

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE DE RECHERCHE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
MANON LE BEL**

**ÉTUDE DES INTERACTIONS AMPHOTÉRICINE B/STÉROLS
DANS UNE MATRICE LIPIDIQUE DE PHOSPHATIDYLCHOLINE**

SEPTEMBRE 2004

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

Voilà maintenant sur papier, le fruit d'années d'efforts et d'expériences exaltantes. Le temps passe tellement vite en bonne compagnie! Je tiens à remercier du fond du cœur tous ceux et celles qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à la réalisation de ce fabuleux projet.

Je veux remercier tout particulièrement, mon directeur de recherche, Monsieur Pierre Tancrède ainsi que Joanna Barwicz sans qui, jamais ce rêve ne serait devenu réalité. Je vous remercie du fond du cœur pour votre patience, pour toute la confiance que vous avez eue en mes capacités ainsi que pour votre présence si agréable et réconfortante.

Je tiens également à remercier mes collègues de travail qui ont su, avec grande générosité, me guider dans cette formidable aventure. Je pense entre autre à Isabelle Fournier et à Catherine Charbonneau. Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à tous ceux qui sont devenu de bons amis au fil du temps et avec qui j'ai partagé de si beaux moments.

Finalement, je m'en voudrais de passer sous silence le soutien et l'encouragement de mes parents dans la poursuite de mes études. Sans eux, le chemin aurait été certainement beaucoup plus tortueux. À vous tous je dis merci et vous offre ce travail de recherche.

RÉSUMÉ

L'Amphotéricine B est un antifongique largement utilisé pour le traitement des infections fongiques systémiques. Ce médicament interagit avec l'ergostérol contenu dans les membranes cellulaires des champignons, ce qui explique son efficacité en tant qu'antifongique. Il interagit également avec le cholestérol, présent dans les membranes cellulaires des mammifères, ce qui explique que ce médicament soit toxique.

L'objectif visé par ce projet de recherche est de vérifier les bases physico-chimiques d'une hypothèse récemment proposée (Feigin A.M., Med. Hypotheses (1999), 52 (5), 383-388.) à l'effet que l'Amphotéricine B pourrait être utilisée pour le traitement de certains types de cancer, notamment du carcinome hépatocellulaire, à condition de pouvoir remplacer le cholestérol par son précurseur biosynthétique, le 7-Déhydrocholestérol (7-DHC).

Dans le but de mieux comprendre cette sélectivité d'action de l'AmB envers les stérols, nous avons utilisé des techniques comme la spectrofluorimétrie, la calorimétrie différentielle à balayage ainsi que la spectroscopie UV-visible. Les résultats globaux démontrent qu'effectivement l'AmB interagit davantage avec le 7-DHC qu'avec le cholestérol. Nous pouvons même établir que l'affinité de l'AmB envers le 7-DHC est supérieure à celle du médicament pour l'ergostérol. De plus, nous avons observé que la structure moléculaire des stérols étudiés, malgré de très légères différences, influence l'affinité de l'AmB pour les systèmes lipidiques. Ces précisions quant à l'interaction de l'AmB avec le 7-DHC, viennent confirmer en partie, l'hypothèse de Feigin, ce qui pourrait avoir une implication importante dans l'élaboration d'une nouvelle stratégie contre le carcinome hépatocellulaire.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	ii
RÉSUMÉ.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
CHAPITRE 1 Introduction.....	1
1.1 L'amphotéricine B.....	1
1.1.1 Propriétés physico-chimiques de l'AmB.....	3
1.1.2 Pharmacocinétique.....	5
1.1.3 Toxicité de l'AmB.....	5
1.1.4 Bases moléculaires du mécanisme d'action de l'AmB.....	6
1.1.5 Interactions AmB/stérols.....	9
1.1.5.1 Mécanisme impliquant les stérols.....	9
1.1.5.2 Mécanisme n'impliquant pas les stérols.....	12
1.2 Hypothèse de Feigin.....	13
1.3 But du travail de recherche.....	19
CHAPITRE 2 Méthodologie.....	20
2.1 Produits.....	20
2.2 Préparation des solutions.....	21
2.2.1 L'AmB.....	21

2.2.2 Les stérols.....	22
2.2.3 La carboxyfluorescéine.....	22
2.2.4 Solution tampon.....	23
2.2.5 Triton.....	23
2.3 Préparation des liposomes.....	23
2.4 Techniques utilisées.....	27
2.4.1 Spectrofluorimétrie.....	27
2.4.2 Spectroscopie UV-visible.....	29
2.4.3 Calorimétrie différentielle à balayage.....	31
CHAPITRE 3 Résultats et discussion.....	34
3.1 Effet de l'AmB sur la perméabilité des membranes :Étude par spectrofluorimétrie.....	34
3.2 Effet de l'AmB sur l'état d'organisation de la bicouche lipidique : Étude par calorimétrie différentielle à balayage.....	42
3.2.1 Bicouches lipidiques de DPPC.....	42
3.2.2 Bicouches lipidiques DPPC + 5% cholestérol.....	48
3.2.3 Bicouches lipidiques DPPC + 5% ergostérol.....	50
3.2.4 Bicouches lipidiques DPPC + 5% 7-DHC.....	53
3.3 Interaction de l'AmB avec la bicouche lipidique :Étude par spectroscopie UV-visible.....	57
3.3.1 Amphotéricine 65×10^{-7} M.....	57
3.3.2 Amphotéricine 250×10^{-7} M.....	68
CHAPITRE 4 Conclusion.....	77
Bibliographie.....	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1: rapports molaires des constituants des différents systèmes étudiés en fluorescence.....	37
Tableau 3.2: rapports molaires des constituants des différents systèmes étudiés en calorimétrie différentielle à balayage	43
Tableau 3.3: température de transition et largeur à la mi-hauteur des pics de transition principale de la matrice constituée de DPPC.....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1: structure moléculaire de l'AmB.....	4
Figure 1.2: structure hypothétique d'un pore d'AmB.....	8
Figure 1.3: schéma d'un pore d'AmB.....	8
Figure 1.4: schéma d'un pore membranaire.....	10
Figure 1.5: structure moléculaire des stérols étudiés.....	11
Figure 1.6: biosynthèse du cholestérol.....	15
Figure 1.7: schéma de la thérapie contre le carcinome hépatocellulaire.....	18
Figure 2.1: structure moléculaire du DPPC.....	21
Figure 2.2: structure moléculaire de la carboxyfluorescéine.....	21
Figure 2.3: étapes de fabrication des liposomes par la méthode de gel/dégel.....	25
Figure 2.4: schéma des paramètres servant au calcul du pourcentage d'efflux.....	29
Figure 2.5: spectres UV-visible de l'AmB monomère et agrégée.....	30
Figure 2.6: thermogrammes de LUV formés de DPPC seul.....	32
Figure 3.1: signal de fluorescence en fonction du log de la concentration de CF libre.....	35
Figure 3.2: signal de fluorescence en fonction de la concentration de Solution liposomale contenant la CF 50 mM.....	35
Figure 3.3: Pourcentage d'efflux de CF en fonction de la concentration d'AmB pour le système constitué de DPPC seul et DPPC + stérols.....	37
Figure 3.4: thermogramme des LUV formés de DPPC seul.....	44
Figure 3.5: thermogrammes des LUV de DPPC seul et en présence d'AmB	45
Figure 3.6: thermogrammes des LUV de DPPC + 5% cholestérol en absence et en présence d'AmB.....	49

Figure 3.7: thermogrammes des LUV de DPPC + 5% ergostérol en absence et en présence d'AmB.....	51
Figure 3.8: thermogrammes des LUV de DPPC + 5% 7-DHC en absence et en présence d'AmB.....	54
Figure 3.9: spectres UV-visible de l'AmB à 65×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 25°C.....	58
Figure 3.10: spectres UV-visible de l'AmB à 65×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 37°C.....	61
Figure 3.11: spectres UV-visible de l'AmB à 65×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 50°C.....	65
Figure 3.12: illustration du "mismatch" hydrophobe.....	66
Figure 3.13: illustration de l'agrégation des pores d'AmB.....	67
Figure 3.14: spectres UV-visible de l'AmB à 250×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérols et avec 5% de stérols à 25°C.....	69
Figure 3.15: spectres UV-visible de l'AmB à 250×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérols et avec 5% de stérols à 37°C.....	73
Figure 3.16: spectres UV-visible de l'AmB à 250×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérols et avec 5% de stérols à 50°C.....	75

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

AmB	Amphotéricine B
AY-9944	Trans-1, 4-bis [2-chlorobenzylaminomethyl] cyclohexane dihydrochloride
CF	Carboxyfluorescéine
7-DHC	7-Déhydrocholestérol
DMPC	Dimyristoylphosphatidylcholine
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholine
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
HMG-CoA réductase	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A réductase
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LUV	Grands liposomes unilamellaires
UA	Unités arbitraires
UV-vis	Spectroscopie UV-visible
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 L'amphotéricine B.

Près de 40% des décès causés par des infections acquises en milieu hospitalier sont attribuables non pas à des infections bactériennes ou virales mais bien à des infections fongiques (Sternberg 1994). Ces patients décèdent, dans plusieurs cas, des conséquences des infections fongiques contractées en milieu hospitalier plutôt que des conditions qui les ont menés à consulter. Ce type de mycose est de plus en plus fréquemment rencontré dû à l'augmentation du nombre de patients ayant un système immunitaire déficient. En effet, les patients atteints, entre autres, du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) ou qui subissent des traitements de chimiothérapie, sont très sensibles aux infections fongiques. Il en est de même pour les patients qui subissent une thérapie immunosuppressive afin de prévenir le rejet lors de transplantation d'organes (Cooper *et al*, 2001). Le taux d'infections fongiques acquises en milieu hospitalier est passé de 6% en 1980 à 11 % en 1990 (Sternberg 1994). Les infections à champignons pathogènes causent de 3% à 10% de décès chez les cancéreux et jusqu'à 40% de décès chez les patients atteints d'hémopathies malignes (Edwards *et al*, 1978). On peut également supposer que ce pourcentage est très élevé chez les sidéens. En effet, les patients atteints du SIDA meurent généralement à la suite d'infections opportunistes qui s'installent en raison de la défaillance du système immunitaire (Fauci A.S., 1996).

De nos jours, les infections fongiques se répandent tellement qu'elles sont devenues une préoccupation majeure pour les hôpitaux, les départements de santé, les laboratoires de recherche ainsi que pour les compagnies pharmaceutiques. Ceci devient de plus en plus inquiétant puisque le nombre de médicaments efficaces contre les mycoses systémiques est très limité. De plus,

la liste des agents pathogènes s'allonge et la résistance des espèces en cause augmente. Ceci a grandement contribué à stimuler la recherche biomédicale au niveau du contrôle et du traitement des infections fongiques.

L'amphotéricine B (AmB) demeure, parmi tous les antifongiques connus à ce jour, le médicament le plus efficace disponible sur le marché pour le traitement des mycoses profondes, et ce, depuis près de 50 ans. L'AmB est un médicament à large spectre appartenant à la grande famille des polyènes et pour lequel les indications thérapeutiques sont multiples. Ce médicament est bien connu pour son efficacité contre la plupart des infections à champignons levuformes (*Candida* ou *Cryptococcus*) mais aussi contre certains champignons filamenteux (*Aspergillus*) et dimorphiques (*Histoplasme*, *Blastomycètes*).

De plus, l'AmB pourrait être employée, outre son utilisation comme antifongique, pour le traitement des infections virales, des infections parasitaires et des infections à prions (Hartsel et Bolard, 1997). En effet, l'AmB aurait montrée un ralentissement de la progression des symptômes d'encéphalopathies chez la souris mais ne préviendrait pas d'éventuelles neurodégénérescences (Mc Kenzie *et al*, 1994). De nature protéique, apparemment dépourvus d'acides nucléiques, les prions sont caractérisés par la capacité qu'a la forme pathogénique de transmettre *via* des interactions protéine-protéine, ses propriétés à l'isoforme normale de la même protéine. L'AmB pourrait donc agir directement avec la protéine normale (isoforme normale) du cerveau afin de retarder son interaction avec l'agent infectieux responsable de l'apparition de protéines anormales impliquées dans ce type de maladies (Demaimay *et al*, 1994).

L'AmB aurait aussi la propriété de stimuler le système immunitaire sous certaines conditions et à certaines doses (Jullien *et al*, 1991). En effet, l'AmB induirait l'augmentation de la production de TNF α (tumor necrosis factor) au niveau des macrophages.

L'AmB, en synergie avec un autre antifongique, la nystatine, serait également en mesure d'inhiber *in vivo* les infections cellulaires par le VIH. Ces deux médicaments auraient la propriété de se lier sélectivement aux membranes des virions car ces derniers auraient un ratio cholestérol : lipides de 2 à 3 fois supérieur à celui des cellules de l'hôte (Hartsel et Bolard, 1994).

Récemment il a été proposé que l'AmB puisse être utilisé comme agent anticancéreux pour le traitement du carcinome hépatocellulaire (Feigin, 1999). Nous élaborerons en détail cette hypothèse dans les paragraphes ultérieurs puisque cette dernière est au cœur même de ce travail de recherche.

1.1.1 Propriétés physico-chimiques de l'AmB.

L'AmB, dont la structure moléculaire est présentée à la figure 1.1, fût découverte en 1956 en sol vénézuélien par Gold et ses collaborateurs (Donovick *et al*, 1955). Elle est le produit de fermentation de *Streptomyces nodosus*, un actinomycète tellurique (Dei-Cas *et al*, 1987). Ce n'est qu'en 1970 que l'équipe de Mechlinski a présenté la structure chimique de l'AmB (Ganis *et al*, 1971).

L'AmB est un antibiotique qui appartient à la famille des macrolides polyéniques. La plupart de ces antibiotiques démontrent une certaine activité antifongique mais parmi la dizaine disponible, seulement deux d'entre eux, soit l'AmB et la nystatine, sont utilisés chez l'humain. De poids moléculaire de 924,1 g/mol et de longueur totale de 25 Å, la molécule d'AmB est formée d'un grand cycle lactonique de 37 atomes de carbone, rappelant la structure des macrolides. L'AmB est également considérée comme une molécule amphiphile.

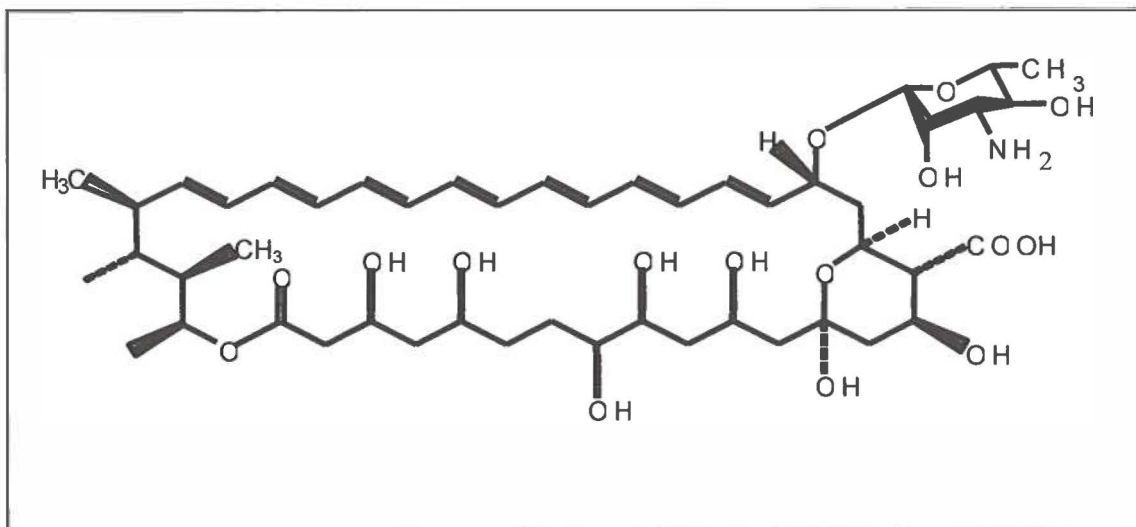


FIGURE 1.1: structure moléculaire de l'AmB.

En effet, elle possède d'un côté du cycle lactonique, 7 liaisons doubles conjuguées en position trans conférant un caractère hydrophobe à la molécule. L'autre côté du cycle lactonique est formé de plusieurs groupements hydroxyyles et d'une molécule de sucre, constituant ainsi la partie hydrophile de la molécule d'AmB. Cette caractéristique amphipatique jouera un rôle très important dans l'interaction de l'AmB avec les constituants membranaires.

Sa nature amphiphile confère donc à l'AmB la capacité de s'organiser en milieu aqueux. En présence d'eau, elle protège sa partie hydrophobe en formant des agrégats. En conséquence elle y est très peu soluble. La concentration micellaire critique de l'AmB est de 6×10^{-7} M (Tancrède *et al*, 1990). Par contre, elle est très soluble dans certains solvants organiques comme par exemple le diméthylsulfoxyde. La nature amphiphile de l'AmB lui permet également de s'organiser en milieu lipidique de telle sorte que la partie hydrophobe de la molécule est en contact avec les lipides environnants alors que sa partie hydrophile est protégée des lipides, comme nous l'expliquerons un peu plus loin. L'AmB, comme son nom le suggère, est également une molécule amphotérique. En effet, elle possède deux groupements ionisables soit le

groupement carboxyle ainsi que le groupement amine. Ces groupements rendent la molécule zwitterionique en milieu aqueux à pH neutre.

1.1.2 Pharmacocinétique.

L'AmB, pour être efficace au niveau systémique, doit être administrée par voie intraveineuse. La forme orale est dépourvue d'activité systémique puisque son absorption digestive est nulle. L'administration intraveineuse de l'AmB nécessite donc une hospitalisation puisqu'elle doit être injectée à plusieurs reprises et de façon très lente afin que ses effets secondaires et sa toxicité soient minimisés.

L'AmB, suite à son administration, se lie fortement aux protéines. Elle se lie préférentiellement aux lipoprotéines mais également à d'autres protéines plasmatiques ainsi qu'aux membranes des érythrocytes (Wolff, 1984). Sa dégradation, bien qu'encore inexpiquée, se ferait probablement par un phénomène d'autooxydation et l'AmB serait principalement éliminée au niveau du foie (Wolff, 1984). L'élimination du médicament se ferait en deux phases: la première, rapide, en début de traitement, avec une demi-vie d'élimination de 24 à 48 heures et la seconde, plus lente, s'effectueraient en environ 15 jours. Cette dernière correspondrait à un relargage secondaire prolongé de l'AmB liée aux membranes cellulaires des tissus.

1.1.3 Toxicité de l'AmB.

L'AmB est encore de nos jours le standard d'excellence pour le traitement des mycoses systémiques. Par contre, ce médicament démontre une certaine toxicité et provoque des effets secondaires indésirables. Les effets toxiques se situent au niveau des reins, du système cardio-vasculaire et de la moelle osseuse tandis que les effets secondaires les plus fréquemment rapportés sont

des douleurs sur le trajet veineux, fièvre, frissons, douleurs articulaires, abdominales et musculaires, nausées, vomissements, céphalées et vertiges (Sokol-Anderson *et al*, 1986). L'AmB induirait également la peroxydation des lipides (Brajtburg *et al*, 1990), l'inhibition des pompes membranaires (Saint-Martin *et al*, 1988) le blocage de l'endocytose ainsi que la modification structurale des lipoprotéines (Barwicz *et al*, 1991). Il semble que l'AmB interagisse avec les lipoprotéines, principalement les LDL et les VLDL, provoquant l'accumulation des produits d'oxydation pouvant être responsables de la toxicité *in vivo* du médicament (Barwicz *et al*, 2002).

La compréhension du mécanisme d'action de l'AmB est donc primordiale afin d'être en mesure de maximiser son efficacité tout en minimisant ses effets secondaires. Suite à de nombreuses années de recherche, on retrouve aujourd'hui l'AmB sous différentes formulations: l'AmB encapsulée dans des liposomes, l'AmB incorporée dans des surfactants ou dans une émulsion et finalement l'AmB liée à un lipide. Ces médicaments, bien qu'innovateurs et très intéressants, donnent souvent lieu à une instabilité du produit, à l'apparition d'autres effets indésirables ou à un coût exorbitant du médicament en question. Par exemple, l'AmB liposomale (Ambisome®) a pour avantage d'augmenter l'effet biologique du médicament tout en le protégeant de la dégradation, ce qui se traduit par une diminution de la toxicité. Cependant le coût d'un traitement avec cette formulation est 60 fois plus élevé qu'un traitement avec l'AmB traditionnelle (Banque interactive de données automatisées sur les médicaments www.biam2.org, <http://www.catie.ca/feuilletts.nsf>)

1.1.4 Bases moléculaires du mécanisme d'action de l'AmB.

Les propriétés antifongiques de l'AmB s'expliquent par le fait que son affinité pour l'ergostérol, principal stérol des membranes cellulaires des champignons, est très grande. Cette interaction spécifique avec les champignons serait donc basée sur les différences structurales existant entre

les molécules d'ergostérol et de cholestérol présentes dans les cellules des mammifères (Medoff *et al*, 1983). Plusieurs études (Teerlink *et al*, 1980, Readio et Bittman, 1982) portant sur la fuite des ions K^+ à travers des membranes cellulaires ont démontré que des concentrations d'AmB dix fois supérieures étaient nécessaires pour provoquer la fuite de ces ions dans le cas de liposomes contenant du cholestérol par rapport à des liposomes contenant de l'ergostérol. L'affinité non négligeable de l'AmB pour le cholestérol, principal stérol des membranes cellulaires des mammifères, pourrait donc expliquer sa toxicité.

Il a été démontré, par des études de conductivité et de perméabilité (Cass *et al*, 1970, Holz et Finkelstein, 1970, Andreoli, 1974) que l'AmB augmente la perméabilité des membranes contenant des stérols. En effet, l'AmB exercerait son action dans la membrane en induisant des perturbations physico-chimiques importantes menant à un déséquilibre de la perméabilité des membranes cellulaires aux ions ainsi qu'aux petites molécules comme par exemple l'eau et l'urée (De Kruijff *et al*, 1974).

Généralement, il est admis que le mode d'action de l'AmB serait la formation de pores hydrophiles dans la membrane (Bonilla et Marin, 1991, Fujii *et al*, 1997). La figure 1.2 représente la structure probable d'un demi-pore d'AmB. L'intérieur de chaque canal serait formé de groupements hydroxyles et d'un groupement méthyle provenant de chaque molécule d'AmB. Ceci est en fait une conséquence directe de la nature amphiphile de la molécule d'AmB qui expose sa partie hydrophile au milieu aqueux. La figure 1.3 nous montre en effet que chaque pore serait en fait constitué de deux demi-pores, lesquels seraient hydrophiles à l'intérieur et hydrophobes à l'extérieur, dans la bicouche lipidique.

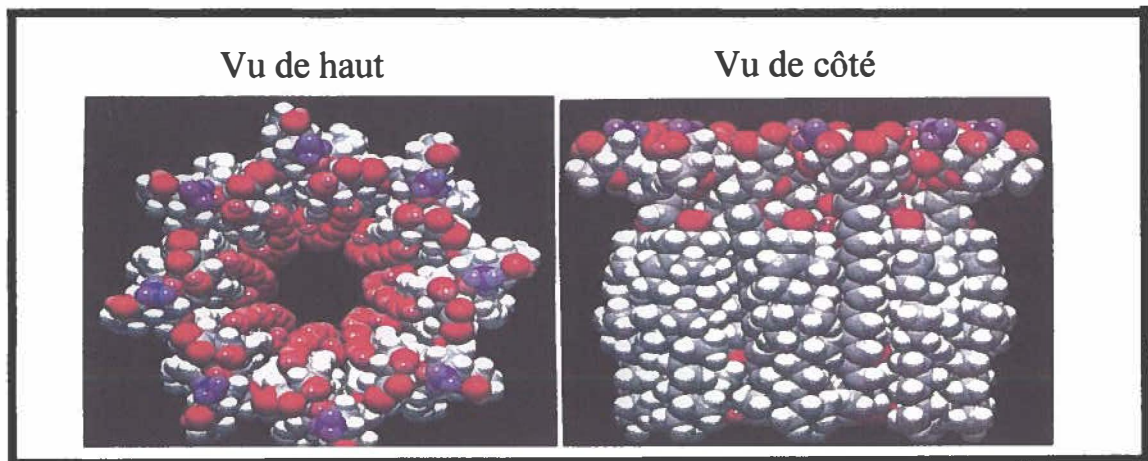


FIGURE 1.2: structure hypothétique d'un pore d'AmB (Khutorsky, V.E., 1992). En rouge l'oxygène, en bleu l'azote, en gris le carbone et en blanc l'hydrogène

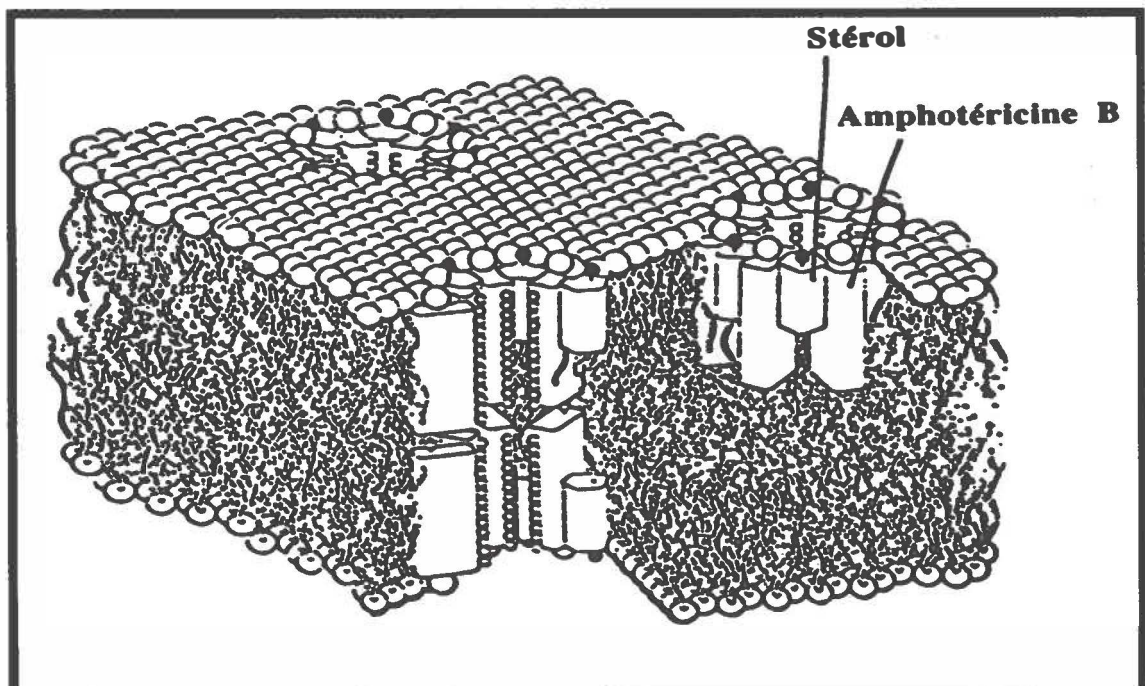


FIGURE 1.3: schéma d'un pore d'AmB formé de deux demi-pores (De Kruijff et al, 1974).

Selon certains auteurs (De Kruijff *et al*, 1974, Baginski *et al*, 1997, Gagos *et al*, 2001), chacun de ces demi-pores serait formé d'environ 6 à 9 molécules d'AmB et d'autant de molécules de stérols. Ce mécanisme de formation de pore par l'AmB n'a jamais directement été mis en évidence mais dernièrement, des études en spectrophotométrie et microscopie de force atomique (Gruszecki, 2002) ont démontré clairement que le médicament forme des pores dans la membrane cellulaire par lesquels le contenu de la cellule peut s'échapper vers le milieu extracellulaire. Cette fuite irréversible du contenu de la cellule mène inévitablement à la mort cellulaire.

1.1.5 Interactions AmB/ stérols.

Jusqu'à maintenant, plusieurs hypothèses tentant d'expliquer les modifications de la perméabilité membranaire induite par l'AmB ont été émises. On retrouve à ce sujet deux grandes lignes de pensées: certains chercheurs, nous le verrons dans la section suivante, croient que la présence de stérols serait nécessaire à l'interaction de l'AmB avec la membrane alors que d'autres croient que la présence de stérols est facultative.

1.1.5.1 Mécanisme impliquant les stérols.

Le premier mécanisme selon lequel la présence des stérols est requise pour que l'AmB interagisse avec la membrane, pourrait se diviser en deux grandes écoles de pensée. La première stipule que les stérols, plutôt que d'être directement impliqués dans la formation du pore membranaire, seraient plutôt responsables d'une modification dans l'organisation de la membrane (Dynarowicz *et al*, 2003). En effet, ces derniers pourraient être la cause de l'apparition de défauts dans la membrane, formant en quelque sorte des "trous" par lesquels l'AmB pourrait pénétrer plus facilement. Dans ce cas-ci, le pore

membranaire serait formé par l'antibiotique seulement (Bonilla et Marin, 1991, Fujii *et al*, 1997).

La seconde école de pensée, elle, suggère que l'AmB forme un complexe avec le stérol, lequel serait organisé en pores membranaires. Selon ce mécanisme, il semble que l'AmB interagisse avec les stérols membranaires et exerce son action par l'entremise de pores-canaux (De Kruijff *et al*, 1974. Coterio *et al*, 1998).

En milieu membranaire, les molécules d'AmB seraient en orientation quasi-parallèles par rapport aux lipides, de telle sorte que le pore serait perpendiculaire au plan de la membrane. La figure 1.4 représente le schéma d'un pore membranaire composé d'AmB et de cholestérol. Des liens hydrogènes ainsi que des liaisons hydrophobes entre les molécules d'AmB et de stérols seraient responsables de la stabilité du canal (Khutorsky, 1992). Ces liaisons hydrophobes impliqueraient, du côté de l'AmB, le système des sept liaisons doubles conjuguées alors qu'au niveau des stérols, ce serait toute la longueur de la molécule qui serait impliquée.

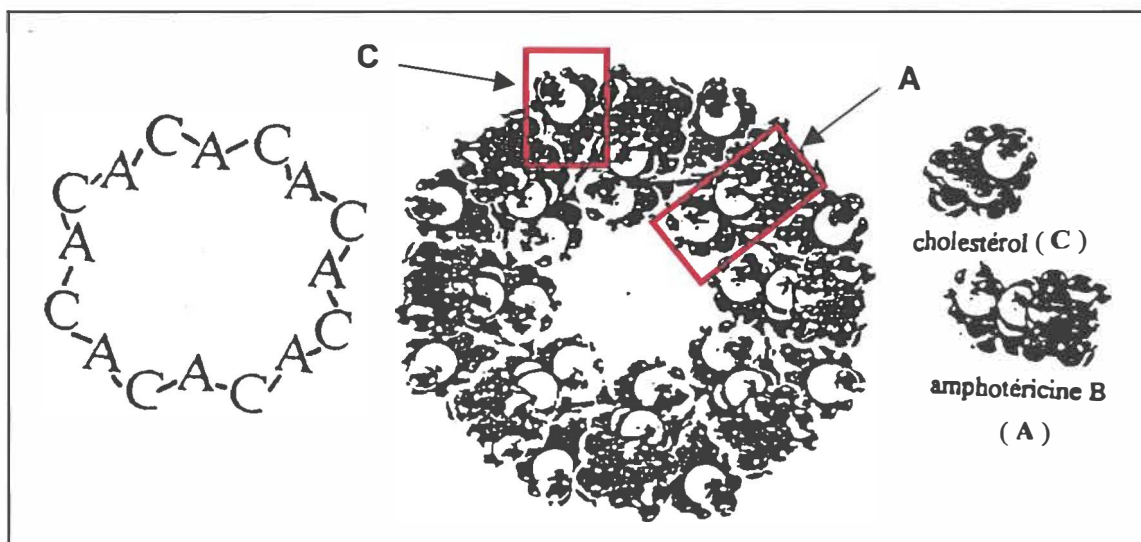


FIGURE 1.4: schéma d'un pore membranaire (vue de haut) composé d'AmB et de cholestérol (De Kruijff *et al*, 1974).

Il a été démontré que la perméabilité membranaire induite par l'AmB dépendait de plusieurs facteurs dont, entre autres, la nature du stérol impliqué (Cass *et al*, 1970, Andreoli, 1974). La figure 1.5 montre les structures moléculaires de différents stérols que nous avons utilisés dans le cadre de ce travail de recherche: le cholestérol, l'ergostérol et le 7-déhydrocholestérol (7-DHC). Ce dernier est étudié afin de nous permettre de vérifier les bases moléculaires de l'hypothèse de Feigin, tel qu'expliqué plus loin. L'affinité de l'AmB pour les différents stérols pourrait être dépendante de la structure moléculaire de ces derniers. En effet, il semble que plus la molécule de stérol est plane, permettant un rapprochement plus efficace de l'AmB, plus l'affinité du médicament pour le stérol est grande. Par exemple, le cycle B de l'ergostérol est plus plan que celui du cholestérol et ceci expliquerait l'affinité supérieure de l'AmB envers ce stérol en comparaison avec le cholestérol (Langlet *et al*, 1994).

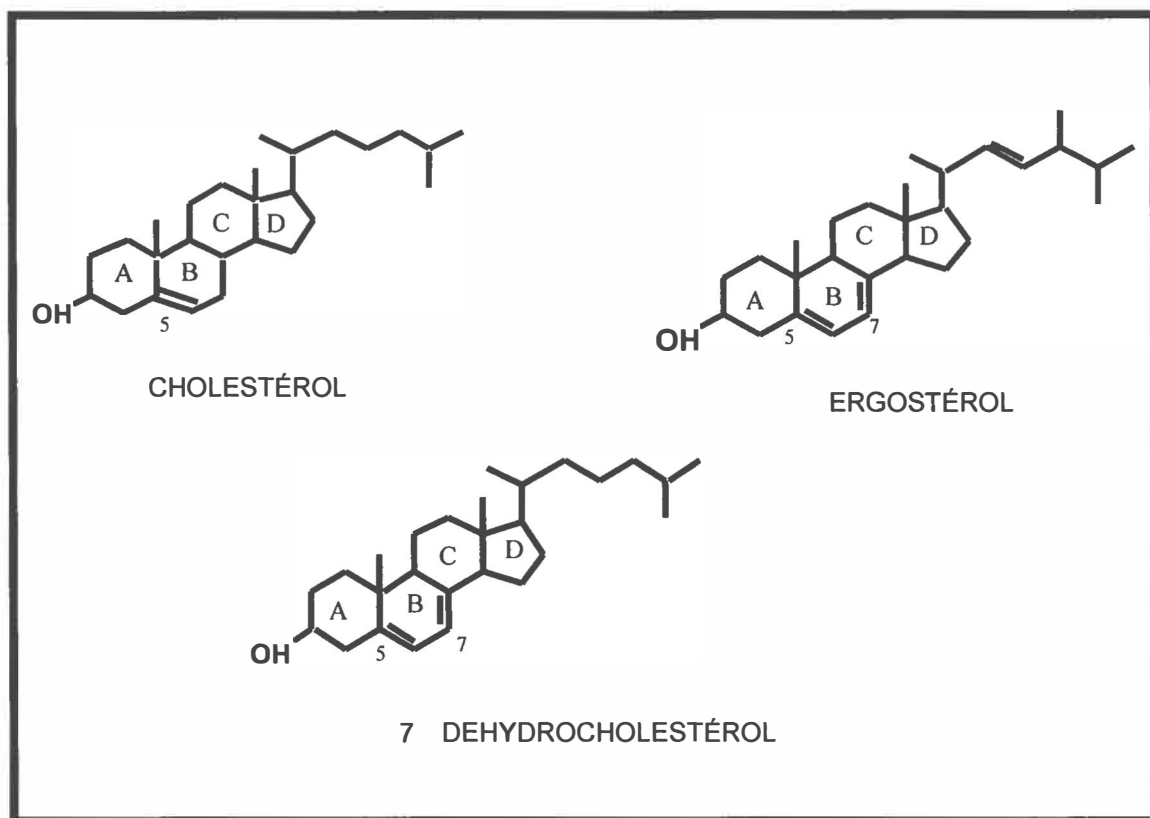


FIGURE 1.5: structure moléculaire des stérols étudiés.

Récemment, des études en spectroscopie UV-visible (Charbonneau *et al*, 2001) concernant la sélectivité d'interaction de l'AmB avec différents stérols (cholestérol, ergostérol, 7-DHC, et différents oxystérols) en solution aqueuse ont démontré que l'AmB a une affinité plus grande envers le 7-DHC que l'affinité qu'elle manifeste envers l'ergostérol ou le cholestérol. D'autres études (Baginski *et al*, 1989) suggèrent plutôt que ce soit la double liaison supplémentaire sur la chaîne latérale de l'ergostérol qui serait responsable de la plus grande affinité de l'AmB envers ce dernier. Le 7-DHC, quant à lui, montre une double liaison supplémentaire en C₇ tout comme l'ergostérol mais ne possède pas de double liaison supplémentaire sur sa chaîne latérale. Ces différences pourraient optimiser l'interaction de l'AmB avec le 7-DHC. Comme nous l'avons déjà mentionné précédemment, il a été démontré par des études en solution aqueuse (Charbonneau *et al*, 2001) que d'infimes modifications de la structure moléculaire des stérols sont responsables de différences dans l'interaction de l'AmB avec ces derniers.

1.1.5.2 Mécanisme n'impliquant pas les stérols.

Récemment, Gruszecki (2002) a mis en évidence, par microscopie à force atomique, la présence de pores membranaires sur des monocouches de DPPC contenant l'AmB. En absence de stérol, le pore se formerait quand même mais ne serait évidemment constitué que de molécules d'AmB. La formation de ces pores serait influencée par l'interaction AmB/lipides et serait dépendante de la nature du lipide. Des études (Cohen, 1992) de perméabilité provoquée par l'AmB sur des liposomes de DMPC ont démontré que l'interaction de l'AmB avec le lipide augmente lorsque la longueur de la chaîne d'acides gras d'un lipide saturé diminue et aussi lorsque le nombre de doubles liaisons de la chaîne aliphatique d'un lipide augmente. Évidemment, la longueur de la chaîne aliphatique du lipide détermine l'épaisseur de la bicouche ce qui aurait une répercussion au niveau de l'interaction de l'AmB avec la membrane si par exemple, avec un lipide donné, la membrane était plus mince que le pore

formé par l'AmB. Les études portant sur les interactions de l'AmB avec les membranes biologiques vont dans le même sens: la sensibilité de ces membranes à l'AmB ainsi qu'aux autres antibiotiques polyéniques, est déterminée par l'organisation globale de la membrane et non seulement par un seul composant.

Comme nous pouvons le constater, l'AmB est une molécule très complexe. Plusieurs groupes de recherche tentent toujours d'élucider son mécanisme d'action et de nouvelles applications pour ce médicament sont proposées. C'est le cas entre autres, de l'hypothèse lancée par Feigin quant à l'utilisation de l'AmB pour le traitement du cancer du foie, sur lequel est basé ce travail de recherche.

1.2 Hypothèse de Feigin.

Une hypothèse récemment proposée par Feigin (Feigin, 1999) stipule que l'AmB puisse être utilisée pour le traitement du carcinome hépatocellulaire, tumeur épithéliale maligne dont les cellules tumorales ressemblent morphologiquement et fonctionnellement à des hépatocytes. Ce type de tumeurs fait partie de celles les plus fréquemment rencontrées chez l'homme à travers le monde. Plusieurs agents, tels les anthracyclines, les thérapies hormonales et les antibiotiques antitumoraux, par exemple, ont été expérimentés pour traiter ce type de cancer mais ont échoué puisqu'ils montrent un taux de réponse inférieure à 20%.

Les antibiotiques polyéniques, dont l'AmB fait partie, sont très efficaces comme agents antifongiques mais sont aussi considérés comme des agents antitumoraux potentiels (Vertut-Croquin *et al*, 1986. Coune, 1988). L'obstacle majeur à surmonter est que les cellules tumorales ne sont pas beaucoup plus sensibles au médicament que les cellules saines. Une voie possible pour rendre les cellules plus sensibles aux agents antitumoraux serait de remplacer,

de façon sélective, le cholestérol dans les cellules cibles par un de ses précurseurs biosynthétiques. En effet, il semble que le fait de remplacer le cholestérol dans les cellules tumorales par un autre stérol qui aurait plus d'affinité pour les antibiotiques polyéniques pourrait augmenter la sensibilité de ces cellules aux dits médicaments. De plus, comme le cholestérol est omniprésent dans les cellules, tant saines que tumorales, le fait de remplacer sélectivement le cholestérol dans les cellules cancéreuses permettrait de cibler l'activité du médicament et d'ainsi minimiser sa toxicité.

L'activité antifongique de l'AmB, comme nous l'avons mentionné précédemment, est attribuable au fait que l'antibiotique a une plus grande affinité pour l'ergostérol, principal stérol des membranes cellulaires des champignons, alors que les membranes cellulaires des mammifères contiennent principalement du cholestérol. Des études (Barton *et al*, 1974) ont démontré que la substitution de l'ergostérol par un autre stérol dans les membranes cellulaires des champignons les rendaient résistantes à l'AmB. Dès ce moment, Feigin et ses collaborateurs (Feigin, 1978, 1979) se sont attardés à essayer de mettre en évidence les raisons de cette affinité supérieure de l'AmB pour l'ergostérol. Ils ont en effet observé une forte corrélation entre la sensibilité des bicouches à l'AmB et la présence d'un système 5,7-diène dans la structure moléculaire des stérols (voir figure 1.5). Les stérols contenant un tel système, comme par exemple l'ergostérol et le 7-DHC, sont effectivement dix fois plus sensibles à l'action de l'AmB si nous les comparons avec des stérols ne contenant pas ce système, comme c'est le cas du cholestérol. Plusieurs expériences ont été menées avec plusieurs stérols afin de mesurer l'habileté de chacun d'eux à augmenter la sensibilité de bicouches lipidiques à l'AmB et à la nystatine (Feigin, 1979). À la lumière de ces résultats, il semble que la présence ou l'absence d'une double liaison ou d'un groupement méthyle supplémentaire dans la chaîne latérale n'aurait aucun effet sur la sensibilité des stérols à l'AmB.

C'est suite à ces observations que Feigin a émis l'hypothèse que si le cholestérol pouvait être substitué, dans les cellules tumorales du foie, par un stérol contenant dans sa structure moléculaire un système 5,7-diène, une augmentation significative de la sensibilité de ces cellules cibles à l'AmB pourrait être observée. Comme le montre la figure 1.6, le 7-DHC est un précurseur biosynthétique du cholestérol et il contient dans sa structure ce système 5,7-diène.

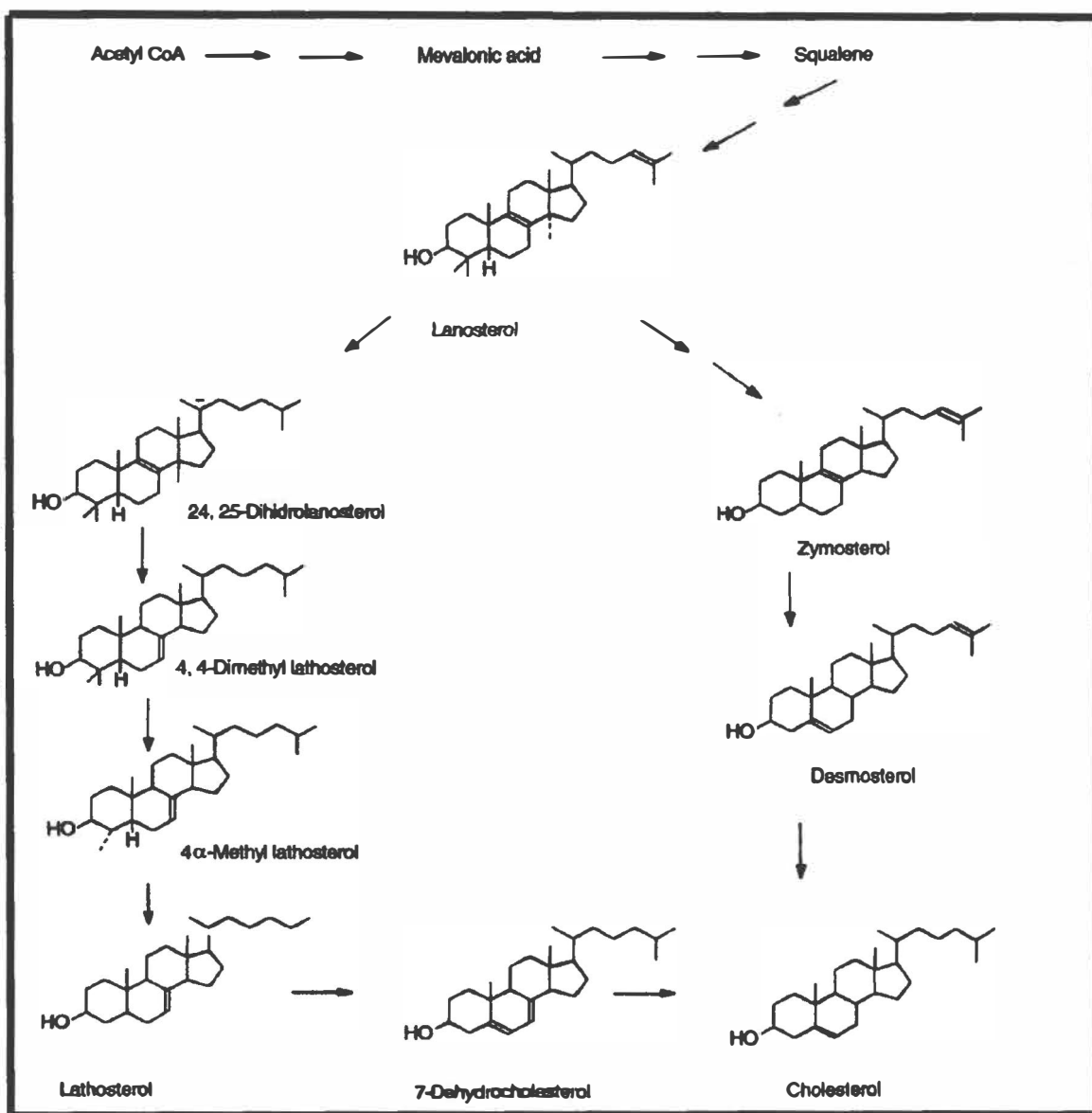


FIGURE 1.6: biosynthèse du cholestérol (Feigin A.M., 1999).

Feigin s'appuie sur le fait qu'il y aurait trois conditions à respecter afin de rendre possible l'accumulation sélective d'un des précurseurs du cholestérol dans les cellules tumorales. Premièrement, la cholestérogénèse est très élevée dans les cellules cancéreuses puisque ces dernières ont perdu le contrôle de leur métabolisme. Deuxièmement, il faut minimiser la biosynthèse du cholestérol dans les cellules saines du foie et des intestins, là où s'effectue presque entièrement la cholestérogénèse (Turley *et al*, 1981). Finalement, il faut utiliser un inhibiteur bloquant spécifiquement la conversion du précurseur désiré en cholestérol.

Un taux élevé de cholestérol dans l'alimentation ferait en sorte que le taux de production de celui-ci serait diminué car il y a déjà une quantité importante disponible pour subvenir aux besoins de l'organisme. Une diète riche en cholestérol serait donc un moyen de diminuer de façon très importante la biosynthèse du cholestérol. En effet, il semble que chez l'humain ainsi que chez l'animal, la biosynthèse du cholestérol au niveau du foie serait diminuée d'au moins cent fois lorsque le sujet absorbe une diète riche en cholestérol (Burtin *et al.*, 1977).

Les cellules cancéreuses, par exemple celles du carcinome hépatocellulaire contre lequel, selon l'hypothèse de Feigin, l'AmB pourrait être efficace, présentent deux particularités: tout d'abord la synthèse du cholestérol est beaucoup plus importante dans les cellules tumorales du foie que dans les cellules normales (Burtin *et al*, 1977. Gregg *et al*, 1986). De plus, les cellules cancéreuses du foie n'ont plus le contrôle physiologique de la cholestérogénèse, ce qui fait en sorte que, même en présence d'une grande quantité de cholestérol dans l'organisme, ces cellules vont poursuivre leur biosynthèse du cholestérol.

Il est intéressant de noter que les cellules précancéreuses du foie perdent le contrôle de leur métabolisme plusieurs semaines avant de démontrer des

signes histologiques du carcinome hépatocellulaire. Cette absence de contrôle est liée au fait que l'enzyme clé de la biosynthèse du cholestérol, la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMG-CoA réductase), ne répond plus à la présence du cholestérol. Il a été démontré (Kawata *et al*, 1990) que cette enzyme est quatre fois plus active dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales du foie d'un même patient. Il est donc logique que la biosynthèse du cholestérol au niveau du carcinome hépatocellulaire soit, elle aussi, beaucoup plus importante.

La biosynthèse normale du cholestérol s'effectue à partir de l'acétate et passe par plusieurs étapes. Habituellement, la dernière étape de cette biosynthèse est celle de la conversion du 7-DHC en cholestérol. Comme le suggère Feigin, il serait primordial de pouvoir bloquer de façon spécifique la biosynthèse du cholestérol à ce niveau. Une molécule bien connue, le AY-9944 (trans-1, 4-bis[2-chlorobenzylaminométhyl] cyclohexane dihydro-chloride) est un inhibiteur de l'enzyme 7-dehydrocholestérol- Δ^7 -réductase, responsable de la conversion du 7-DHC en cholestérol. Cette substance serait donc utile pour empêcher la conversion du 7-DHC en cholestérol.

En 1976, l'équipe de Sabine (Burtin *et al.*, 1976) a démontré que la combinaison de AY-9944 et une diète riche en cholestérol pouvait rendre possible l'accumulation de 7-DHC au niveau des cellules précancéreuses du foie. Il serait donc possible d'induire une accumulation sélective de 7-DHC au niveau des cellules malignes du foie et, par le fait même, d'augmenter la sensibilité de ces cellules à l'AmB. C'est à la suite à ces constatations que Feigin a lancé l'hypothèse de la thérapie contre le carcinome hépatocellulaire basée sur la substitution du cholestérol par le 7-DHC dans les cellules atteintes. La figure 1.7 présente le schéma général de cette thérapie.

Une diète riche en cholestérol ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la biosynthèse du cholestérol permettront, comme nous l'avons

expliqué précédemment, l'accumulation de 7-DHC dans les cellules cancéreuses du foie alors que le contenu des cellules normales, lui, sera très peu modifié. Les cellules cancéreuses seront donc sensibles à l'action de l'AmB alors que les cellules saines seront moins affectées par le médicament. C'est cette nouvelle perspective d'utilisation de l'AmB que nous tenterons d'étudier plus en profondeur à travers ce travail de recherche puisque Feigin a émis cette hypothèse mais il n'existe aucune donnée disponible à ce jour qui viennent confirmer ou infirmer les bases physico-chimiques de cette hypothèse.

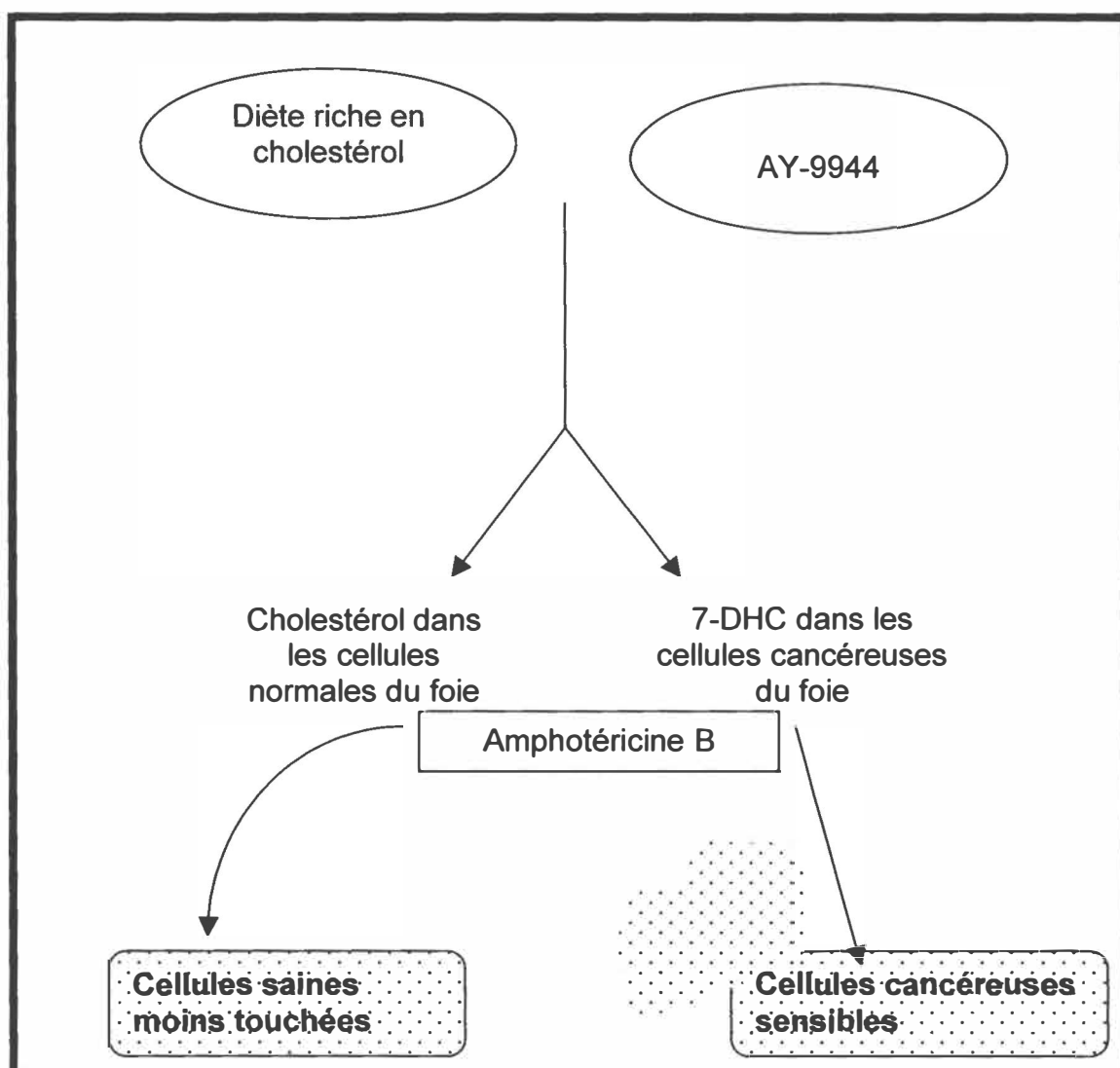


FIGURE 1.7: schéma de la thérapie contre le carcinome hépatocellulaire proposée par Feigin (Feigin A.M., 1999).

1.3 But du travail de recherche.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, Feigin a émis l'hypothèse que l'AmB, médicament antifongique classique et reconnu pour sa grande efficacité, pourrait être utilisé pour le traitement du carcinome hépatocellulaire. Ce type de tumeurs étant fréquemment rencontrées chez l'homme, nous allons tenter, à travers ce travail de recherche, d'apporter des connaissances sur cette nouvelle stratégie thérapeutique contre le carcinome hépatocellulaire. Le but du présent travail est donc de vérifier les bases physico-chimiques de l'hypothèse de Feigin par l'étude de l'interaction de l'AmB avec différents stérols contenus dans de grands liposomes unilamellaires de DPPC, couramment utilisés comme modèle de la membrane cellulaire. Nous avons stratégiquement choisi d'étudier les stérols suivants: le cholestérol, l'ergostérol et le 7-DHC afin d'être en mesure de comparer l'activité antifongique classique de l'AmB à l'activité anticancéreuse potentielle de ce médicament.

L'effet de l'AmB sur les bicouches contenant l'ergostérol sera étudié puisque ce dernier fait partie intégrante des membranes cellulaires des champignons ce qui nous permettra d'évaluer son pouvoir antifongique et de le comparer avec les données de la littérature. Les bicouches contenant le cholestérol, quant à elles, seront étudiées puisque ce dernier est le principal stérol des membranes cellulaires des mammifères et il est bien établi dans la littérature que la toxicité de l'AmB serait attribuable au fait que ce médicament a une affinité importante pour le cholestérol. Ceci nous permettra donc de comparer la toxicité de l'AmB à son pouvoir antifongique. Finalement, l'étude des bicouches contenant le 7-DHC, précurseur biosynthétique du cholestérol, nous permettra de vérifier les bases moléculaires de l'hypothèse de Feigin et de comparer le pouvoir anticancéreux potentiel de l'AmB à son activité antifongique classique.

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre précisera quels sont les produits qui ont été utilisés au cours de ce travail de recherche. Il décrira également comment les différentes solutions utilisées ont été préparées, ainsi que la méthode de préparation des grands liposomes unilamellaires. Pour terminer, nous expliquerons les différentes techniques employées soit la spectrofluorimétrie, la calorimétrie différentielle à balayage ainsi que la spectroscopie UV-visible.

2.1 Produits.

Le phospholipide utilisé pour la préparation des liposomes, soit le DPPC, dont la structure moléculaire est présentée à la figure 2.1, provient de la compagnie Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al.) et est sous forme de poudre. L'AmB employée provient de la compagnie Sigma (St-Louis MO.) et est pure à 80%. Les stérois quant à eux, soit le cholestérol, l'ergostérol et le 7-DHC, proviennent de la compagnie Sigma (Oakville, ON.) et sont purs à 98%. La carboxyfluorescéine (CF) utilisée comme sonde fluorescente, provient de la compagnie Molecular Probes (Eugene, OR.) et est composée d'un mélange d'isomères. La figure 2.2 présente la structure moléculaire de la CF. Cette substance est très sensible à la lumière, spécialement lorsqu'elle est en solution, c'est pourquoi nous devons recouvrir les fioles de papier aluminium. Les phosphates de sodium monobasiques et dibasiques servant à la fabrication de la solution tampon proviennent de la compagnie Sigma, tout comme le Triton X-100 utilisé comme détergent et le diméthyl sulfoxyde (DMSO) dans lequel l'AmB est solubilisé. Finalement le chloroforme, de grade spectroscopique, provient de la compagnie Anachemia (Montréal, QC.). L'eau servant à la préparation des solutions est déminéralisée et doublement distillée sur un système Sybron-Barnstead de la compagnie Fisher Scientific (Montréal, QC.)

2.2 Préparation des solutions.

2.2.1 L'amphotéricine B.

L'AmB est préparée en diluant, dans un petit volume de DMSO, la quantité nécessaire à la préparation d'une solution mère à partir de laquelle nous préparons des solutions à différentes concentrations soit 250×10^{-7} M, 65×10^{-7} M et 10^{-7} M. Ces différentes concentrations sont utilisées pour les raisons

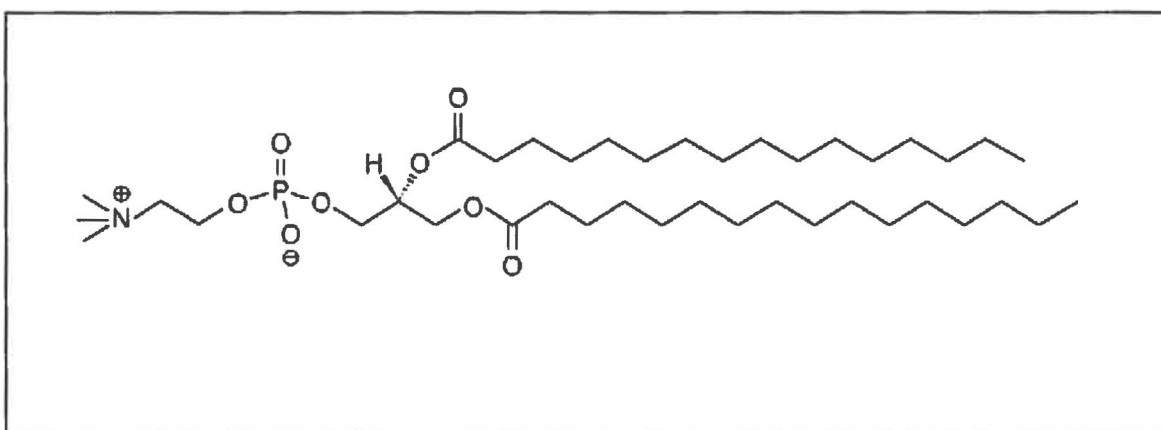


FIGURE 2.1: structure moléculaire du DPPC.

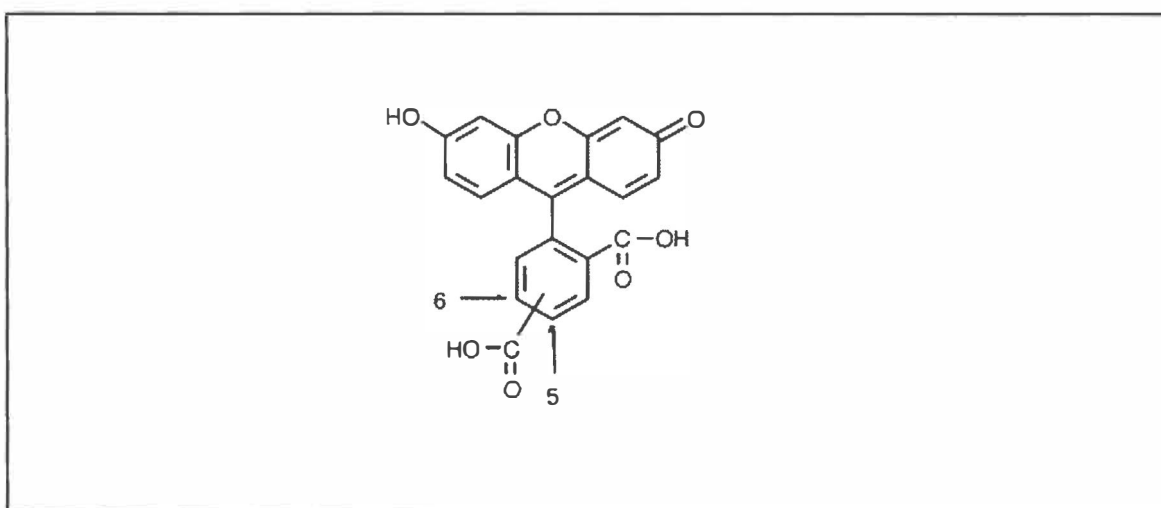


FIGURE 2.2: structure moléculaire de la CF.

suivantes: la première, celle de 250×10^{-7} M représente la concentration administrée par voie intraveineuse lors d'un traitement. À cette concentration, l'AmB se trouve majoritairement sous forme de grands agrégats. La seconde, celle de 65×10^{-7} M, représente la concentration sérique et à cette concentration, l'AmB se trouve majoritairement sous forme d'oligomères. La dernière de 10^{-7} M est celle qui se trouve près de la concentration micellaire critique qui est de 5×10^{-7} M (Tancrède *et al*, 1990) et à cette concentration l'AmB se trouve majoritairement sous forme monomérique.

2.2.2 Les stérols.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'effet de trois stérols est étudié soit le cholestérol, l'ergostérol et le 7-DHC. Les bicouches formées de DPPC seul permettent d'étudier l'effet de l'AmB sur un système simple et servent de référence pour les systèmes binaires comprenant lipides et stérols. L'ergostérol est présent à une concentration d'environ 15% des lipides totaux dans les membranes cellulaires des champignons alors que le cholestérol représente plus que 25% des membranes cellulaires des mammifères. C'est pour cette raison que ces concentrations sont étudiées. Nous utilisons également une concentration de 5% afin d'observer le mécanisme d'action de l'AmB sur les bicouches où les stérols sont présents en très petite quantité. Il est à noter que les stérols sont ajoutés aux lipides lors de la pesée et le tout est solubilisé dans le chloroforme.

2.2.3 La carboxyfluorescéine (CF).

La CF (voir figure 2.2) est une sonde fluorescente couramment utilisée pour permettre la mesure d'efflux par spectrofluorimétrie. La solution de CF 50 mM est préparée en ajoutant tout d'abord un minimum de NaOH afin de permettre la solubilisation du composé et l'ajustement du pH de cette solution à

7,0. Du tampon phosphate à pH 7,0 est par la suite ajouté ainsi que de l'eau afin de compléter le volume final.

2.2.4 Solution tampon.

Le tampon utilisé est un tampon phosphate fabriqué à partir de phosphate de sodium monobasique et dibasique et dont le pH est ajusté à 7,0. Ce tampon phosphate est utilisé tel quel sauf dans le cas où on l'utilise en présence de liposomes contenant de la CF, soit lors de manipulations en spectrofluorimétrie. Dans ce cas, à l'étape de la chromatographie sur colonne, du NaCl est incorporé au tampon afin de respecter les conditions d'isoosmolarité et ainsi éviter que les liposomes n'éclatent et se vident de leur contenu.

2.2.5 Triton.

Le triton X-100 est un détergent puissant utilisé pour provoquer le bris des liposomes, permettant ainsi la fuite totale de la CF dans le milieu externe. Il est dilué dans l'eau de façon à obtenir une solution à une concentration de 10% v/v.

2.3 Préparation des liposomes.

Le phospholipide utilisé pour la fabrication des liposomes est le DPPC. Ce phospholipide est formé d'une tête polaire et de deux chaînes latérales saturées, constituées chacune de 16 atomes de carbone (voir figure 2.1). Ce phospholipide a une température de transition de 41,4 °C, il est donc en phase gel à température ambiante (25°C).

Les liposomes sont préparés par la méthode classique de gel/dégel. Tout d'abord, on prépare une solution mère en solubilisant les lipides dans le chloroforme. Tel que mentionné précédemment, lorsqu'un stérol est ajouté à la préparation, il est incorporé sec aux phospholipides lors de la pesée, avant même d'ajouter le chloroforme. Ces stérols seront incorporés aux liposomes à différentes concentrations soit à 0%, 5%, 15% et 25% par rapport aux phospholipides. Cette solution peut être conservée à basse température pendant plusieurs jours. La figure 2.3 présente les étapes de préparation de liposomes par la méthode classique de gel/dégel. La première étape consiste à prélever une certaine quantité de la solution mère de façon à obtenir une solution d'une concentration de 4 mg/ml. Cette solution est déposée dans un ballon contenant des billes de verre afin d'augmenter la surface de contact. Une quantité minimale de chloroforme est ajoutée pour permettre la solubilisation optimale des lipides et le tout est placé sur un rotoévaporateur pendant 20 minutes, au-dessus d'un bain thermostaté à une température légèrement supérieure (50°C) à la température de transition de phase du phospholipide utilisé (voir étape 1 figure 2.3).

Par la suite, lorsque le chloroforme est totalement évaporé, le film lipidique est redistribué dans la solution aqueuse qui est, dans notre cas, le tampon phosphate (voir étape 2 figure 2.3). Pour les liposomes utilisés en spectrofluorimétrie et donc, incorporant la CF, le film lipidique est redistribué dans une solution contenant la sonde fluorescente. De cette façon, la CF se trouve aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur des liposomes. La suspension liposomale ainsi formée est ensuite recueillie et quatre cycles de gel/dégel sont effectués respectivement dans un bain d'azote liquide et un bain thermostaté à 50°C. L'objectif ici est de briser les multicouches et d'obtenir une majorité de vésicules unilamellaires. Il est à noter qu'une agitation au vortex est effectuée entre chaque cycle.

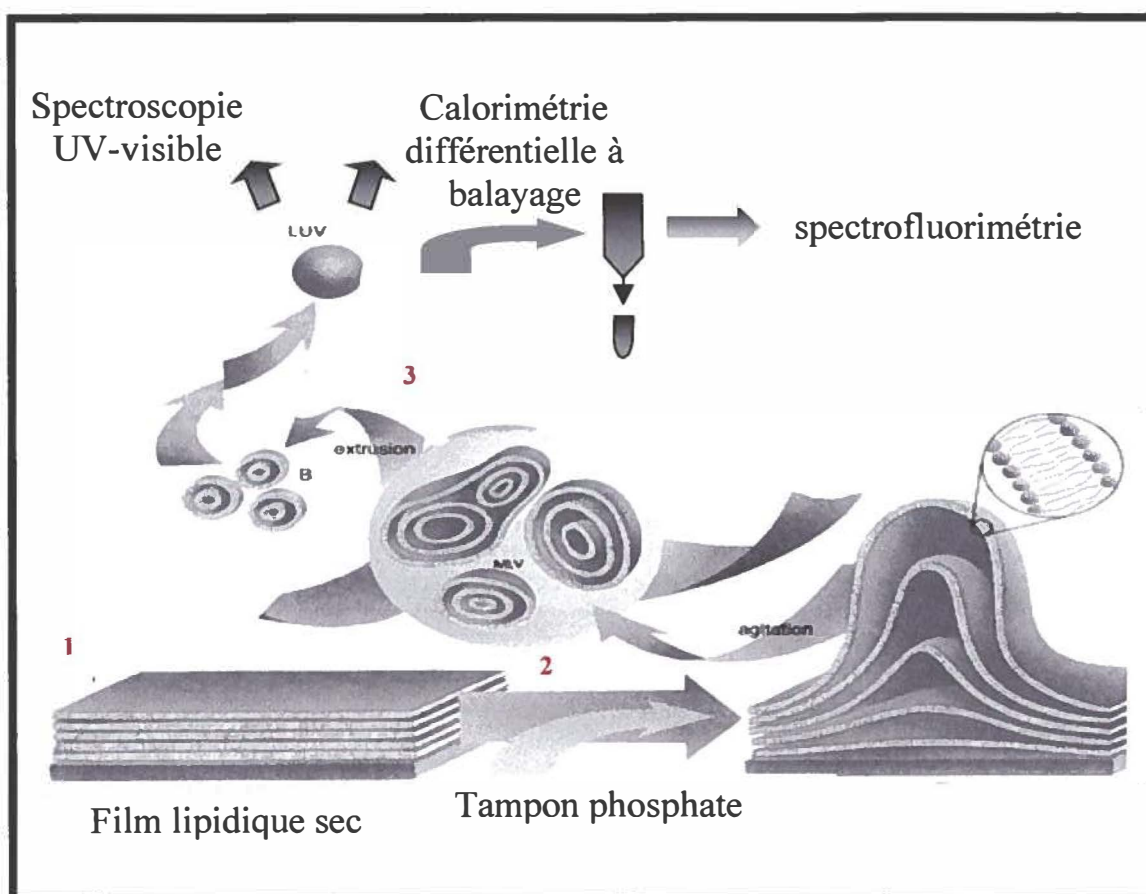


FIGURE 2.3: étapes de fabrication des liposomes par la méthode de gel/dégel.

Subséquentement, dix cycles d'ultrafiltration sont exécutés (voir étape 3 figure 2.3) à l'aide d'un extruder sur lequel est installé un filtre muni de pores de $0,2\ \mu\text{m}$ de diamètre (Nucléopore Toronto, Canada) et ce, dans le but d'obtenir majoritairement des LUV (large unilamellar vesicles). La technique d'ultrafiltration a l'avantage de ne requérir qu'une pression modérée d'azote (de 200 à 600 psi) et les pores calibrés permettent d'obtenir une population liposomale de taille relativement homogène. L'utilisation simultanée du gel/dégel et de l'ultrafiltration permet de maximiser le taux d'encapsulation de la sonde fluorescente. La teneur en lipides de la solution liposomale suite à l'ultrafiltration a été contrôlée par calorimétrie différentielle à balayage et se situe à 3mg/ml.

Quand les liposomes ont été préparés dans la solution contenant la sonde fluorescente, il faut éliminer la CF présente à l'extérieur des liposomes. Pour ce faire, la solution résultante est filtrée à travers une colonne à chromatographie PD10 à usage unique (Amersham Pharmacia Québec, Canada) dont le mécanisme d'action est l'exclusion par la taille. La colonne contient un gel Sephadex G25M qui retarde la CF libre ce qui permet d'éliminer la CF qui n'est pas incorporée aux liposomes (Meyuhas *et al*, 1995). La fraction récoltée par chromatographie est donc une solution de vésicules englobant la CF et exempte de sonde fluorescente libre. De ce fait, l'intérieur des liposomes présentera un excédent d'espèces chargées par rapport à l'extérieur. C'est pour cette raison que du NaCl est ajouté au tampon d'élution (tampon phosphate) afin de respecter les conditions d'isoosmolarité. La quantité de sel à ajouter au tampon phosphate dépend de la quantité de NaOH nécessaire à la solubilisation de la CF lors la préparation de cette solution. Par exemple, si nous devons ajouter 2,4 ml de NaOH 1M pour solubiliser la CF lors de la préparation de 20 ml de cette solution (donc 0,120 M NaOH dans 20 ml), ceci provoquera l'ionisation de la CF initialement neutre en CF^{2-} ce qui fera en sorte qu'après avoir éliminé la CF à l'extérieur des liposomes, il y aura un excédent de charges à l'intérieur. Cet excédent de charges correspond à une concentration totale de 190 mM (0.050M de CF^{2-} , 0.120 M de Na^+ et 0.020 M de OH^- (0,100M de OH^- ayant ionisé la CF), nous devons donc ajouter 95mM de NaCl (soit 190 mM d'espèces chargées) à l'extérieur des liposomes, soit dans notre cas dans le tampon phosphate, afin de contrebalancer l'excédent de charges présent à l'intérieur des liposomes.

Pour les mesures prises en spectrofluorimétrie, une série de quatre tubes est préparée. Elle comprend le tube contrôle (contenant 65 μ L de la solution liposomale et le tampon phosphate 20 mM, pH 7), et un tube pour chacune des trois concentrations d'AmB étudiées (contenant aussi la solution liposomale, l'AmB et le tampon phosphate). Il est à noter que le volume final est toujours de 2 ml. Il en est de même pour les mesures en UV-visible, où le blanc comprend

la solution liposomale et du tampon phosphate alors que les échantillons contiennent, en plus, les différentes concentrations d'AmB à analyser. Pour ce qui est de la calorimétrie différentielle à balayage, les échantillons, dont le volume final est encore de 2 ml, contiennent ou non l'AmB aux différentes concentrations à étudier, ainsi que la solution liposomale et le tampon phosphate.

2.4 Techniques utilisées.

2.4.1 Spectrofluorimétrie.

La fluorescence est, comme nous le savons, attribuable à la radiation émise lorsqu'une molécule passe d'un état excité à un état fondamental. La spectrofluorimétrie est la technique qui nous servira à évaluer la perméabilité des liposomes à l'AmB, grâce à l'efflux de la carboxyfluorescéine (Schwarz *et al*, 1995) encapsulée dans des liposomes contenant ou non les différents stéroïdes dans leur partie aliphatique. C'est donc à partir de cette solution liposomale que les mesures de fluorescence sont prises et c'est par le calcul du pourcentage d'efflux de la CF, décrit ci dessous, que l'effet de l'AmB est étudié. Les expériences ont été effectuées à au moins quatre reprises et les données représentent une moyenne des résultats obtenus.

Les mesures de fluorescence sont prises à l'aide d'un appareil Shimadzu RF-540 (Shimadzu, Japon). Les paramètres utilisés sont les suivants:

- Échelle de l'abscisse $\times 2$
- Échelle de l'ordonnée $\times 1$
- Fente d'excitation et d'émission 10nm
- Longueur d'onde d'excitation 490nm
- Longueur d'onde d'émission 519nm
- Sensibilité basse (2)
- Vitesse de balayage 6

La fluorescence de départ est mesurée à l'aide du tube contrôle contenant la solution liposomale et le tampon phosphate. Cette fluorescence est très faible car la signal qu'émet la CF, comme pour les autres fluorophores, est "quenchée" due à la forte concentration de cette sonde à l'intérieur des vésicules. La concentration de CF étant très grande à l'intérieur des vésicules, il y a beaucoup de collisions entre les molécules avoisinantes présentes à l'intérieur des liposomes, ce qui fait qu'aucun signal de fluorescence n'est détecté par l'appareil. Par la suite, l'ajout de Triton X-100 provoque la rupture des liposomes et permet de mesurer la fluorescence totale de la sonde lorsqu'elle est diluée dans toute la solution. L'augmentation du signal de fluorescence observé entre le départ, c'est à dire lorsque les vésicules sont intactes et le moment où le détergent brise les vésicules, est liée à la quantité de CF expulsée des liposomes sous l'effet du Triton X-100 et par le fait même à la quantité totale de sonde fluorescente qui a été encapsulée dans les vésicules.

Les autres tubes subissent le même traitement à la différence près que nous ajoutons, avant le détergent et pour chacun des tubes, une quantité précise d'AmB à l'extérieur des liposomes. Nous mesurons alors un efflux de CF vers le milieu extérieur après 15 minutes d'incubation. Ensuite par bris des liposomes avec le Triton X-100, nous mesurons la fluorescence totale et les différentes données recueillies nous permettent de calculer le pourcentage d'efflux, lequel reflète les perturbations causées dans la bicouche par l'incorporation de l'AmB dans la matrice lipidique. La figure 2.4 représente schématiquement le déroulement d'une expérience d'efflux de CF.

Le pourcentage d'efflux se calcule de la façon suivante:

$$\% \text{ efflux} = \frac{F_c - F_b}{F_d - F_b} \times 100\%$$

où F_b est la fluorescence au temps zéro (sans AmB), F_c est la fluorescence après l'ajout de l'AmB et finalement F_d est la fluorescence totale après ajout de Triton.

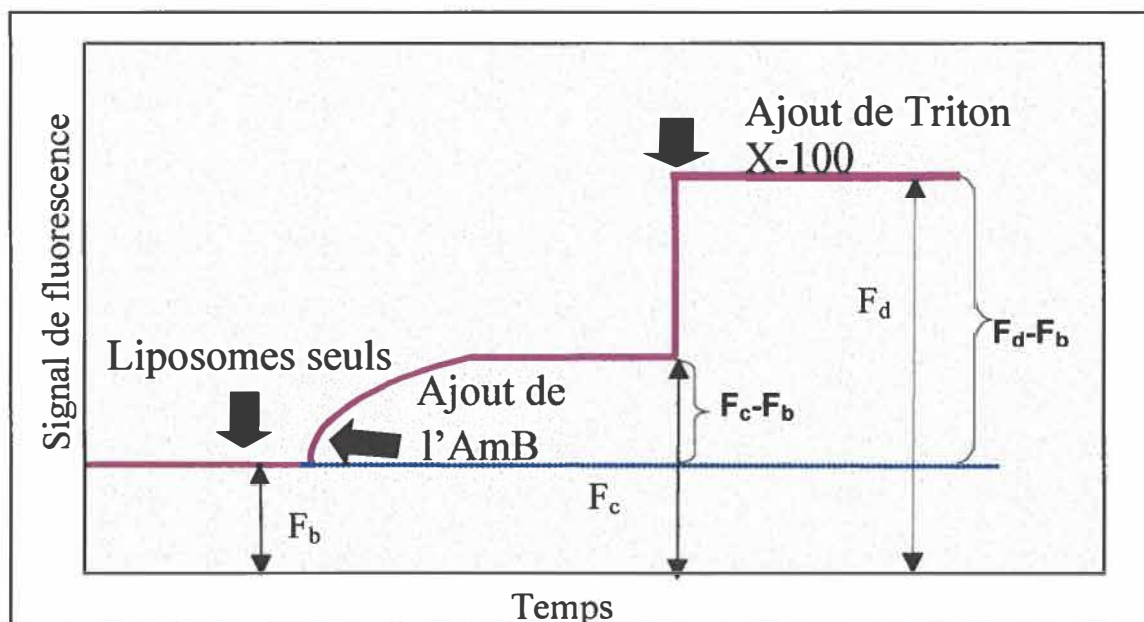


FIGURE 2.4: schéma des paramètres servant au calcul du pourcentage d'efflux.

Il est à noter qu'un bain thermostaté a été installé afin de maintenir la température de la cuvette constante à 25°C et que les mesures sont prises sous agitation constante. Les manipulations en fluorescence se font à une température fixe de 25°C puisque au-delà de cette température, les liposomes sont instables et la CF fuit ce qui ne permet pas d'évaluer convenablement l'effet de l'AmB sur la matrice lipidique. De plus, le volume final contenu dans les cuvettes est toujours de 2 ml.

2.4.2 Spectroscopie UV-visible.

La spectroscopie UV-visible est une technique très utile pour l'étude de l'organisation de l'AmB puisque cette dernière possède un spectre d'absorption

très sensible à son environnement (Barwicz *et al*, 1993. Lamy-Freund *et al*, 1993). L'antibiotique, dont le spectre d'absorption se situe dans la région comprise entre 300 et 450 nm, possède dans sa structure moléculaire un système de liaisons doubles conjuguées (voir figure 1.1), ce qui donne un spectre très caractéristique selon l'état d'agrégation et l'interaction avec un autre composé (Tancredi *et al*, 1990). En effet, comme le démontre la figure 2.5, lorsque l'AmB est sous forme monomérique, son spectre est caractérisé par la présence de 4 bandes bien définies dont les maximums d'absorption se situent à environ 348 nm, 365 nm, 385 nm et 409 nm. Cette dernière est la bande principale d'absorption de l'AmB monomère. Lorsque l'antibiotique se trouve sous forme agrégée, le spectre est considérablement modifié et la bande principale d'absorption se déplace dans la région de 348 nm. Par contre, en présence d'autres composés comme par exemple des stérols, la bande située à 409 nm se déplace vers la région comprise entre 414 et 416 nm (Barwicz *et al*, 1991) et la position exacte de cette dernière ainsi que l'allure du spectre sont caractéristiques de l'interaction de l'AmB avec le phospholipide et/ou le stérol. Nous pourrions donc, à l'aide de cette méthode, observer l'interaction de l'AmB avec les différents systèmes étudiés.

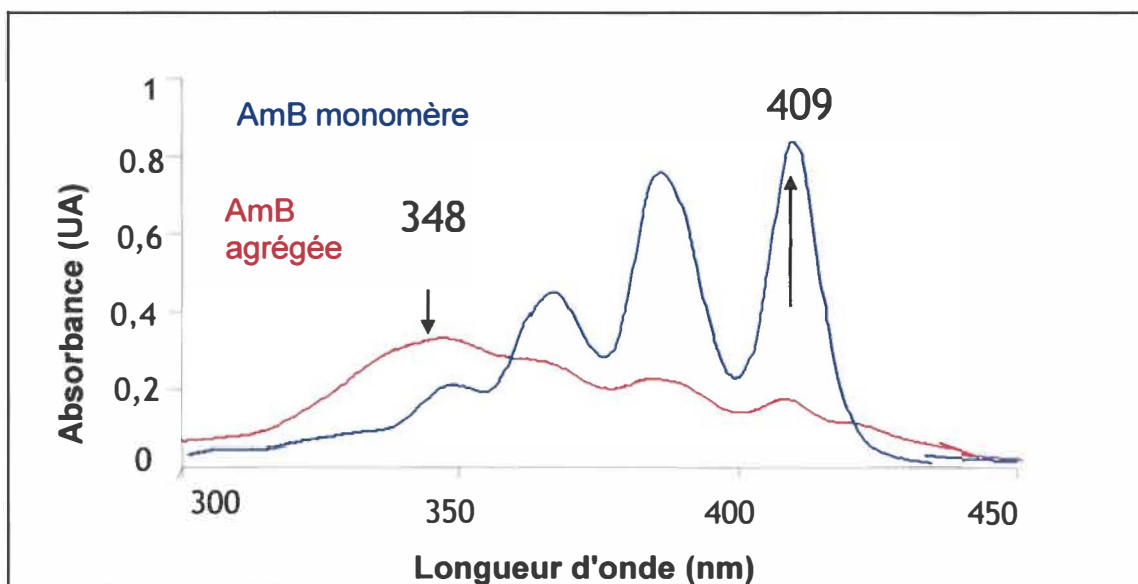


FIGURE 2.5: spectres UV-visible de l'amphotéricine B monomère et agrégée.

Le spectrophotomètre utilisé pour ces mesures est de marque Agilent HP chemstation (Agilent Technologies Canada, Ont.) et l'erreur absolue des mesures d'absorbance est de l'ordre de 1×10^{-5} . Les mesures sont effectuées à des températures de 25°C, soit sous la température de transition du lipide, à 37°C, soit à une température voisine de la transition principale du lipide et à 50°C, soit à une température au-delà de la température de transition du lipide.

La référence contient le mélange lipidique étudié sans AmB alors que les échantillons contiennent le mélange lipidique et l'AmB à différentes concentrations et donc nous obtenons le spectre de l'AmB seulement. Les manipulations ont été effectuées à au moins trois reprises.

2.4.3 Calorimétrie différentielle à balayage.

La calorimétrie différentielle à balayage est une technique couramment utilisée pour l'étude des modèles membranaires (Mc Mullen et Mc Elhaney, 1995). Elle permet l'observation des variations de capacités calorifiques qui surviennent lors de la transition de phase des bicouches lipidiques lorsque la température de l'échantillon est augmentée. Cette technique mesure le flux de chaleur différentiel nécessaire pour maintenir un échantillon à la même température que celle d'une référence. En absence d'une transition de phase, l'appareil ne mesure aucune différence de flux de chaleur à fournir aux deux cellules chauffées indépendamment. Par contre, lorsqu'une transition de phase survient, la quantité de chaleur à fournir à l'échantillon diffère de celle à fournir à la référence et cette différence de flux de chaleur est enregistrée par l'appareil.

Lorsque la capacité calorifique de l'échantillon est portée en graphique en fonction de la température, nous obtenons un thermogramme qui met en évidence les transitions de phase.

La transition de phase la plus souvent étudiée et caractérisée en calorimétrie différentielle à balayage est la transition principale. La figure 2.6 présente un thermogramme obtenu avec de grands liposomes unilamellaires de DPPC dont la transition principale se situe à une température de 41,4 °C. Cette transition est la plus couramment caractérisée puisqu'elle présente un rapport signal/bruit très important et elle est associée principalement à l'état d'organisation globale des chaînes aliphatiques du phospholipide étudié. À des températures inférieures à la température de transition, le phospholipide est en phase gel et ses chaînes aliphatiques sont rigides et forment un milieu ordonné.

Lorsque la température de transition du phospholipide est atteinte, le niveau d'énergie augmente et il y a augmentation du nombre de conformères gauches au niveau des chaînes aliphatiques du lipide de telle sorte que le milieu est plus désordonné. Le phospholipide passe de la phase gel à la phase liquide

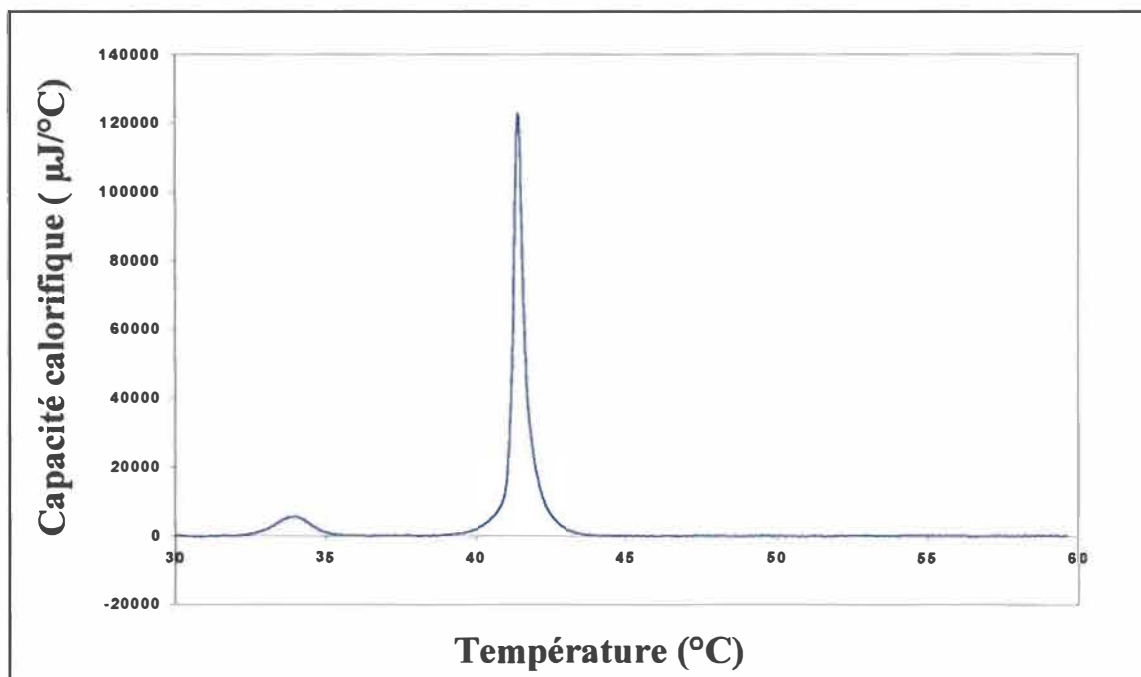


FIGURE 2.6: thermogramme de LUV formés de DPPC seul

cristalline. Cette technique nous permet donc d'évaluer l'état d'organisation du phospholipide dans les différents systèmes étudiés par des paramètres thermodynamiques tels la température de transition du phospholipide, l'amplitude du signal calorimétrique et l'enthalpie associée à cette transition.

L'appareil utilisé pour ces mesures est un calorimètre de marque Hart Scientific Differential Calorimeter (Calorimetry Sciences Corporation, Provo, Utah) et la précision de cet appareil atteint 0,025°C. Les mesures sont prises à des températures allant de 30°C à 60°C avec un taux de chauffe de 10°C/heure, ce qui correspond à l'intervalle de température utilisé pour un système lipidique composé de DPPC. Les échantillons contiennent le mélange lipidique étudié (avec ou sans stérols) incorporant différentes concentrations d'AmB, le tout dans du tampon phosphate. Les expériences ont été effectuées à au moins trois reprises afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats.

CHAPITRE 3:

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Effet de l'AmB sur la perméabilité des membranes : Étude par spectrofluorimétrie.

Par cette technique nous avons voulu vérifier la modification de perméabilité des différentes bicouches lipidiques induite par l'AmB. Tout d'abord, et avant même de débiter les expériences avec le système de référence constitué de DPPC seul, nous avons effectué différents contrôles afin d'établir quelles sont les meilleures conditions expérimentales à adopter. Premièrement, nous avons voulu déterminer la concentration de la solution de CF à utiliser afin d'obtenir un signal de fluorescence qui soit quenché afin d'éviter que la CF n'émette un signal de fluorescence lorsqu'elle est concentrée dans les liposomes. Nous avons donc effectué des mesures de fluorescence avec des solutions de CF à différentes concentrations (de 0,0005 mM à 50 mM) et nous avons tracé un graphique du logarithme de la concentration de CF en fonction du signal de fluorescence, ce qui nous a permis de déterminer la concentration optimale à utiliser pour les manipulations ultérieures. Ce graphique est présenté à la figure 3.1 et nous pouvons constater que c'est à une concentration de 0.05 M ($\log 0.05M = -1,7$) de CF que le signal de fluorescence est nul et donc que la fluorescence est quenchée. C'est pour cette raison que la concentration de CF contenue à l'intérieur de nos liposomes sera de 50 mM.

Nous avons également procédé à des contrôles nous permettant d'établir quelle est la concentration optimale de la solution liposomale à utiliser afin d'obtenir un signal de fluorescence maximal une fois les liposomes brisés par le détergent.

La figure 3.2 présente le graphique du signal de fluorescence en fonction de la concentration de la solution de DPPC. Nous pouvons constater que c'est à une concentration de 0,0975 mg/ml de DPPC que nous obtenons un signal de fluorescence maximal.

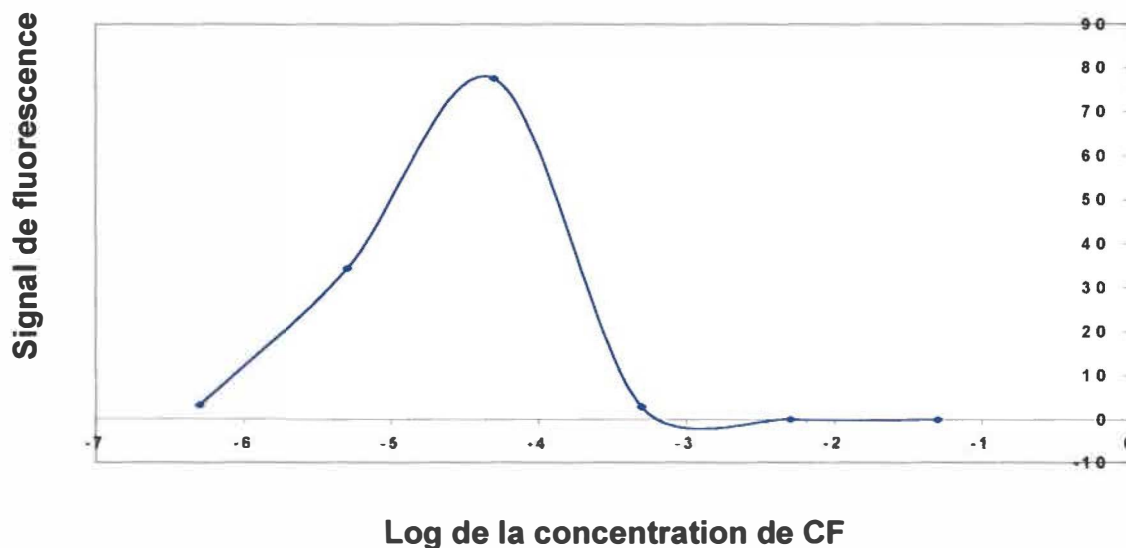


FIGURE 3.1: signal de fluorescence en fonction du log de la concentration de CF libre.

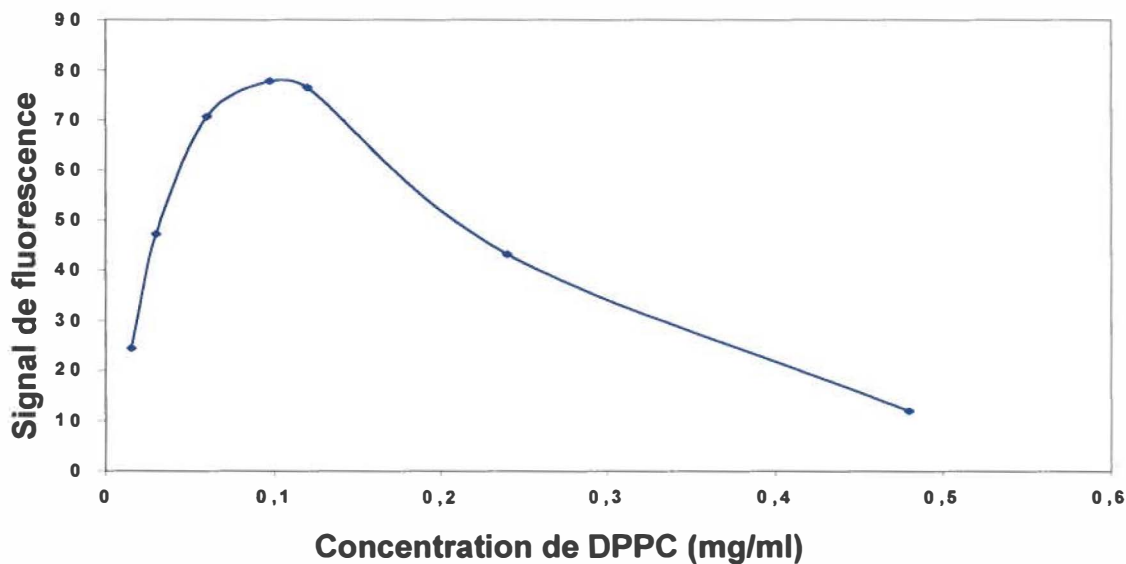


FIGURE 3.2: signal de fluorescence en fonction de la concentration de solution liposomale contenant de la CF 50 mM.

Finalement, nous avons remarqué que lorsque la température à laquelle est soumise la solution liposomale augmente, par exemple dû à l'échauffement de l'appareil, il y a augmentation importante du signal de fluorescence donc fuite de la CF à l'extérieur des vésicules. C'est pour éviter cette fuite de la sonde fluorescente à l'extérieur des liposomes que toutes les manipulations sont effectuées à une température de 25°C. Sous ces conditions, les bicouches lipidiques sont à l'état de gel, donc plus rigides, puisque nous sommes au-dessous de la température de transition du lipide qui est de 41,4°C.

Une fois les conditions expérimentales optimisées, nous avons pu procéder aux manipulations proprement dites. Le premier système que nous avons étudié est celui constitué de DPPC seul. Ce système simple nous permettra de recueillir des informations en rapport avec la perméabilité provoquée par l'AmB et pourra servir de référence afin de comparer les données que nous obtiendrons avec les systèmes plus complexes contenant les différents stérols étudiés.

La figure 3.3 montre le graphique du pourcentage d'efflux de CF en fonction de la concentration d'AmB pour la matrice constituée de DPPC seul (courbe en noir) et contenant 5% (lignes continues) et 25% (lignes pointillées) des différents stérols étudiés. Il est à noter que la concentration de 15% de stérols a aussi été étudiée mais les résultats ne sont pas présentés ici puisque ces derniers sont comparables à ceux obtenus avec 5% de stérols. La figure présente les courbes de pourcentages d'efflux de CF obtenus avec les trois concentrations d'AmB étudiées: 10^{-7} M, 65×10^{-7} M et 250×10^{-7} M.

Le tableau 3.1 présente les rapports molaires des constituants des différents systèmes étudiés. Lorsque nous observons la figure 3.3, nous pouvons tout d'abord remarquer que, même en phase gel, l'AmB ajoutée dans

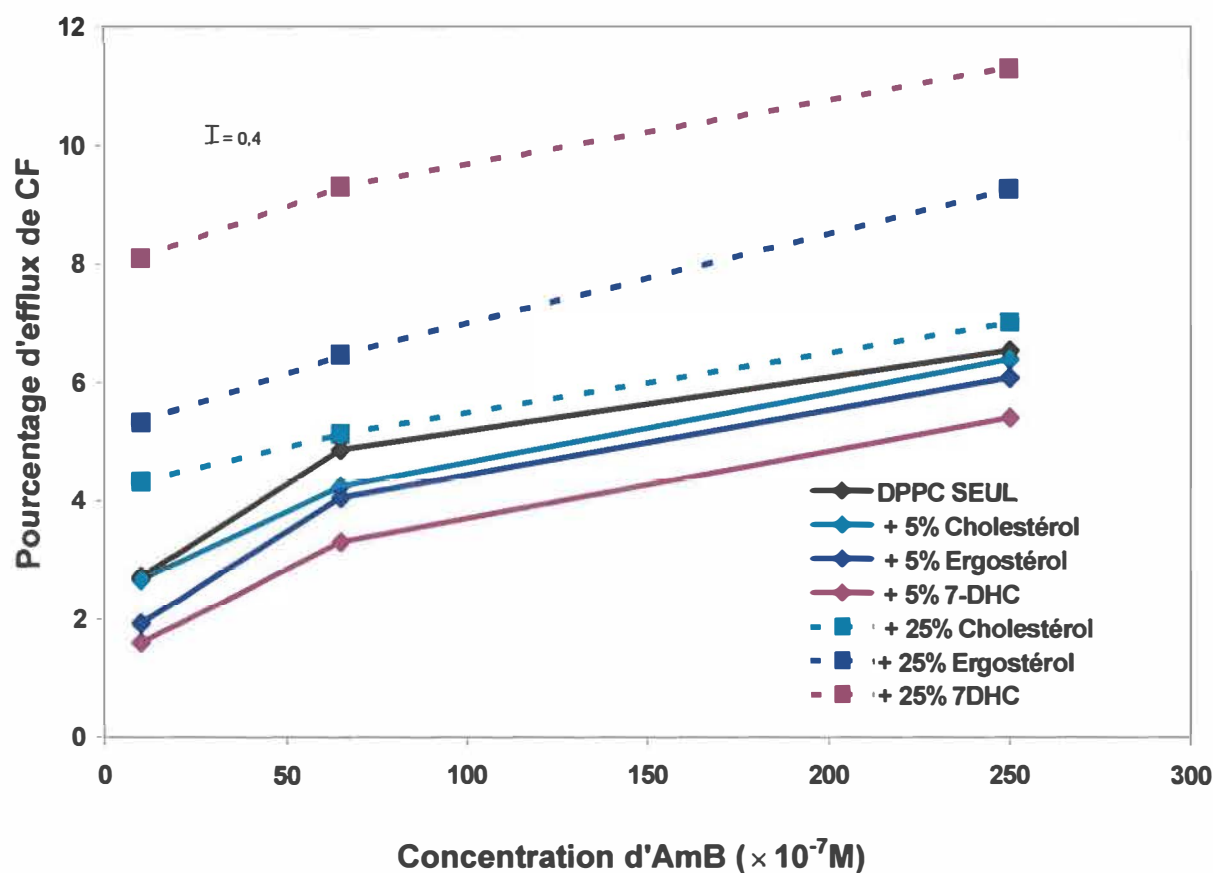


FIGURE 3.3: pourcentage d'efflux de CF en fonction de la concentration d'AmB pour le système constitué de DPPC seul et DPPC + stérols.

TABLEAU 3.1

rapports molaires ([lipides] ou [stérols] / [AmB]) des constituants des différents systèmes étudiés en fluorescence.

	DPPC	5% stérols	25% stérols
AmB 10^{-7} M	1330	67	335
AmB $65 \times 10^{-7} \text{ M}$	21	1	5
AmB $250 \times 10^{-7} \text{ M}$	5	0,3	1,3

le milieu externe pénètre la bicouche lipidique puisque nous pouvons observer un certain pourcentage d'efflux de CF à l'extérieur des liposomes et ce, pour tous les systèmes étudiés. Plus nous augmentons la concentration d'AmB, plus le pourcentage d'efflux est grand.

Cette fuite de la sonde fluorescente vers le milieu externe est dûe à un effet perturbateur de l'AmB au niveau de la bicouche lipidique. Ceci pourrait être attribuable à deux choses: tout d'abord, à des défauts provoqués dans la bicouche par l'AmB et par lesquels la sonde fluorescente peut s'échapper vers le milieu externe. La CF pourrait également fuir par des pores que pourrait former l'AmB dans la membrane, tel que proposé dans la littérature (Baginski *et al*, 1997, Gruszecki, 2002)

En effet, la CF initialement concentrée dans les liposomes et n'émettant pas de signal de fluorescence puisque ce dernier est quenché, s'échapperait par les pores formés par l'AmB mais probablement aussi par des défauts présents dans la membrane lipidique. Un signal de fluorescence serait alors émit à mesure que la sonde se dilue dans le milieu externe. L'augmentation du signal de fluorescence reflète donc la perméabilisation des bicouches lipidiques provoquée par l'AmB. Le médicament a un effet de perméabilisation sur les bicouches lipidiques de DPPC ne contenant pas de stérols. Des études en dichroïsme circulaire sur des petits liposomes unilamellaires de DPPC effectuées par l'équipe de Bolard en 1992 (Joly *et al*. 1992) ont effectivement démontré que l'AmB perméabilise les bicouches lipidiques ne contenant pas de stérols. D'autres études en monocouches (Dynarowicz *et al*, 2003) ont démontré, elles aussi, que l'AmB pénètre des monocouches constituées de DPPC seul et ce, en fonction de la concentration du médicament. Ceci est en contradiction avec certaines écoles de pensées (De Kruiff *et al*, 1974, Bonilla et Marin, 1991, Fujii *et al*, 1997, Coterio *et al*, 1998) pour lesquelles la présence de stérols est obligatoire pour que l'AmB soit active.

L'AmB pénètre également, toujours en phase gel, les bicouches contenant les différents stérols puisque nous observons également un efflux de CF à l'extérieur des liposomes. Par contre nous pouvons constater qu'une faible concentration de stérols, soit 5% de cholestérol (courbe continue verte), d'ergostérol (courbe continue bleue) ou de 7-DHC (courbe continue rose) semble avoir un effet protecteur sur la bicouche lipidique. En effet, en présence de 5% de stérols dans la matrice lipidique, le pourcentage d'efflux de CF est inférieur à celui observé pour la matrice de DPPC seul. Ceci peut s'expliquer par le fait que la présence de 5% de stérols pourrait provoquer une restructuration de la bicouche lipidique de telle sorte qu'il y aurait moins de défauts dans la membrane et que l'AmB aurait plus de difficulté à perméabiliser cette dernière. Des études en fluorescence sur des modèles membranaires (Battacharya et Harbor, 2000) ont démontré que l'incorporation du cholestérol dans les modèles membranaires induit des changements au niveau de la bicouche. En effet, il semble que la présence du cholestérol ait un effet de condensation des bicouches lipidiques en diminuant l'aire occupée par les molécules ce qui se traduit par une diminution de la perméabilité des membranes. Il en serait de même pour l'ergostérol et pour le 7-DHC (Van Zutphen *et al*, 1971). Ceci pourrait expliquer le fait que, à de faibles concentrations de stérols, la perméabilisation des bicouches lipidiques par l'AmB soit inférieure à celle observée pour la matrice constituée de DPPC seul. Nous remarquons également, sur la figure 3.3, que les résultats obtenus avec 5% de 7DHC démontrent un effet "protecteur" des stérols significativement plus grand que ceux obtenus avec 5% de cholestérol ou d'ergostérol, ces données étant comparables entre elles. Ceci est probablement attribuable aux différences existant entre les structures moléculaires des stérols se reflétant dans l'organisation des bicouches lipidiques qui les contiennent.

Dans le cas de la matrice contenant 25% de stérols (courbes pointillées), la situation est différente. On peut tout d'abord remarquer, sur la figure 3.3, que lorsque la bicouche lipidique contient 25% de cholestérol (courbe pointillée

verte), le pourcentage d'efflux n'est pas significativement différent de celui obtenu avec la matrice contenant seulement le DPPC (courbe en noir) sauf pour ce qui est de la concentration de 10^{-7} M d'AmB. On peut donc conclure, pour deux des trois concentrations d'AmB étudiées, qu'il y a peu d'effet de la concentration du cholestérol sur la perméabilité des bicouches lipidiques provoquée par l'AmB puisqu'à une concentration de 5% ou de cinq fois supérieure (25%) de ce stérol dans les liposomes, le pourcentage d'efflux de CF observé est semblable à celui obtenu avec la matrice de DPPC seul.

Par contre, avec 25% d'ergostérol (courbe pointillée bleu) et davantage avec la même concentration de 7-DHC (courbe pointillée rose), le pourcentage d'efflux de CF observé est significativement différent de celui observé avec la matrice contenant autant de cholestérol ou celle constituée de DPPC seul. Tout d'abord, dans le cas des liposomes contenant 25% d'ergostérol, nous pouvons dire que l'AmB augmente davantage la perméabilité pour ce système que pour celui contenant la même concentration de cholestérol ou contenant le DPPC seul. Des études en calorimétrie différentielle à balayage sur des bicouches lipidiques de DPPC (Fournier *et al.* 1998) ont mis en évidence le fait que l'AmB interagirait différemment avec l'ergostérol et avec le cholestérol. En effet, il semble qu'il y aurait interaction entre l'AmB et l'ergostérol, ce qui fait en sorte que ce dernier soit moins disponible pour interagir avec le lipide. Comme l'ergostérol, dans ce cas-ci, est présent en plus grande quantité (25%), l'AmB va interagir plus facilement avec ce dernier ce qui pourrait expliquer l'absence de l'effet de condensation de ce stérol. Nos résultats obtenus pour le système de DPPC + 25% ergostérol sont compatibles avec ce que nous savons de l'activité antifongique de l'AmB (voir section 1.2) et sont cohérents avec le fait que l'activité antifongique est supérieure à la toxicité du médicament, cette dernière étant reliée à l'affinité de l'AmB pour le cholestérol.

Pour ce qui est de la matrice contenant 25% de 7-DHC, nous pouvons constater que c'est dans ce cas que nous obtenons le plus grand pourcentage

d'efflux, à toutes les concentrations d'AmB. Nous pouvons donc conclure que l'AmB a une plus grande affinité pour les bicouches contenant 25% de 7-DHC comparativement à celles contenant autant de cholestérol, d'ergostérol ou le DPPC seul. Ces résultats viennent appuyer d'autres études (Charbonneau *et al*, 2001) par spectroscopie UV-visible portant sur l'AmB en solution avec différents stérols qui ont également mis en évidence que c'est envers le 7-DHC que l'AmB a la plus grande affinité. Ces résultats appuient également l'hypothèse proposée par Feigin, à l'effet que l'AmB ait une affinité supérieure envers le 7-DHC plutôt qu'envers le cholestérol. Nous mettons également en évidence le fait que l'affinité de l'AmB pour les bicouches contenant le 7-DHC est supérieure à l'affinité du médicament pour les bicouches contenant l'ergostérol. Ceci nous permet donc de croire que l'activité anticancéreuse potentielle de ce médicament pourrait être supérieure à l'activité antifongique déjà bien connue de l'AmB.

Cette figure nous permet finalement de constater que le pourcentage d'efflux provoqué par l'ajout de l'AmB n'est pas linéaire en fonction de la concentration du médicament. On remarque, en effet, que lorsque l'AmB est sous forme de grands agrégats (250×10^{-7} M), elle n'est pas beaucoup plus active que lorsqu'elle est sous forme monomérique (10^{-7} M) ou oligomérique (65×10^{-7} M) bien que ces deux dernières concentrations soient beaucoup plus petites. Ceci est en accord avec le fait déjà connu que l'activité de l'AmB n'est pas proportionnelle à sa concentration. Il a également été démontré (Barwicz *et al*, 1997) que l'état d'agrégation de l'AmB joue un rôle important au niveau de l'interaction du médicament avec d'autres molécules, comme par exemple les phospholipides et ce serait lorsqu'elle est sous forme oligomérique que l'AmB serait la plus active.

Les résultats que nous avons obtenus démontrent que, comme mentionné précédemment, plus nous augmentons la concentration d'AmB plus nous observons un pourcentage d'efflux de CF élevé, mais l'augmentation du

signal de fluorescence n'est pas proportionnelle à l'augmentation de la concentration du médicament. Ceci pourrait être relié au mécanisme d'action de l'AmB avec la membrane puisque comme à 250×10^{-7} M, l'AmB est sous forme de grands agrégats, ces derniers doivent probablement se dissocier en monomères ou en oligomères, forme active du médicament, afin de pouvoir interagir avec la membrane. Comme nous prenons les mesures de fluorescence pendant quinze minutes puisque le signal est habituellement stable au-delà de ce temps, les conditions expérimentales utilisées ne nous permettent probablement pas d'observer la dissociation complète de ces agrégats puisque ce phénomène est possiblement très lent.

3.2: Effet de l'AmB sur l'état d'organisation de la bicouche lipidique : Étude par calorimétrie différentielle à balayage.

3.2.1 Bicouches lipidiques de DPPC

La calorimétrie différentielle à balayage, couramment utilisée pour l'étude des modèles membranaires, nous sera utile afin d'étudier l'organisation des lipides en présence de stérols et/ou de l'AmB. Nous avons, comme pour les autres techniques, débuté nos expérimentations sur les bicouches lipidiques constituées de DPPC seul, système simple qui servira de référence afin de comparer les résultats obtenus avec les systèmes plus complexes contenant 5% de stérols. Les mêmes expérimentations ont été effectuées sur les bicouches lipidiques de DPPC contenant 15% des stérols étudiés. Toutefois, la présence de 15% de stérols abaisse fortement le signal calorimétrique, de telle sorte que ce dernier se confond souvent avec le bruit de fond et c'est pour cette raison que ces données ne sont pas présentées. La concentration de la solution lipidique utilisée pour ces manipulations est de 0.24 mg/ml et les concentrations d'AmB que nous avons étudiées sont celles de 65×10^{-7} M et de 250×10^{-7} M. La concentration de la solution lipidique diffère de celle utilisée en spectrofluorimétrie puisque nous avons dû davantage concentrer les lipides afin

d'obtenir un signal calorimétrique satisfaisant tout en évitant qu'il n'y ait trop de bruit de fond. De plus, nous n'avons pas effectué les manipulations avec la concentration d'AmB de 10^{-7} M puisque cette dernière, très faible, ne nous a pas permis d'obtenir des résultats concluants. Les rapports molaires des molécules constituant chacun des différents systèmes étudiés sont présentés au tableau 3.2.

La figure 3.4 montre le thermogramme obtenu pour la matrice constituée de DPPC seul. On remarque sur cette figure, qu'à des températures inférieures à 34°C, soit la température identifiée à la prétransition, les lipides sont inclinés et les chaînes aliphatiques, rigides et ordonnées, sont en majorité sous forme de conformères *trans* (Vogel et Jahnig, 1981). Par la suite, avec l'augmentation de la température, le lipide passe par une phase de prétransition (34°C), qui est le résultat d'une perturbation au niveau des têtes polaires du lipide. À cette température, le phospholipide est en phase gel-ondulée. Les chaînes aliphatiques du lipide sont toujours en conformation *trans* mais ne sont pas inclinées.

TABLEAU 3.2
rapports molaires ([lipides] ou [stérois] / [AmB]) des constituants des
différents systèmes étudiés en DSC .

	DPPC	5% stérois
AmB (65×10^{-7} M)	66	3
AmB (250×10^{-7} M)	17	1

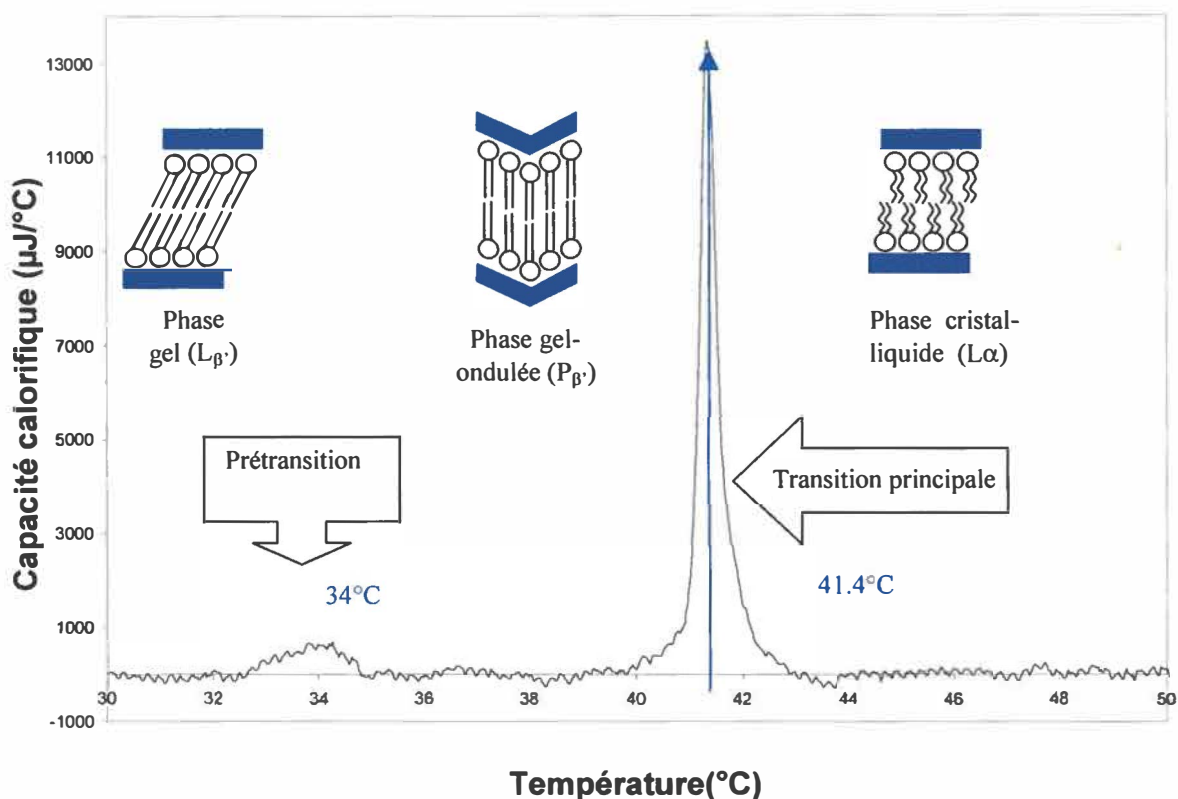


FIGURE 3.4: thermogramme des LUV formées de DPPC seul.

En s'approchant de la température de transition principale qu'on trouve à $41,4^\circ\text{C}$, le niveau d'énergie s'élève et le nombre de conformères gauches s'accroît au niveau des chaînes aliphatiques du lipide. Ce dernier passe alors en phase cristal-liquide et le milieu est désordonné. Les informations recueillies à l'aide de ce thermogramme, soit la température de la prétransition (34°C) et celle de la transition principale ($41,4^\circ\text{C}$), sont en accord avec celles présentées par l'équipe de Mc Mullen et Mc Elhaney (1995) et celles de Fournier *et al* en 1998.

La figure 3.5 présente le thermogramme obtenu pour la matrice constituée de DPPC seul et en présence de différentes concentrations d'AmB.

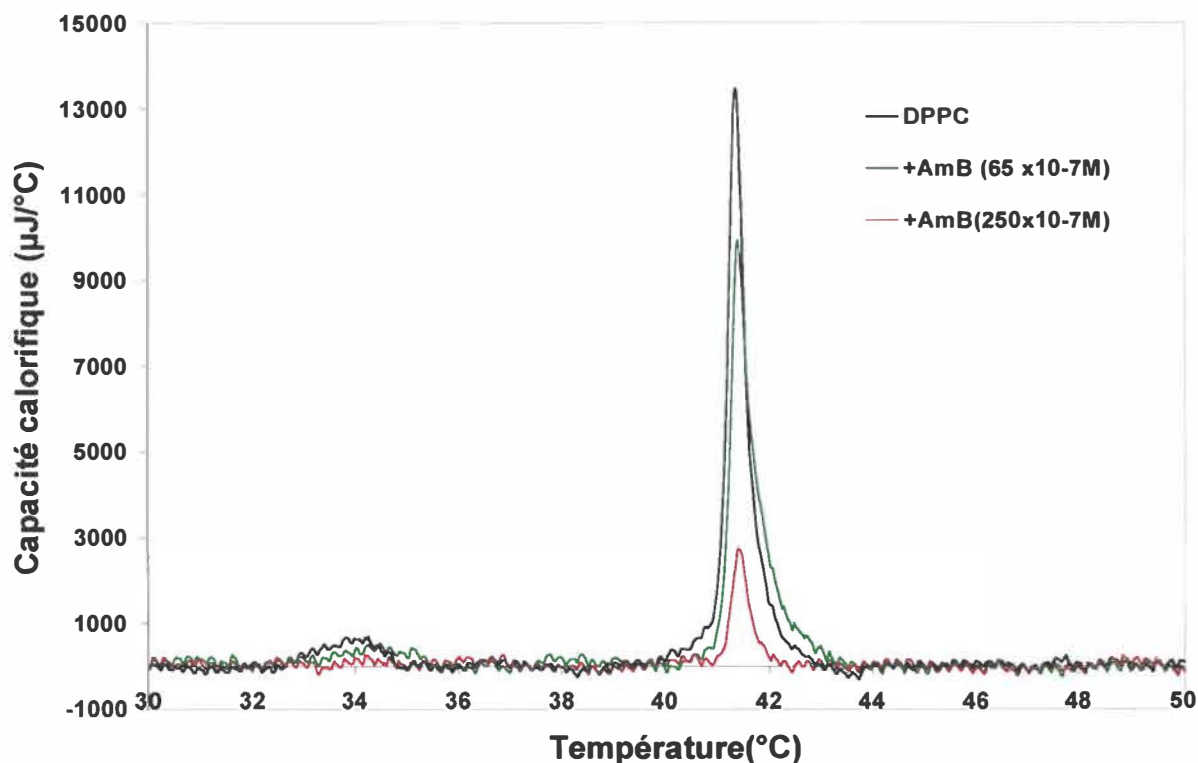


FIGURE 3.5: thermogrammes des LUV de DPPC seul et en présence d'AmB.

Tout d'abord, nous remarquons que la présence d'AmB à l'une ou l'autre des deux concentrations, ne fait pas disparaître complètement la prétransition, ce qui signifie que le médicament ne perturbe que légèrement l'état d'organisation des têtes polaires du phospholipide. Avec les stérols, nous le verrons plus loin, ce comportement n'est pas observé puisque la prétransition disparaît. Nous pouvons donc supposer que l'AmB ne se trouve pas insérée de façon homogène dans la bicouche lipidique.

Par contre, si nous examinons comment la présence de l'AmB affecte la phase de transition principale, nous remarquons que cela est différent avec les deux concentrations de l'antibiotique. Tout d'abord à une concentration d'AmB de 65×10^{-7} M, nous remarquons que la hauteur du pic de transition principale diminue. Nous constatons également que le signal calorimétrique est grandement diminué lorsque l'AmB est présente à une concentration plus

élevée. Il est important de noter, qu'à l'exception de la prétransition, il n'y a aucune autre transition de phase observée à des températures inférieures ou supérieures à la transition principale et ce, peu importe la concentration d'AmB ajoutée dans le milieu. De plus, la température de transition ainsi que la largeur à la mi-hauteur restent sensiblement les mêmes (voir tableau 3.3) en présence ou en absence d'AmB, que dans le cas de la matrice de DPPC sans AmB.

TABLEAU 3.3

Température de transition et largeur à la mi-hauteur des pics de transition principale de la matrice constituée de DPPC.

	Température de transition (°C)	Largeur à la mi-hauteur (°C)
DPPC seul	41.4	0.3
+ AmB (65x 10 ⁻⁷ M)	41.4	0.3
+ AmB (250x 10 ⁻⁷ M)	41.5	0.3

Le fait que la température de transition et la largeur à la mi-hauteur restent toujours les mêmes, que l'AmB soit présente ou non et indépendamment de sa concentration, signifie que nous sommes toujours en présence de la même phase, soit le DPPC seul. De plus, la diminution du pic de transition principale signifie qu'il y a une partie des lipides qui ne passent pas cette transition. En effet, nous observons une séparation de phase où il y a une partie du DPPC qui est fortement affectée par l'AmB mais dont la transition n'est pas visible, probablement dû au fait que ces lipides sont déjà en phase cristalline ou que leur transition de phase est très peu coopérative et tellement large qu'elle n'est pas visible à travers le bruit de fond. On remarque que la quantité de lipides qui ne passent pas la transition principale est beaucoup plus grande lorsque la concentration d'AmB est plus élevée, donc l'effet du médicament sur la bicouche est encore plus important dans ce cas-ci. Nous

avons calculé qu'à la concentration de 65×10^{-7} M d'AmB, 28% des lipides sont affectés par la présence du médicament alors qu'à la concentration plus élevée, soit celle de 250×10^{-7} M, ce pourcentage s'élève à 81.

L'effet de l'AmB que nous observons sur les bicouches lipidiques de DPPC pourrait s'expliquer de deux façons: premièrement une partie des vésicules pourrait être détruite par l'AmB, lequel pourrait agir comme un détergent. Cette hypothèse n'est pas retenue puisque nous avons démontré, en fluorescence, que l'AmB ne provoque pas le bris des liposomes car la CF ne fuit pas totalement des liposomes sous l'effet du médicament. En effet, l'ajout de l'AmB est suivi par un efflux d'une certaine quantité de CF à l'extérieur des liposomes mais nous n'atteignons le maximum de fluorescence que lorsque nous brisons les vésicules à l'aide du détergent (Triton X-100). De plus, des travaux de calorimétrie différentielle à balayage effectués par Fournier *et al* en 1998, démontrent que les liposomes de DPPC contenant 28% en mol d'AmB sont stables dans la gamme de températures utilisées pour cette technique. La seconde hypothèse serait que l'AmB pénètre les bicouches lipidiques, affectant une partie des molécules de DPPC - qui ne subissent pas de transition de phase - les rendant ainsi non visibles en calorimétrie et laissant l'autre partie intacte, celle que l'on voit transiter.

En conclusion, l'AmB en pénétrant la bicouche ne se disperse pas de façon homogène et provoque une séparation de phase, ce qui a été mis en évidence pour la première fois dans notre laboratoire par Fournier *et al* en 1998. En effet, il a été observé au cours de cette étude où l'AmB est incorporée aux bicouches lipidiques lors de leur préparation, que la présence du médicament provoque une séparation de phase dans la bicouche lipidique. Fournier *et al* ont observé une nouvelle phase à une température plus élevée que la température de transition du lipide ce qui permet donc de croire que l'AmB a un effet structurant sur la bicouche de DPPC. Nous n'avons pas observé cette nouvelle phase, probablement dû au fait que les techniques utilisées sont différentes,

mais ces résultats sont comparables à ceux que nous avons obtenus avec une quantité de lipides et d'AmB qui est de six fois inférieure.

3.2.2 Bicouches lipidiques de DPPC + 5% cholestérol

La figure 3.6 montre le thermogramme obtenu pour la matrice de DPPC seul (courbe en noir), pour la matrice contenant 5% de cholestérol sans AmB (courbe en vert), avec 65×10^{-7} M (courbe en bleu) et 250×10^{-7} M (courbe en rouge) d'AmB. L'incorporation du cholestérol dans les bicouches de DPPC modifie grandement le thermogramme. En effet, nous pouvons tout d'abord remarquer que, suite à l'ajout de cholestérol (courbe en vert) dans la matrice lipidique, il y a disparition de la prétransition du lipide. Nous remarquons également que l'ajout de cholestérol se traduit par une diminution de la température de transition du lipide ($40,8^{\circ}\text{C}$) ainsi qu'une diminution de la hauteur du pic de transition principale.

Les molécules de cholestérol fluidifient la matrice lipidique en s'insérant entre les molécules de DPPC, diminuant les interactions entre ces dernières. Ces modifications observées sur le thermogramme, c'est-à-dire disparition de la phase de prétransition, diminution de la hauteur et de la température du pic de transition principale sont cohérentes avec celles retrouvées dans la littérature (Mc Mullen et Mc Elhaney, 1995. Fournier *et al*, 1998) et sont typiques des variations constatées suite à l'ajout de stérols dans la matrice lipidique. Lorsque nous ajoutons l'AmB, nous remarquons tout d'abord que pour l'une ou l'autre des concentrations du médicament (courbe bleue pour 65×10^{-7} M et courbe rouge pour 250×10^{-7} M d'AmB), nous sommes toujours en présence de la même phase puisque la température de transition obtenue est la même que celle observée pour la matrice sans AmB.

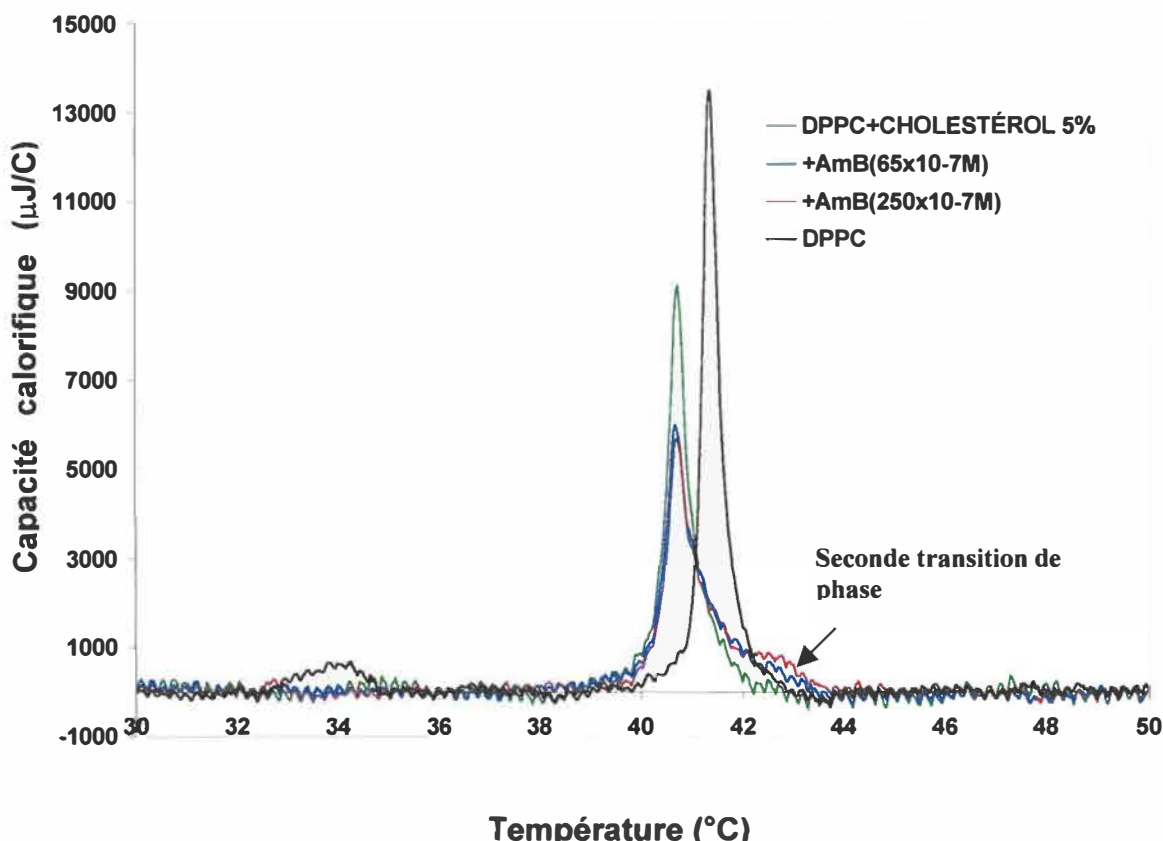


FIGURE 3.6 : thermogrammes des LUV de DPPC + 5% cholestérol en absence et en présence d'AmB.

Par contre, la hauteur du pic de transition principale diminue par rapport à celui de la matrice lipidique sans AmB (courbe en vert), signifiant qu'il y a une diminution du nombre de molécules de phospholipide qui subissent la transition. Nous pouvons remarquer que, sur cette phase de transition principale, l'AmB a son effet maximal à une concentration de 65×10^{-7} M et que, même avec une concentration d'antibiotique de près de quatre fois supérieure, la transition principale est sensiblement la même. On peut donc dire que l'effet de l'AmB sur cette phase atteint un plateau à 65×10^{-7} M.

Par ailleurs, en examinant attentivement le thermogramme de la figure 3.6, nous pouvons également constater qu'il y a apparition d'un second pic

(indiqué par une flèche) à une température plus élevée que celle de la transition principale, résultats cohérents avec ceux obtenus par le groupe de Fournier *et al* en 1998 malgré le fait que les méthodes de préparation des échantillons soient différentes. Nous pouvons dire que, comme elle se produit à plus haute température, cette seconde phase est plus stable que la phase de transition principale. Nous remarquons, de plus, que cette seconde phase est dépendante de la concentration d'AmB puisque sa capacité calorifique est visiblement plus élevée à une concentration de 250×10^{-7} M qu'à une concentration de 65×10^{-7} M du médicament. Cette augmentation de la hauteur du pic signifie que l'AmB va chercher des lipides ailleurs, c'est à dire du DPPC qui est déjà dans la phase liquide-cristalline, ce qui laisse présager la présence d'une troisième phase affectée par le stérol, laquelle n'est pas visible ici.

En conclusion, l'ajout d'AmB provoque une séparation de phase dans la matrice lipidique. L'effet du médicament sur la phase de transition principale est déjà saturé à 65×10^{-7} M mais nous observons tout de même une augmentation du signal calorimétrique de la seconde phase en fonction de la concentration d'AmB.

3.2.3 Bicouches lipidiques de DPPC + 5% ergostérol

La figure 3.7 montre le thermogramme obtenu pour la matrice de DPPC seul (courbe en noir), pour la matrice contenant 5% d'ergostérol sans AmB (courbe en vert), avec 65×10^{-7} M (courbe en bleu) et 250×10^{-7} M (courbe en rouge) d'AmB. Nous pouvons tout d'abord remarquer que l'ajout d'ergostérol (courbe en vert), tout comme l'ajout de cholestérol, se traduit par la disparition de la prétransition. Nous remarquons également un élargissement de la phase de transition située à des températures supérieures à la température de transition du lipide, lequel pourrait probablement être associé à la présence d'une seconde phase dans la matrice lipidique.

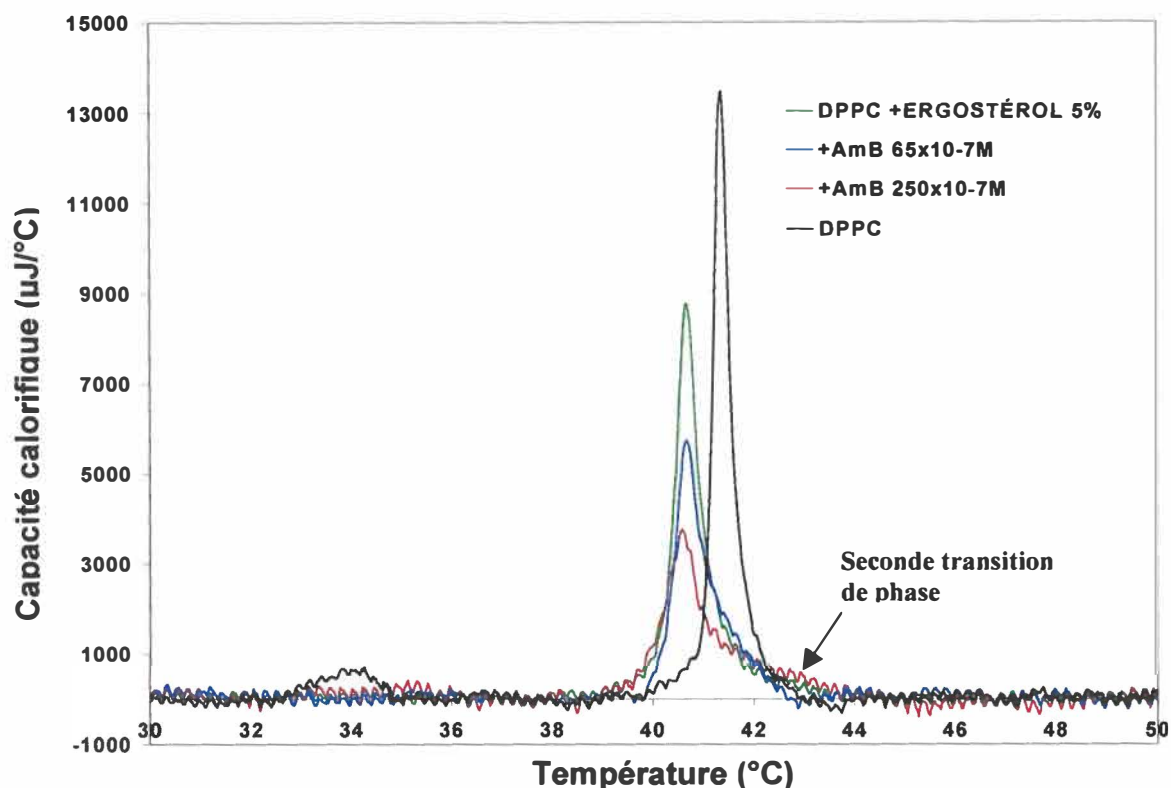


FIGURE 3.7 : thermogrammes des LUV de DPPC + 5% d'ergostérol en absence et en présence d'AmB.

Nous observons aussi une diminution de la température de transition du lipide ainsi qu'une diminution de la hauteur du pic de transition principale si nous comparons avec le thermogramme de la matrice de DPPC seul (courbe en noir).

La température de transition des lipides de la matrice contenant 5% d'ergostérol (40,7°C) est très semblable à celle obtenue avec les bicouches contenant 5% de cholestérol (40,8°C).

La hauteur du pic de la transition principale des lipides d'une matrice contenant 5% d'ergostérol n'est que très légèrement inférieure à celle de la matrice contenant le cholestérol, ce qui suggère que ces deux stérols ont des interactions très semblables avec le DPPC. De plus, étant donné les résultats obtenus ainsi que la ressemblance entre les deux structures moléculaires du

cholestérol et de l'ergostérol, il n'est pas exclu, bien que cela ne soit pas démontré, que l'ergostérol fluidifie la membrane lipidique, tout comme le cholestérol. Ces modifications observées sur le thermogramme de la matrice de DPPC contenant 5% d'ergostérol (disparition de la prétransition, diminution de la hauteur et de la température du pic de transition principale) sont très semblables à celles obtenues lors de l'ajout de cholestérol dans la bicouche lipidique et sont typiques des modifications calorimétriques constatées lors de l'ajout de stérols dans la matrice (Fournier *et al*, 1998).

Lorsque nous ajoutons l'AmB (courbe en bleu pour 65×10^{-7} M et courbe en rouge pour 250×10^{-7} M d'AmB), nous remarquons tout d'abord que nous sommes toujours en présence de la même transition de phase puisque la température de transition est la même que celle obtenue avec la matrice lipidique ne contenant pas l'AmB. De plus, il y a diminution du pic de transition principale par rapport au thermogramme de la matrice lipidique contenant 5% d'ergostérol sans AmB (courbe en vert). Ceci signifie qu'il y a une diminution du nombre de molécules de phospholipide qui passent la transition principale et que, tout comme dans le cas de la matrice lipidique contenant du cholestérol, nous sommes en présence d'une séparation de phase. De plus, nous remarquons, dans le cas où l'ergostérol est présent dans la matrice lipidique, que sous l'effet de l'AmB, il y a élargissement de la transition vers des températures supérieures à la température de transition du phospholipide ce qui pourrait suggérer la présence d'une seconde transition de phase (indiquée par une flèche) qui serait plus stable.

L'AmB, à 250×10^{-7} M (courbe en rouge) a dans ce cas-ci et contrairement à ce que nous avons observé avec la matrice contenant 5% de cholestérol, un effet significativement plus important que celui de la concentration inférieure sur la transition de phase principale. Comme nous pouvons également le remarquer, la seconde transition de phase augmente légèrement sous l'effet de l'AmB mais cet accroissement n'est pas proportionnel

à la diminution de la première phase provoquée par l'antibiotique. Il est donc logique de penser qu'il devrait exister une troisième phase où transitent les lipides, laquelle phase n'est pas visible sur le thermogramme, possiblement dû au fait qu'elle est très affectée par l'AmB.

En comparant le thermogramme obtenu d'une matrice lipidique contenant l'ergostérol à celui d'une de DPPC seul, on remarque que, dans les deux cas, l'ajout de l'AmB a un effet important sur la transition principale et se traduit par l'apparition d'une autre transition de phase qu'on ne voit pas sur le thermogramme, soit parce que les lipides sont déjà en phase cristal-liquide ou parce que leur transition est très peu coopérative et donc très large. Fournier *et al*, en 1998, ont également observé avec la matrice contenant l'ergostérol, l'apparition d'une nouvelle phase plus stable, à des températures supérieures à celle de la transition de phase du phospholipide.

3.2.4 Bicouches lipidiques de DPPC + 5% 7-DHC

La figure 3.8 montre le thermogramme d'une matrice de DPPC seul (courbe en noir), d'une matrice contenant 5% de 7-DHC sans AmB (courbe en vert), avec 65×10^{-7} M (courbe en bleu) et 250×10^{-7} M (courbe en rouge) d'AmB. Nous pouvons tout d'abord remarquer que l'ajout de 7-DHC (courbe en vert), tout comme l'ajout des autres stérols se traduit par la disparition de la prétransition. Nous remarquons également que c'est en présence de 7-DHC que la diminution de la température de transition du lipide ($40,6^{\circ}\text{C}$) ainsi que la diminution de la hauteur du pic de transition principale est la plus importante si on compare avec les deux autres stérols étudiés

L'ajout de 7-DHC fluidifie donc davantage les bicouches lipidiques si on compare avec le cholestérol ou l'ergostérol. Nous pouvons donc conclure que le 7-DHC affecte une plus grande quantité de phospholipides.

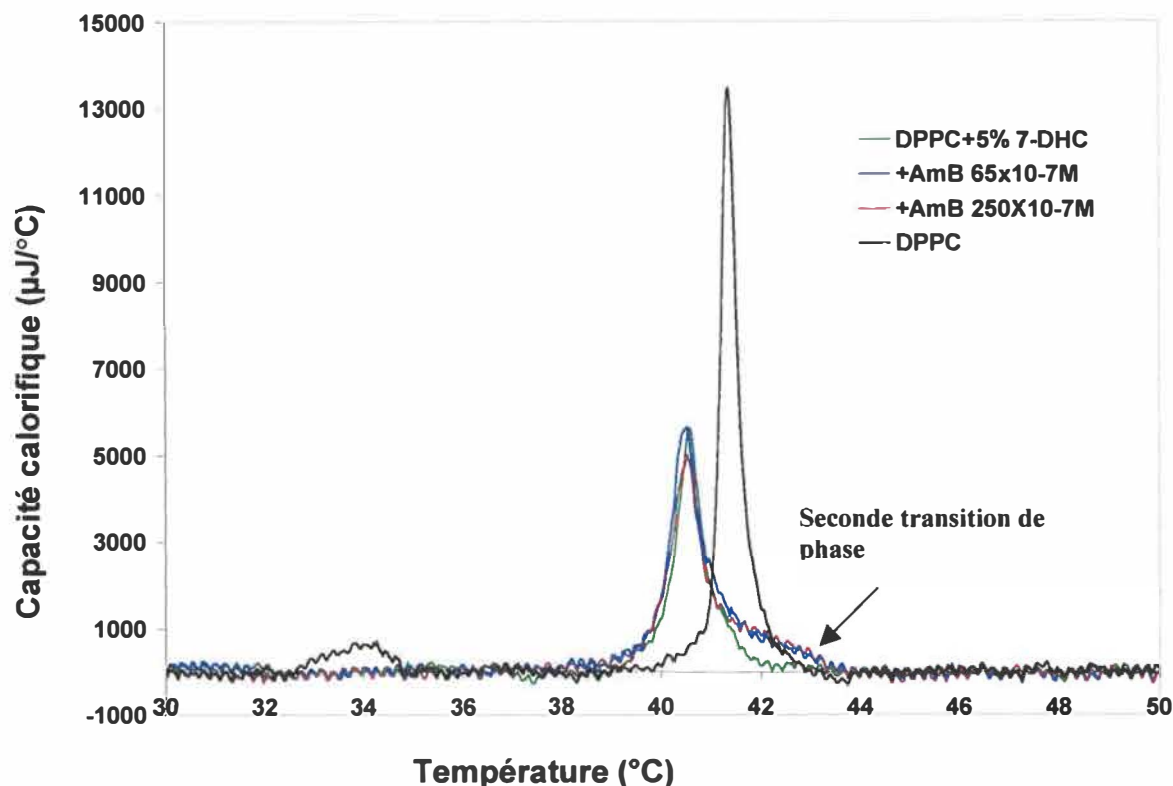


FIGURE 3.8 : thermogrammes des LUV de DPPC + 5% 7-DHC en absence et en présence d'AmB.

que le cholestérol ou l'ergostérol. Ceci démontre bien que de petites différences dans les structures moléculaires des stérols (voir figure 1.5), peuvent avoir de grandes répercussions dans l'organisation de la bicouche lipidique.

Lorsque nous ajoutons l'AmB, à une concentration de 65×10^{-7} M (courbe en bleu) ou de 250×10^{-7} M (courbe en rouge), nous remarquons, une fois de plus que nous sommes toujours en présence de la même phase puisque la température de transition reste la même que celle obtenue avec la matrice ne contenant pas l'AmB. Par contre, nous observons que le pic de transition principal n'est pas significativement différent de celui obtenu sans AmB (courbe en vert). Nous pouvons donc dire que l'AmB n'a presque pas d'effet sur cette transition de phase. Tout comme pour les autres matrices contenant les stérols,

on observe ici l'apparition d'une seconde transition phase à des températures supérieures à la transition principale. L'effet de l'AmB sur cette seconde phase atteint un plateau à une concentration de 65×10^{-7} M. En effet, même en présence d'une concentration de presque 4 fois supérieure du médicament, l'effet observé sur cette transition phase est quasi identique. Cette séparation de phase a également été observée par Charbonneau *et al* en 2001 en dépit du fait que dans ce dernier cas, l'AmB est incorporée dans les liposomes lors de leur préparation.

La présence d'AmB ne semble donc pas affecter la transition principale puisque le signal calorimétrique reste sensiblement le même peu importe la concentration d'AmB. Par contre le médicament, bien que son effet atteigne un plateau à une concentration de 65×10^{-7} M, affecte la seconde phase de transition puisque cette dernière augmente. Comme cette seconde transition de phase augmente en présence d'AmB mais que l'antibiotique a peu d'effet sur la transition principale, nous pouvons donc suggérer que nous sommes en présence d'une troisième phase, probablement sous forme liquide-cristalline, laquelle n'est pas détectable en calorimétrie.

Le 7-DHC, comme nous l'avons mentionné, est le stérol qui perturbe le plus la bicouche lipidique. Étant donné que la troisième transition de phase est très affectée par la présence du 7-DHC et qu'elle n'est pas visible sur le thermogramme, on peut supposer qu'elle contient beaucoup de ce stérol. L'AmB structure les lipides de cette phase puisqu'on remarque l'apparition de la nouvelle transition de phase à des températures supérieures à la température de transition des lipides. On observe également que la présence de l'antibiotique n'affecte pratiquement pas la phase de transition principale, contenant probablement peu de stérols. L'interaction préférentielle de l'AmB avec la phase contenant beaucoup de 7-DHC pourrait donc être attribuable à deux choses: tout d'abord au fait que le médicament a une grande affinité pour ce stérol (Charbonneau *et al*, 2001) ou encore au fait que la présence de ce

dernier provoque une organisation lipidique spécifique favorisant l'interaction de l'AmB avec ces parties de la bicouche.

La calorimétrie différentielle à balayage nous a permis d'obtenir des résultats qui démontrent clairement que l'incorporation d'un stérol perturbe grandement l'organisation lipidique. La présence de stérols fluidifie la bicouche en diminuant les interactions entre les molécules de DPPC puisque dans ce cas, la température de transition des lipides est déplacée vers des valeurs inférieures. La disparition de la prétransition, suite à l'ajout de stérols, nous permet de conclure que ces derniers perturbent de la même façon l'organisation des bicouches lipidiques au niveau des têtes polaires du DPPC et sont distribués presque uniformément dans la bicouche, s'insérant entre les molécules de phospholipide. Par contre, l'effet sur la transition principale diffère d'un stérol à l'autre et il est plus prononcé dans le cas de la matrice lipidique qui contient le 7-DHC.

Pour ce qui est de l'effet de l'AmB, les résultats démontrent que la phase de prétransition est toujours présente en absence de stérols, même à des concentrations élevées du médicament (voir figure 3.5). De plus, l'AmB en présence de stérols provoque l'apparition d'une seconde transition de phase à des valeurs supérieures à la température de transition du lipide en absence de l'antibiotique, ce qui nous permet de conclure que le médicament stabilise l'environnement lipidique en induisant une séparation de phase.

La calorimétrie différentielle à balayage nous informe sur l'organisation lipidique des différents systèmes étudiés. Les résultats obtenus nous permettent d'obtenir des renseignements complémentaires à ceux obtenus en spectrofluorimétrie. Nous observons en effet que c'est en présence de 7-DHC que la bicouche lipidique est la plus perturbée et que l'AmB interagit de façon préférentielle avec cette dernière.

3.3: Interaction de l'AmB avec la bicouche lipidique : Étude par spectroscopie UV-visible.

Nous avons choisi d'utiliser la technique de spectroscopie UV-visible afin de recueillir des informations sur l'interaction de l'AmB avec les molécules présentes dans son environnement, le phospholipide et les stérols dans notre cas, et sur l'état dans lequel se trouve le médicament. Pour ces expériences, le phospholipide (DPPC) est utilisé à une concentration de 0,24 mg/ml tout comme pour les manipulations en calorimétrie différentielle à balayage et les rapports moléculaires lipide ou stérol/AmB sont aussi les mêmes (voir tableau 2 chapitre 3.2). Nous avons effectué les expériences à au moins trois reprises afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats et ce avec les deux concentrations d'AmB: à 65×10^{-7} M soit lorsque l'AmB est sous forme oligomérique et à 250×10^{-7} M, soit lorsque l'AmB est sous forme de grands agrégats. Nous avons également étudié différentes températures soit 25°C, en dessous de la température de transition du lipide, 37°C, température se rapprochant de la température de transition du lipide ainsi que 50°C, au-dessus de la température de transition du lipide. Ceci nous permettra de vérifier l'effet de la température et de l'état du lipide sur l'interaction de l'AmB avec les matrices lipidiques (phospholipide et/ou stérol) ainsi que sur l'état d'aggrégation du médicament. Pour une même concentration d'AmB, une échelle unique d'absorbance a été utilisée pour les trois températures étudiées, afin de faciliter la comparaison des valeurs d'absorbances aux différentes températures.

3.3.1: Amphotéricine 65×10^{-7} M

La figure 3.9 présente les spectres UV-visible de l'AmB à 65×10^{-7} M, et pour la même concentration, ajoutée cette fois à la solution liposomale contenant 0% et 5% de stérols à 25°C. Les courbes en pointillés représentent le spectre de l'AmB seule (c'est à dire sans liposome) au temps 0 (en bleu) et

au temps 90 minutes (en rouge). Nous avons effectué ces expériences afin d'évaluer l'effet du temps à une température donnée sur le spectre d'absorption de l'antibiotique seul se trouvant dans le milieu aqueux. Au temps zéro (courbe pointillée bleu), tel que mentionné précédemment (chapitre 2.4.2) le spectre de l'AmB est caractérisé par la présence de 4 bandes dont les maximums d'absorption se situent à environ 348 nm, 365 nm, 385 nm et 409 nm. Cette dernière est la bande principale d'absorption de l'AmB monomère alors que celle située à 348 nm est celle de l'AmB sous forme agrégée de type oligomérique.

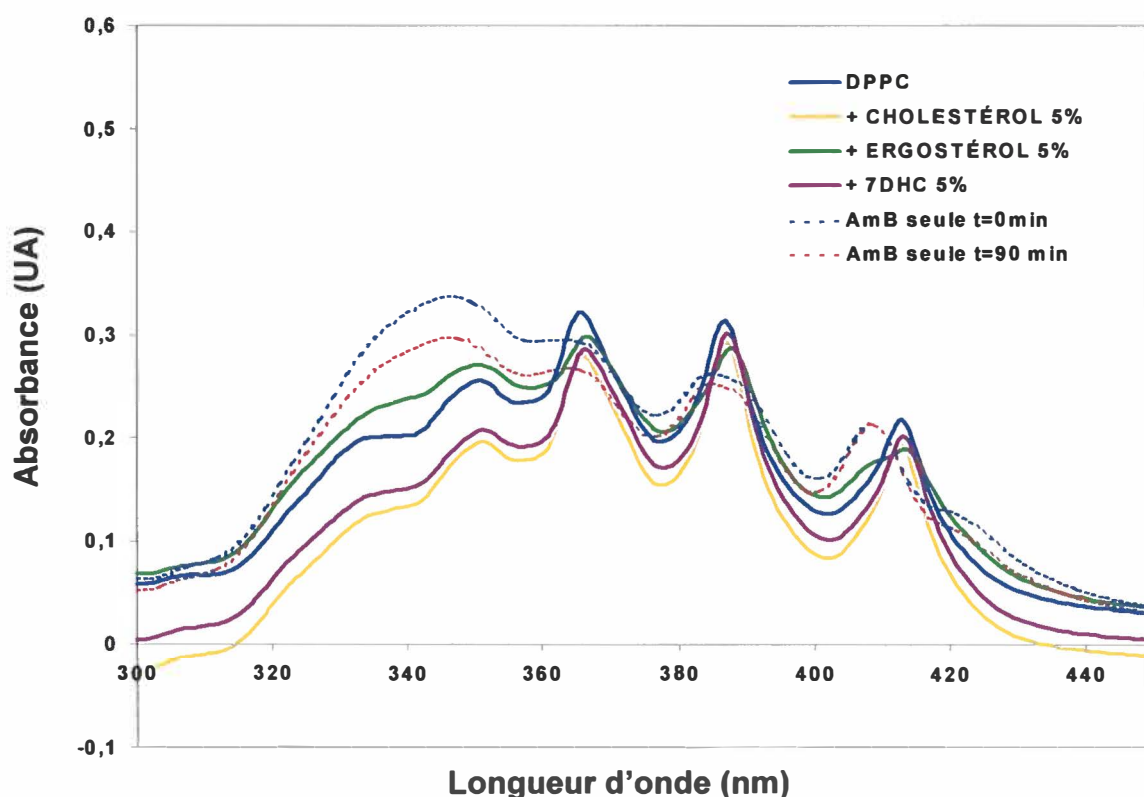


FIGURE 3.9: spectres UV-visible de l'AmB à $65 \times 10^{-7} \text{ M}$ dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 25°C.

Comme nous pouvons le constater, après 90 minutes d'incubation à 25°C (courbe pointillée rouge), la bande d'absorption à 348 nm, bande principale de l'AmB agrégée, diminue avec le temps alors que la bande d'absorption de l'AmB monomère (à 409 nm) demeure inchangée. En solution aqueuse, il est connu dans la littérature que les monomères d'AmB sont relativement instables (Lambing *et al* 1993, Chapados *et al*, 1994, Baginski *et al*, 1997). L'AmB sous forme de monomères subit en effet une dégradation chimique en solution et pour que l'équilibre entre la forme agrégée et la forme monomérique soit ré-établi, les agrégats du médicament sont dégradés. Ceci explique donc que la bande à 409 nm, bande d'absorption principale de l'AmB sous forme monomérique demeure inchangée alors que celle à 348 nm diminue en fonction du temps. Nous observons donc que, en solution aqueuse, l'AmB se désagrège et/ou se dégrade chimiquement. Nous remarquons également, pour l'AmB en solution aqueuse, la présence d'une faible bande d'absorption à 421 nm, laquelle témoigne de la présence de très grands agrégats d'AmB dans la solution aqueuse (Hartsel *et al*, 2001).

La figure 3.9 montre également les spectres d'absorbance de l'AmB en présence de liposomes de DPPC seul et de DPPC contenant 5% des stérols étudiés. La courbe continue en bleu présente le spectre de l'AmB en présence de DPPC seul, la courbe en jaune, le spectre de l'AmB en présence de DPPC+ 5% de cholestérol, la courbe en vert, le spectre du médicament en présence de DPPC+ 5% d'ergostérol puis finalement la courbe en rose, le spectre de l'AmB en présence de DPPC+ 5% de 7-DHC et ce, après 90 minutes d'incubation pour chacun des systèmes.

Tout d'abord, nous remarquons que, en présence de l'une ou l'autre des matrices lipidiques étudiées, il y a une importante modification du spectre par rapport à celui obtenu en solution aqueuse. La bande d'absorption de l'AmB à 409 nm, soit la bande principale de l'antibiotique sous forme monomérique en solution aqueuse, se déplace vers des longueurs d'ondes supérieures soit à

environ 413 nm indiquant, par là, que l'AmB se trouve dans un milieu lipidique. En effet, cette dernière bande, comme nous l'avons mentionné précédemment (voir chapitre 2.4.2 spectroscopie UV-visible), est la bande principale d'absorption de l'AmB en interaction avec les molécules environnantes, soit, dans ce cas-ci, le phospholipide et/ou les stérols (Barwicz *et al*, 1991). La présence de cette bande à 413 nm signifie donc que l'antibiotique a pénétré la bicouche lipidique car la partie hydrophobe de la molécule d'AmB, contenant les sept liaisons doubles conjuguées et responsable de l'activité spectrale, se trouve sous l'effet du milieu hydrophobe du lipide. Nous pouvons donc affirmer qu'à 25 °C, soit à une température en dessous de la température de transition du lipide (41,4°C) où les molécules de DPPC sont en phase gel, l'AmB est en interaction au sein des différentes bicouches lipidiques étudiées.

La bande à 413 nm est très semblable pour tous les systèmes, à l'exception de celui du DPPC+ 5% ergostérol (courbe en vert), pour lequel le spectre est différent. En effet, dans ce dernier cas, nous observons une bande d'absorption à environ 413 nm (AmB en interaction avec le phospholipide et/ou les stérols) mais aussi un épaulement avec le maximum à environ 409 nm (AmB monomérique dans la solution aqueuse). Ce spectre montre donc la superposition de 2 spectres: celui de l'AmB dans la solution aqueuse et celui de l'AmB dans la matrice lipidique. Lorsque l'ergostérol est présent dans la bicouche, il y a donc une bonne partie des molécules d'AmB qui restent dans la solution aqueuse. Il semble de ce fait que, dans ces conditions expérimentales, la présence d'ergostérol protège la bicouche contre la pénétration de l'AmB et ce, lorsque le phospholipide est en phase gel. Cette différence associée à l'ergostérol est probablement due, tel que nous l'avons mentionné précédemment (chapitre 3.1) aux légères différences de structures moléculaires des stérols, provoquant une organisation de la bicouche lipidique particulière pour chaque stérol, qui module l'interaction de l'AmB. En plus de cette protection contre la pénétration de l'AmB dans la bicouche lipidique contenant l'ergostérol, observée en UV-visible, nous avons remarqué, en

spectrofluorimétrie, une protection contre l'efflux de CF à l'extérieur des liposomes et ce pour les bicouches contenant l'ergostérol mais aussi pour celles contenant chacun des autres stérols étudiés. Ce phénomène de protection contre la pénétration du médicament dans les bicouches contenant l'ergostérol pourrait être à la base d'un plus petit efflux de CF à l'extérieur des liposomes ou il pourrait s'additionner au phénomène de protection contre l'efflux du colorant fluorescent à l'extérieur des bicouches lipidiques.

La figure 3.10 présente les spectres UV-visible de l'AmB pour les mêmes

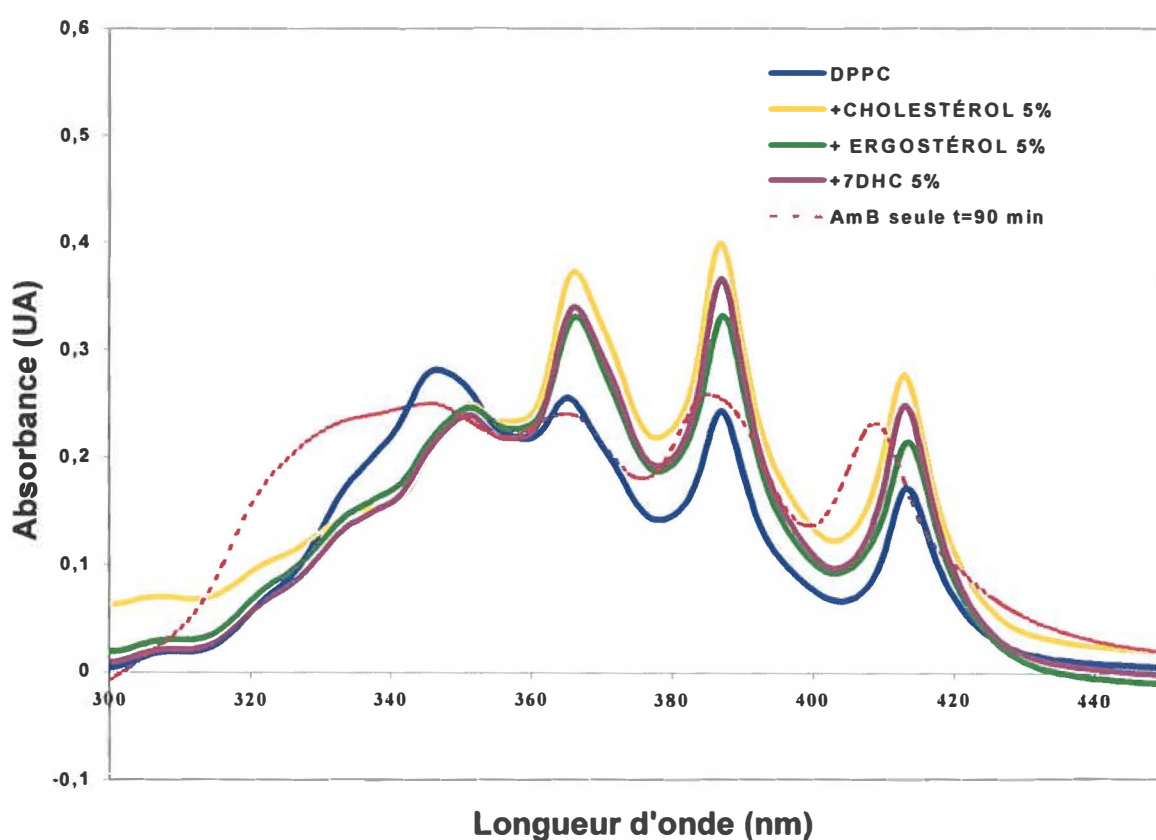


FIGURE 3.10: spectres UV-visible de l'AmB à 65×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 37°C.

systèmes mais à une température différente, soit 37°C. La courbe en pointillé rouge représente le spectre du médicament seul en solution aqueuse après 90

minutes d'incubation à 37°C. Nous remarquons que la bande d'absorption à 348 nm s'élargit et se déplace vers des longueurs d'ondes inférieures. Nous remarquons également que l'absorbance de cette bande diminue très légèrement (absorbance de 0,24) si on compare cette courbe avec celle de l'AmB au temps 90 min et à 25°C (absorbance de 0,26) (voir figure 3.9 courbe pointillée rouge). La bande d'absorption à 409 nm, est toujours présente et son

absorbance augmente très légèrement (absorbance après correction de la ligne de base de 0,19 à 25°C et de 0,22 à 37°C). Ceci signifie donc, une fois de plus, que l'augmentation de la température cette fois jusqu'à 37°C provoque dans le temps, la désagrégation et/ou la dégradation chimique des molécules du médicament.

À 37°C, tout comme il fût mentionné pour les spectres à 25°C, la présence de la bande d'absorption à environ 413 nm témoigne de l'interaction du médicament avec la bicouche lipidique. L'AmB, à une température voisine de celle de la transition du lipide, pénètre donc la bicouche et le médicament est en interaction avec le phospholipide et/ou les stérols. Nous remarquons également, en examinant l'absorbance à 413 nm, que cette interaction à 37°C pour les matrices contenant le cholestérol, l'ergostérol et le 7-DHC (absorbance après correction de la ligne de base de 0,24, 0,20 et 0,26 respectivement) est légèrement supérieure à celle observée à 25°C (absorbance après correction de la ligne de base de 0,19, 0,15, 0,21 respectivement).

De plus, nous constatons que l'absorbance vers 348 nm, bande principale de l'AmB sous forme agrégée est plus élevée pour le système constitué de DPPC seul que pour les autres systèmes. Cela implique qu'il y a donc début d'agrégation de l'AmB dans la matrice constituée de DPPC seul. Nous remarquons également que cette bande est différente de celle obtenue avec l'antibiotique seul en solution aqueuse (comparer la région comprise entre 320 et 350 nm, courbe pointillée et en bleu) et que la bande d'absorption à 413

nm est présente dans le cas de l'AmB avec le DPPC seul (courbe bleue), ce qui signifie que les agrégats d'AmB se situent dans un environnement autre que celui de la solution aqueuse, soit ici, dans le milieu lipidique. Cette agrégation du médicament dans la matrice lipidique pourrait être associée à la formation de pores par l'AmB (Bolard 1986, Matsuoka et Murata, 2003.) et à leur agrégation dans la membrane. Ces pores seraient les structures moléculaires de l'antibiotique proposées dans la littérature (Holz et Finkelstein, 1970, Andreoli, 1974, Hartsel et Bolard 1994, Gruszecki *et al* 2002) pour expliquer le mécanisme d'activité membranaire de l'AmB. Étant donné que les spectres obtenus en milieu lipidique sont différents de ceux obtenus en milieu aqueux, nous observons que dans ces conditions et pour tous les systèmes étudiés, la composante du spectre de l'AmB en solution aqueuse (409 nm) est faible. Il en résulte donc que la majeure partie de l'AmB se retrouve en interaction au sein de la bicouche et non en solution aqueuse.

L'agrégation du médicament dans la bicouche lipidique à 37°C, soit légèrement au-dessus de la température de prétransition du lipide où il y a restructuration au niveau des têtes polaires, peut s'expliquer par le fait que les chaînes latérales du DPPC deviennent davantage mobiles et il est probable que ceci ne soit pas favorable à l'interaction du médicament avec ces dernières. Les molécules d'AmB préfèrent donc interagir avec elles-mêmes et cela se traduit par la formation d'agrégats dans la matrice lipidique.

Nous pouvons constater, en examinant la figure 3.10, que la présence de stérols empêche toutefois l'agrégation du médicament ayant comme conséquence de favoriser l'interaction de l'AmB avec la bicouche lipidique. Cette interaction un peu plus élevée de l'AmB en présence des matrices contenant les stérols peut s'expliquer de deux façons : soit que la présence de stérols agisse directement sur l'AmB ou que ceux-ci affectent la bicouche lipidique de façon à ce que la pénétration du médicament soit facilitée. Il est connu dans la littérature (Ohvo-Rekilä *et al*, 2002) qu'en dessous de la

température de transition du phospholipide, la présence de stérols fluidifie les membranes alors qu'au delà de cette température, les stérols rigidifient l'environnement lipidique. Par contre, dans les présentes conditions, soit à 37°C, la bicouche contenant les stérols est davantage rigide que celle contenant le phospholipide seul, ce qui pourrait expliquer la plus grande interaction du médicament au sein des bicouches lipidiques à cette température. En comparant les valeurs d'absorbance à 413 nm (absorbance corrigée de 0,24, 0,20, 0,26 pour les matrices contenant le cholestérol, l'ergostérol et le 7-DHC respectivement) nous pouvons observer que l'interaction du médicament avec la matrice contenant les stérols est légèrement plus élevée dans le cas du système contenant le 7-DHC que pour le système contenant le cholestérol, alors que cette dernière est légèrement supérieure à l'interaction de l'AmB avec la matrice contenant l'ergostérol. Cet effet légèrement supérieur de l'AmB envers la matrice contenant le 7-DHC est compatible avec l'hypothèse de Feigin voulant que le médicament ait une affinité supérieure pour les matrices contenant ce stérol (voir chapitre 1.2).

La figure 3.11 présente les spectres UV-visible de l'AmB dans les mêmes conditions qu'à 25 et à 37°C mais à une température de 50°C. La courbe en pointillé rouge présente le spectre de l'AmB seule (c'est à dire sans liposome) en solution aqueuse après une incubation de 90 minutes à une température de 50°C. Nous constatons que, une fois de plus, la bande principale d'absorption de l'AmB agrégée (348 nm) diminue et que la bande d'absorption de l'AmB monomérique (409) augmente légèrement si on compare cette courbe avec celle de l'AmB à la même concentration après 90 minutes d'incubation et à 25°C (courbe pointillée rouge figure 3.9) (absorbance corrigée à 348 nm de 0,26 à 25°C et 0,17 à 50°C et absorbance à 409 nm de 0,19 à 25°C et 0,21 à 50°C). L'augmentation de la température provoque donc une désagrégation et/ou une dégradation chimique du médicament en solution aqueuse.

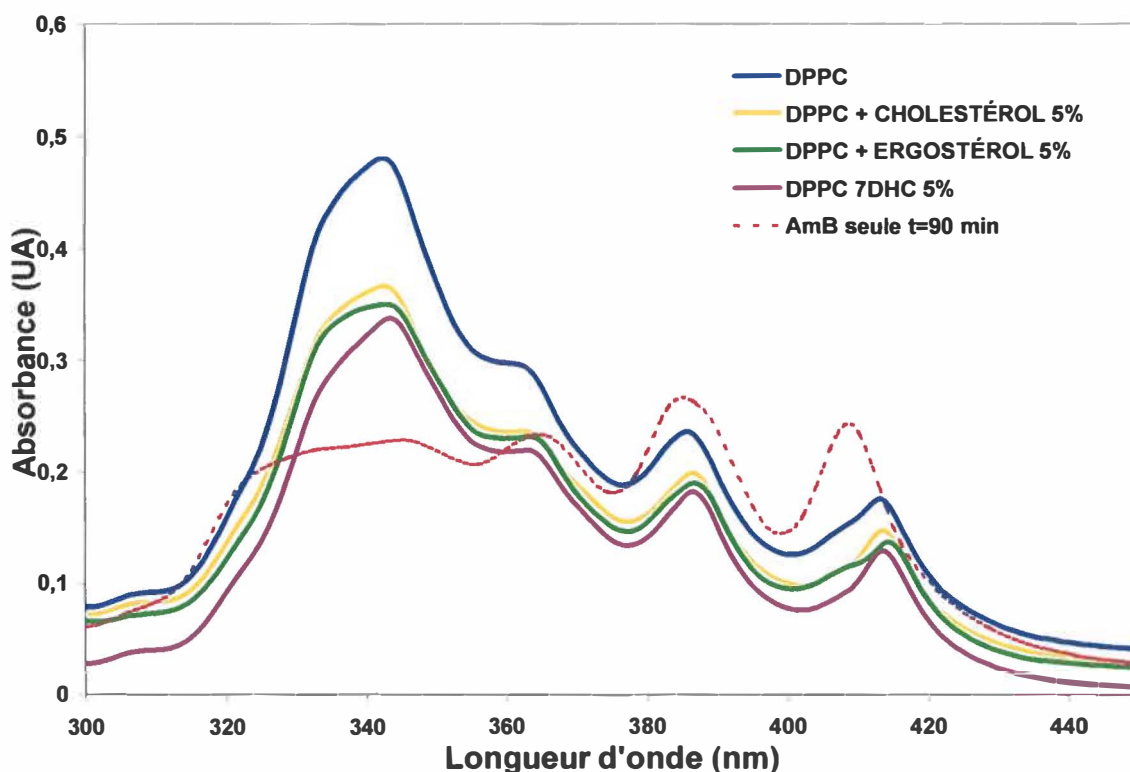


FIGURE 3.11: spectres UV-visible de l'AmB à 65×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 50°C.

Lorsque l'AmB est ajoutée aux différents systèmes lipidiques étudiés, nous remarquons tout d'abord que l'allure générale du spectre est très différente de ceux obtenus à 25 ou à 37°C. Nous observons toujours l'interaction de l'antibiotique avec les différents systèmes étudiés (bande d'absorption à environ 413 nm) et ce à 50°C, soit lorsque le phospholipide est en phase liquide-cristalline. Par contre, si nous comparons les valeurs d'absorbance à 413 nm pour chacune des trois températures étudiées, nous notons que ces absorbances sont nettement plus faibles à 50°C (absorbance corrigée de 0,11, 0,12, 0,10, 0,11 pour DPPC seul, et en présence de cholestérol, d'ergostérol et de 7-DHC respectivement) que celles obtenues à 25 et à 37°C (voir p.64). Nous pouvons conclure que le nombre de molécules d'antibiotique en interaction avec

les molécules environnantes, soit le phospholipide et/ou les stérols, est moindre à 50°C qu'aux autres températures et ce, pour chacun des systèmes étudiés. Ceci pourrait être attribuable à un effet de "mismatch" hydrophobe (voir figure 3.12). En effet, lorsque les lipides sont en phase gel, l'épaisseur de la bicouche correspond à la hauteur du pore d'AmB de longueur de deux molécules du médicament (Fournier *et al*, 1998, Battacharya *et al*, 2000, Matsuoka *et al*, 2003.). Par contre, lorsque les lipides sont en phase liquide cristalline, l'épaisseur de la bicouche diminue et ceci provoque un effet de "mismatch" hydrophobe pouvant jouer un rôle important au niveau du fonctionnement et de la stabilité du pore d'AmB (May, 2000).

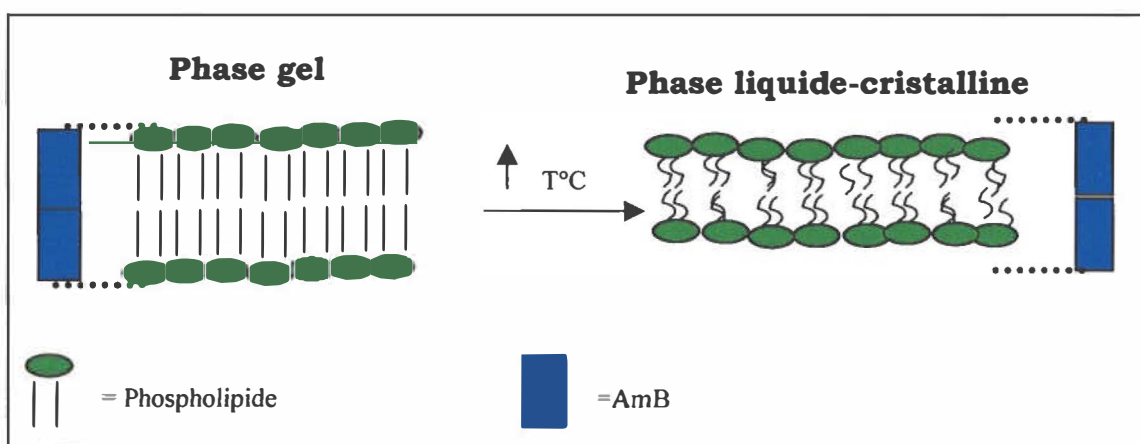


FIGURE 3.12 : illustration du "mismatch" hydrophobe

En effet, l'AmB de par sa structure moléculaire, est énergétiquement instable lorsque le phospholipide est en phase liquide-cristalline et elle aura tendance à s'agréger puisque la molécule, étant rigide, interagit moins bien avec des chaînes contenant des conformères gauches. Ceci est probablement à la base de l'agrégation des pores du médicament se traduisant ainsi par une diminution du nombre de molécules d'AmB disponibles pour interagir avec les molécules de DPPC (voir figure 3.13).

Nous remarquons également, par la présence particulièrement importante d'une bande d'absorption à 343 nm, qu'il y a une très grande

agrégation du médicament, mais cette agrégation est différente de celle mentionnée plus haut, caractérisée par une bande principale à 348 nm (AmB en solution aqueuse). Cette bande à 343 nm est notamment très élevée dans le cas de la bicouche lipidique formée de DPPC seul et davantage encore que celle observée pour l'AmB en solution aqueuse (courbe pointillée rouge). Cette agrégation du médicament dans la bicouche lipidique de DPPC seul est également supérieure à celle observée pour le médicament en présence des membranes lipidiques contenant les stérols, ce qui nous permet de conclure que, dans ces conditions expérimentales, la présence de ces derniers atténue l'effet d'agrégation du médicament dans la matrice.

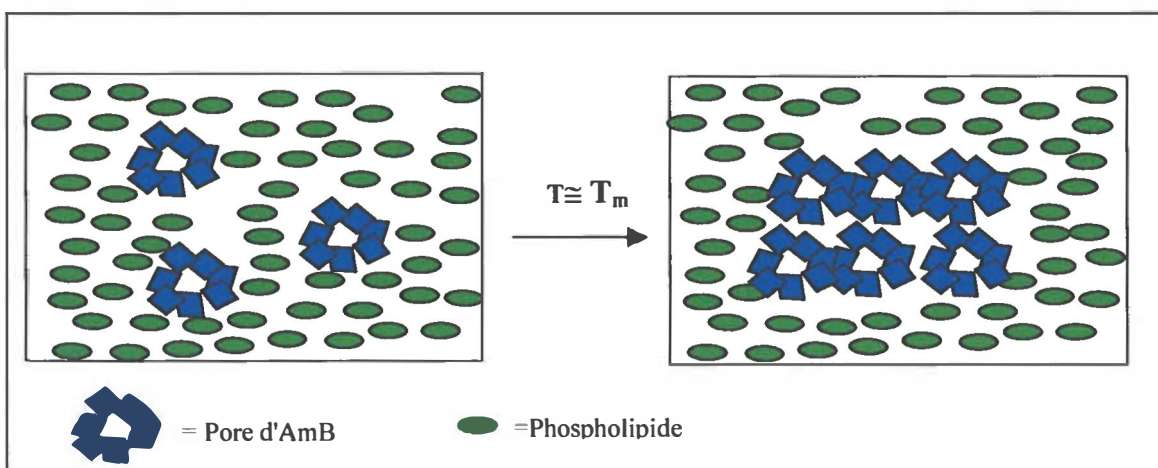


FIGURE 3.13 : illustration de l'agrégation des pores d'AmB.

En résumé, nous remarquons qu'à une concentration d'AmB de 65×10^{-7} M, l'augmentation de la température ainsi que le temps provoquent la désagrégation et/ou la dégradation chimique du médicament se trouvant dans la solution aqueuse, tel que mentionné précédemment. Par contre, lorsque l'AmB est en présence des bicouches lipidiques, le médicament interagit avec ces dernières et ce, même à des températures où les lipides sont en phase cristalline. On observe toutefois que l'interaction de l'AmB avec le phospholipide au sein de la bicouche diminue de façon concomitante avec l'agrégation de l'AmB. En effet plus l'AmB est agrégée, moins l'interaction est grande. Cette

agrégation du médicament dans la matrice lipidique contenant ou non les stérols, pourrait être associée, comme nous l'avons mentionné précédemment, à la formation de pores par l'AmB et à l'agrégation de ces derniers dans la membrane.

Les résultats obtenus en UV-visible sont compatibles avec ceux obtenus en fluorescence puisque l'efflux de CF à l'extérieur des liposomes est associé à la pénétration de l'AmB dans la bicouche lipidique, pénétration que nous pouvons aussi mettre en évidence en UV-visible. Nous avons également obtenu par spectroscopie UV-visible, des résultats compatibles avec ceux obtenus en calorimétrie différentielle à balayage puisque nous avons pu mettre en évidence que la présence d'AmB induit une séparation de phase dans la bicouche lipidique. De ce fait, le médicament ne serait pas distribué de façon homogène dans la membrane lipidique mais plutôt sous forme de phase riche en AmB, à l'intérieur de laquelle le médicament se trouve probablement sous forme de pores et/ou d'agrégats de pores, ce que nous avons également observé en UV-visible.

3.3.2: *Amphotéricine* $250 \times 10^{-7} \text{ M}$

Nous avons effectué les mêmes expériences que précédemment mais avec une concentration plus élevée d'AmB afin d'étudier l'effet de l'état d'agrégation du médicament sur son interaction avec les bicouches lipidiques.

La figure 3.14 présente les spectres UV-visible de l'AmB en solution aqueuse à une concentration de $250 \times 10^{-7} \text{ M}$, et pour la même concentration du médicament ajoutée cette fois à la solution liposomale contenant 0% et 5% de stérols à 25°C. Les courbes pointillées représentent le spectre de l'AmB en solution aqueuse au temps zéro (bleu) et au temps 90 minutes d'incubation (rouge) à 25°C. À cette plus grande concentration d'AmB, nous remarquons tout d'abord que le spectre de l'AmB en solution aqueuse est différent de celui obtenu avec une concentration de $65 \times 10^{-7} \text{ M}$. En comparant les deux courbes

pointillées de la figure 3.14, nous pouvons observer que la bande à 348 nm (bande principale d'absorption de l'AmB sous forme agrégée) diminue avec le temps d'incubation alors que la bande d'absorption à 409 nm (bande principale de l'AmB sous forme monomérique) demeure pratiquement inchangée. Les grands agrégats et les oligomères du médicament se désagrègent afin d'atteindre un équilibre entre la forme monomérique et oligomérique. Nous pouvons donc conclure que la température provoque une désagrégation et/ou

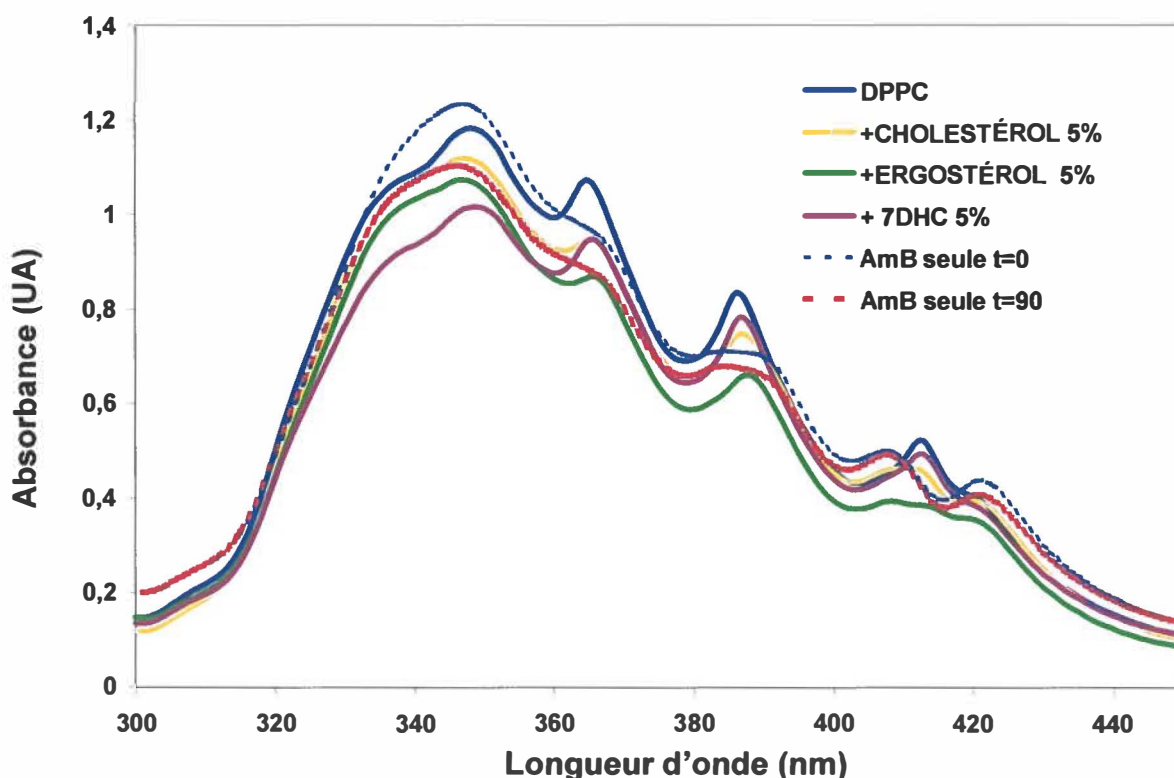


FIGURE 3.14: spectres UV-visible de l'AmB à 250×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 25°C.

une dégradation chimique du médicament en solution aqueuse, phénomène également observé à une concentration d'AmB de 65×10^{-7} M et à la même température.

Nous remarquons finalement la présence d'une bande d'absorption à environ 421 nm pour l'AmB en solution. Cette dernière bande témoigne de la présence de très grands agrégats du médicament dans le milieu aqueux (Hartsel *et al*, 2001). Cette bande d'absorption à 421 nm a été observée avec une concentration plus faible d'AmB (voir figure 3.9) mais celle-ci était moins bien définie, se présentant plutôt comme un épaulement sur la courbe du spectre

Par la suite, nous avons ajouté l'AmB aux différentes bicouches lipidiques étudiées, soit la matrice constituée de DPPC seul (courbe continue bleue), celle de DPPC + 5% cholestérol (courbe continue jaune), la matrice de DPPC + 5% ergostérol (courbe continue verte) et finalement celle formée de DPPC + 5% 7-DHC (courbe continue rose). Nous remarquons, tout d'abord, que ces spectres sont différents de ceux obtenus pour l'AmB en solution aqueuse (courbes pointillées) et qu'ils sont le résultat de la superposition de deux spectres : celui de l'AmB en solution aqueuse et celui du médicament ayant pénétré la bicouche lipidique. Pour tous les systèmes, nous constatons que la région comprise entre 409 et 422 nm est beaucoup moins bien définie avec une plus grande concentration du médicament que ce que nous avons observé à 65×10^{-7} M. Nous observons la persistance de la bande d'absorption à 421 nm et l'épaulement à 409 nm, respectivement caractéristique de l'AmB agrégée sous forme de très grands agrégats et de monomères dans la solution aqueuse. Ceci suggère qu'il y a une grande partie du médicament qui n'a pas pénétré la bicouche lipidique et qui reste dans la solution. Le même phénomène a été observé pour la concentration d'AmB de 65×10^{-7} M en présence des liposomes contenant l'ergostérol.

Nous remarquons également la présence de la bande d'absorption à 413 nm laquelle est caractéristique de l'AmB en interaction avec les membranes lipidiques. Nous pouvons donc affirmer que, à une température de 25°C, soit en dessous de la température de transition du lipide où ce dernier est en phase gel, l'AmB est en interaction avec le phospholipide et/ou le stérol. Si nous

comparons les valeurs d'absorbance à 413 nm des deux concentrations d'AmB étudiées à 25 °C, nous constatons que celle obtenues avec 250×10^{-7} M du médicament sont deux fois plus élevées que les valeurs obtenues pour 65×10^{-7} M, mais il faut garder en mémoire que cette dernière concentration est presque quatre fois plus petite. Étant donné qu'avec une plus faible concentration d'AmB, nous observons une bande d'absorption mieux définie à environ 413 nm, nous pouvons donc supposer que dans ce cas, un plus grand pourcentage d'AmB est en interaction avec la bicouche lipidique, alors qu'à une concentration de 250×10^{-7} M du médicament, un plus grand pourcentage d'AmB reste en solution. Nous constatons donc que dans ces conditions, les molécules du médicament préfèrent rester en interaction avec elles-mêmes en formant de grands agrégats dans la solution aqueuse plutôt que d'interagir avec l'environnement lipidique.

Nous remarquons, en comparant les valeurs d'absorbance à environ 413 nm pour la concentration de 250×10^{-7} M d'AmB et pour chacune des différentes matrices étudiées (absorbance après correction de la ligne de base: DPPC seul 0,39; DPPC+ 5% cholestérol 0,30; DPPC+ 5% ergostérol 0,21 et DPPC+5% 7-DHC 0,37) que c'est en présence de la matrice constituée de DPPC seul que l'interaction du médicament avec les bicouches lipidiques est la plus grande. L'interaction du médicament en présence de la matrice contenant le 7-DHC est comparable à celle obtenue avec la bicouche de phospholipide seul. Toutefois lorsque nous comparons cette situation à celle de la matrice de DPPC contenant 5% de cholestérol et davantage encore avec celle contenant 5% d'ergostérol, nous constatons que la partie du spectre autour de 413 nm n'est pas bien définie, tel qu'expliqué précédemment. Nous avons en effet observé, pour la matrice lipidique contenant l'ergostérol, que même après 90 minutes d'incubation, il y avait très peu d'interaction de l'AmB avec la bicouche. Nous croyons donc que l'équilibre serait atteint plus lentement lorsque l'AmB est en présence de la bicouche contenant 5% d'ergostérol, que lorsque le médicament est en présence des autres systèmes étudiés. Tout comme nous

avons mentionné précédemment pour la concentration d'AmB de 65×10^{-7} M, la présence d'ergostérol semble protéger la membrane contre l'effet de l'AmB et ce, même à une concentration du médicament presque quatre fois plus élevée.

La figure 3.15 présente les spectres UV-visible de l'AmB seule en solution aqueuse ainsi qu'avec les différents systèmes lipidiques étudiés mais à une température de 37°C. Tout d'abord, en comparant le spectre de l'AmB en solution aqueuse après 90 minutes d'incubation à 37°C (courbe pointillée rouge) au spectre de l'AmB seule au temps 90 minutes d'incubation à 25°C (courbe pointillée rouge figure 3.14), nous pouvons constater que la bande d'absorption de l'AmB agrégée (à environ 348 nm) diminue alors que la bande d'absorption de l'AmB monomérique (à environ 409 nm) augmente légèrement. Ceci signifie donc que, dans le temps, le médicament en solution aqueuse se monomérise et/ou se dégrade chimiquement sous l'effet de la température. Le spectre de l'AmB en solution aqueuse de la figure 3.15, permet aussi remarquer la présence de la bande d'absorption à environ 421 nm, laquelle indique la présence de très grands agrégats d'AmB.

Lorsque le médicament est mis en présence des différentes bicouches lipidiques étudiées (DPPC seul courbe continue bleu, DPPC+5% cholestérol courbe en jaune, DPPC + 5% ergostérol courbe en vert et DPPC + 5% 7-DHC courbe en rose), nous remarquons tout d'abord un changement remarquable de l'allure du spectre, les bandes d'absorption étant cette fois-ci beaucoup mieux définies. Nous notons qu'il y a présence de la bande d'absorption bien définie à 413 nm pour chacun des systèmes étudiés, et ce, à une température se rapprochant de la température de transition du lipide, où ce dernier est encore en phase gel (précisément en phase gel ondulé). Cette bande, tel que mentionné précédemment, est caractéristique de l'interaction du médicament avec le phospholipide et/ou les stérols. Nous constatons également que cette interaction est plus importante que celle observée à 25°C en comparant les valeurs d'absorbance après correction de la ligne de base (DPPC seul 0,53;

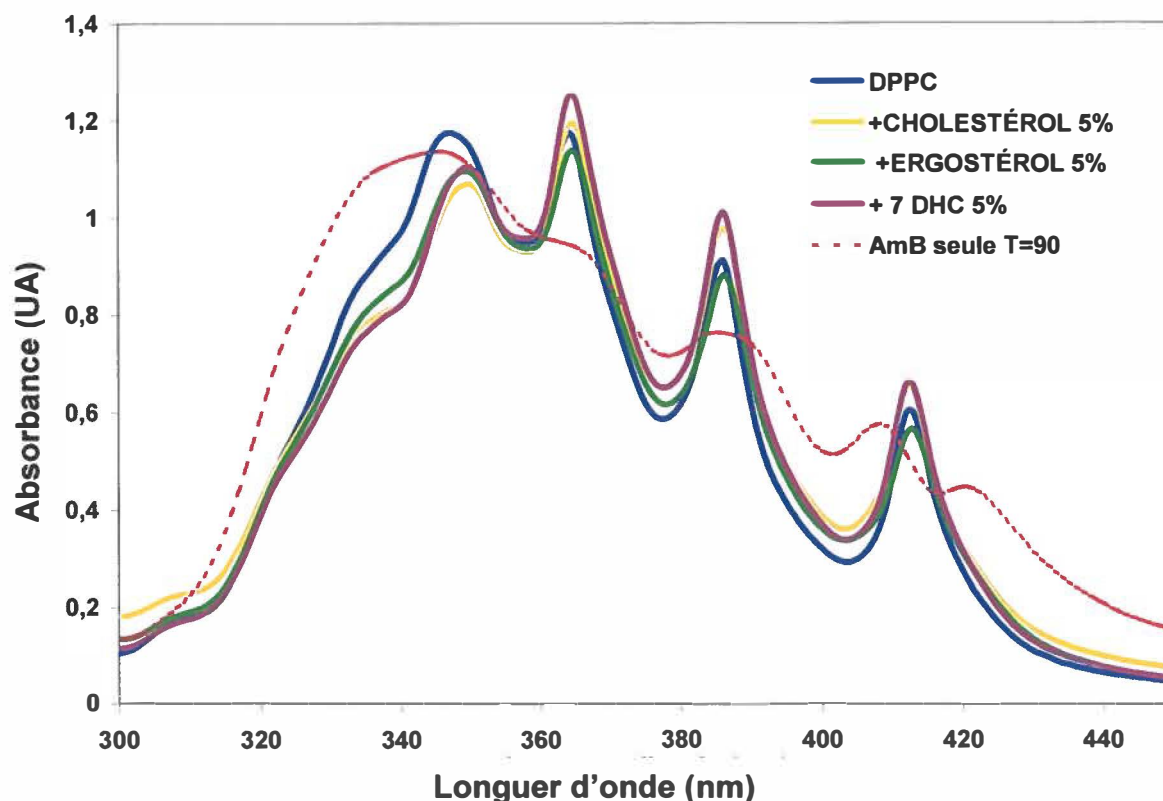


FIGURE 3.15: spectres UV-visible de l'AmB à 250×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 37°C.

DPPC + 5% cholestérol 0,58; DPPC+5% ergostérol 0,49 et DPPC+5% 7-DHC 0,60). Cette interaction est également maximale avec les bicouches lipidiques contenant le 7-DHC ou le cholestérol, (dans ces deux cas, les bandes à 413 nm se superposent et par conséquent sont difficiles à différencier) ce que nous avons également observé avec l'AmB à 65×10^{-7} M.

Pour ce qui est de l'état d'agrégation de l'AmB en présence des différentes bicouches lipidiques (voir bande d'absorbance à 348 nm) nous pouvons remarquer qu'il y a un début d'agrégation de l'antibiotique particulièrement pour les bicouches formées de DPPC seul, ce que nous avons

également observé en présence d'une concentration plus faible d'AmB (voir figure 3.10) à la même température.

Nous remarquons également que, contrairement à ce que nous avons observé à une température de 25°C, il n'y a pas de bande d'absorption à 409 nm ni à 421 nm. Nous pouvons donc conclure ici qu'une très importante partie de l'AmB pénètre la bicouche lipidique et est en interaction avec celle-ci.

La figure 3.16 présente les spectres UV-visible de l'AmB dans les mêmes conditions mais à une température de 50°C. La courbe pointillée rouge représente le spectre de l'AmB en solution aqueuse après un temps d'incubation de 90 minutes à cette température. Nous constatons tout d'abord, en comparant ce spectre avec celui de l'antibiotique en solution aqueuse au temps 90 minutes d'incubation à 25°C (voir figure 3.9 courbe pointillée rouge), que la bande d'absorption de l'AmB sous forme agrégée (à environ 348 nm) diminue et également que la bande d'absorption de l'AmB sous forme monomérique (à environ 409 nm) augmente légèrement. Ceci suggère donc qu'en solution aqueuse, l'AmB se monomérise et/ou se dégrade chimiquement sous l'effet de la température.

Nous remarquons aussi que lorsque les bicouches lipidiques sont présentes dans la solution, le spectre prend une toute autre allure. Tout d'abord, en examinant la bande d'absorption à 343 nm, nous constatons que l'agrégation de l'AmB dans la matrice lipidique est très importante. De plus, nous remarquons en comparant les valeurs d'absorbance à 413 nm (absorbance après correction de la ligne de base de 0,39, 0,35, 0,29, 0,45 pour les matrices de DPPC seul, +5% cholestérol, +5% ergostérol et finalement +5% 7-DHC respectivement), que l'interaction du médicament avec les différentes bicouches lipidiques étudiées est la plus élevée avec la matrice contenant le 7-DHC et la plus faible avec la matrice contenant l'ergostérol (si nous tenons compte de la ligne de base). La présence de l'ergostérol semble donc réduire

l'interaction du médicament au sein de la bicouche lipidique alors que la présence de 7-DHC favorise l'interaction du médicament avec la matrice, ce qui est en accord avec l'hypothèse de Feigin voulant que l'AmB interagissent préférentiellement avec le 7-DHC.

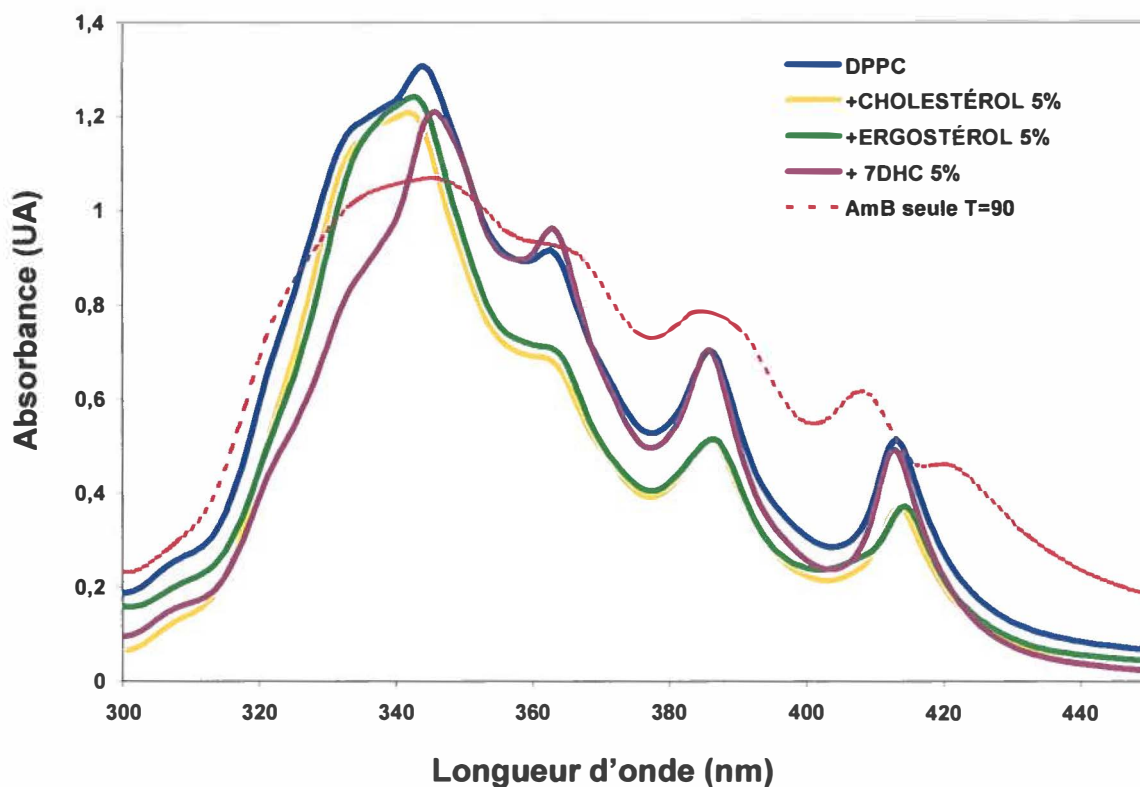


FIGURE 3.16: spectres UV-visible de l'AmB à de 250×10^{-7} M dans la solution contenant les liposomes de DPPC sans stérol et avec 5% de stérols à 50°C.

L'antibiotique est grandement agrégé dans la matrice lipidique pour les systèmes de DPPC seul mais aussi pour ceux contenant 5% de cholestérol et d'ergostérol ce que nous pouvons constater par la présence de la bande d'absorption à environ 343 nm ainsi que la valeur de son absorbance. De plus, l'agrégation du médicament en milieu lipidique est plus importante que celle observée en milieu aqueux.

En général, nous constatons qu'à une concentration de 250×10^{-7} M, tout comme à une concentration de 65×10^{-7} M, l'allure du spectre à 50°C est très différente de ceux obtenus à 25 ou à 37°C. L'interaction de l'antibiotique avec les molécules environnantes, soit le phospholipide et/ou les stérols, est moindre à 50°C qu'à 25 et à 37°C, et ce pour chacun des systèmes étudiés. Ceci est probablement attribuable à un effet de mismatch hydrophobe tel qu'expliqué précédemment. Dans de telles conditions expérimentales (50°C), le phospholipide se trouve en phase liquide-cristalline et ses chaînes aliphatiques sont plus mobiles. Les molécules d'AmB préfèrent alors interagir entre elles plutôt qu'avec le phospholipide, ce qui explique que le médicament est davantage agrégé et qu'il y a moins de molécules du médicament disponibles pour interagir avec les molécules de phospholipide et/ou de stérols.

Notons enfin que les mêmes expériences ont été effectuées avec 25% de stérols mais ces résultats ne sont pas présentés puisqu'ils sont très semblables à ceux obtenus avec 5% de stérols.

En conclusion, l'AmB interagit avec les différents systèmes étudiés lorsque le phospholipide est en phase gel, ce que nous avons également observé en spectrofluorimétrie. En effet, le médicament montre une interaction avec les matrices lipidiques à 25°C (phase gel) mais celle-ci est maximale à 37°C (phase gel ondulé). La présence de stérols dans la bicouche lipidique provoque une modification de la structure membranaire se répercutant également dans l'interaction du médicament avec ces dernières. Nous pouvons donc dire que l'état dans lequel se trouve la bicouche influence les interactions de l'AmB avec son milieu. Un milieu plus fluide favorise l'interaction de l'AmB avec elle-même, ce qui se traduit par une agrégation du médicament dans la bicouche, alors qu'un milieu moins fluide favorise une interaction directe du médicament au sein de la matrice lipidique (DPPC + stérols). Dans ce dernier cas, les molécules de phospholipides et/ou de stérols étant plus rigides, cela permet un meilleur rapprochement des molécules lipides/AmB.

CHAPITRE 4

CONCLUSION

Le but du présent travail de recherche était de vérifier les bases physico-chimiques de l'hypothèse de Feigin par l'étude de l'interaction de l'AmB avec différents stérols contenus dans de grands liposomes unilamellaires de DPPC, couramment utilisés comme modèle de la membrane cellulaire. L'atteinte de cet objectifs nécessitant une meilleure compréhension du mécanisme d'action de l'AmB, nous nous sommes donc intéressés à deux phénomènes particuliers; celui de la pénétrabilité du médicament dans les différentes bicouches lipidiques ainsi que celui de la perméabilité de celles-ci provoquée par l'AmB. Si on considère la formation de pores membranaires comme mécanisme d'action de l'AmB, il est évident que les deux phénomènes cités précédemment sont étroitement liés, c'est à dire que perméabilité exige pénétrabilité du médicament dans les bicouches lipidiques. De plus, ces deux phénomènes sont probablement en relation avec les différents états dans lequel se trouve la matrice, ce qui dépend de la température. Deux grands systèmes distincts ont été étudiés, soit celui du DPPC sans stérol et celui du DPPC en présence de chacun des trois stérols (cholestérol, ergostérol et 7-DHC) et ce, à trois températures différentes, donc trois état physiques distincts de la matrice lipidique.

Pour ce qui est, tout d'abord, de la pénétrabilité de l'AmB dans les matrices lipidiques de DPPC sans stérol, nous constatons que le médicament s'insère dans la bicouche lorsque cette dernière se trouve même en phase gel (à 25°C). En effet, nous avons mis en évidence que le médicament interagit avec le phospholipide (résultat d'UV-visible) et provoque un efflux de CF à l'extérieur des liposomes (résultat de spectrofluorimétrie) ce qui démontre bien que l'AmB a pénétré la bicouche lipidique. Nous remarquons, par contre, que cette pénétrabilité du médicament n'est pas proportionnelle à sa concentration.

Lorsque nous augmentons la température, de façon à ce que la bicouche lipidique soit un peu plus fluide (37°C), nous obtenons alors un maximum de pénétrabilité du médicament dans la matrice lipidique. Effectivement, nous avons vu, en UV-visible, que l'interaction de l'antibiotique avec la bicouche de DPPC seul était la plus forte à cette température. Par contre, si la température dépasse celle de la température de transition du phospholipide, la bicouche lipidique se trouve en phase liquide-cristalline et donc davantage fluide. Nous remarquons, dans ce cas, que la pénétrabilité du médicament est également élevée mais que le changement d'état de la bicouche lipidique a provoqué une très grande agrégation de l'AmB dans la matrice (résultat d'UV-visible), agrégation également mise en évidence par la présence de phases lipidiques distinctes en calorimétrie différentielle à balayage.

Le second grand système étudié est celui de la bicouche lipidique de DPPC contenant un stérol, soit le cholestérol, l'ergostérol ou le 7-DHC. En se basant sur les résultats de spectrofluorimétrie et sur l'étude des spectres UV-visible, nous constatons, tout d'abord, qu'en état de gel perturbé par la présence soit d'une faible ou d'une plus grande concentration de stérols (5 ou 25%), l'AmB pénètre la matrice lipidique. Il est toutefois important de souligner que, à 25°C et aux deux concentrations d'AmB, la présence de 5% d'ergostérol diminue la pénétrabilité de l'AmB dans la bicouche lipidique, ce que nous avons pu remarquer en UV-visible par une plus faible interaction du médicament avec cette matrice. Un autre fait remarquable est que, pour les mêmes conditions, la plus grande interaction de l'antibiotique (donc plus grande pénétrabilité) avec la matrice lipidique a été observée lorsque cette dernière contient le 7-DHC, ce qui vient appuyer les fondements de l'hypothèse de Feigin.

Tout comme pour le cas de la matrice constituée de DPPC seul, c'est lorsque la bicouche lipidique devient plus fluide (37°C) que nous obtenons un maximum de pénétrabilité (maximum d'interaction observé en UV-visible) de l'AmB dans les bicouches contenant les stérols et ce, aux deux concentrations

du médicament. Par contre, lorsque la température dépasse celle de la transition du phospholipide, la perméabilité reste élevée mais nous remarquons que la présence de stérols offre une protection contre l'agrégation des pores du médicament dans la bicouche lipidique.

Tout comme pour le cas de la matrice de DPPC seul, nous constatons que, lorsque le phospholipide se trouve en phase liquide-cristalline (c'est à dire au delà de 42°C), la présence de stérols modifie l'organisation des bicouches lipidiques en induisant une séparation de phase (résultat de calorimétrie différentielle à balayage). De tous les stérols étudiés, c'est en présence de 7-DHC que la matrice lipidique est la plus perturbée et l'AmB interagit davantage avec cette dernière, ce qui, encore une fois, vient appuyer l'hypothèse de Feigin.

Le second phénomène que nous avons voulu étudier est celui de la perméabilité des membranes provoquée par l'AmB. Nous avons constaté, à la lumière de nos résultats, que le médicament perméabilise les membranes constituées de DPPC seul, et ce lorsque le phospholipide est en phase gel (25°C). Il est évident que pour perméabiliser la membrane lipidique, l'AmB doit d'abord pénétrer cette dernière mais comme nous l'avons constaté en comparant les résultats de spectrofluorimétrie à ceux d'UV-visible, nous concluons qu'une plus grande pénétrabilité du médicament n'implique pas nécessairement une plus grande perméabilité de la bicouche provoquée par l'AmB. En effet, nous avons remarqué qu'avec une petite quantité de stérols (5%), l'AmB pénètre la matrice lipidique (UV-visible) mais que le pourcentage d'efflux de CF à l'extérieur des liposomes est inférieur à celui obtenu avec la matrice de DPPC seul. Ceci est donc attribuable à l'effet des stérols et signifie que la présence d'une petite quantité de ces derniers modifie l'organisation lipidique de façon à ce que la bicouche soit davantage protégée contre la perméabilisation qui aurait pu être provoquée par l'AmB.

Lorsqu'une plus grande quantité de stérols (25%) est présente dans la matrice lipidique, nous remarquons que le pourcentage d'efflux de CF est supérieur à celui observé pour la matrice de DPPC seul, sauf pour le cas des bicouches contenant le cholestérol. En effet, la concentration de ce stérol semble avoir très peu d'effet sur la perméabilité des membranes causée par l'AmB. Par contre on remarque que l'efflux de CF obtenu avec l'ergostérol est significativement plus grand que celui obtenu avec la matrice de DPPC seul ou la matrice contenant le cholestérol, ce qui met en évidence l'activité antifongique bien connue de l'AmB. Ceci nous laisse croire que la toxicité du médicament, (liée à son affinité pour le cholestérol) serait inférieure à son activité antifongique (liée à son affinité pour l'ergostérol). Nous constatons finalement, par cette technique, que le pourcentage d'efflux de CF obtenu avec la matrice contenant le 7-DHC est sans aucun doute beaucoup plus grand que tout ce que nous avons obtenu avec les autres systèmes étudiés jusqu'à maintenant. Ce résultat, fort encourageant, vient appuyer l'hypothèse de Feigin et nous permet de dire que l'activité anticancéreuse potentielle du médicament pourrait être encore plus grande que son activité antifongique déjà bien reconnue.

L'affinité de l'AmB pour les divers systèmes semble donc être étroitement liée aux différences de structures moléculaires des stérols étudiés, si minimes soient-elles. Il est fort probable que l'organisation des bicouches lipidiques diffère en présence de chacun des stérols et ces petites différences modulent l'interaction de l'AmB avec chacune des matrices étudiées. Nos résultats globaux démontrent que l'AmB possède une affinité légèrement supérieure pour la matrice lipidique contenant le 7-DHC que pour tous les autres systèmes étudiés, ce qui nous a permis de vérifier la base de l'hypothèse de Feigin sur laquelle repose ce travail de recherche et dont l'essence même est cette différence d'affinité. Ces précisions apportent donc un support physico-chimique à l'idée que l'AmB pourrait être utilisé pour le traitement de certains types de cancers comme le carcinome hépatocellulaire.

Bibliographie

- Andreoli, T. E. (1974) "The structure and function of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235: 448-68.
- Baginski, M., Tempczyk, A., Borowski, E (1989) "Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics." *Eur. Biophys. J.* 17 (3): 159-66.
- Baginski, M., Resat, H., McCammon, J. A. (1997) "Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation", *Mol. Pharmacol.* 52 (4):560-70.
- Barton, D.H., Corrie, J. E., Bard, M., Woods, R. A. (1974) "Biosynthesis of terpenes and steroids. IX. The sterols of some mutant yeasts and their relationship to the biosynthesis of ergosterol." *J. Chem. Soc.* 11: 1326-33.
- Barwicz, J. Gareau, R., Audet, A. Morisset, A. Illiard, J., Gruda, I. (1991) "Inhibition of the interaction between lipoproteins and amphotericin B by some delivery systems", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 (2):722-28.
- Barwicz, J., Gruszecki, W., Gruda, I (1993) "Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium." *J. Coll. Interface Sci.* 158: 71-6.
- Barwicz, J., Tancrede, P. (1997) "The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers", *Chem. Phys. Lipids* 85 (2):145-55.
- Battacharya, S., Haldar, S. (2000) " Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage.", *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 39-53.
- Bolard, J. (1986), "How do the polyene antibiotics affect the cellular membrane properties", *Biochim. Biophys. Acta* 864: 257-304.
- Bonilla-Marin, M., Moreno-Bello, M., Ortega-Blake, I. (1991) "A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel", *Biochim. Biophys. Acta* 1061 (1): 65-77.
- Brajtburg, J., Powderly, W. G., Kobayashi, G. S., Medoff, G (1990) "Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action", *Antimicrob. Agents Chemother.* 34 (2): 183-88.

Burtin, P., Sabine, M. C., Chavanel, G. (1977) " A comparative study of the localization of CEA and NCA2 in cancerous and normal gastrointestinal tissues", *Int. J. Cancer* 19 (5): 634-41.

Cass, A., Finkelstein, A., Krespi, V. (1970) "The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B", *J. Gen. Physiol.* 56 (1): 100-24.

Chapados, C., Barwicz, J., Gruda, I. (1994) " Separation of overlapping spectre from evolving systems using factors analysis. 2. Amphotericin B in aqueous propanol and in aqueous laurosyl sucrose". *Biophys. Chem.* 51: 71-80.

Charbonneau, C., Fournier, I., Dufresne, S., Barwicz, J., Tancrede, P. (2001) "The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy", *Biophys. Chem.* 91 (2): 125-33.

Cohen, B.E. (1992) "A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition." *Biochim. Biophys. Acta* 1108 (1): 49-58.

Cooper, D., Sharples, L., Cornelissen, J., Wallwork, J., Alexander, G., Trull, A. (2001) "Comparison between procalcitonin, serum amyloid A, and C-reactive protein as markers of serious bacterial and fungal infections after solid organ transplantation", *Transplant Proc.* 33 (1-2): 1808-10.

Cotero, B. V., Rebolledo-Antunez, S., Ortega-Blake, I. (1998) "On the role of sterol in the formation of the amphotericin B channel", *Biochim. Biophys. Acta* 1375 (1-2): 43-51.

Coune A. (1988) "Amphotericin B as a potentiation agent to cytotoxic chemotherapy", *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 24 (2): 117-21.

De Kruijff, B., Gerritsen, W. J., Oerlemans, A., Demel, R. A., van Deenen, L. L. (1974) "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics", *Biochim. Biophys. Acta* 339 (1): 30-43.

Dei-Cas, E., Ajana, F., Deldicque, P., Bonaly, R., Vernes, A. (1987) "Current role of amphotericin B in the treatment of deep mycoses", *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 45(6): 673-9.

Demaimay, R., Adjou, K., Lasmezas, C., Lazarini, F., Cherifi, K., Seman, M., Deslys, J. P., Dormont, D. (1994) "Pharmacological studies of a new derivative of amphotericin B, MS-8209, in mouse and hamster scrapie", *J. Gen. Virol.* 75: 2499-503.

Donovick, R., Gold, W., Pagano, J. F., Stout, H. A. (1955) "Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. In vitro studies", *Antibiot. Annu.* 3: 579-86.

Dynarowicz P., Seoane R., Minones J.Jr., Velo M. and Minones J. (2003) "Study of penetration of amphotericin B into cholesterol or ergosterol containing dipalmitoylphosphatidylcholine Langmuir monolayers." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 27 (2-3): 249-63.

Edwards, J. E., Jr., Lehrer, R. I., Stiehm, E. R., Fischer, T. J., Young, L.S. (1978) "Severe candidal infections: clinical perspective, immune defense mechanisms, and current concepts of therapy", *Ann. Intern. Med.* 89 (1): 91-106.

Fauci, A. S. (1996) "Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes", *Nat. Med.* 2(9): 966-7.

Feigin, A.M., Belousova, Il., Tereshin, I. M. (1978) " Role of sterol structure in complex formation with polyene antibiotics." *Antibiotiki* 23 (12): 1079-83.

Feigin, A.M., Belousova, Il., Lakhimovich, R.I., Vasilevskaia, V.N., Tereshin, I. M. (1979) " Role of the number and position of double bonds in the four-ring sterol nucleus in reactions with polyene antibiotics." *Biofizika* 24 (2): 330-1.

Feigin, A. M. (1999) "Selective modification of sterol composition of hepatomas: new opportunities for chemotherapy", *Med. Hypotheses* 52 (5): 383-8.

Fournier, I., Barwicz, J., Tancrede, P. (1998) "The structuring effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol-containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a differential scanning calorimetry study", *Biochim. Biophys. Acta* 1973 (1): 76-86.

Fujii, G., Chang, J. E., Coley, T., Steere, B. (1997) "The formation of amphotericin B ion channels in lipid bilayers", *Biochemistry* 36 (16): 4959-68.

Gagos, M., Koper, R., Gruszecki, W. I. (2001) "Spectrophotometric analysis of organisation of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing the polyene antibiotic amphotericin B", *Biochim. Biophys. Acta* 1511 (1): 90-8.

Ganis, P., Avitabile, G., Mechlinski, W., Schaffner, C. P. (1971) "Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative", *J. Am. Chem. Soc.* 93 (18): 4560-4.

Gregg, R.G., Davidson, M., Milce, P.A. (1986) "Cholesterol synthesis and HMG CoA reductase activity during hepatocarcinogenesis in rats", *Int. J. Biochem.* 18 (4): 389-93.

Gruszecki, W.I. (2002) "Polyene antibiotic amphotericin B in monomolecular layers: spectrophotometric and scanning force microscopic analysis", *FEBS Letters* 524: 92-6.

Hartsel, S. C., Bolard, J. (1994) "Na⁺, K⁺ and Cl⁻ selectivity of the permeability pathways induced through sterol-containing membrane vesicles by amphotericin B and other polyene antibiotics", *Eur. Biophys. J.* 23 (2): 125-32.

Hartsel, S., Bolard, J. (1997) "Amphotericin B: new life for an old drug", *Trends Pharmacol. Sci.* 17 (12): 445-9.

Hartsel, S., Bass, B., Bauer, E., Foree, L.T. Jr., Kindt, K., Presi, H., Scott, A., Kwong, E.H., Ramaswamy, M., Raman, K.M. (2001) "Heat-induced superaggregation of amphotericin B modifies its interaction with serum proteins and lipoproteins and stimulation of TNF- α ", *J. Pharm. Sci.* 90 (2): 124-33.

Holz, R., Finkelstein, A. (1970) "The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B", *J. Gen. Physiol.* 56 (1): 125-45.

Joly, V., Bolard, J., Saint-Julien, L., Carbon, C., Yeni, P. (1992) "Influence of phospholipid/amphotericin B ratio and phospholipid type on in vitro renal cell toxicities and fungicidal activities of lipid-associated amphotericin B formulations", *Antimicrob. Agents Chemother.* 36 (2): 262-6.

Jullien, S., Capuozzo, E., Salerno, C., Crifo, C. (1991) "Effects of polyene antibiotics on the activation of human polymorphonuclear leukocytes", *Biochem. Pharmacol.* 41(12): 2037-2040.

Kawata, S., Takaishi, K., Nagase, T., Ito, N., Matsuda, Y., Tamura, S., Matsuzawa, Y., Tarui, S.. (1990) "Increase in the active form of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in human hepatocellular carcinoma: possible mechanism for alteration of cholesterol biosynthesis", *Cancer Res.* 50 (11): 3270-3.

Khutorsky, V. E. (1992) "Structures of amphotericin B-cholesterol complex", *Biochim. Biophys. Acta* 1108 (2): 123-7.

Lambing, H.E., Wolf, B.D., Hartsel, S.C. (1993) "Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B". *Biochim. Biophys. Acta* 1152 (1): 185-8.

Lamy-Freund, M.T., Ferreira, V.F., Faljoni-Alario, A., Schreier, S. (1993) "Effect of aggregation on the kinetics of autoxidation of the polyene antibiotic amphotericin B", *J. Pharm. Sci.* 82 (2): 162-6.

Langlet, J., Berges, J., Caillet, J., Demaret, J. P. (1994) "Theoretical study of the complexation of amphotericin B with sterols", *Biochim. Biophys. Acta* 1191 (1): 79-93.

Matsuoka, S., Murata, M. (2003) "Membrane permeabilizing activity of amphotericin B is affected by chain length of phosphatidylcholine added as minor constituent". *Biochim. Biophys. Acta* 1617(1-2): 109-15.

May, S. (2000) "Theories on structural perturbations of lipid bilayers", *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 5 : 244-49.

Mc Kenzie, D., Kaczkowski, J., Marsh, R., Aiken, J. (1994) "Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection", *J. Virol.* 68 (11): 7534-6.

Mc Mullen T.P.W., Mc Elhaney, R.N. (1995) "New aspects of the interaction of cholesterol with dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as revealed by high-sensitivity differential scanning calorimetry", *Biochem. Biophys. Acta* 1234: 80-98.

Medoff, G., Brajtburg, J., Kobayashi, G. S., Bolard, J. (1983) "Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections", *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 303-30.

Meyuhas, D., Lichtenberg, D. (1995) "The effect of albumin on the state of aggregation and phase transformations in phosphatidylcholine-sodium cholate mixtures", *Biochim. Biophys. Acta* 1234 (2): 203-13.

Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J.P. (2002) "Cholesterol interactions with phospholipids in membranes". *Prog. Lipid Res.* 41 (1): 66-97.

Radio, J. D., Bittman, R. (1982) "Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols", *Biochim. Biophys. Acta* 685 (2): 219-24.

Saint-Martin, J., Vital, C., Rivel, J., Choulot, J.J., Desplat, A., Lippa, A., Vertut, J.L. (1988) "Cerebral neuroblastoma in the newborn infant", *Ann. Pathol.* 8 (3): 244-7

Schwarz, G., Arbuzova, A. (1995) "Pore kinetics reflected in the dequenching of a lipid vesicle entrapped fluorescent dye", *Biochim. Biophys. Acta* 1239 (1): 51-7.

Sokol-Anderson, M.L., Brajtburg, J., Medoff, G. (1986) "Sensitivity of *Candida albicans* to amphotericin B administered as single or fractionated doses.", *Antimicrob. Agents Chemother.* 29 (4): 701-2.

- Sternberg S., (1994) "The emerging fungal threat", *Science* 266 (5191): 1632-4.
- Tancrède, P., Barwicz, J., Jutras, S., Gruda, I. (1990) "The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B", *Biochim. Biophys. Acta* 1030 (2): 289-95.
- Teerlink, T., De Kruijff, B., Demel, R. A. (1980) "The action of pimarin, etruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content", *Biochim. Biophys. Acta* 599 (2): 484-92.
- Turley, S.D, Andersen, J.M., Dietschy, J. M. (1981) "Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat in vivo", *J. Lipid Res.* 22 (4): 551-69.
- Vertut-Croquin, A., Brajtburg, J., Medoff, G. (1986) "Two mechanisms of synergism when amphotericin B is used in combination with actinomycin D or 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea against the human promyelocytic leukemia cell line HL-60." *Cancer. Res.* 46 (12): 6054-8.
- Van Zutphen, H., Demel, R.A., Norman, A.W., Van deenen, L.L. (1971) "The action of polyene antibiotics on lipid bilayer membranes in the presence of several cations and anions." *Biochim. Biophys. Acta* 241 (2): 310-30.
- Vogel, H., Jahnig, F. (1981) "Conformational order of the hydrocarbon chains in lipid bilayers. A raman spectroscopic study", *Chem. Phys. Lipids* 29 (1): 83-101.
- Wolff, L. J. (1984) "Supportive care for children with cancer. Guidelines of the Children Cancer Study Group. Use of prophylactic antibiotics", *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 6 (3): 267-76.