

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD-TLEMEN

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 »

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Option : Biochimie Appliquée

Thème

**Etude de l'effet de l'action combinée du pH et des sels sur la toxicité
de l'amphotéricine B**

Présenté par: M^{elle} HAKMI Asmaa

Soutenu le : 01 juin 2015

Devant le jury suivant :

Président : M^{me} BOUCHERIT Zahia.

Examineur : M^{elle} BENARIBA Nabila

Promoteur : M^{me} SARI Lamia.

Maitre de conférences

Maitre de conférences

Maitre de conférences

Année Universitaire : 2014/2015.

Remerciements

Tout d'abord nous remercions le dieu d'avoir donné à l'homme le pouvoir de raisonner d'exploiter les vérités de l'univers.

Ce travail a été effectué au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques: physico-chimie, synthèse et activité biologique » de l'Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.

*Je tiens à remercier profondément **Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia** , professeur à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen, directrice du laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique», de m'avoir accueillie dans son laboratoire, aussi pour sa générosité et sa grande patience d'avoir bien voulu accepter de faire partie de la commission d'examen.*

*Mes sincères remerciements et gratitudes sont adressés à mon promoteur **Madame SARI-BELKHERROUBI Lamia** Maître de conférences Classe A à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Sciences de la Terre et de l'Univers de l'Université Abou bekr Belkaïd Tlemcen qui m'a encadré tout au long de ce mémoire, sans la quelle rien ne serait là aujourd'hui, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, pour ses conseils précieux et ses orientations scientifiques et surtout pour le plaisir qu'elle a su me faire découvrir et la patience nécessaire dans la recherche.*

*J'adresse mes vifs remerciements à **Melle BENARIBA Nabila**. Maitre de conférences au département de biologie Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.*

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements à toute personne qui a participé de près ou de loin pour l'accomplissement de ce modeste travail.

Résumé

L'amphotéricine B est actuellement le traitement de référence des mycoses systémiques malgré sa toxicité vis-à-vis des cellules animales, qui est liée à son insolubilité en milieu aqueux.

Pour cette raison diverses formulations lipidiques d'amphotéricine B ont été développées afin d'augmenter son index thérapeutique mais qui reste malheureusement trop onéreuse.

Plusieurs stratégies ont été proposées pour améliorer l'index thérapeutique de l'amphotéricine B dont la modulation de l'environnement physico-chimique. Le pH de la solution joue un rôle important dans l'activité de cette molécule.

C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de l'action combinée du pH et des sels $MgSO_4$ et $MgCl_2$ sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B envers les globules rouges humaines.

Il ressort de notre travail que la présence des sels $MgSO_4$ et $MgCl_2$ réduit la toxicité de Fungizone[®] envers les globules rouges humaines mais cette réduction est beaucoup plus importante en présence de $MgSO_4$ qu'en présence de $MgCl_2$.

A pH 5,4 la Fungizone[®] est moins toxique. Le taux d'hémolyse est réduit en présence de $MgSO_4$ à concentration égale à $10^{-1}M$.

Mots clés : Amphotéricine B, Fungizone[®], toxicité sélective, pH, érythrocytes, $MgSO_4$, $MgCl_2$.

Abstract

Amphotericin B is currently the standard treatment of systemic fungal infections despite his vis-à-vis toxicity animal cells, which is related to its insolubility in aqueous medium. For this reason various lipid formulations of amphotericin B have been developed to increase the therapeutic index but which is unfortunately too expensive.

Several strategies have been proposed to improve the therapeutic index of amphotericin B with the modulation of the physico-chemical environment. The pH of the solution plays an important role in the activity of this molecule.

That is why we have studied the effect of the combined action of pH and MgSO₄ and MgCl₂ salts on selective toxicity of amphotericin B to human red blood cells.

It is clear from our work that the presence of MgSO₄ and MgCl₂ salts reduces the toxicity of Fungizone® towards human red blood cells but this reduction is much greater in the presence of MgSO₄ in the presence of MgCl₂.

At pH 5.4 the Fungizone® is less toxic. The hemolysis rate is reduced in the presence of MgSO₄ concentration equal to 10⁻¹M.

Keywords: Amphotericin B, Fungizone®, selective toxicity, pH, erythrocytes, MgSO₄, MgCl₂.

ملخص

ال amphotéricine B هو حاليا العلاج القياسي من الالتهابات الفطرية الجهازية على الرغم من سمية خلايا الحيوان وجها لوجه، والذي يرتبط إلى الذوبان في وسط مائي. لهذا السبب وضعت مختلف الصيغ الدهون من ال amphotéricine B لزيادة مؤشر العلاجي ولكن الذي هو للأسف مكلفة للغاية.

وقد اقترحت عدة استراتيجيات لتحسين المؤشر العلاجي لل amphotéricine B مع تعديل البيئة الفيزيائية والكيميائية. ال pH للمحلول تلعب دورا هاما في نشاط هذا الجزيء. هذا هو السبب في أننا درسنا تأثير العمل المشترك من درجة الحموضة و الأملاح $MgSO_4$ و $MgCl_2$ عن سمية ال amphotéricine B لخلايا الدم الحمراء البشرية. ويتضح من عملنا أن وجود الأملاح $MgSO_4$ و $MgCl_2$ يقلل من سمية $Fungizone^{\text{®}}$ نحو خلايا الدم الحمراء في الانسان ولكن هذا التخفيض هو أكبر بكثير في ظل وجود $MgSO_4$ و في وجود $MgCl_2$. في pH 5,4 ال $Fungizone^{\text{®}}$ هو أقل سمية. يتم خفض معدل انحلال الدم في وجود تركيز $MgSO_4$ يساوي $10^{-1} M$.

كلمات البحث: ال amphotéricine B، $Fungizone^{\text{®}}$ ، سمية انتقائية، درجة الحموضة، الكريات الحمراء، $MgSO_4$ ، $MgCl_2$.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. INTRODUCTION.....	2
2. STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'AMPHOTERICINE B.	4
3. MECANISME D'ACTION DE L'AMPHOTERICINE B.....	5
4. NOUVELLE FORMULATION DE L'AMPHOTERICINE B.....	7
4.1. Modification de la structure chimique de l'amphotéricine B.....	7
4.2. Modification de la composition chimique de l'amphotéricine B.....	7
4.3. Combinaison aux lipides.....	8
4.4. Combinaison aux lipoprotéines.....	9
4.5. Combinaison aux polymères.....	9
4.6. Modification de l'environnement physico-chimique de l'amphotéricine B.....	9
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES	12
1. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	13
2. Préparation des solutions antifongique.....	13
3. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges.....	13
TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION	15
1. Effet de la concentration croissante de Fungizone®	18
2. Effet des solutions de Fungizone® (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées à pH 5,4 et additionné de sels sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.....	20
3. Effet des solutions de Fungizone® (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées dans l'eau physiologique et additionné de sels sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.....	22
4. Effet de la nature du solvant.....	24
5. Effet de la concentration croissante de MgSO ₄	26
5.1. Dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique (100mM) à pH 5,4.....	26
5.2. Dans l'eau physiologique.....	28

6. Effet de la concentration croissante de $MgCl_2$	30
6.1. Dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique (100mM) à pH 5,4.....	30
6.2. Dans l'eau physiologique.....	32
QUATRIEME PARTIE : CONCLUSION GENERALE.....	34
CINQUIEME PARTIE : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	36

LISTE DES FIGURES

Figure N°01 : Structure chimique de l'amphotéricine B.....	5
Figure N°02 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	6
Figure N°03 : Interaction amphotéricine B-cholestérol.....	6
Figure N°04 : Effet de la solution Tampon pH 5,4 , de la solution MgSO ₄ ,et de la solution MgCl ₂ sur la fuite de l'hémoglobine extracellulaire chez le globule rouge humain en absence d'antifongique.....	17
Figure N°05 : Effet de la concentration finale croissante de Fungizone [®] solubilisée à 10 ⁻⁴ M dans l'eau physiologique sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.....	19
Figure N°06 : Effet des solutions de Fungizone [®] (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées à pH 5,4 et additionné de sels (à 10 ⁻³ M) sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.....	21
Figure N°07 : Effet des solutions de Fungizone [®] (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées dans l'eau physiologique et additionnées de sels (à 10 ⁻³ M) sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.....	23
Figure N°08 : Effet de la nature du solvant des solutions de Fungizone [®] , sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.....	25
Figure N°09 : Effet des concentrations croissantes de MgSO ₄ sur la toxicité de la Fungizone [®] (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées à pH 5,4 envers les globules rouges humains.....	27
Figure N°10 : Effet des concentrations croissantes de MgSO ₄ sur la toxicité de la Fungizone [®] (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées dans l'eau physiologique envers les globules rouges humains.....	29
Figure N°11 : Effet des concentrations croissantes de MgCl ₂ sur la toxicité de la Fungizone [®] (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées à pH 5,4 envers les globules rouges humains.....	31
Figure N°12 : Effet des concentrations croissantes de MgCl ₂ sur la toxicité de la Fungizone [®] (concentration finale 10 ⁻⁵ M) préparées dans l'eau physiologique envers les globules rouges humains.....	33

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

1. Introduction :

Au cours de ces dernières années, l'incidence des infections fongiques ou mycoses systémiques a augmenté de façon dramatique. Ces affections constituent actuellement un vrai problème clinique et économique. Elles sont en forte recrudescence, en raison de l'extension de la population à risque, 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, 2003).

Ces infections sont associées à une élévation significative de la morbidité et de la mortalité des patients hospitalisés (Blanchet et coll., 2004).

Le nombre de champignons incriminés en pathologie humaine est passé de moins d'une trentaine d'espèces dans les années 50 à plus de 400 aujourd'hui (Chabasse et coll., 2005).

Les infections à levures, principalement *Candida*, représentent la principale cause des infections fongiques nosocomiales (80%). Les souches de *Candida* peuvent produire une grande variété d'infections, allant des infections légères mucocutanées aux infections invasives affectant un organe (Rex et coll., 2000). Il existe au-delà de 150 espèces de *Candida*. Cependant, *Candida albicans* est responsable d'environ 50% des Candidoses profondes devant *C.glabrata*, *C.parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei*. La proportion des espèces non-albicans varie en fonction des pathologies à risque, de l'âge des patients et des zones géographiques (Gigou-Cornet, 2006).

Ces infections mycosiques nécessitent donc un traitement systémique particulier. Depuis l'apparition de l'amphotéricine B en 1955 jusqu'aux antifongiques les plus récents (tableau 1), les chercheurs et les industriels n'ont pas cessé de mettre sur le marché des molécules antifongiques avec un rapport bénéfice/risque de plus en plus favorable (Faure, 2009).

Tableau N°01: Molécules antifongiques utilisées pour le traitement des mycoses systémiques (Lacroix et coll., 2003).

Classes	Composés antifongiques	Année de commercialisation	Cible
Polyènes	AmphotéricineB(Fungizone®)	1958	Membrane plasmique
Azolés	Fluconazole (Triflucan®)	1988	Membrane plasmique
	Itraconazole (Sporanox®)	1992	
	Voriconazole (Vfend®)	2002	
Analogues nucléosidiques	5-fluoro-cytosine (Ancotil®)	1972	Acides nucléiques
Echinocandines	Caspofungine (Cancidas®)	2001	Paroi fongique

D'un autre côté, malgré la diversité des médicaments antifongiques, leur pharmacocinétique complexe et variable, rend difficiles les études cliniques proposant des recommandations. Si le suivi thérapeutique de l'amphotéricine B n'est pas nécessaire, celui de la fluorocytosine et de l'itraconazole est indispensable (Blachet et coll., 2004).

Le cout du traitement est lui aussi, un élément important dans la stratégie thérapeutique. Le cout de revient par le fluconazole est nettement plus élevé que celui de l'amphotéricine B, quant au voriconazole et à la caspofungine, ils coutent trois fois plus cher que le fluconazole mais la résistance à ce dernier peut justifier leur utilisation (Kettani et coll., 2006).

En attendant le développement de nouveaux antifongiques, le coût de revient, le spectre d'action, la résistance relativement rare de champignons pathogènes à l'amphotéricine B, chez les isolats cliniques (Kanafani et Perfect, 2008), font du chef de file des polyènes, le traitement de référence de ces mycoses invasives (Aseandei et Luchian, 2008). Cependant, la toxicité de cet antifongique limite son utilisation en clinique, c'est pourquoi il est indispensable d'améliorer l'index thérapeutique de cette drogue. C'est dans ce cadre là que s'inscrit notre étude, qui consiste à étudier l'effet de l'action combinée du pH et des sels sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B.

L'amphotéricine B est la plus connue des antifongiques polyéniques. Introduite en pratique clinique en 1958, elle est le traitement de choix des infections fongiques systémiques (Hartsel et Bolard, 1996). Elle présente une activité fongistatique à faible concentration et fongicide pour des concentrations élevées (0,5 à 2 fois la concentration minimale inhibitrice). L'amphotéricine B est active sur la plupart des fungi pathogènes (Blanchet et coll., 2004). Elle est utilisée actuellement dans le traitement d'un grand nombre des mycoses profondes (cryptococcose, candidose, aspergillose, histoplasmoses, coccidioidomycoses, sporotrichoses...). Rares sont les souches résistantes à l'amphotéricine B (Kleinberg, 2006).

Elle est également antiparasitaire de premier ordre, utilisée pour traiter les leishmanioses et certaines amibiases (Cohen et Jacquot, 2008).

L'absorption de l'amphotéricine B par le tractus gastro-intestinal est négligeable, ce qui entrave grandement son administration par voie orale. Dans le sérum, le polyène est fortement lié aux protéines plasmatiques et surtout aux lipoprotéines, il est aussi très lié aux tissus, les plus fortes concentrations se trouvant au niveau du foie et de la rate (14 à 41% de la dose administrée), des taux plus faibles étant retrouvés dans les reins (0,3 à 2%) et les poumons (1,2 à 6%) (Marquet, 2004).

2. Structure et propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B :

L'amphotéricine B est un antibiotique isolé à partir d'une culture de *Streptomyces nodosus* dont la structure a été établie en 1970. Elle fait partie de la famille des macrolides (molécule cyclique fermée par une liaison ester interne) polyéniques (Hammond, 1977).

Son poids moléculaire est de 960 (Carbon et coll., 1994). Elle comprend une partie apolaire rigide, constituée de 7 double liaisons conjuguées, responsable de la lipophilie de la molécule et d'un intense spectre d'absorption qui permet des études spectroscopiques. Une partie polaire rigide constituée de 7 groupe hydroxyles. Elle comprend aussi un aminosucre ; la micosamine (figure N°1), (Hammond, 1977).

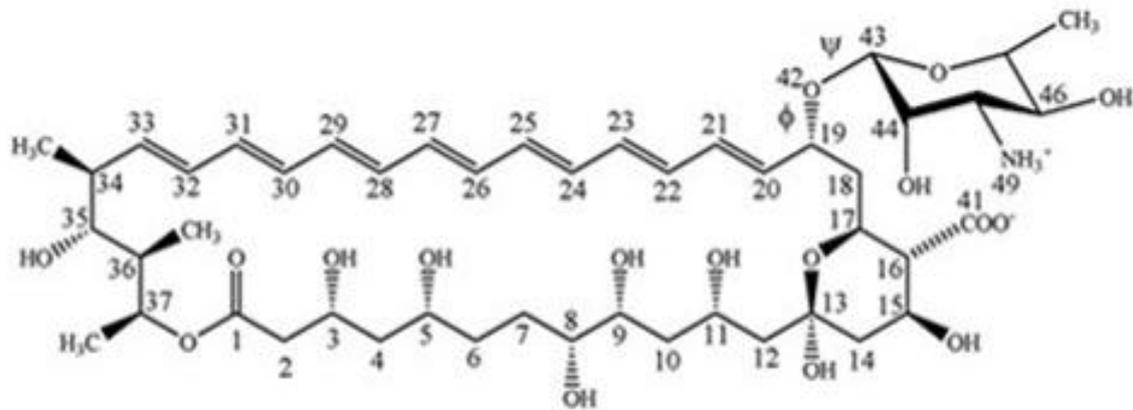


Figure N°01 : Structure chimique de l'amphotéricine B (Gagos et Arczewska, 2010).

L'amphotéricine B est une poudre jaune insoluble dans l'eau et dans l'alcool, soluble dans les solvants organique tel le dimethylsulfoxyde (DMSO) (30 à 40 mg/mL) ou le dimethylformamide (DMF) (4 mg/mL). Son association à des sels biliaries, tel le désoxycholate de sodium, entraine la formation de micelles mixtes qui permet de solubiliser l'amphotéricine B. L'exposition à la lumière dégrade légèrement la molécule (Collignon et coll., 2007).

En solution aqueuse, l'amphotéricine B existe à l'état de monomères solubles, d'oligomères solubles et d'agrégats insolubles qui se forment successivement lorsque la concentration totale d'amphotéricine B augmente (Collignon et coll., 2007).

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

L'amphotéricine B a pour cible l'ergostérol, le principal composant de la membrane plasmique des champignons. Son caractère amphotère lui permet de s'associer à la bicouche lipidique de la membrane fongique, en formant des pores (Lemke et coll., 2005). La formation des pores ou des canaux cause une dépolarisation de la membrane et une augmentation de la perméabilité cellulaire avec la perte du contenu cytoplasmique (Figure N° 02). La fuite des ions potassium et l'entrée des ions sodium et de protons H^+ altère la viabilité cellulaire, et entraine la mort de la cellule fongique [(Mc Taggart et Wong, 2002) ; (Bernardo et coll., 2004) ; (Clinton et Duane, 2008)].

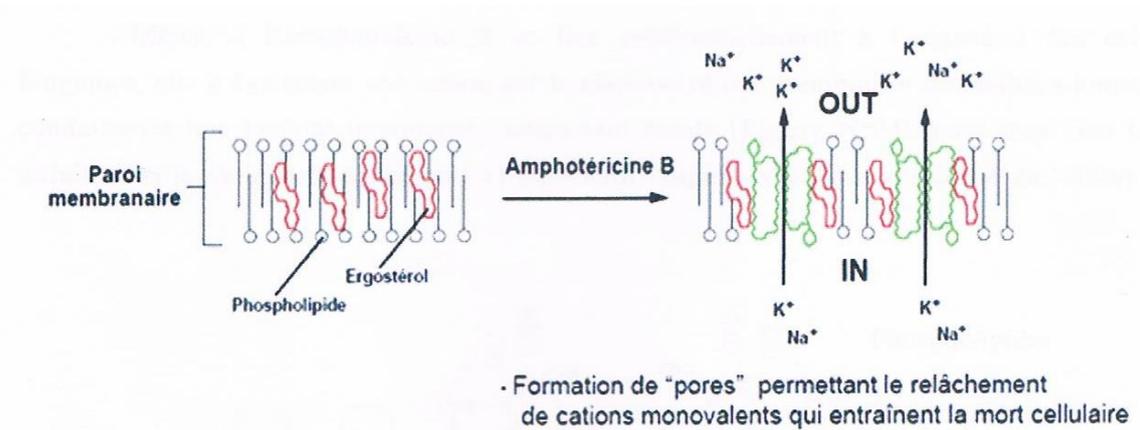


Figure N° 02 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B (Million, 2006).

D'autres hypothèses ont été formulées sur le mécanisme d'action de l'amphotéricine B :

- L'amphotéricine B agit sur la stimulation de la consommation d'oxygène ; de plus la transformation de l'ATP en ADP diminuent la synthèse des composés azotés, des réserves glucidiques avec fuite de potassium et de métabolite essentiels [(Desormeaux, 2002) ; (Grooters et Taboada, 2003)].

- L'amphotéricine B pourrait être responsable d'une réaction oxydative et stimulation de l'immunité cellulaire de l'hôte. Elle stimulerait les lymphocytes, les macrophages, et les polynucléaires neutrophiles et induirait la production d'interleukine-1 et du TNF α (Tumor Necrosis Factor α) (Scott et Miller, 2001).

Même si l'amphotéricine B se fixe préférentiellement à l'ergostérol des cellules fongiques, elle a également une action sur le cholestérol des membranes des cellules animales (Figure N°03), conduisant à une toxicité importante, notamment rénale, mais avec une faible affinité pour le cholestérol par rapport à l'ergostérol (Gigou-Cornet, 2006).

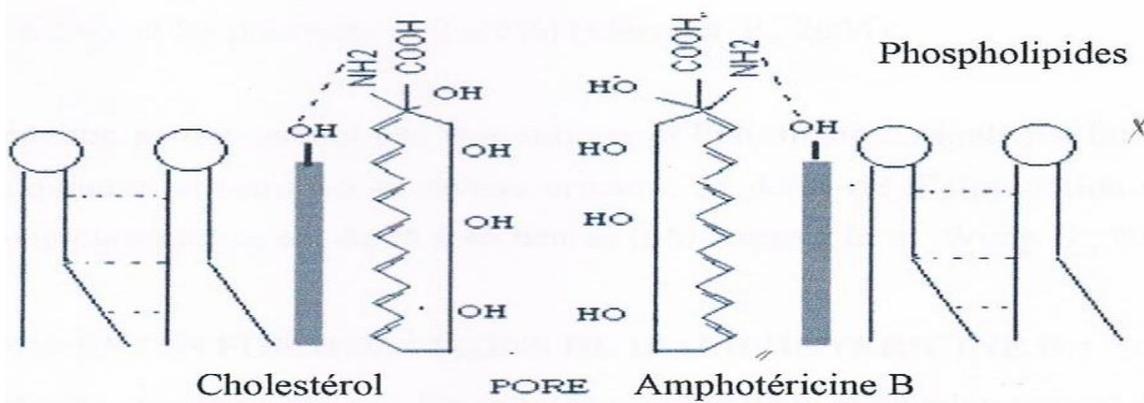


Figure N° 03: Interaction amphotéricine B- cholestérol (Yolandy, 2006).

4. Nouvelles formulations de l'amphotéricine B :

Durant la dernière décennie en vue d'améliorer l'index thérapeutique de l'amphotéricine B, différentes stratégies ont été adoptées et mises en œuvre pour mettre au point une méthode optimale de préparation du médicament : par exemple, encapsuler l'amphotéricine B dans les liposomes phospholipidiques, l'entourer par les molécules d'un surfactant, l'associer à un lipide pour créer un complexe ou l'insérer dans une émulsion (Dupont, 2002).

4.1. Modification de la structure chimique :

Il s'agit d'une semi-synthèse qui aboutit à des dérivés solubles de l'amphotéricine B par substitution de groupements ionisables (NH^{3+} et COO^-). Les dérivés les plus intéressants étant : le PAME [N-(1-Piperidinepropionyl) amphotéricine B Méthyl Ester] qui est nettement moins toxique que l'amphotéricine B conventionnelle (Hac-Wydro et coll., 2005), le SAME [N-N'-3-diméthyl aminopropyl-Succinimido amphotéricine B Méthyl Ester] qui favorise une bonne interaction hydrophobe avec les milieux apolaires (Czub et coll., 2007) et l'AMA [amphotéricine B-3- (N'N'-diméthylamino) propylamide] utilisé dans la vectorisation d'oligonucléotides anti-sens (ODN) dans les cellules animales [(Hianik et coll., 2008) ; (Czub et coll., 2009)].

4.2. Modification de la composition chimique :

C'est une voie qui consiste à créer un environnement d'inclusion ou d'adsorption pour l'amphotéricine B basée sur des mélanges sous forme de complexes, d'émulsions, ou de phases structurées (liposome, particules,...) entre l'antifongique et les molécules biologiquement tolérées [(Hennequin et coll., 2010) ; (Shao et coll., 2010)].

En effet, les associations amphotéricine B /détergents ont donné des résultats très encourageants. Les dérivés hydrosolubles du cholestérol, des polyoxéthyléneglycols sont capables d'assurer une protection totale des globules rouges contre l'effet toxique de cette drogue. L'ester de sucrose augmente significativement la dose létale à 50% de la Fungizone[®] après une injection unique chez la souris [(Gruda et coll., 1991) ; (Tasset et coll., 1991)].

4.3. Combinaison aux lipides :

Le principe des amphotéricine B lipidiques repose sur le captage préférentiel par le système réticulo-endothélial avec libération progressive d'amphotéricine B, plus particulièrement au site de l'infection. Ce mode de transfert de l'amphotéricine B protège les cellules de l'organisme, en particulier les cellules rénales.

Les formulations lipidiques d'amphotéricine B commercialisées actuellement dans le monde sont (Andrès et coll., 2001) :

- **Amphotéricine B en complexe lipidique (Abelcet[®]) :**

L'amphotéricine B en complexe lipidique (amphotericin B lipid complex [ABLC]), commercialisée sous le nom d'Abelcet[®], est une suspension d'amphotéricine B et de phospholipides (dimyristoyl phosphatidylcholine et dimyristoyl phosphatidylglycérol, selon un ratio de 1 : 3). Les particules forment des rubans de 1 600 à 6 000 nm de long.

- **Amphotéricine B incorporée dans les liposomes (Ambisome[®]) :**

L'Ambisome[®] correspond à une formulation lipidique d'amphotéricine B incorporée dans des liposomes unilamellaires. Ces liposomes sont constitués de phosphatidylcholine hydrogéné, de cholestérol et de distéaroyl phosphatidylglycérol, selon un rapport de 2 /1/0,8. Ils forment des sphères de 80 nm de diamètre.

- **Amphotéricine B en dispersion colloïdale (Amphocil[®]) :**

L'amphotéricine B en dispersion colloïdale (amphotericin B colloidal dispersion [ABCD]), commercialisée sous le nom d'Amphocil[®] en Europe et d'Amphotec[®] aux Etats-Unis, est composée d'amphotéricine B liée à du sulfate de cholestérol, selon un mélange équimolaire. Les particules ont une forme de disque de 120 à 140 nm de diamètre et de 4 nm d'épaisseur. L'avantage de ces différentes formulations lipidiques c'est la réduction de la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des cellules hôtes et la préservation et l'augmentation de l'efficacité vis-à-vis des cellules fongiques.

Malheureusement, ces formulations lipidiques ont un cout de revient important ce qui limite significativement leur utilisation en clinique.

4.4. Combinaison aux lipoprotéines :

L'amphotéricine B se lie aux LDL (Low density of lipoprotein) et aux HDL (High density of lipoprotein). Ces lipoprotéines sériques assurent la protection des globules rouges humains même en présence des concentrations élevées en amphotéricine B, mais l'effet protecteur des HDL est supérieur à celui observé avec les LDL [(Bedrane, 1997) ; (Boucherit, 1995)].

D'un autre côté, le complexe amphotéricine B / lipoprotéines sériques lourdes (HDL) protège les cellules animales jusqu'à une concentration de 10 µg/mL (10 fois la concentration minimal inhibitrice). Il est à noter que dans ces conditions, son efficacité vis-à-vis des levures reste inchangée [(Wasan et coll., 1994a) ; (Boucherit, 1995) ; (Bedrane, 1997) ; (Soulimane, 2001)].

4.5. Combinaison aux polymères :

Les polymères composés de segments hydrophiles et hydrophobes [(Hans et coll., 2005) ; (Jiang et coll., 2008)] peuvent être employés en tant que véhicules de livraison de drogue très peu hydrosolubles [(Riss, 2003) ; (Layre et coll., 2006)] comme l'amphotéricine B. Citons comme exemple : les copolymères amphiphilic [poly hyperbranched (amine-ester) – poly (lactide-Co-glycolide)] micelles polymères (HPAE-Co-PLGA) (Wang et coll., 2010) et un copolymère de trois esters de cholestéryle carbonate (CCEs) : carbonates de cholestéryle de sodium, carbonates de palmityl de cholestéryle, et carbonates de dicholestéryl (Chuealee et coll., 2010).

4.6. Modification de l'environnement physico-chimique de l'amphotéricine B :

Rappelons qu'en solution aqueuse l'amphotéricine B se trouve sous trois formes différentes (Bolard, 1991) :

- une forme monomérique soluble non toxique pour les cellules animales.
- une forme oligomérique soluble toxique pour les cellules animales.
- une forme agrégée insolubles toxique pour les cellules animales hôtes.

L'état d'agrégation de la molécule peut être modulé par son environnement physico-chimique (Hung et coll., 1988). Selon Legrand et coll. (1992) la concentration de la solution mère et la nature du solvant favorisent la prédominance des différentes formes d'amphotéricine B. D'après leur étude, plus la concentration de la solution mère augmente plus le taux d'agrégats augmente. D'autre part, le diméthyl sulfoxyde (DMSO) favorise plus de formes agrégées que le diméthyl formamide (DMF) (Eneida et coll., 2009).

D'un autre côté, le préchauffage des solutions d'amphotéricine B à 70⁰ C pendant 20 minutes induit la formation de super agrégats, qui sont de loin les formes les moins toxiques envers les cellules animales. Il s'agit d'une condensation entre les formes monomériques et les agrégats qui donnent cet état super agrégé de la molécule. Ces super agrégats restent actifs envers les cellules fongiques cibles [(Gaboriau et coll., 1997a) ; (Gaboriau et coll., 1997b) ; (Petit et coll., 1998)].

Le pH module lui aussi l'état d'agrégation de l'amphotéricine B. En milieu alcalin, l'agrégat passe d'une forme plus compacte à une forme plus expansée à partir de pH 9, puis se dissocie pour des pH supérieurs à 10 (Dupont et coll., 1977). Selon Gagos et coll. (2008), l'amphotéricine B est sous forme de monomères aux pH supérieurs à 10, alors que les agrégats apparaissent aux $3 < \text{pH} < 10$.

L'activité de l'antifongique est elle aussi modulée en fonction du pH du milieu. A pH acide la CMI (concentration minimale inhibitrice) de l'amphotéricine B pour le *Candida*, le *Cryptococcus* et l'*Aspergillus*, est plus élevée que celle observée à des pH plus élevés [(Te Dorsthorst et coll., 2004) ; (Te Dorsthorst et coll., 2005)].

De plus, Belkherroubi-Sari et ses collaborateurs (2008), ont montré que l'efficacité de l'amphotéricine B utilisée à une concentration finale de 2 μM à pH 5,4 et 10,8, est maintenue vis-à-vis de *Candida albicans* avec une importante réduction de la toxicité vis-à-vis des globules rouges humains. Par ailleurs à pH 5,4 ils (Belkherroubi-Sari et coll., 2011) ont observés une réduction de la toxicité rénale et hépatique avec un maintien de l'efficacité antifongique chez les rats contaminés par *Candida albicans*. Il a été noté également qu'à pH 5,4 la dormance des levures *Candida albicans* est observée d'une part avec une augmentation du taux d'inhibition de la croissance levurienne en comparaison avec la solution de Fungizone[®] classique qui, elle, permet une croissance optimale après la phase de dormance des levures (Belkherroubi-Sari et coll., 2013).

D'un autre côté selon Toledo-Grijalba et coll. (2006), les anions sulfates, citrate et phosphate, réduisent la solubilité de l'amphotéricine B ce qui augmente la proportion des agrégats insolubles. Alors que les anions thiocyanate et trichloracétate solubilisent complètement l'amphotéricine B et ses dérivés. La force ionique joue elle aussi un rôle dans la répartition des formes d'amphotéricine B, où il a été observé que l'augmentation de la force ionique diminuerait la concentration des monomères de l'AmA (amphotéricine B 3-diméthylaminopropylamide) (Blanc et coll., 2000) et du MFAME (N-méthyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester) (Szlinger-Reichert et coll., 2001).

Quant aux travaux de Boucherit et coll. (2011), ils ont mis en évidence le rôle de l'environnement ionique de l'amphotéricine B sur la modulation de sa toxicité sélective. En effet, une réduction de la toxicité cellulaire est observée en présence des sels (MgSO_4 et MgCl_2) avec un maintien de l'activité.

Suite à l'ensemble de ces travaux, il nous a semblé indispensable d'étudier l'effet combiné du pH et de l'addition des sels sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été effectué au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » de l'Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.

1. Préparation de la suspension érythrocytaire :

Du sang fraîchement prélevé provenant d'un donneur unique en apparence sain 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 pH 7,4 10mM (NaCl 150mM), puis suspendue à nouveau dans ce même tampon.

2. Préparation des solutions antifongiques :

Pour la préparation des solutions antifongiques, nous avons utilisé :

- Le Fungizone[®] provenant des laboratoires Bristol-Meyers Squibb, poudre pour solution injectable dont la composition pour 100 mg de produit final est: 50 % d'amphotéricine B, 38,75 % de désoxycholate de sodium qui facilite la solubilisation de l'amphotéricine B dans un milieu aqueux, 10% de phosphate disodique dodécahydraté et 0,887% de phosphate monosodique dihydraté.
- Le tampon acétate de sodium/ acide acétique 100mM à pH 5,4. (Test)
- Le tampon phosphate salé pH 7,4 10mM (NaCl 150mM) (PBS). (Lavage)
- Solution de MgSO₄ à 1M.
- Solution de MgCl₂ à 1M.

À partir d'une solution mère de Fungizone[®] à 10⁻²M solubilisée dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde), nous avons préparé des solutions de Fungizone[®] à une concentration de 10⁻⁴M aussi bien dans le tampon acide acétique/ acétate de sodium 0,1 M à pH 5,4, que dans l'eau physiologique à pH 7,4.

3. Evaluation de la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges :

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

Après l'addition de la solution antifongique à une concentration finale de 10⁻⁵M, la suspension érythrocytaire est incubée à 37°C sous agitation continue pendant 120 minutes. 500µL sont prélevés, à partir de la solution réactionnelle, à intervalle du temps. À ces prises d'essai, sont ajoutés 2mL d'une solution de lavage glacée (NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM).

Après centrifugation à 4000 tours/minutes pendant 5 minutes, le surnageant est récupéré sur lequel nous avons dosé l'hémoglobine extracellulaire par spectrophotomètre à une longueur d'onde $\lambda = 548$ nm.

Pour déterminer le contenu cellulaire total en hémoglobine, 500µL de la solution érythrocytaire témoin (où aucune addition n'a été faite) et 2 mL d'eau distillée sont

additionnées et suite à une forte agitation, les cellules sont totalement lysées, ce qui correspond à 100% d'hémoglobine.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'amphotéricine B est un antifongique qui mis à part son action thérapeutique a de lourds effets toxiques, tels l'anémie et l'endommagement des reins. Mais l'incidence croissante des infections fongiques profondes potentiellement mortelles et l'indisponibilité d'un antifongique alternatif à large spectre contre ces mycoses, empêchent l'abandon de l'utilisation de l'amphotéricine B en clinique et encouragent les recherches qui visent à trouver une solution améliorant l'index thérapeutique de cet antifongique (Schöffski et coll., 2000).

Au sein de notre laboratoire Belkherroubi-Sari et ses collaborateurs (2008-2012-2013), ont montré que la toxicité de l'amphotéricine B vis-à-vis des globules rouges dépend du pH de la solution mère. Ils ont remarqué d'un part que cette toxicité est largement réduite dans des conditions de pH 5,4 et ce, aussi bien *in vitro* que *in vivo*. D'autre part que l'efficacité antifongique été maintenue dans ces conditions expérimentales.

De plus les travaux de Boucherit et ses collaborateurs (2011), ont mis en évidence le rôle de l'environnement ionique de l'amphotéricine B sur la modulation de sa toxicité sélective. En effet, une réduction de la toxicité cellulaire est observée en présence des sels ($MgSO_4$ et $MgCl_2$) avec un maintien de l'activité.

C'est pourquoi nous avons étudié l'effet de l'action combinée du pH et des sels sur la toxicité sélective de l'amphotéricine B.

Nous avons dans un premier temps testé l'innocuité du solvant utilisé pour la solubilisation de l'antifongique. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°01.

La figure N°04 représente l'effet de la solution Tampon pH 5,4, de la solution $MgSO_4$, et de la solution $MgCl_2$ sur la fuite de l'hémoglobine extracellulaire chez le globule rouge humain en absence d'antifongique.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'utilisation du tampon acétate de sodium/acide acétique 100mM à pH 5,4 ou de sels en absence de Fungizone[®] n'entraîne aucune hémolyse (hémolyse < 1%) au bout des 120 minutes d'incubation.

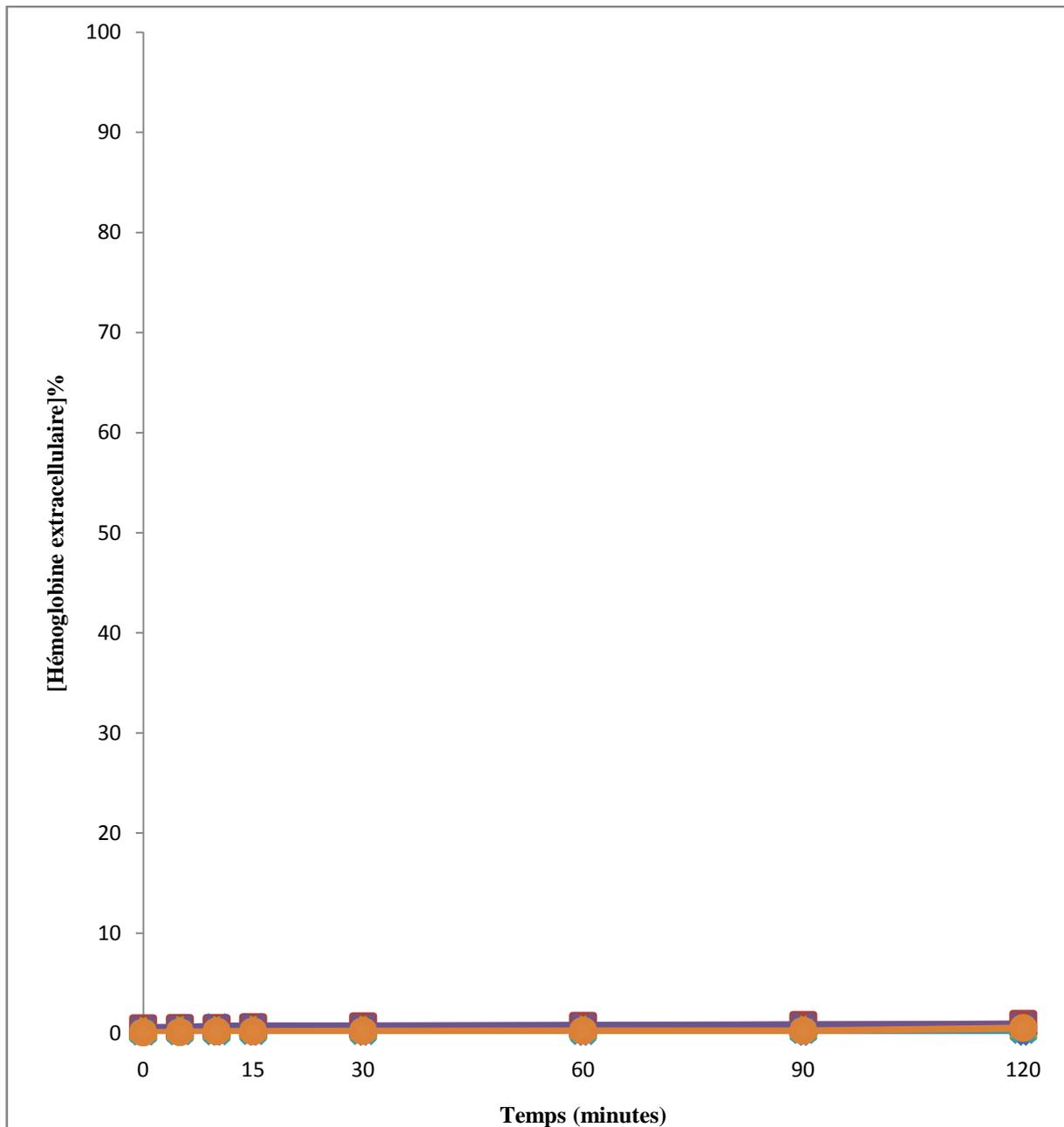


Figure N°04 : Effet de la solution Tampon pH 5,4 , de la solution MgSO₄ ,et de la solution MgCl₂ sur la fuite de l'hémoglobine extracellulaire chez le globule rouge humain en absence d'antifongique.

- ◆— courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Contrôle Tampon pH 5,4
- ▲— courbe (c) : Contrôle MgSO₄
- ×— courbe (d) : Contrôle MgCl₂
- ✦— courbe (e) : Contrôle Tampon pH 5,4+MgSO₄
- courbe (f) : Contrôle Tampon pH 5,4+MgCl₂

1. Effet de la concentration croissante de Fungizone[®] :

Afin de fixer la concentration d'antifongique avec laquelle nous allons tester nos différentes formulations, nous avons fait des courbes doses/réponses. Nous avons fait varier la concentration finale de Fungizone[®]. Les résultats obtenus sont regroupés sur la figure N°05.

- La courbe (a) représente la courbe témoin où il n'y a aucune addition d'antifongique. Nous n'observons pas d'hémoglobine dans le milieu extracellulaire durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] ajoutée à une concentration finale de 10^{-5} M. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 38% après 15 minutes et ne dépasse pas un taux de 60% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-4} M. Après 30 minutes d'incubation, les globules rouges perdent 62% de leur hémoglobine. Cette perte est autour de 70% après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-3} M. Les globules rouges perdent 65% de leur hémoglobine dès les 15 premières minutes d'incubation, et environ 80%, après 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous avons choisi la concentration finale de 10^{-5} M puisqu'elle induit le moindre taux d'hémolyse.

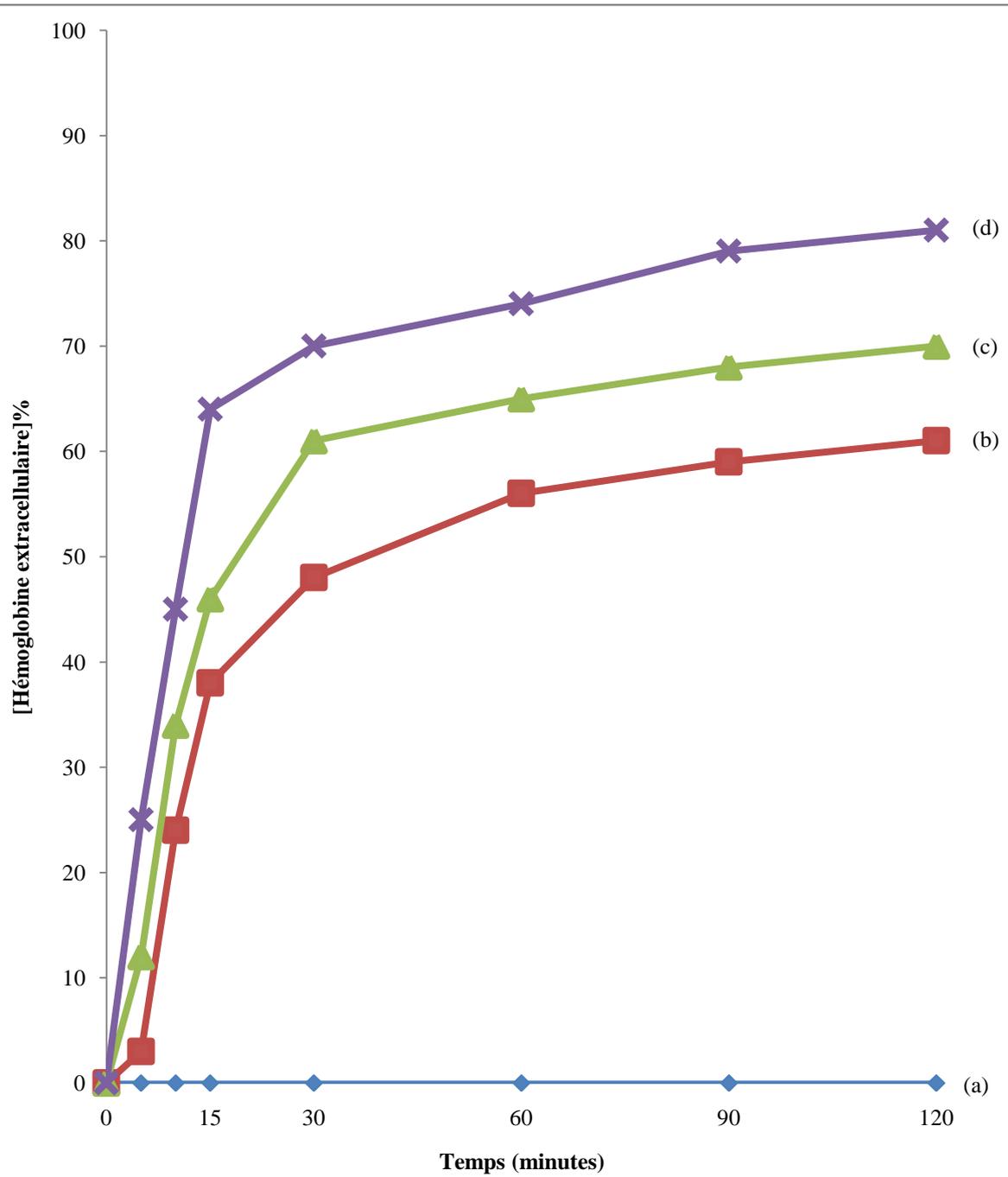


Figure N°05 : Effet de la concentration finale croissante de Fungizone® solubilisée à $10^{-4}M$ dans l'eau physiologique sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- ◆— courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Concentration Finale de Fungizone® 10-5M
- ▲— courbe (c) : Concentration Finale de Fungizone® 10-4M
- ×— courbe (d) : Concentration Finale de Fungizone® 10-3M

2. Effet des solutions de Fungizone[®] (concentration finale 10^{-5} M) préparées à pH 5,4 et additionné de sels sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

La figure N°06 représente l'effet des solutions de Fungizone[®] (concentration finale 10^{-5} M) préparées à pH 5,4 et additionné de sels sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition d'antifongique. Nous n'observons pas d'hémolyse durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée à pH 5,4. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 25% après 30 minutes et ne dépasse pas un taux de 60% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée à pH 5,4 additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Les globules rouges perdent en 30 minutes près de 10 % de leur hémoglobine et autour de 25% après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée à pH 5,4 additionné de solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Après 15 minutes d'incubation, les globules rouges perdent 15% de leur hémoglobine. Cette perte est estimée à 40% au bout de 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'addition de sel au milieu réactionnel permet de réduire le taux d'hémolyse, ce taux est réduit de 35% avec $MgSO_4$ alors qu'il est réduit de 20% avec $MgCl_2$.

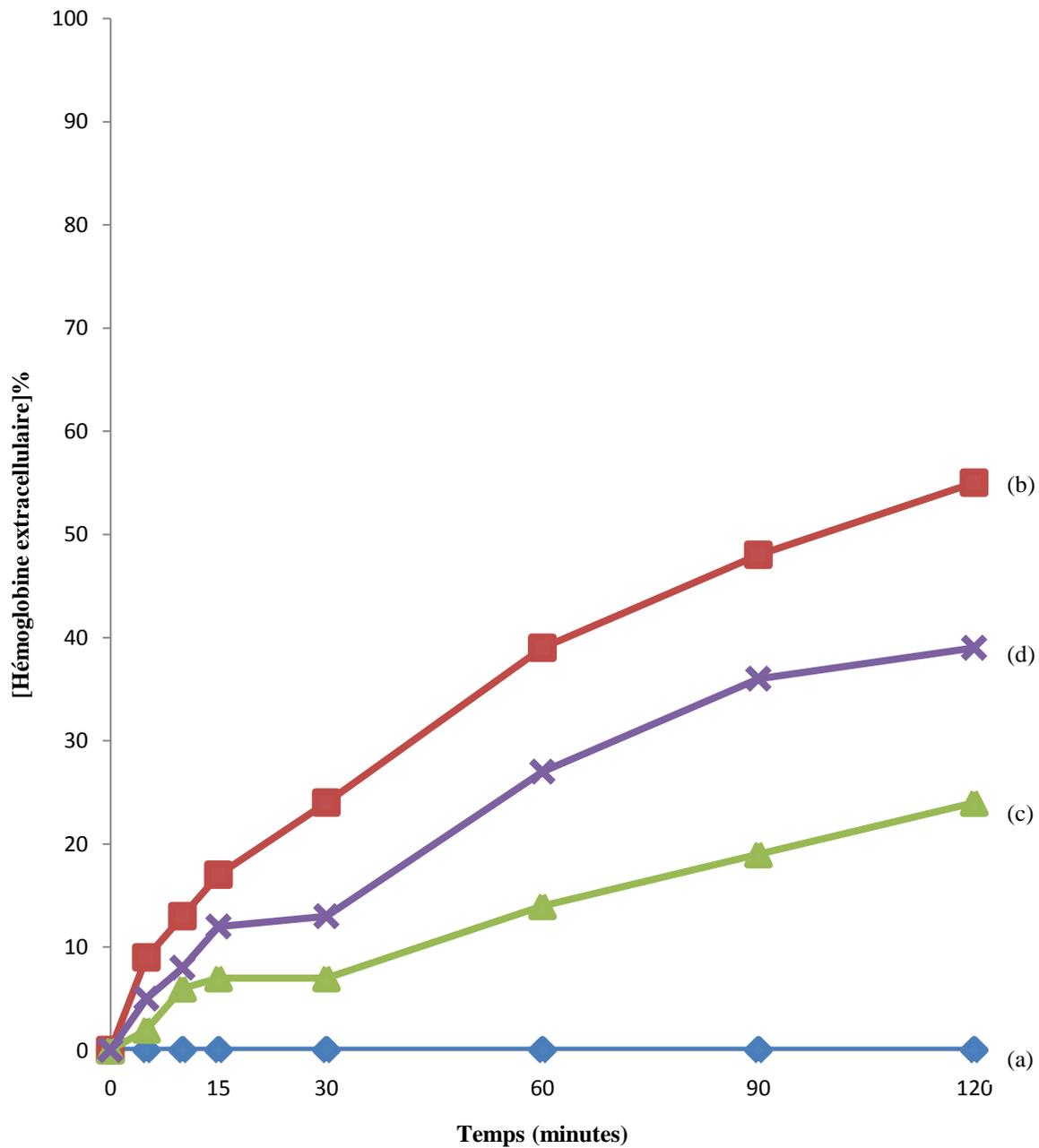


Figure N°06 : Effet des solutions de Fungizone® (concentration finale $10^{-5}M$) préparées à pH 5,4 et additionné de sels sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

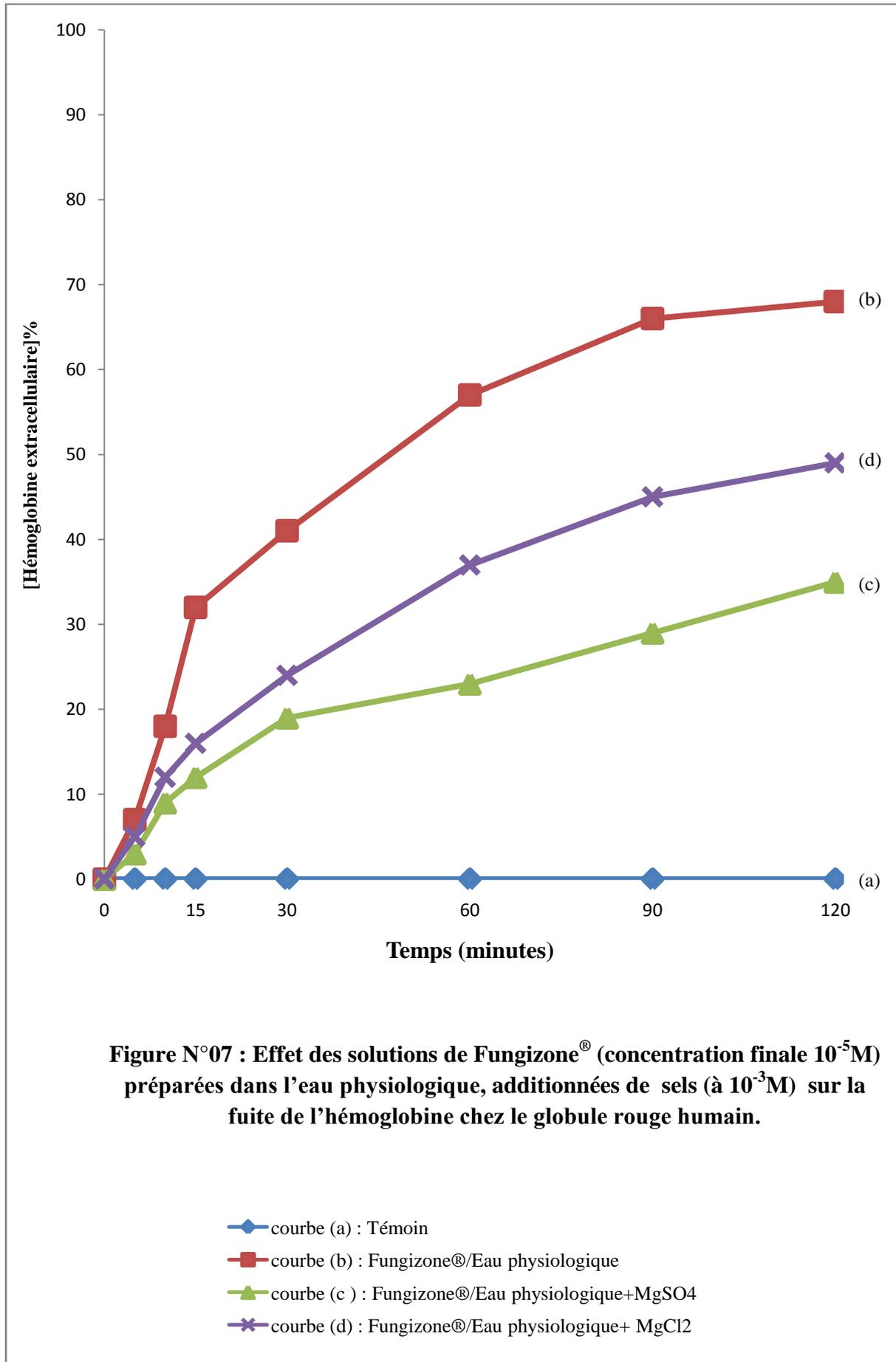
- ◆ courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Fungizone® / Tampon pH 5,4
- ▲ courbe (c) : Fungizone® / Tampon pH 5,4 + MgSO4
- ✕ courbe (d) : Fungizone® / Tampon pH 5,4 + MgCl2

3. Effet des solutions de Fungizone[®] (concentration finale 10^{-5} M) préparées dans l'eau physiologique et additionné de sels sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

La figure N°07 représente l'effet des solutions de Fungizone[®] (concentration finale 10^{-5} M) préparées dans l'eau physiologique et additionné de sels (à concentration 10^{-3} M) sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition d'antifongique. Nous n'observons pas d'hémolyse durant les 120 minutes d'incubation.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée dans l'eau physiologique. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 35% après 15 minutes et atteint un taux de 70% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée dans l'eau physiologique additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Les globules rouges perdent en 10 minutes près de 10% de leur hémoglobine et autour de 35% après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée dans l'eau physiologique additionné de solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Après 15 minutes d'incubation, les globules rouges perdent 17% de leur hémoglobine. Cette perte est estimée à 50% au bout de 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'addition de $MgCl_2$ au milieu réactionnel réduit l'hémolyse de 20% alors que cette réduction est plus importante en présence de $MgSO_4$, elle est de 35%.



4. Effet de la nature du solvant :

La figure N°08 représente l'effet de la nature du solvant des solutions de Fungizone[®], sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition de Fungizone[®]. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation à 37°C.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée à pH 5,4. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 25% après 30 minutes et ne dépasse pas un taux de 60% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée dans l'eau physiologique. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 35% après 15 minutes et atteint un taux de 70% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée à pH 5,4 additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Les globules rouges perdent en 15 minutes près de 8% de leur hémoglobine et autour de 25% après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée dans l'eau physiologique additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Les globules rouges perdent en 30 minutes près de 18% de leur hémoglobine et autour de 32% après 120 minutes d'incubation.
- La courbe (f) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée à pH 5,4 additionné de solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Après 5 minutes d'incubation, les globules rouges perdent 23% de leur hémoglobine. Cette perte est estimée à 30% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (g) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de 10^{-5} M préparée dans l'eau physiologique additionné de solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de 10^{-3} M. Après 5 premières minutes d'incubation, les globules rouges perdent 25% de leur hémoglobine. Cette perte est estimée à 40% au bout de 120 minutes d'incubation.

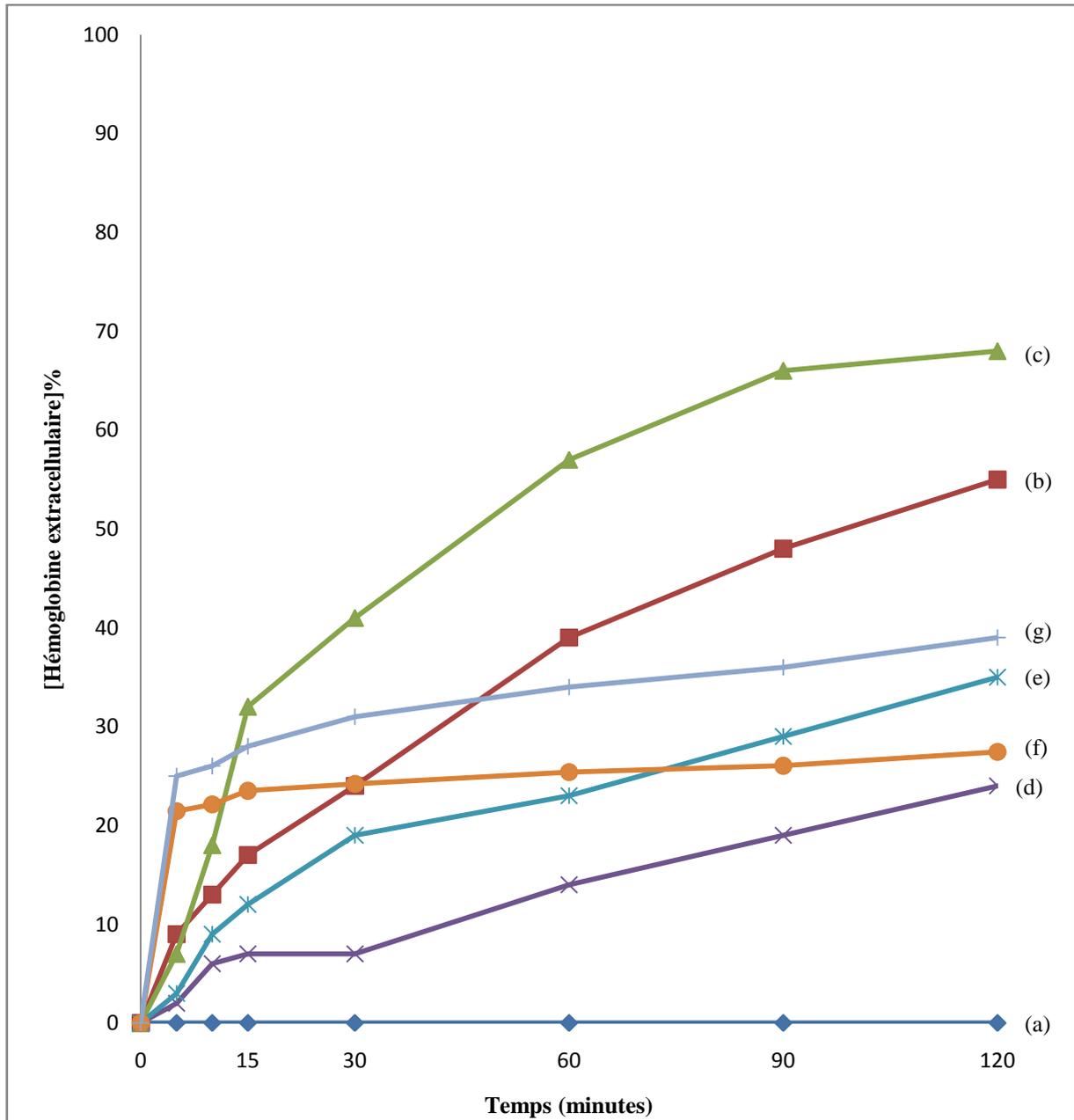


Figure N°08 : Effet de la nature du solvant des solutions de Fungizone®, sur la fuite de l'hémoglobine chez le globule rouge humain.

- ◆ courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Fungizone®/Tampon pH 5,4
- ▲ courbe (c) : Fungizone®/Eau physiologique
- × courbe (d) : Fungizone®/Tampon pH5,4+MgSO4
- * courbe (e) : Fungizone®/Eau physiologique+MgSO4
- courbe (f) : Fungizone®/Tampon pH 5,4+MgCl2
- + courbe (g) : Fungizone®/Eau physiologique+MgCl2

5. Effet de la concentration croissante de $MgSO_4$:

5.1. Dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique (100mM) à pH 5,4 :

La figure N°09 représente l'effet des concentrations croissantes de $MgSO_4$ sur la toxicité de la Fungizone[®] (concentration finale $10^{-5}M$) préparées à pH 5,4 envers les globules rouges humains.

- La courbe (a) représente la courbe témoin où aucune addition n'a été faite. L'hémoglobine intra érythrocytaire reste constante. Nous n'observons aucune fuite d'hémoglobine vers le milieu extracellulaire au cours des 120 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparée à pH 5,4. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 25% après 30 minutes et ne dépasse pas un taux de 60% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution de $MgSO_4$ à une concentration finale de $10^{-2}M$. Ce n'est qu'au bout de 120 minutes d'incubation que nous observons 1% d'hémolyse.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées à pH 5,4 additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de $10^{-3}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 8% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 25% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées à pH 5,4 additionnée d'une solution de $MgSO_4$ (1 M) à une concentration finale de $10^{-2}M$. Les globules rouges perdent près de 20% de leur hémoglobine après 30 minutes d'incubation, et près de 37% après 120 minutes d'incubation à 37°C.
- La courbe (f) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées à pH 5,4 additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de $10^{-1}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 4% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 9% au bout de 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'augmentation de la concentration de $MgSO_4$ au milieu réactionnel permet de réduire le taux d'hémolyse.

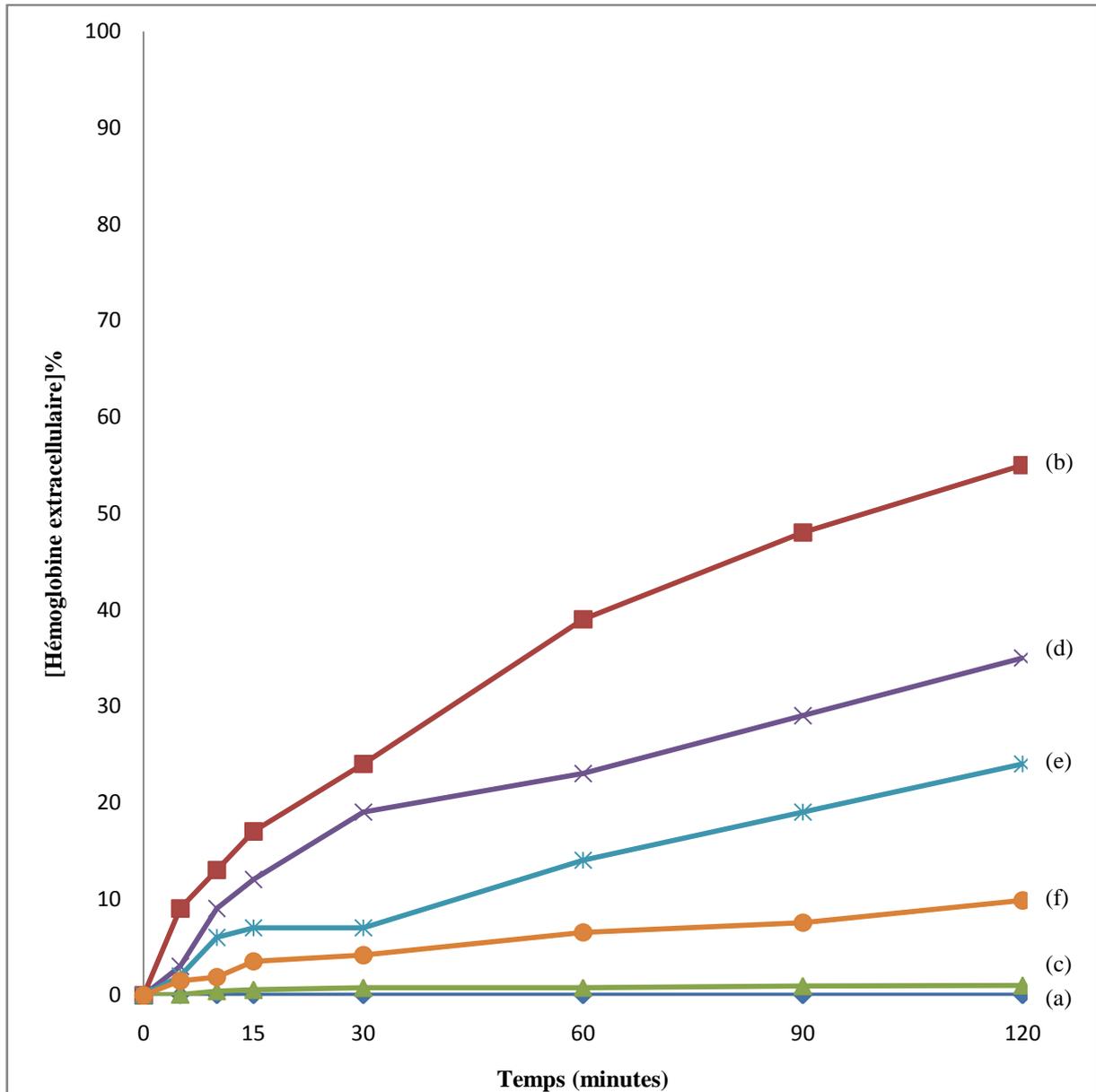


Figure N°09: Effet des concentrations croissantes de MgSO₄ sur la toxicité de la Fungizone® (concentration finale 10⁻⁵M) préparées à pH 5,4 envers les globules rouges humains.

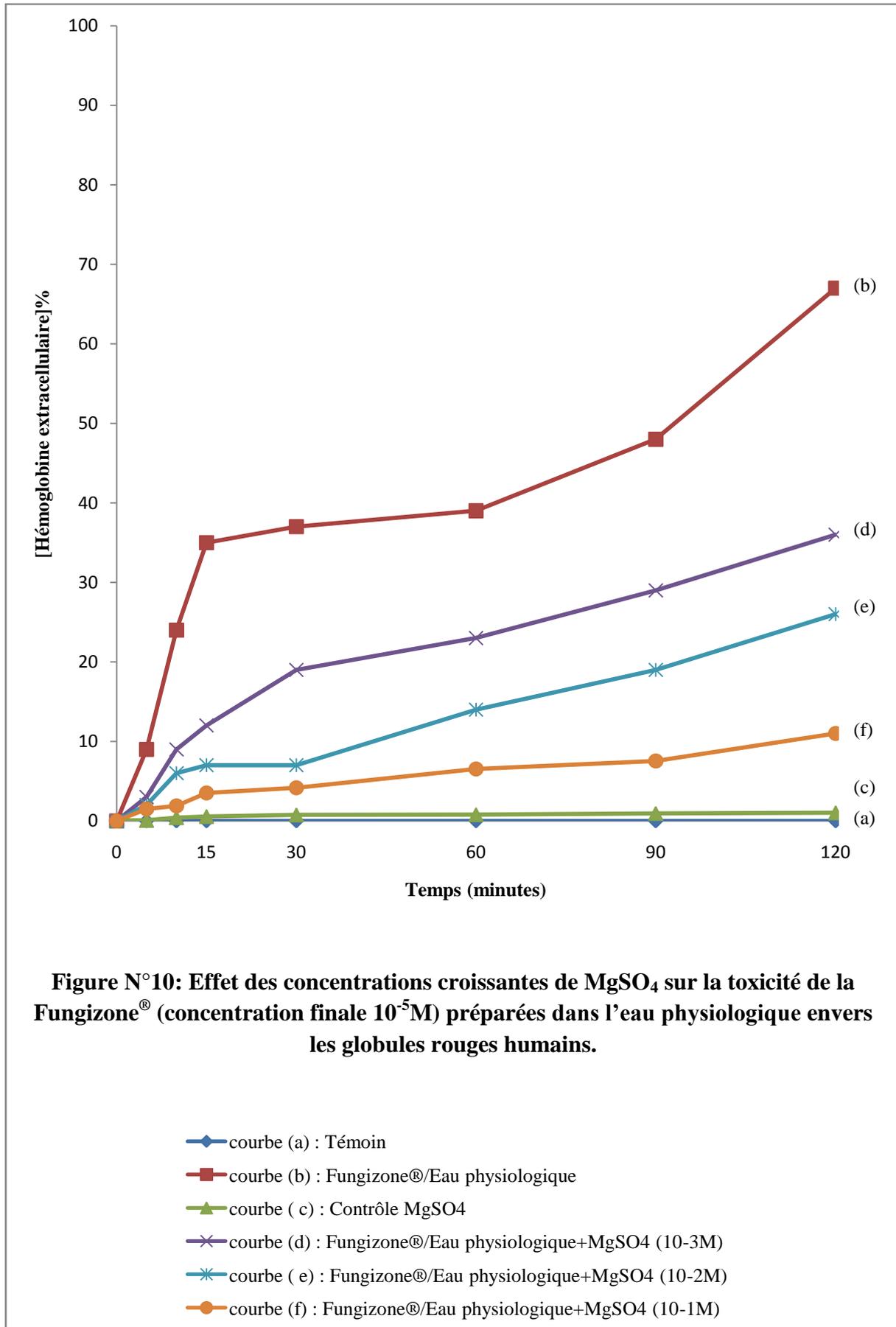
- ◆— courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Fungizone®/Tampon pH 5,4
- ▲— courbe (c) : Contrôle MgSO₄
- ×— courbe (d) : Fungizone®/Tampon pH 5,4+MgSO₄ (10-3M)
- *— courbe (e) : Fungizone®/Tampon pH 5,4+MgSO₄ (10-2M)
- courbe (f) : Fungizone®/Tampon pH 5,4+MgSO₄ (10-1M)

5.2. Dans l'eau physiologique :

La figure N°10 représente l'effet des concentrations croissantes de $MgSO_4$ sur la toxicité de la Fungizone[®] (concentration finale $10^{-5}M$) préparées dans l'eau physiologique envers les globules rouges humains.

- La courbe (a) représente la courbe témoin où aucune addition n'a été faite. L'hémoglobine intra érythrocytaire reste constante. Nous n'observons aucune fuite d'hémoglobine vers le milieu extracellulaire au cours des 120 minutes d'incubation à $37^{\circ}C$ sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparée dans l'eau physiologique. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 35% après 15 minutes et atteint un taux de 70% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution de $MgSO_4$ à une concentration finale de $10^{-2}M$. Ce n'est qu'au bout de 120 minutes d'incubation que nous observons 1% d'hémolyse.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées dans l'eau physiologique additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de $10^{-3}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 8% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 25% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées dans l'eau physiologique additionnée d'une solution de $MgSO_4$ (1 M) à une concentration finale de $10^{-2}M$. Les globules rouges perdent près de 20% de leur hémoglobine après 30 minutes d'incubation, et près de 37% après 120 minutes d'incubation à $37^{\circ}C$.
- La courbe (f) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées dans l'eau physiologique additionné d'une solution de $MgSO_4$ (1M) à une concentration finale de $10^{-1}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 4% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 9% au bout de 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'augmentation de la concentration de $MgSO_4$ au milieu réactionnel induit une réduction du taux d'hémolyse.



6. Effet de la concentration croissante de $MgCl_2$:

6.1. Dans le tampon acétate de sodium/ acide acétique (100mM) à pH 5,4 :

La figure N°11 représente l'effet des concentrations croissantes de $MgCl_2$ sur la toxicité de la Fungizone® (concentration finale $10^{-5}M$) préparées à pH 5,4 envers les globules rouges humains.

- La courbe (a) représente la courbe témoin sans aucune addition de Fungizone®. Nous n'observons aucune perte d'hémoglobine durant les 120 minutes d'incubation à 37°C.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone® à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparée à pH 5,4. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 25% après 30 minutes et ne dépasse pas un taux de 60% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution de $MgCl_2$ à une concentration finale de $10^{-2}M$. Les globules rouges perdent 2% de leur hémoglobine intracellulaire après 30 minutes d'incubation à 37°C sous agitation continue. Ce taux reste constant durant 120 minutes d'incubation.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone® à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées à pH 5,4 additionné d'une solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de $10^{-3}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 8% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 25% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère de Fungizone® à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées à pH 5,4 additionnée d'une solution de $MgCl_2$ (1 M) à une concentration finale de $10^{-2}M$. Les globules rouges perdent près de 20% de leur hémoglobine après 30 minutes d'incubation, et près de 37% après 120 minutes d'incubation à 37°C.
- La courbe (f) représente l'effet de la solution mère de Fungizone® à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées à pH 5,4 additionné d'une solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de $10^{-1}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 4% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 9% au bout de 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'augmentation de la concentration de $MgCl_2$ au milieu réactionnel permet de réduire le taux d'hémolyse.

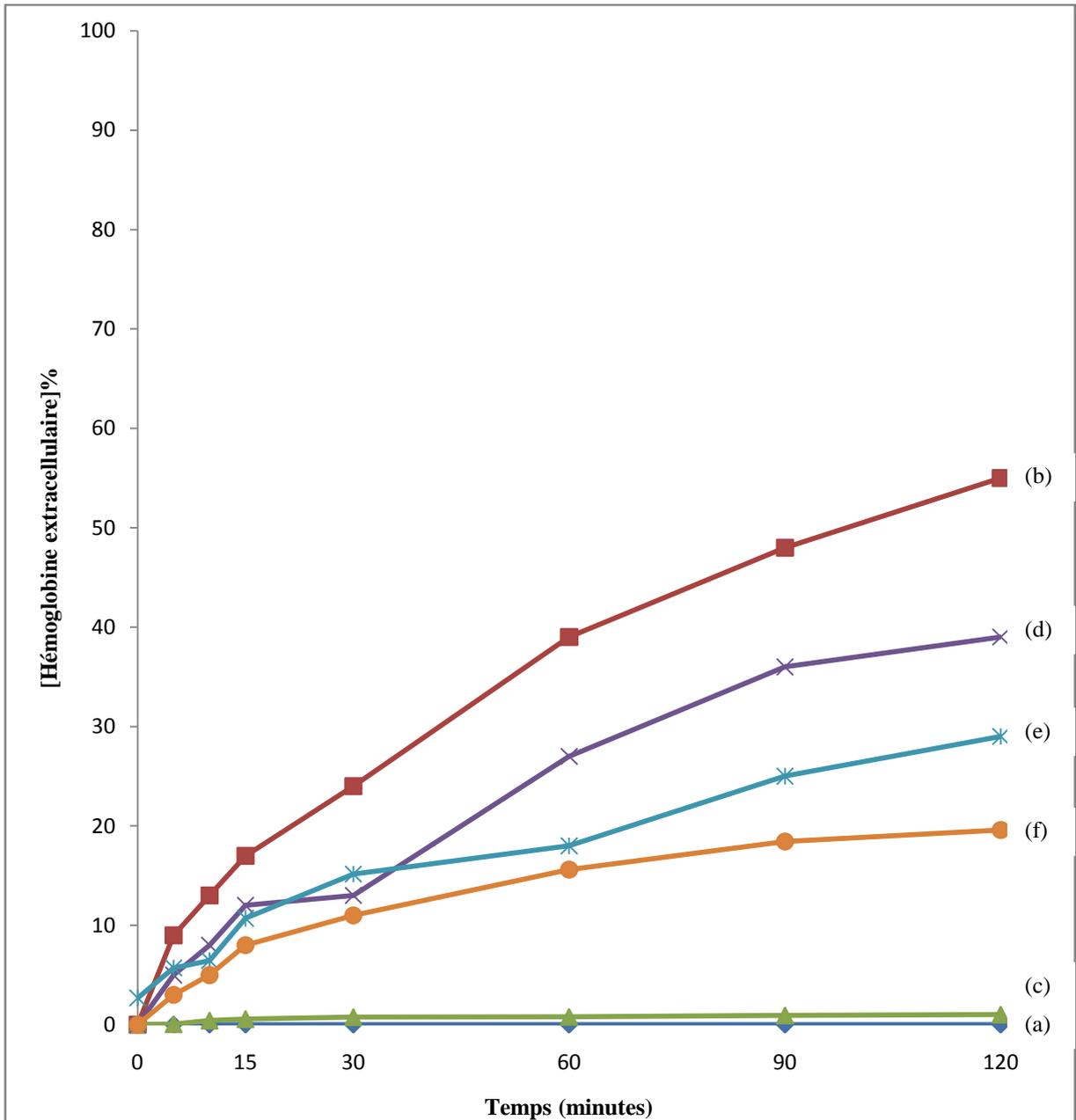


Figure N°11 : Effet des concentrations croissantes de MgCl₂ sur la toxicité de la Fungizone® (concentration finale 10⁻⁵M) préparées à pH 5,4 envers les globules rouges humains.

- ◆— courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Fungizone®/pH 5,4
- ▲— courbe (c) : Contrôle MgCl₂
- ×— courbe (d) : Fungizone®/pH 5,4+MgCl₂ (10-3M)
- *— courbe (e) : Fungizone®/pH 5,4+MgCl₂ (10-2M)
- courbe (f) : Fungizone®/pH 5,4+MgCl₂ (10-1M)

6.2. Dans l'eau physiologique :

La figure N°12 représente l'effet des concentrations croissantes de $MgCl_2$ sur la toxicité de la Fungizone[®] (concentration finale $10^{-5}M$) préparées dans l'eau physiologique envers les globules rouges humains.

- La courbe (a) représente la courbe témoin où aucune addition n'a été faite. L'hémoglobine intra érythrocytaire reste constante. Nous n'observons aucune fuite d'hémoglobine vers le milieu extracellulaire au cours des 120 minutes d'incubation à $37^{\circ}C$ sous agitation continue.
- La courbe (b) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparée dans l'eau physiologique. Le taux d'hémoglobine extracellulaire est de 35% après 15 minutes et atteint un taux de 70% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (c) représente l'effet de la solution de $MgCl_2$ à une concentration finale de $10^{-2}M$. Ce n'est qu'au bout de 120 minutes d'incubation que nous observons 1% d'hémolyse.
- La courbe (d) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées dans l'eau physiologique additionné d'une solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de $10^{-3}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 8% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 25% au bout de 120 minutes d'incubation.
- La courbe (e) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées dans l'eau physiologique additionnée d'une solution de $MgCl_2$ (1 M) à une concentration finale de $10^{-2}M$. Les globules rouges perdent près de 20% de leur hémoglobine après 30 minutes d'incubation, et près de 37% après 120 minutes d'incubation à $37^{\circ}C$.
- La courbe (f) représente l'effet de la solution mère de Fungizone[®] à une concentration finale de $10^{-5}M$ préparées dans l'eau physiologique additionné d'une solution de $MgCl_2$ (1M) à une concentration finale de $10^{-1}M$. Il y a une libération de l'hémoglobine près de 4% après 15 minutes d'incubation et atteint un taux de 9% au bout de 120 minutes d'incubation.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que l'augmentation de la concentration de $MgCl_2$ au milieu réactionnel induit une réduction du taux d'hémolyse.

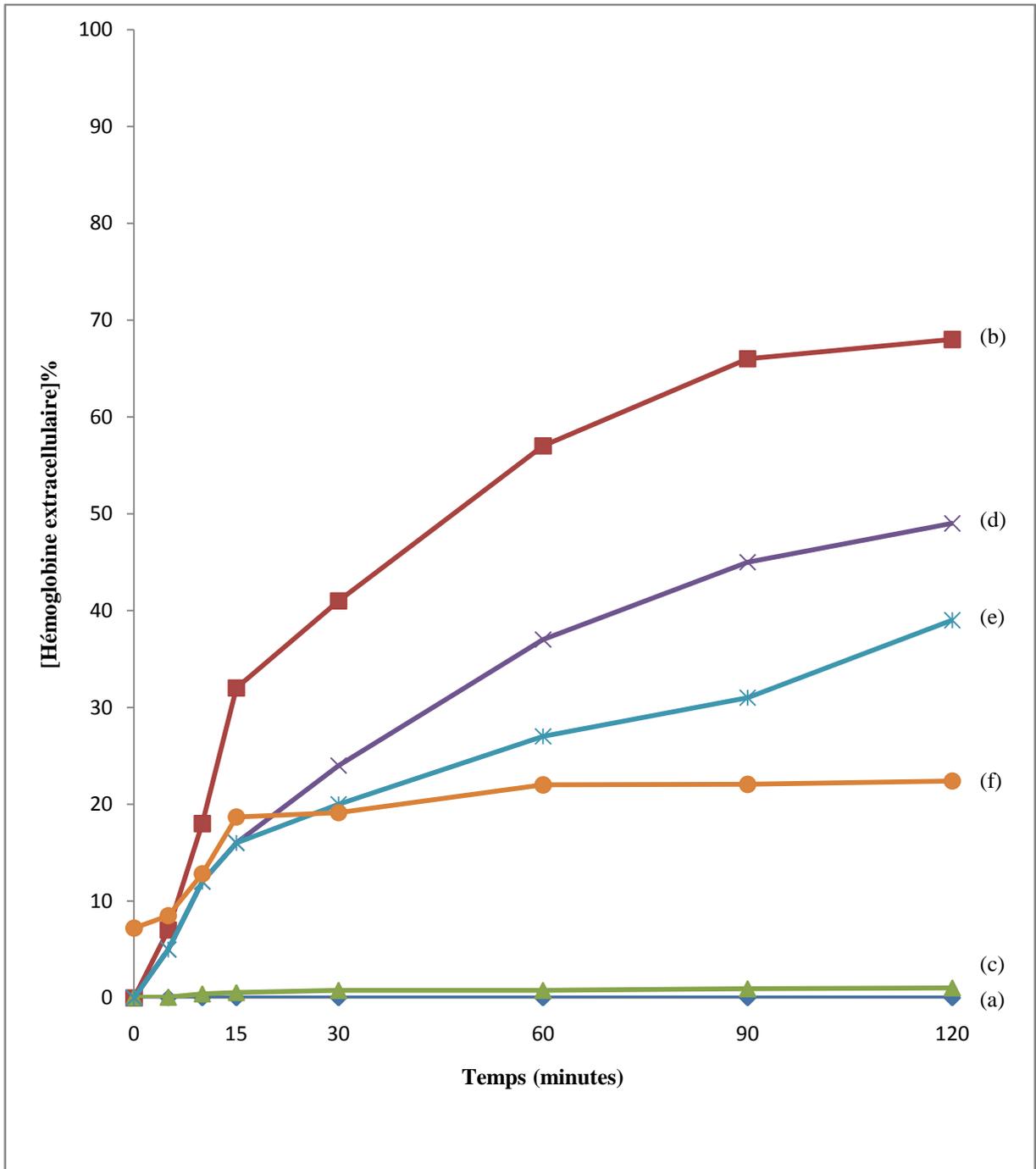


Figure N°12 : Effet des concentrations croissantes de MgCl₂ sur la toxicité de la Fungizone® (concentration finale 10⁻⁵M) préparées dans l'eau physiologique envers les globules rouges humains.

- ◆— courbe (a) : Témoin
- courbe (b) : Fungizone®/Eau physiologique
- ▲— courbe (c) : Contrôle MgCl₂
- ×— courbe (d) : Fungizone®/Eau physiologique+MgCl₂ (10-3M)
- *— courbe (e) : Fungizone®/Eau physiologique+MgCl₂ (10-2M)
- courbe (f) : Fungizone®/Eau physiologique+MgCl₂ (10-1M)

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de ce travail été la détermination *in vitro* de l'effet de l'action combiné du pH et des sels $MgSO_4$ et $MgCl_2$ sur la toxicité de l'amphotéricine B envers les globules rouges humaines.

L'ensemble des résultats obtenus nous a permis de conclure que :

- En présence de sels au milieu réactionnel permet de réduire la toxicité de la Fungizone[®] envers le globule rouge, et ce aussi bien en présence de $MgSO_4$ qu'en présence de $MgCl_2$.
- Le sel $MgSO_4$ permet une réduction de la toxicité (30-35%) plus importante que le sel $MgCl_2$ (20%).
- La toxicité de la Fungizone[®] préparé à pH 5,4 envers le globule rouge est largement réduite en présence de $10^{-1}M$ de $MgSO_4$ dans le milieu réactionnel. Il n'y a que 9% d'hémolyse.

Pour compléter ce travail il faudrait :

- Faire des tests d'efficacité antifongique envers les levures tels *Candida*.
- Faire des tests de toxicité sélective *in vivo* chez l'animal sain et contaminé par les levures.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- Andrès E., Tiphine M., Letscher-Bru V., Herbrecht R. (2001). Nouvelles formes lipidiques de l'amphotéricine B Revue de la littérature. Rev Méd Interne 22: 141-150.
- 2- Aseandei A., Luchian T. (2008). Ion selectivity, transport properties and dynamics of amphotericin B channels studied over a wide range of acidity changes. Colloids and Surfaces Biointerfaces 67: 99-106.
- 3- Bedrane M.A. (1997). Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associé aux lipoprotéines du sérum sanguin chez des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* Thèse de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Abou-Bekr Belkaid - Tlemcen.
- 4- Belkherroubi-Sari L., Adida H., Seghir A., Boucherit Z., Boucherit K. (2013). New strategy for enhancing the therapeutic index of Fungizone[®]. Journal de Mycologie Médicale, vol 23: 3-7.
- 5- Belkherroubi-Sari L., Boucherit Z., Boucherit K., Belbraouet S. (2011). Study of Renal Toxicity in Wistar Rats Following the Action of Amphotericin B Solution Prepared under Extreme pH Conditions. Food and Nutrition Sciences, 2011, 2, 731-735.
- 6- Belkherroubi-Sari L., Boucherit Z., Cheron M., Boucherit K., Benyoucef M., Belbraouet S. (2008). Modulation of the polyene antibiotic amphotericin B selective toxicity by pH change of the stock solutions. African Journal of Microbiology Research. Vol. (2) pp. 242-246.
- 7- Bernardo J. F., Sabra R., Vyas S. J., Branch R. A. (2004). Clinical nephrotoxins: Rénal Injury from Drugs and Chemicals second edition. Springer Science and Business Media, Inc. 10:200-222.
- 8- Blanc I., Bueno Da Costa M. H., Bolard J., Saint-Pierre Chazalet M. (2000). Oligonucleotide delivery by a cationic derivative of the polyene antibiotic amphotericin B: Interaction oligonucleotide/vectot as studied by optical spectroscopy and electron microscopy. Biochim. Biophys. Acta 1464: 299-308.

- 9- Blanchet B, Huet E, Astier A, (2004). Suivre thérapeutique des médicaments antifongiques. Pharmacocinétique des médicaments infectieux : Revue Française des Laboratoires 365 : 39-47.
- 10- Bolard, J. (1991) Mechanism of action of an anti-*Candida* drug: amphotericin B and its derivatives. Ed. R. Prasad, 214-23.
- 11- Boucherit K., Boucherit Z., Belkherroubi-Sari L. (2011). Effet of the ionic environment of the therapeutic index of amphotericin B. Chemical Technology. Vol 6 (1): 18-23.
- 12- Boucherit Z. (1995). Etude de l'effet de quelques facteurs sur la cytotoxicité induite par l'amphotéricine B associé aux lipoprotéines du sérum sanguin chez des cellules de globules rouges humains. Thèse de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Abou-Bekr Belkaid-Tlemcen.
- 13- Carbon C., Regnier B., Saimot G., Valide J.L., Yeni P. (1994). Antifongiques : données générales. Ed. Médecine Science Flammarion : 449-461.
- 14- Carle S. (2003). "les antifongiques dans le traitement des infections invasive." Pharmacturl 36(1): 25-41.
- 15- Chabasse D., Pihet M., Bouchara J .P. (2005). Les moisissures opportunistes : émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine, revue générale. Rev Fr Lab; 373 :21-34.
- 16- Chuealee R., Wiedmann T.S., Suedee R ., Srichana T. (2010). Interaction de l'amphotéricine B avec de l'ester de carbonate de palmyl de cholestéryle. Journal des Sciences Pharmaceutiques. Volume 99, issue 11, 4593-4602.
- 17- Clinton K. M., Duane R. H. (2008). Approach to patients with suspected fungal infections. diagnosis and traitement of human mycoses. Humana Press. 1:3-12.
- 18- Cohen Y., Jacquot C. (2008). Pharmacologie. Elsevier Masson: 487- 384.

- 19- Collignon Anne., Martine Beljean., Robert Farinotti., Christian Doutremepuich. (2007). Infectiologie. Le Moniteur Internet: 1036-879.
- 20- Czub J., Borowski E. and Baginski M. (2007). "Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes--a molecular dynamics study." *Biochim Biophys Acta* 1768(10): 2616-2626.
- 21- Czub J., Neumann A., Borowski E. and Baginski M. (2009). Influence of a lipid bilayer on the conformational behavior of amphotericin B derivatives: A molecular dynamics study. *Biophysical Chemistry* 141: 105-116.
- 22- Desormeaux M. (2002). La dermatite à *Malassezia* chez le chien : synthèse bibliographique et étude rétrospective de 61 cas. Université Claude-Bernard, p 105.
- 23- Dupont B. (2002). Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* 49 : 31-36.
- 24- Dupont G., Rinnert, H., Lematre, J. (1977) Etude physico-chimique de l'amphotéricine B en milieu alcalin. *Compte Rendu de l'académie des sciences Paris* 284 : 853-856.
- 25- Eneida A., Romero Æ., Elizabeth Valdivieso Æ. B., Eleazar C. (2009). Formation of two different types of ion channels by amphotericin B in human erythrocyte membranes. *J Membrane Biol* 230:69–81.
- 26- Faure S. (2009). Antifongiques systémiques. *Actualités pharmaceutiques*. N° 483 : p49-52.
- 27- Gaboriau F., Cheron M., Leroy L. and Bolard J. (1997a). Physico-chemical properties of heat-induced superaggregates of amphotericin B. *Biophysical chemistry* 66: 1-12.
- 28- Gaboriau F., Cheron M., Petit C. and Bolard J. (1997b). Heat-induced superaggregation of amphotericin B reduces its *in vitro* toxicity: a new way to improve its therapeutic index. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 41: 2345-2351.

- 29- Gagos M. and Arczewska M. (2010). "Spectroscopic studies of molecular organization of antibiotic amphotericin B in monolayers and dipalmitoylphosphatidylcholine lipid multibilayers." *Biochim Biophys Acta* 1798(11): 2124-2130.
- 30- Gagos M., Herec M., Arczewska M., Czemel G., Dalla Serra M., Gruszecki W.I. (2008). Anomalous high aggregation level of the polyene antibiotic amphotericin B in acidic medium: Implications for the biological action. *Biophysical Chemistry* 136: 44-49.
- 31- Gigou-Cornet Murielle. (2006). Role des gènes RIM et VPS dans la signalisation du pH, la virulence et la résistance aux antifongiques chez la levure *Candida albicans*. Thèse de Doctorat en Agronomi. Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- 32- Grooters A. M., Taboada J. (2003). Update on antifungal therapy. *Clin North Am Small Anim Pract.* Vol 33 (N°4): 749-758.
- 33- Gruda I., Milette D., Brother M., Kobayashi G. S., Medoff G. and Brajtburg 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(1): 24-28.
- 34- Hac-Wydro K., Dynarowicz-Latka P., Grzybowska J., Borowski E. (2005). N-(1-Piperidinepropionyl)amphotericin B methyl ester (PAME) - a new derivative of the antifungal antibiotic amphotericin B: Searching for the mechanism of its reduced toxicity. *Journal of Colloid and Interface Science* 287: 476-484.
- 35- Hammond S.M. (1977). Biological activity of polyene antibiotics. *Progress in medical chemistry* (14). Edd. G. P. Bllis and G. R. West: 106-164.
- 36- Hans M., Shimoni K., Danino D., Siegel S.J., Lowman A. (2005). Synthesis and characterization of mPEG-PLA prodrug micelles. *Biomacromolecules* 6:2708–2717.
- 37- Hartsel, S., Bolard, J. (1996) Amphotericin B: new life for an old drug. *TiPS* 17: 445-449.

- 38- Hennequin C., Gauzit R., Wolff M., Cordonnier C. (2010). Recommandations de stratégies thérapeutiques pour le traitement des candidoses et aspergilloses invasives chez l'adulte. *Infections fongiques-antifongiques. Antibiotiques*. Volume 12, issue 3, 165-170.
- 39- Hianik T., Ostatnik L., Polohova V. and Bolard J. (2008). "Changes of conductance and compressibility of bilayer lipid membranes induced by oligonucleotide-cationic polyene antibiotic complexes." *Bioelectrochemistry* 74(1): 2-8.
- 40- Hung, C.T., Lam, F.C., Perrier, D.G., Souter, A. (1988) A stability study of amphotericin B in aqueous media using factorial design. *Inter. J. Pharma.* 44: 117-123.
- 41- Jiang X.Z., Zhang J.Y., Zhou Y.M., Xu J., Liu S.Y. (2008) .Facile preparation of core-crosslinked micelles from azide-containing thermoresponsive double hydrophilic diblock copolymer via click chemistry. *J Polym Sci A Polym Chem* 46:860-871.
- 42- Kanafani Z.A., Perfect J.R. (2008). Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* 46:120-128.
- 43- Kettani A, Belkhadir ZH, Mosadik A, Faroudy A, Ababou A, Sbihi A (2006). Traitement antifongique des candidoses systémiques en réanimation. *Journal de Mycologie Médicale* 16 : 16-25.
- 44- Kleinberg M. (2006). What is the current and future status of conventional amphotericin B? *International Journal of Antimicrobial Agents* 27: 12-16.
- 45- Lacroix C., Dubach M., Feuilhade M. (2003). Les échinocandines : une nouvelle classe d'antifongiques. *Médecine et maladies infectieuses* 33 :183–191.
- 46- Layre A., Couvreur P., Chacun H., Richard J., Passirani C., Requier D., Benoit J.P., Gref R. (2006). Novel composite core-shell nanoparticles as busulfan carriers. *J Control Release* 111:271–280.
- 47- Legrand, P., Romero, E.A., Cohen, E., Bolard, J. (1992) Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 36: 2518-2522.

- 48- Lemke A., Kiderlen A. F et O Kayser. (2005). Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:151-162.
- 49- Marquet P. (2004). *Suivi thérapeutique pharmacologique: Pour l'adaptation de posologie des médicaments.* Elsevier: 539-117.
- 50- Mc Taggart B., Wong G. (2002). Invasive Fungal infection: review and update of drug management. *Can J Hosp Pharm* 55(suppl 2):S1-S19.
- 51- Million L. (2006). Antifongiques traitements des mycoses invasives. *DIU chimiothérapie anti-infectieuse.*
- 52- Petit C., Cheron M., Joly V., Rodrigues J.M., Bolard J., Gaboriau F. (1998). In-vivo therapeutic efficacy in experimental murine mycoses of a new formulation of desoxycholate-amphotericin B obtained by mild heating. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (42) : 779-785.
- 53- Rex J. H., Walsh T.J., Sobel J.D., Filler S.G., Pappas P.G., Dismukes W.E. (2000). Practice guidelines for the treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis*; 30:662-78.
- 54- Riss G. (2003). Micellization of block copolymers. *Prog Polym Sci* 28:1107–1170.
- 55- Schöffski P., Freund M., Wunder R., Petersen D., Kohne C.H., Hecker H. (2000). Safety and toxicity of amphotericin B in glucose 5% or Intralipid® 20% in neutropenic patients with pneumonia or fever of unknown origin : randomized study. *Br Med J* **317** : 379-384.
- 56- Scott D.W., Miller W.H. (2001). Fungal skin diseases, in muller and kirck's small animal dermatology 6th, Saunders Editor: Philadelphia: 336-422.
- 57- Shao K., Huang R., Li J., Han L., Ye L., Lou J., Jiang C. (2010). Angiopep-2 modified PE-PEG based polymeric micelles for amphotericin B delivery targeted to the brain. *Volume 147, issue 1: 118-126.*

- 58- Soulimane N. (2001). Etude in vivo de quelques nouvelles formulations de l'amphotéricine B chez les souris Wistar. Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Abou Bekr Belkaïd Tlemcen.
- 59- Szindler-Reichert J., Mazerski J., Cybulska B., Grzyboska J., Borowski E. (2001). MFAME, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity : relationship between self-association and effects on red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1528: 15-24.
- 60- Tasset C., Preat V. and Roland M. (1991). "The influence of Myrj 59 on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B." *J Pharm Pharmacol* 43(5): 297-302.
- 61- Te Dorsthorst D. T. A., Mouton J. W., Van Den Beukel C.J.P., Van Der Lee H.A.L., Meis J.F.G.M., Verweij P.E. (2004). Effect of pH on the in vitro activities of amphotericin B, itraconazole and flucytosine against *Aspergillus* isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 48 : 3147-3150.
- 62- Te Dorsthorst D.T.A., Verweij P.E., Meis J.F.G.M., Mouton J.W. (2005). Relationship between in vitro activities of amphotericin B and flucytosine and pH for clinical yeast and mold isolates. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 49: 3341-3346.
- 63- Toledo Grijalba M., Chéron M., Borowski E., Bolard J. and Schreier S. (2006). Modulation of polyene antibiotics self-association by ions from the Hofmeister series. *Biochimica and Biophysica Acta*. 1760: 973-979.
- 64- Wang T., Wu Y., Li M. (2010). Novel hyperbranched poly (amine-ester)-poly (lactide-co-glycolide) polymeric micelles as amphotericin B carriers *Polym. Bull.* 65:425-442.
- 65- Wasan, K.M., Rosenblum, M.G., Cheun, L., Lopez-Berestein, G. (1994 a) Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 38: 223-227.
- 66- Yolandy B. (2006). Amphotericin B as a mycolic acid specific targeting agent in tuberculosis. Master of Science. Department of Biochemistry. Faculty of Natural and Agricultural Sciences. University of Pretoria.