmitique et l'acide linoléique ou l'acide myristique et l'acide linoléique) a montré une augmentation de la même manière de la biomasse des levures, cette addition a pour intérêt de mimer le rôle des phospholipides qui se constitue du mélange d'acides gras saturés et insaturés.

La diminution de l'effet de l'amphotéricine B est due à la stimulation des cellules dormantes en augmentant la fluidité membranaire ; les acides gras peuvent s'intégrer

dans les membranes cellulaires pour modifier les propriétés physiques des membranes cellulaires (**Yang et coll., 2011**) ce qui favorise la résurrection des cellules en présence d'amphotéricine B.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



1. Adler-Moore J.P., Proffitt R. (2002). AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. *J Antimicrob Ther.* N°49 p21-30.
2. Andrès E., Tiphine M., Letscher-Bru V., Herbrecht R. (2001). Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B. Revue de la littérature. *Rev Méd Interne* N° 22 p 141-50.
3. Baginski M., Resat H., Borowski E. (2002). Comparative molecular dynamics simulations of Amphotericin B–cholesterol/ergosterol membrane channels. *Biochimica Biophysica Acta.* N°1567 p 63-78.
4. Baginski M., Resat H., McCammon J.A. (1997). Properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation. *Mol Pharmacol.* N° 52 p560-570.
5. Baran M., Borowski E and Mazerski J. (2009). Molecular modeling of amphotericin B ergosterol primary complex in water II. *Biophysical Chemistry*; N° 141 p162-168.
6. Barratt G., Bretagne S. (2007) Optimizing efficacy of Amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine.* Vol2, N°3 p 301-313.
7. Bedr-Dine H and Khelkhal S. (2003). Effet de quelques acides gras libres sur l'activité antifongique de l'amphotéricine B vis à vis de *Candida albicans*. *Mémoire de master.* Département de biologie moléculaire et cellulaire. Faculté des sciences. Université Aboubekr Belkaid
8. Bellmann R., Egger P., Djanani A., Wiedermann C.J.(2004). Pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in critically ill patients on continuous veno-venous haemofiltration. *International Journal of Antimicrobial Agents.* N°23 p80-83.
9. Benmansour W.(2010). Effet de concentrations croissantes de MgCl<sub>2</sub> et MgSO<sub>4</sub> sur l'activité fongitoxique de l'amphotéricine B. *Mémoire de master.* Département de biologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de l'univers. Université de Tlemcen.
10. Bertagnolio S., DeGaetano D.K., Tacconelli E., Scoppettuolo G., Posteraro B., Fadda G. (2004). Etal.Hospital-acquired candidemia in HIV-infected patients.Incidence,risk factors and predictors of outcome. *JChemother.* N°16 p172-178.
11. Bibb C and Young R.W. (1974). Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments. *The journal of cell biology.* Vol 61 p 327 -343.
12. Bolard J. (1986). How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta.*N° 864 p 257-304.
13. Bolard J., Joly V., Yeni P. (1997). Amphotéricine B : ancien médicament, nouveaux concepts. *Médecine thérapeutique.* Vol 3, N° 3, p 207-213.
14. Bonilla-Marin M., Moreno-Bello M., Ortega-Blake I. (1991). A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel. *Biochim. Biophys. Acta.* N°10 p 61-65.



15. Boucherit-Atmani Z. (2007). Mécanisme d'action des antifongiques polyéniques .Exemple de l'Amphotéricine B. Thèse de Doctorat d'état. Département de biologie moléculaire et cellulaire. Faculté des sciences. Université de Tlemcen.
16. Brittain H.G. (1994). Circular dichroism studies of the self-association of Amphotericin B. *Chirality*. N° 6 p 665-669.
17. Chevrel G. (2009). 300 médicaments injectables. *Ed .Elsevier Masson*. p 261-267.
18. Chandrasekar P. (2006). The experience is CLEAR®. *International Journal of Antimicrobial Agent*. N°27 p31–35.
19. Challis G. L., Hopwood D.A. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci.*N°100 p145-155.
20. Clejan S. and Bittman R. (1985). Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *J Biol Chem*.Vol 260 N°5 p 2884-2889.
21. Cybulska B., Kupczyk K., Szlinder-Richert J., Borowski E. (2002). Comparative in vitro studies on liposomal formulations of amphotericin B and its derivative, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester (MFAME). *Acta Biochim*. Vol 49, N°1 p 67-75.
22. Czub J., Baginski M. (2006). Comparative Molecular Dynamics Study of Lipid Membranes Containing Cholesterol and Ergosterol. *Biophysical journal*. Vol 90, N° 7 p 2368-2382.
23. Datry A., Thellier M., Traoré B., Alfa Cissé O., Danis M. (2001). Utilisation des antifongiques dans le traitement des candidoses systémiques: antifongigramme, point sur les résistances, Données pharmacologiques. *Ann Fr Anesth Réanim*. N°20 p 389-393.
24. Deroure B., Charpentier B., Saliba F., Dürrbach A., (2006). Néphrotoxicité de l'amphotéricine B : mise au point. *Journal de mycologie médicale*.N°16 p 82-86.
25. Dynarowicz-Latka P., Seoane R., Minones J., Velo M. (2002). Study of penetration of amphotericin B in to cholesterol or ergosterol containing dipalmitoylphosphatidylcholine Langmuir monolayers. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*. N°27 p 249-263.
26. Espada R., Valdespina S., Dea M.A., Molero G., Ballesteros M.P., Bolás F., Torrado J.J.(2008).*In vivo* distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol 61 N° 5 p 1125-1131.
27. Gagos M., Herec M., Arczewska M., Czernel G., Serra M.D.S., Gruszecki W. (2008). Anomalously high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: Implications for the biological action. *Biophysical Chemistry*. Vol 136, N°1p 44-49.
28. Gellen-Dautremer J., Lanternier F., Dannaoui E and Lortholary O. (2009). Associations antifongiques invasives. *La revue de Medecine interne*. N° 3 p 72-78.
29. Georgopapadakou N.H., Walsh T.J. (1996). Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob Agents Chemother*. N°40 p 279-291.



30. Gruszecki W.I., Gagos M., Herec M., Kernen P. (2003). Organization of amphotericin B in model lipids membranes. *Amini review, CellMol. Biol. Lett.* 8 / 16.
31. Joly V., Saint-Pierre-Chazalet M., Saint-Julien L., Bolard J., Carbon C. and Yeni P. (1992). Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. *J Infect Dis.* Vol 165, N°2 p 337-343.
32. Jones and Bartlett. (2010). Nurse's Drug Handbook. *Ninth edition:* p 78-81.
33. Jung S.H., Lim D.H., Lee J.E., Jeong K.S., Seong H., Shin B.C. (2009). Amphotericin B entrapping lipid nano particles and their in vitro and in vivo characteristics. *Eur. J. Pharm .Sci.*N°37 p 313–320.
34. Herbrecht R., Letscher V., Andrès E., Cavalier A. (1999). Safety and efficacy of amphotericin B colloidal dispersion. *Chemotherapy.* N°45 p 67–76.
35. Iannitelli, R.C. and Ikawa A.M. (1980). Effect of fatty acids on action of polyene antibiotics. *Antimicrob Agents chemother.* N°17 p 861-864.
36. Kayser O., Olbrich C., Yardley V., Kiderlen A.F., Croft S.L. (2003). Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *International Journal of Pharmaceutics.* Vol 254, N°1 p 73-75.
37. Lemke A., Kiderlen A.F., Kayser O. (2005). Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology.* N° 68 p 151-162.
38. Loredana E.V., Topala C. (2009). The characterizing of the interaction of amphotericin B with cholesteryl esters. *Journal of Molecular Liquid.* N °147 p 135 138.
39. Maltezou H.C. (2010). Drug resistance in visceral leishmaniasis. *Journal of biomidecine and biothechnology*N°20 p 1-8.
40. Mannock D.A., Lewis R.N.A.H., Mc Elhancy R.N. (2010). A calorimetric and spectroscopic comparison of the effects of ergosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta.* N°179 p 376-388.
41. Mariné M., Espada R., Torrado J., Pastor F.J., Guarro J.(2009). Efficacy of a new formulation of amphotericin B in murine disseminated infections by *Candida glabrata* or *Candida tropicalis*. *International Journal of Antimicrobial Agents.*N°34 p 566–569.
42. Marty A., Filkenstein A.J. (1975). *Gen.Physiol.*N°65 p 515.
43. Matsumori N., Eiraku N., Matsuoka S., Oishi T., Murata M., Aoki T and Ide T. (2004). An Amphotericin B-Ergosterol covalent conjugate with powerful membrane permeabilizing activity. *Chimistry and Biology. Elsevier Ed.*N°11 p 673-679.
44. Matsuoka S. and Murata M. (2003). Membrane permeabilizing activity of amphotericin B is affected by chain length of phosphatidylcholine added as minor constituent. *Biochim Biophys Acta.* N°1617 p109-115.



45. Milhaud J., Ponsinet V., Takashi M., Michels B. (2002). Interactions of the drug amphotericin b with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insights in to the role of ergosterol. *Biochim Biophys Acta*. N°1558 p 95-108.
46. Miñones J., Pais S., Conde O., Dynarowicz-Łątka P. (2009). Interactions between membrane sterols and phospholipids in model mammalian and fungi cellular membranes A Langmuir monolayer study. *Biophysical Chemistry* .Vol 140 p 69-77.
47. Norman A.W., Demel R.A., De Kruijff B and Van Deenen L.L. M. (1972). Studies on the biological properties of polyene antibiotics: Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *The journal of biological chemistry*. Vol 247,N°6 p 1918-1929.
48. Rabwkan C., Pornanong A., Kusumarn N., Teerapol S (2011). Bioactivity and toxicity studies of amphotericin B incorporated in liquid crystals. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. N°43 p 308-317.
49. Rao T.V., Trivedi A., Prasad R. (1985). Phospholipid enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on polyene sensitivity. *Can J Microbiol*. Vol31, N°4 p 322-326.
50. Readio J. D., Bittman R. (1982). Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols. *Biochim Biophys Acta*. Vol685, N°2 p 219-224.
51. Ruckwardt T, Scott A., Scott J., Mikulecky P., Hartsel S.C. (1998). Lipid and stress dependence of amphotericin B ion selective channels in sterol-free membranes. *Biochim Biophys Acta*. N°1372 p283-288.
52. Safe L.M., Safe S.H., Subden R.E., Morris D.C. (1977). Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*, *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*. *Can J Microbiol*. Vol 23, N°4 p 398-401.
53. Umegawa Y., Matsumori N., Oishi T., Murata M. (2008). Ergosterol Increases the Intermolecular Distance of Amphotericin B in the Membrane-Bound Assembly As Evidenced by Solid-State NMR. *Biochemistry*. N°47 p 13463-13469.
54. VandeVen H., Paulussen C., Feijens P.B., Matheussen A., Rombaut P., Kayaert P., VandenMooter G., Weyenberg W., Cos P., Maes L., Ludwig A. (2012). PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome. *Journal of Controlled Release*.
55. Vijan L.E., Topala C.M., Oprescu B., Anghel S. (2009). Spectral study of cholesteryllinoleate - amphotericin B interaction and behaviour of cholesteryl esters in electric field. *Electronics and advanced materials. Rapid communication*. Vol 2, N° 9 p 582-586.
56. Whiting RC., Buchanan R.L. (1993). A classification of models for predictivemicrobiology. *Food Microbiol*.N°10 p 175-177.

57. Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S. M., Seifert H., Wenzel R. P., Edmond M. B. (2004). Nosocomial blood stream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* N° 39 p 309-317.
- Yang X., Sheng W., Sun G.Y., Lee J.C.M (2011). Effects of fatty acid unsaturation numbers on membrane fluidity and  $\alpha$ -secretase-dependent amyloid precursor protein processing. *Neurochemistry International*. Vol 58, N°3 p 321–329