

UNIVERSITE DU QUEBEC

MEMOIRE

PRESENTE A

L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR

HELENE ROCHELEAU

INFLUENCE D'UN SURFACTANT, L'ESTER DE MANNOSE  
SUR LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'AMPHOTERICINE B

AOUT 1992

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.

*Je dédie entièrement ce mémoire à  
mon fils, Miguel.*

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	i
REMERCIEMENTS .....	iii
LISTE DES TABLEAUX .....	iv
LISTE DES FIGURES .....	v
LISTE DES ABREVIATIONS .....	vii
INTRODUCTION .....	1
I- REVUE DE LA LITTERATURE .....	4
Historique .....	4
Struture et propriétés physico-chimiques de l'amphotéricine B .....	5
Propriétés biologiques de l'amphotéricine B .....	8
Mécanismes impliqués dans le mode d'action de l'amphotéricine B .....	10
Augmentation de l'indice thérapeutique .....	16
II- MATERIEL ET METHODES .....	25
Synthèse régiosélective du palmityl mannose monosubstitué .....	25
Activité biologique de l'amphotéricine B en présence de l'ester de mannose .....	29

III- RESULTATS .....	39
Cytotoxicité de l'AmB envers les cellules eucaryotes .....	39
Activation des macrophages péritonéaux par l'AmB .....	50
Influence de l'ester de mannose sur les propriétés physiques et physiologiques de l'AmB .....	60
IV- DISCUSSION .....	65
V- CONCLUSION .....	70
VI- BIBLIOGRAPHIE .....	71

## RESUME

L'amphotéricine B (AmB) est un antifongique utilisé de façon empirique dans le traitement des mycoses profondes. La thérapie actuelle par l'AmB reste cependant très limitée en raison des nombreux effets toxiques qu'elle engendre sur l'ensemble des fonctions de l'organisme. Cette toxicité est principalement associée à la faible différence d'affinité de l'AmB pour les deux types de stérols membranaires impliqués, l'ergostérol des cellules fongiques et le cholestérol des cellules du mammifère-hôte. Le problème que pose la thérapie antifongique découle du fait que le médicament actuel exerce une toxicité sélective à l'intérieur d'une fourchette très étroite de doses, limites imposées par la faible sélectivité de l'AmB pour un stérol en particulier. Dans le but d'augmenter cette sélectivité, nous avons complexé l'AmB à un surfactant glycosylé, l'ester de mannose. L'intérêt pour cette molécule reposait d'abord sur son caractère surfactant susceptible de modifier la toxicité de l'AmB à l'égard des cellules de mammifères et sur son sucre, le mannose, pouvant permettre le ciblage des complexes d'AmB vers les macrophages, des cellules impliquées dans la défense antimicrobienne. Nous avons donc étudié diverses propriétés biologiques de cette nouvelle formulation d'AmB complexée à l'ester de mannose. Ces études ont porté principalement sur la toxicité du complexe Ester-AmB envers des cellules de mammifères (les cellules tumorales SP<sub>2</sub>) et envers 4 souches de levures de même que ses effets à des doses toxiques pour l'organisme entier. Un autre volet expérimental consistait à démontrer les propriétés stimulantes du nouveau complexe sur les macrophages. Les résultats de cette étude démontrent que, comparativement à l'AmB libre et à la forme commerciale Fungizone®, la complexation de l'ester de mannose à l'AmB entraîne une diminution de la toxicité de l'AmB envers les cellules de mammifères (10 fois). Cette diminution de toxicité est maximale à un rapport molaire Ester-AmB de (2:1), rapport inférieur à celui qui induit la monomérisation de l'AmB. La complexation entraîne aussi une diminution de la toxicité envers les cellules fongiques (12 à 25 fois). La perte du pouvoir fongicide est équivalente à celle observée pour la forme liposomale d'AmB. Le nouveau complexe conserve toutefois un pouvoir

fongistatique et son pouvoir fongicide demeure à une concentration en deça des limites acceptables pour la cure antimycotique chez l'humain. Aux doses fongicides observées, on constate un maintien des fonctions macrophagiques, lequel est essentiel à l'augmentation de l'indice thérapeutique de l'AmB par action combinée des macrophages et du médicament. L'AmB, complexée ou non à l'ester, induit l'augmentation de la sécrétion de peroxyde d'hydrogène par les macrophages. L'injection intraveineuse de doses massives d'AmB complexée à l'ester ne prolonge pas la survie des souris mais augmente de façon appréciable leur résistance quant aux effets toxiques immédiats observés. Cette étude nous permet donc d'apprécier les bienfaits de l'ester de mannose sur la diminution de la toxicité de l'AmB mais aussi, apporte des éléments nouveaux à la compréhension des mécanismes qui régissent cette toxicité. Par les analyses spectroscopiques, on a démontré que les changements apportés par l'ester sur la diminution de la toxicité de l'AmB reposent sur une forte affinité de l'ester pour l'AmB laquelle favorise une modification des capacités d'interaction du polyène avec les stérols.

## REMERCIEMENTS

Je désire remercier toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à la réalisation de ce mémoire en commençant par ma directrice de thèse, Hélène-Marie Thérien pour son support et ses conseils judicieux, Eliane Shahum et Agnès Lejeune qui m'ont guidée tout au long de cette entreprise.

Un merci tout spécial à Ilona Gruda et Andrée Fortin pour leur aide apportée à la synthèse et à la purification du palmityl mannose et Joanna Barwicz pour son étroite collaboration à l'étude.

En dernier lieu, je tiens à remercier mes parents et amis pour leurs multiples encouragements à la poursuite de mes études de maîtrise.



## LISTE DES TABLEAUX

1. Efficacité <i>in vitro</i> de l'activité fongistatique de l'AmB en présence de l'ester de mannose .....	48
2. Efficacité <i>in vitro</i> de l'activité fongicide de l'AmB en présence de l'ester de mannose .....	49
3. Sécrétion de peroxyde d'hydrogène par les macrophages <i>in vitro</i> après stimulation <i>in vivo</i> avec différentes formulations d'AmB .....	56
4. Influence de l'ester de mannose en mélange avec des doses toxiques d'AmB sur la stimulation de la sécrétion de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux .....	59

## LISTE DES FIGURES

1. Structure chimique du cholestérol et de l'ergostérol . . . . .	6
2. Structure chimique de l'amphotéricine B . . . . .	7
3. Spectres d'absorption de l'amphotéricine B en ultraviolet . . . . .	9
4. Coupe schématique de l'interaction de l'AmB avec la membrane cytoplasmique. . . . .	13
5. Schéma d'un pore transmembranaire . . . . .	14
6. Structure chimique de l'ester de mannose ou palmityl mannose. . . . .	24
7. Représentation schématique d'une bandelette TLC . . . . .	28
8. Modèle de plaque de culture utilisée pour l'essai de la cytostase . . . . .	33
9. Principe chimique de la méthode de dosage du H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	35
10. Prolifération des cellules tumorales SP <sub>2</sub> en fonction de la concentration en ester de mannose . . . . .	40
11. Prolifération des cellules tumorales SP <sub>2</sub> en fonction de la concentration d'AmB pure ou complexée au DOC (Fungizone®) ou à l'ester de mannose . . . . .	43
12. Influence de la concentration en ester de mannose sur la prolifération des cellules tumorales SP <sub>2</sub> en présence de fortes concentrations d'AmB . . . . .	44

13. Influence du rapport molaire Ester:AmB sur la prolifération des cellules tumorales SP <sub>2</sub> .....	45
14. Concentration d'ester de mannose requise pour obtenir 50 % de prolifération cellulaire en présence de concentrations toxiques d'AmB .....	46
15. Contribution de l'AmB et des macrophages à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales SP <sub>2</sub> .....	51
16. Contribution des macrophages inflammatoires et résidents à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales SP <sub>2</sub> en présence d'AmB mélangée à l'ester de mannose (25 µg/mL) .....	53
17. Effet de protection sur la viabilité des cellules de mammifères par la complexation de l'ester de mannose (25 µg/mL) à l'AmB .....	54
18. Sécrétion de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux stimulés <i>in vivo</i> avec différentes préparations d'AmB en fonction de la concentration de PMA .....	57
19. Influence d'un ligand mannosylé sur la sécrétion de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux présensibilisés à l'AmB .....	58
20. Spectres d'absorption de l'AmB dans une solution aqueuse de dextrose 5 % .....	62
21. Spectres d'absorption de l'AmB en présence de 10 % FCS .....	63
22. Toxicité <i>in vivo</i> de l'AmB (Fungizone®) (4,4 mg/kg) et du mélange Ester/AmB (2:1) .....	64

## LISTE DES ABREVIATIONS

AmB	Amphotéricine B
AME	Dérivé-ester de l'amphotéricine B
BCG	Bacille Calmette-Guérin
CMF	Concentration Minimale Fongicide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CPM	Coups par minute
DCF	Dichlorofluorescéine
DCFH	Dichlorofluorescéine hydrolysé
DCFH-DA	Dichlorofluorescéine diacétate
DMSO	Diméthyl sulphoxyde
DOC	Désoxycholate de sodium
FCS	Foetal Calf Serum
HBSS	Hank's Balanced Salts Solution
HDL	High Density Lipoproteins
HRPO	Horse radish peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
L-AmB	Ampholiposomes
LD <sub>50</sub>	Lethal dose 50%
LDL	Light Density Lipoproteins
LPS	Lipopolysaccharides
LS	Lauryl sucrose
Mφ	Macrophages
O <sub>2</sub>	Anion superoxyde
OH	Hydroxyle
PBS	Phosphate buffer solution
PEC	Peritoneal Exudate Cells
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PMA	Phorbol Myristate Acetate

SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SOD	Superoxyde dismutase
TLC	Thin Layer Chromatography
TNF	Tumor Necrosis Factor
UV	Ultraviolet
VLDL	Very Light Density Lipoproteins

## INTRODUCTION

L'amphotéricine B est une substance antibiotique connue pour ses propriétés antifongiques (Bindschadler et Bennett;1969). Cette substance est utilisée dans le traitement des mycoses profondes, des infections à microorganismes opportunistes généralement attribuables à des états d'immunodépression (ex: SIDA et thérapie antitumorale). La cure antimycotique par l'AmB reste cependant limitée d'une part, par la très faible hydrosolubilité de l'AmB et d'autre part, par son importante toxicité. Le premier problème a toutefois été résolu tôt par la complexation de l'AmB avec un sel biliaire, le désoxycholate de sodium (DOC). Cette complexation avec le DOC avait pour but de favoriser la désagrégation de l'AmB afin d'accroître sa solubilité et de faciliter son emploi thérapeutique. Cette formulation d'AmB a été commercialisée sous le nom de Fungizone<sup>®</sup> et est présentement administrée aux patients par infusion intraveineuse. Mais, les bienfaits thérapeutiques de la thérapie actuelle s'accompagnent de nombreux effets secondaires compromettant l'ensemble des fonctions de l'organisme. Ces complications inhérentes à la toxicité du médicament résultent du fait que l'AmB, complexée ou non, interagit tout autant avec les micromycètes qu'avec les cellules du mammifère-hôte. Cette faible sélectivité découle de la faible différence d'affinité de l'AmB pour les deux types de stérols membranaires impliqués soient, l'ergostérol des levures et le cholestérol des cellules de mammifères. L'action toxique de l'AmB exercée sur ces deux types cellulaires restreint donc son utilisation en thérapie antifongique rétrécissant ainsi la fenêtre des doses thérapeutiquement efficaces i.e. les doses pour lesquelles on observe des effets toxiques pour les levures et des effets secondaires acceptables pour l'hôte.

La toxicité sélective de l'AmB s'exerce donc à l'intérieur d'une fourchette de doses très étroite. On sait par ailleurs qu'à des doses inférieures aux doses nocives chez l'hôte où l'AmB n'est plus ou n'est que faiblement toxique à l'égard des levures, on observe une stimulation des fonctions de certaines cellules du système immunitaire dont celles du macrophage. Le macrophage est une cellule hautement impliquée dans

la régulation de l'immunité tant spécifique que non spécifique. Des faibles doses d'AmB sont capables de moduler certaines fonctions effectrices des macrophages en augmentant leur tumoricidie et leur microbicidie (Vecchiarelli et al;1987) (Vecchiarelli et al;1991).

Une meilleure compréhension des phénomènes moléculaires impliqués dans l'action toxique de l'amphotéricine B devrait mener à la mise au point d'une stratégie antifongique par l'élaboration de dérivés de l'AmB plus sélectifs i.e. capables d'interférer préférentiellement avec le métabolisme des cellules fongiques sans nuire au métabolisme des cellules de l'hôte comme c'est le cas pour la thérapie antibactérienne. La stratégie vise donc à augmenter la sélectivité de l'AmB tout en conservant le pouvoir antifongique et en permettant, non seulement, le maintien des fonctions métaboliques des cellules de l'hôte mais peut-être aussi, l'induction d'un état d'activation des éléments clés du système immunitaire, activation que l'on peut observer à faibles doses d'AmB. L'organisme pourrait ainsi via la stimulation des cellules de l'immunité (ex: macrophages) couplée à l'action antimycotique de l'AmB, disposer de moyens de défense plus efficaces pour lutter contre l'agent pathogène responsable de l'infection.

C'est dans cette problématique que se situe la recherche ici présentée dont l'objectif principal était d'analyser l'impact d'une nouvelle formulation d'AmB complexée à un surfactant glycosylé sur la toxicité sélective et le maintien ou l'activation des défenses naturelles de l'organisme. Cette recherche s'inspire d'autres études qui ont porté sur l'utilisation de détergents autres que le DOC du Fungizone®, dans la modulation des propriétés de l'AmB. Ces détergents, entres autres les esters de sucre, se sont avérés particulièrement intéressants quant à leur capacité de moduler l'état physique de l'AmB ainsi que son affinité pour les stérols aussi bien que sa toxicité vis à vis les cellules de mammifères. Dans une autre formulation où l'AmB est associée à des phospholipides, on a relié l'efficacité thérapeutique de cette forme liposomale d'AmB à une prise en charge du complexe par les macrophages. Sur la base de ces données, un dérivé mannosylé de l'acide palmitique, l'ester de mannose a été choisi comme détergent. En plus de posséder des propriétés surfactantes capables de modifier l'état physique de l'AmB, ce dérivé fournit un sucre, le mannose qui peut interagir comme ligand à la surface des macrophages via un récepteur complémentaire. Ce ciblage

potentiel sur les macrophages par le mannose nous permettait d'espérer que l'ester de mannose une fois complexé à l'AmB pourrait reproduire les bénéfices de la préparation liposomale d'AmB dans la cure antimycotique. Or, dans cette étude nous avons comparé cette nouvelle formulation à la formulation commerciale Fungizone® et à l'AmB seule quant à sa toxicité envers les cellules de mammifères, son activité antifongique, sa capacité d'activer la tumoricidie et la microbicidie des macrophages, sa capacité de moduler l'état physique de l'AmB de même que sa toxicité aiguë sur les souris.



## CHAPITRE I

### REVUE DE LA LITTERATURE

#### 1.1. Historique:

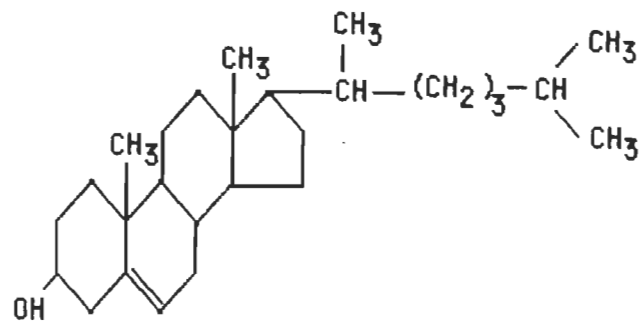
L'Amphotéricine B est une substance antifongique appartenant à une classe d'antibiotiques, les macrolides polyéniques, caractérisée par un macrocycle lactonique incluant plusieurs doubles liaisons conjuguées (Briand; 1976). Sa découverte remonte au tout début des années 50 et est associée à la découverte de plus de 200 autres molécules apparentées, toutes isolées à partir d'un microorganisme du genre *Streptomyces* (Bolard;1986) (Norman et al; 1976). Ce type de microorganisme synthétise naturellement un polyène. L'amphotéricine B est synthétisée plus particulièrement par l'espèce *Streptomyces nodosus*. La synthèse de polyène constitue pour ces microorganismes un mécanisme naturel de compétition interspécifique servant simplement à inhiber la croissance des micromycètes ou levures afin de favoriser la survie de l'espèce dans son milieu. L'amphotéricine B est donc une molécule dont le rôle premier est d'assurer la survie de *Streptomyces nodosus* en facilitant la lutte compétitive entre les espèces de microorganismes, rôle analogue à celui de la pénicilline pour le mycélium *Penicillium chrysogenum* qui agit en inhibant la croissance des autres bactéries Gram-positives. C'est par l'observation de ce phénomène naturel que les chercheurs ont extrait ces molécules à caractère antifongique dans le but de mettre au point un médicament antibiotique pouvant perturber spécifiquement la croissance des micromycètes comme il en a été le cas pour la pénicilline.

Le problème avec l'amphotéricine B est que son action toxique naturelle s'exerce sur des cellules fongiques, lesquelles sont très semblables à celles des mammifères-hôtes. L'AmB est donc toxique pour les cellules eucaryotes en général d'où l'aspect problématique de son utilisation thérapeutique chez l'humain.

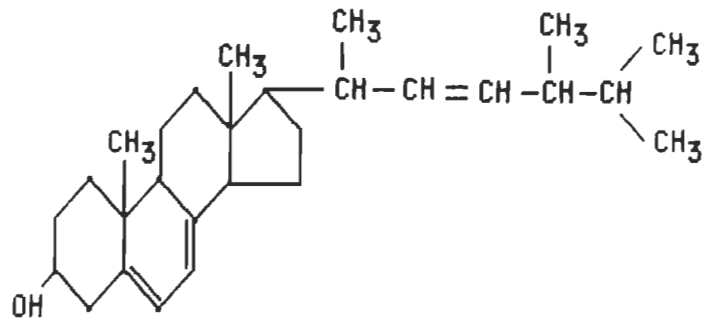
L'amphotéricine B doit préalablement s'incorporer dans la membrane cytoplasmique pour effectuer son action toxique sur la cellule. L'action cytotoxique de l'AmB implique l'induction de perturbations membranaires reliées à son interaction avec les stérols. L'action antifongique serait associée à l'interaction avec l'ergostérol (figure 1A), le stérol dominant des membranes de levures et sa toxicité à l'interaction avec le cholestérol (figure 1B), le stérol dominant des cellules de mammifères. Ces deux types de stérol possèdent en commun trois structures favorables pour l'interaction du polyène: une fonction 3 $\beta$ -hydroxyle, une double liaison en C<sub>5</sub>-C<sub>6</sub> et une chaîne latérale en C<sub>17</sub> (Briand;1986). Ce manque de spécificité d'interaction est à la base de la toxicité exercée par l'AmB sur les cellules de l'hôte.

### 1.2. Structure et propriétés physico-chimiques de l'Amphotéricine B:

La molécule d'amphotéricine B comporte deux parties: une partie commune à tous les macrolides polyéniques, i.e. le grand cycle lactonique, responsable de son caractère amphiphile, et une partie spécifique. Le cycle lactonique de 37 atomes de carbone (figure 2) comprend une région hydrophile et une région hydrophobe. La région hydrophile consiste en un segment hydroxyl-substitué (C<sub>1</sub>-C<sub>13</sub>) dont trois groupements hydroxyles équatoriaux sont placés sur les carbones en position 8, 15 et 35 et quatre autres, ayant une configuration axiale, en position 3, 5, 9 et 11. La région polyénique hydrophobe, parallèle au segment hydrophile (C<sub>20</sub>-C<sub>33</sub>), est constituée d'un segment heptaènique (sept doubles liaisons) qui confère à la molécule sa rigidité (Norman et al;1976). La partie spécifique de la molécule est concentrée dans la région polaire et comprend un groupement carboxyle sur la chaîne aliphatique en position C<sub>13</sub> sur le segment hydrophile et un sucre aminé, le D-mycosamine, en configuration de chaise, relié avec l'hydroxyle du C<sub>19</sub> par un lien  $\alpha$ -glycosidique (Briand;1986).



CHOLESTEROL



ERGOSTEROL

Figure 1. Structure chimique du A) cholestérol et de B) l'ergostérol.

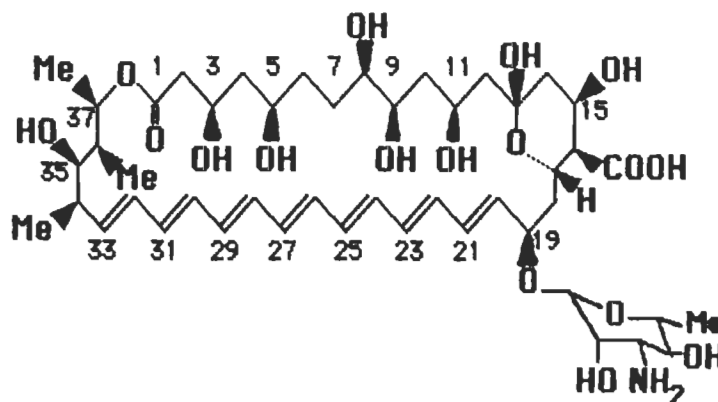


Figure 2. Structure chimique de l'amphotéricine B.

En résumé, l'Amphotéricine B ( $C_{46}H_{73}O_{18}N$ ) est le glycoside de la D-mycosamine avec un macrolide heptaénique (Norman et al;1976). Sa structure chimique a été élucidée par cristallographie aux rayons X à partir d'un dérivé N-iodoacétylé (Norman et al;1976).

L'amphotéricine B est une molécule amphiphile et conséquemment faiblement soluble dans l'eau et les solvants non polaires. Elle est par contre fortement soluble dans les solvants polaires tels le diméthyl sulphoxyde (DMSO) et le diméthylformamide. Après solubilisation dans le DMSO, elle peut être diluée dans l'eau jusqu'à  $100\mu\text{g/mL}$ . Cette faible solubilité en solution aqueuse complique aussi son utilisation thérapeutique.

La molécule d'amphotéricine B absorbe dans l'ultraviolet et dans le visible et donne un spectre caractéristique des polyènes avec des bandes vibrationnelles dans la région 325-420 nm. L'intensité relative de ces bandes nous renseigne sur la structure qu'adopte la molécule au cours d'interactions intermoléculaires. Il est possible d'observer par l'analyse des spectres, le phénomène d'agrégation de la molécule d'AmB autant que d'importantes modifications structurales suite à une interaction avec une autre molécule (figure 3 D) comme le cholestérol (Barwicz et al;1991). Lorsque l'AmB est sous une forme monomérique (figure 3A), on observe un pic intense et étroit à 409 nm ainsi que des pics faibles et étendus à 344 nm et 328 nm. L'agrégation est associée à une diminution d'intensité du pic à 409 nm et une

augmentation d'intensité dans la région qui couvre l'intervalle de 330 à 350 nm (figure 3 B et 3 C) (Barwicz et al;1991). L'apparition de très gros agrégats est concomitante avec l'apparition d'un pic à 420 nm. La présence de stérol modifie le comportement spectral de l'AmB en influençant les interactions entre les molécules d'AmB de même que leur état d'agrégation et induit l'apparition d'un pic à 415 nm (figure 3 D).

### 1.3. Propriétés biologiques de l'amphotéricine B:

#### 1.3.1. Effets sur les cellules eucaryotes:

Un bon nombre d'études rapportent que l'amphotéricine B médie son action toxique sur les cellules sensibles via son interaction avec les stérols membranaires (De Kruijff et al; 1974) (Raatikainen;1991 (Vertut-Croquin;1983). De nombreuses évidences impliquant des contextes expérimentaux différents utilisant soit des modèles membranaires soit des modèles cellulaires, suggèrent que l'AmB est plus avide pour la molécule d'ergostérol que pour celle du cholestérol. L'amphotéricine B et la nystatine, un autre polyène ont été reconnues pour leur plus forte interaction envers les cellules ou les vésicules lipidiques (Vertut-Croquin;1983) contenant l'ergostérol que celles contenant le cholestérol, propriété à la base de son emploi thérapeutique généralisé (Bratjburg;1990). Si l'affinité de l'AmB pour les molécules de stérols reste essentielle dans l'actualisation de son action toxique dans un contexte cellulaire (Bolard;1986) et dans le contexte encore plus vaste de l'organisme, plusieurs autres facteurs peuvent influencer cette interaction et conséquemment, la susceptibilité des cellules eucaryotes à la toxicité du composé. En fait, il existe une hétérogénéité quant à la sensibilité des cellules fongiques et de différents types de cellules à l'action toxique de l'AmB (Bratjburg;1977) (Bolard;1986). Certaines souches de levures sont sensibles à l'action toxique du polyène alors que d'autres sont totalement résistantes. Parmi les hypothèses proposées pour expliquer cette hétérogénéité de la sensibilité à l'action toxique de l'AmB particulièrement pour les cellules fongiques, il a été proposé qu'en plus de l'ergostérol, la composition lipidique membranaire qui subit de subtiles modifications en cours de croissance ou la présence de sucres dans la membrane pourraient être des facteurs déterminants.

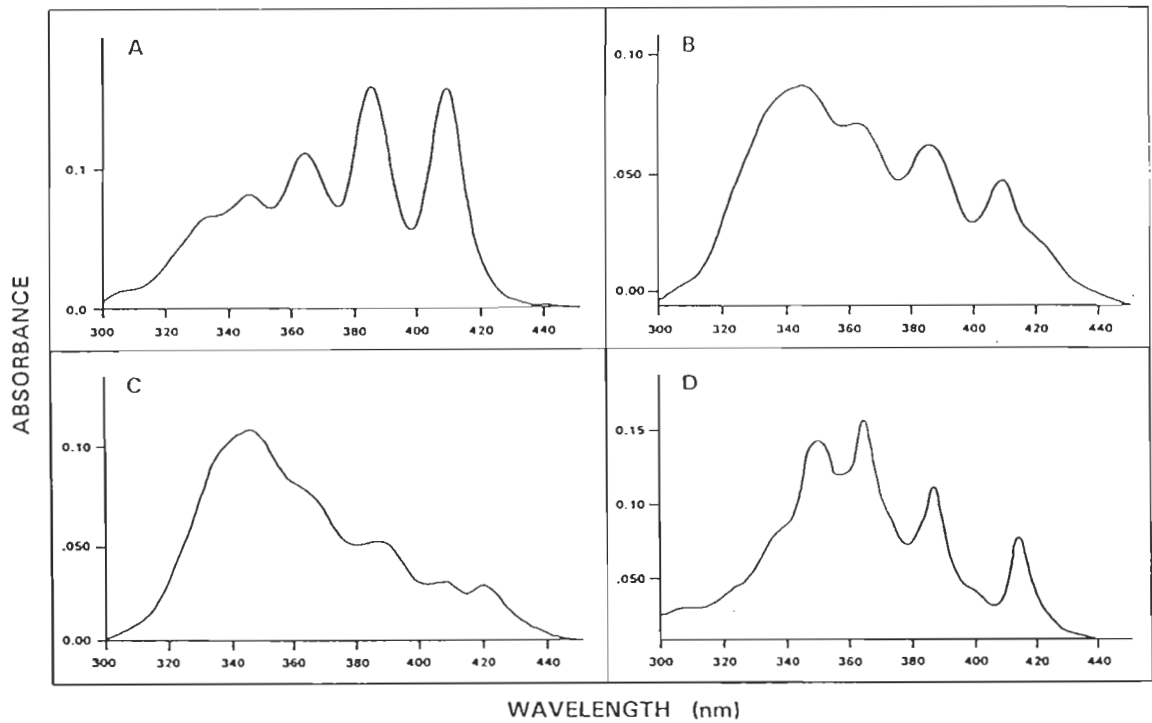


Figure 3. Spectres d'absorption de l'Amphotéricine B ( $2.6 \times 10^{-5}$  M) en ultraviolet A) forme monomère; B) forme partiellement agrégée; C) forme presque entièrement agrégée; D) forme complexée avec le cholestérol (Barwicz et al;1991).

De plus, l'AmB influence différemment le comportement cellulaire en fonction de la dose. Des propriétés activatrices sur les cellules sont observées à faibles doses alors que des effets toxiques sont rencontrés à fortes doses. Cette dichotomie de l'effet de l'AmB a été notamment observée et décrite sur plusieurs fonctions exercées par les cellules du système immunitaire (Little et Shore; 1985) (Stein et al;1987) (Ferrante et al;1979) (Hammarström et Smith;1976) (Shirley et al;1979) (Stewart et al;1981).

### 1.3.2. Effets sur l'organisme:

Un des plus sérieux effets toxiques engendrés par l'amphotéricine B lors du traitement des mycoses chez les patients immunodéprimés est la détérioration de la fonction rénale. Cette néphrotoxicité est attribuée à une trop grande affinité du polyène pour les membranes lysosomales provoquant par le fait même, une importante vacuolisation intracytoplasmique des cellules de l'épithélium tubulaire (tubules proximaux et distaux) et des cellules de la média artériolaire (Briand; 1986). D'autres effets non négligeables à caractère plus systémique ont aussi été observés parmi lesquelles, l'hypokaliémie (Deuticke et al;1973), la protéinurie, l'acidose rénale (McCurdy et al;1968), l'insuffisance respiratoire et l'anémie hémolytique (Kinsky et al;1962) qui tous impliquent une perturbation de l'élimination et de la réabsorption des composés sanguins dans la toxicité de l'AmB. D'autres réactions d'intolérance se manifestant en début de traitement telles, les frissons, la fièvre, une faiblesse et des céphalées sont attribuables aux modifications biologiques du système immunitaire dont nous parlerons plus loin. De plus, la thérapie antifongique avec Fungizone® exerce de multiples effets secondaires neurotoxiques associés à la dégénérescence de la myéline des cellules nerveuses (Racis et al;1990). L'amphotéricine B cause donc toujours un problème de taille quant à son utilisation thérapeutique.

## 1.4. Mécanismes impliqués dans le mode d'action de l'amphotéricine B:

### 1.4.1. Interaction stérol-polyène:

De Kruijff et coll. ont été les premiers à décrire la nécessité des stérols dans l'interaction polyène-membrane grâce à un modèle simple et particulier, le microorganisme *Acholeplasma laidlawi*. Ce microorganisme peut croître en culture

dans un milieu avec ou sans la présence de cholestérol. Dans un milieu enrichi en cholestérol, le microorganisme croît tout en incorporant le cholestérol exogène dans sa membrane cytoplasmique. L'amphotéricine B inhibe la croissance de *A.laidlawi* en présence de cholestérol alors qu'elle n'a aucun effet sur sa croissance et sa viabilité en absence de stérol. Les cellules dépourvues de stérol, telles les cellules procaryotes (bactéries et algues bleues-vertes) sont insensibles à l'action de l'amphotéricine B alors que les cellules contenant un stérol membranaire comme les érythrocytes y sont particulièrement sensibles (Bolard;1986).

Toute modification de la structure et de la forme du polyène de même que toute variation de la forme ou de l'état du stérol permettent d'obtenir des renseignements utiles sur les lois qui régissent l'interaction du polyène avec les stérols. La nature du cholestérol (lipoprotéines plasmatiques) et l'environnement lipidique du stérol (type d'association lipidique avec le stérol) sont des facteurs pouvant modifier ses propriétés d'interaction avec le polyène (De Kruiff et al;1974) (Kotler-Brajburg et al;1977). L'environnement lipidique, la concentration en AmB et en stérol sont autant de paramètres importants dans les interactions observées, paramètres souvent mal contrôlés et qui ont donné lieu à des résultats contradictoires dans les études portant sur la perméabilité membranaire de liposomes. Les spectres en dichroïsme circulaire montrent que l'AmB s'associe plus fortement aux LDL (Light Density Lipoproteins) et VLDL (Very Light Density Lipoproteins) qu'aux HDL (High Density Lipoproteins). Ces résultats suggèrent l'implication d'un cholestérol non estérifié ayant un groupement 3- $\beta$ -OH intact régissant l'interaction stérol-polyène (Brajtburg et al; 1984).

#### 1.4.2. Formation d'un pore trans-membranaire:

De par sa nature amphiphile, la molécule d'amphotéricine B arrive à s'introduire verticalement dans une bicouche lipidique. Selon le modèle proposé par Corey-Pauling, la molécule d'amphotéricine B mesure 24 Å de longueur soit approximativement la moitié de l'épaisseur d'une demi-bicouche lipidique schématisée à la figure 4 (Andreoli:1974) (Briand; 1986). On peut imaginer l'intercalation de la molécule d'amphotéricine B dans la membrane comme suit: la molécule sous forme de bâtonnet orienté s'introduit dans le même sens qu'une chaîne



hydrocarbonnée de phospholipides membranaires orientant son sucre mycoaminé et son groupement carboxylique du côté hydrophile, ce qui permet une interaction avec le noyau perhydrophénanthrène du stérol en place ou avec l'hydroxyle polaire du stérol. La présence de stérol ayant une fonction  $3\beta$ -OH est prérequise pour l'interaction de l'amphotéricine B avec les membranes (Norman et al;1976). Le complexe stérol-amphotéricine B implique trois types d'interactions hydrophiles schématiquement représentées (figure 4) dont (1): des liens hydrogène entre le proton du groupement  $3\beta$ -hydroxyle et l'oxygène du carboxyle en  $C_{16}$ , (2): des liens hydrogène entre l'oxygène de cet hydroxyle et le proton en  $C_{17}$  et (3): des forces de Van der Waals maintenant en place les segments heptaéniques ( $C_{20}$ - $C_{33}$ ) (Andreoli; 1974) (Norman et al; 1976). La formation d'un pore résulterait de l'intercalation d'approximativement 10 molécules d'amphotéricine B réunies de chaque côté de la bicouche lipidique et requiert ou nécessite la présence d'autant de molécules de stérol (Holz;1974). Selon le modèle proposé (figure 5), la face interne du pore (partie ombragée) est tapissée par les segments hydroxyl-substitués alors que les régions externes lipophiles (les segments heptaéniques) s'exposent à l'espace lipidique membranaire. L'interstice crée entre chaque paire de molécules pourrait accomoder une molécule de stérol. Les points noirs du schéma symbolisent les fonctions hydroxyles en position 35 de chacune des molécules d'amphotéricine B, le tout formant un anneau. En conséquence, l'agrégation des molécules d'amphotéricine B ainsi organisées prend l'anatomie d'un canal ionophorétique ayant un rayon d'environ 4 Å .

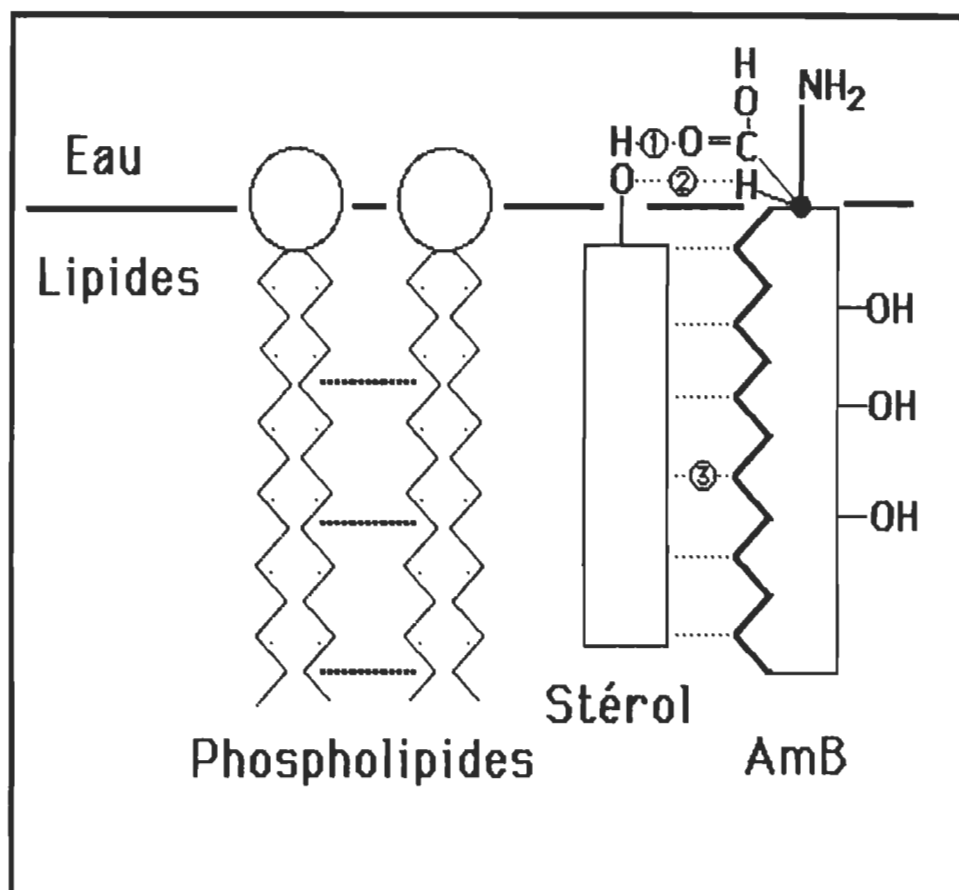


Figure 4. Coupe schématique de l'interaction de l'AmB avec la membrane cytoplasmique.

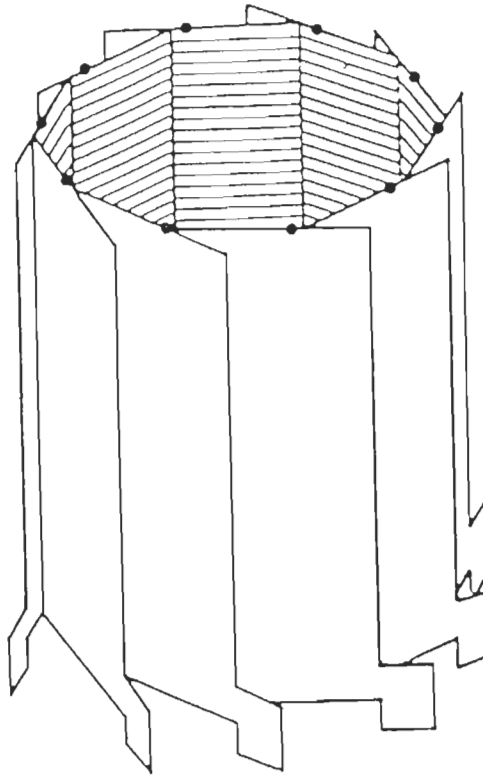


Figure 5. Schéma d'un pore transmembranaire.

#### 1.4.3. Perturbation de la perméabilité membranaire:

Plusieurs études démontrent que l'AmB induit une importante perturbation du potentiel membranaire par hausse d'influx de sodium et baisse de rétention intracytoplasmique de potassium. Ces passages passifs d'électrolytes actionnent la pompe à sodium-potassium et sont donc associés à une hyperactivité de l'ATPase, une demande accrue en énergie et une forte mobilisation du calcium cytosolique tel que démontré chez les membranes synaptosomales (Raatikainen;1991). De toute évidence, l'amphotéricine B agit sur le changement de la perméabilité membranaire et ce mécanisme est régi par la présence de molécules de stérol (Andreoli;1974).

#### 1.4.4. Oxydation de composantes membranaires:

Une autre hypothèse pouvant expliquer les effets sélectifs de l'AmB sur les cellules eucaryotes a été proposée. L'AmB, au point de vue de sa structure chimique est semblable à la vitamine A et comme cette molécule, elle est facilement oxydable. Or, dans un contexte où le polyène interagit avec une membrane cytoplasmique, une oxydation peut altérer une partie des lipides membranaires et modifier la perméabilité de la membrane cellulaire. Certaines cellules possèdent des mécanismes enzymatiques pour contrer l'oxydation de leur membrane et restreindre les dommages causés par le polyène par sécrétion d'enzymes tels, la catalase et la superoxyde dismutase (SOD) (Sokol-Anderson et al; 1986). Ces évidences supportent l'hypothèse voulant que l'interaction polyène-stérol ne soit pas le seul facteur déterminant dans la sélectivité thérapeutique de l'AmB.

#### 1.4.5. Interaction membrane-polyène et toxicité:

Les effets toxiques de l'AmB sur les cellules eucaryotes peuvent ainsi être reliés à trois phénomènes majeurs tous découlant d'interactions avec la membrane cytoplasmique: 1) le choc osmotique 2) l'effet détergent et 3) la perturbation chimique de la membrane (Bolard;1986).

1) Le choc osmotique est la conséquence d'une interaction avec les stérols membranaires et de la formation d'une pore qui, en favorisant le passage anarchique des ions, induit un déséquilibre électrolytique qui fragilise la cellule et provoque son éclatement. Plusieurs études faites sur des érythrocytes ont ainsi montré le pouvoir hémolytique de l'AmB.

2) L'effet détergent est une conséquence de la perte de cholestérol membranaire par suite d'une interaction de l'AmB avec le stérol. Cette action décapante de l'AmB résulte en une augmentation de la fluidité membranaire qui perturbe les fonctions cellulaires.

3) La perturbation chimique impliquerait une action oxydante de l'amphotéricine B sur les lipides membranaires. L'amphotéricine B accélère ou provoque une cascade de réactions oxydatives conduisant à l'oxydation de la membrane de la cellule. Les dommages résultant de cette oxydation impliquent un oxygène actif. Certaines cellules plus résistantes présentent une forme de protection (catalase et SOD) contre l'oxydation de la membrane lipidique. On a pu reproduire cette résistance chez certaines lignées cellulaires et chez des souches de levures sensibles à l'action de l'amphotéricine B par l'ajout de catalase exogène (Sokol-Anderson et al;1986).

#### 1.5. Augmentation de l'indice thérapeutique:

##### 1.5.1. Toxicité sélective de l'AmB:

Plusieurs chercheurs se sont penchés sur le problème de la faible sélectivité de l'AmB. Plusieurs moyens ont été proposés afin de rendre la molécule plus sélective, i.e. moins toxique pour les cellules des mammifères sans altérer sa propriété antifongique, de façon à augmenter son indice thérapeutique. Comme l'interaction stérol-polyène est déterminante dans la toxicité et la faible sélectivité de l'amphotéricine B, les approches ont surtout recherché des moyens permettant d'augmenter l'interaction préférentielle de l'amphotéricine B avec l'ergostérol des cellules fongiques tout en diminuant l'avidité du polyène pour le cholestérol des cellules des mammifères. Cependant, plusieurs études ont aussi cherché à diminuer la toxicité du composé en augmentant sa solubilité en milieu aqueux pour mieux faciliter son utilisation et diminuer son interaction avec les membranes.

De par la nature amphiphile de l'amphotéricine B, le problème de toxicité pouvait être attaqué sur deux fronts soit, augmenter son hydrophilie ou agir sur sa région lipophile.

#### 1.5.1.1. Augmentation de l'hydrophilie:

L'AmB est une substance très faiblement hydrosoluble et a tendance à former des agrégats ou micelles lorsqu'elle est solubilisée dans une solution physiologique. Comme ce médicament doit être administré par voie intraveineuse, le problème des micelles gêne son emploi thérapeutique. L'augmentation de l'hydrophilie n'a pas comme conséquence unique de faciliter son utilisation thérapeutique en milieu aqueux mais aussi de diminuer l'interaction AmB-membranes. Le premier but avait été déjà atteint en utilisant une complexation aux sels biliaires (ex:Fungizone®). Cependant, les sels biliaires utilisés pour cette complexation ne font que diminuer la taille des micelles (Bernaudin et al;1987), sans modifier la charge nette de la molécule d'amphotéricine B et donc ses interactions potentielles avec la membrane. Les sels biliaires sont de plus très toxiques et accélèrent l'élimination rénale de l'AmB (Bennett et al;1963) entraînant une diminution de la proportion d'AmB bioactive dans le plasma sanguin (Collette et al;1989). Le second but, le plus important, requiert pour être atteint un changement de la molécule même afin de la rendre plus polaire. Une des formes de l'AmB est un dérivé ester (AME), caractérisé par l'absence d'un groupement ionisable en C<sub>18</sub>. Cette modification confère à l'AmB une solubilité intéressante en milieu aqueux tout en diminuant considérablement sa toxicité envers les cellules de mammifères (Racis et al;1990) (Bolard;1986). Malheureusement, le blocage du groupement carbonyle en C<sub>16</sub>, celui-là même qui interagit avec le groupement 3-β-OH du stérol, chez les dérivés amines, diminue non seulement la toxicité envers les érythrocytes mais aussi considérablement celle envers les levures (Czerwinski et al;1990).

#### 1.5.1.2. Action sur la région lipophile:

L'exploitation des propriétés lipophiles de l'AmB a comme but premier de diminuer l'interaction avec les membranes cellulaires et de modifier l'état d'agrégation de la molécule. Deux moyens ont été utilisés pour modifier l'interaction stérol-AmB 1) l'association lipophile de l'AmB avec des détergents doux et 2) l'association lipidique de l'AmB avec des liposomes ou ampholiposomes ( L-AmB). Ces associations permettent entre autres, de ralentir l'échange membrane à

membrane ou le transfert à la cellule sensible (Szoka et al;1987) et dans un contexte *in vivo* l'échange avec les lipoprotéines plasmatiques (Gruda et al;1991).

#### 1.5.2.2.1. Les détergents doux:

L'action détergente d'un surfactant a pour but de réduire les agrégats d'AmB. Comme le désoxycholate de sodium (DOC) dans la préparation de Fungizone®, le Triton X-100 brise les agrégats d'AmB et modifie l'hydrophobicité des complexes. Il a été démontré que le Triton X-100 diminue l'interaction de l'AmB avec le cholestérol sans pour autant affecter celle avec l'ergostérol (Gruda et al 1980). Un surfactant comme le lauryl sucrose (LS) induit la monomérisation de l'AmB, rendant la substance antifongique plus sélective pour l'ergostérol (Gruda et al;1988). Le lauryl sucrose (LS) est un détergent doux, non ionique et non toxique lorsqu'administré par voie intraveineuse. Il s'associe plus fortement à l'AmB que le surfactant ionique DOC contenu dans la préparation du Fungizone® car, ce dernier n'arrive pas à infiltrer les micelles hydrophobes et à provoquer des modifications sur les spectres en U.V. (Tancredi et al;1990). Il a été démontré que lorsque complexée avec le LS, l'AmB s'associe préférentiellement à l'ergostérol et ce mélange permet de diminuer la toxicité envers les cellules de mammifères, tel qu'indiqué par la diminution de l'hémolyse chez les érythrocytes et la réduction de la fuite de potassium chez les fibroblastes L-929, sans affecter la toxicité envers les cellules fongiques *Candida albicans*. (Gruda et al;1988). L'état d'agrégation de l'AmB apparaît donc déterminante tant pour son pouvoir toxique que pour sa sélectivité pour une molécule de stérol donnée chez les cellules eucaryotes.

#### 1.5.1.2.2. Les ampholiposomes (L-AmB):

Les ampholiposomes résultent de l'association de l'AmB avec des membranes artificielles ou liposomes constitués de phospholipides. L'idée première consistait à utiliser ces préparations liposomales à titre de transporteurs de l'amphotéricine B dans l'organisme. *In vivo*, la cure antimycotique par les L-AmB s'est avérée positive dans la plupart des études entreprises autant chez l'humain (Lopez-Berestein;1987)(Lopez-Berestein et al;1985)(Lopez-Berestein et al;1987) ainsi que chez des souris infectées (Lopez-Berestein et al;1983) (Tremblay et al;1984).

En général, les ampholiposomes sont mieux tolérés que ne l'est Fungizone® (Scullier et al;1990) qui induit des effets secondaires chez l'humain à une concentration sérique maximum de 3µg/mL alors que pour les L-AmB des doses deux à trois fois plus grandes peuvent être utilisées. De plus, ils ne provoquent pas de toxicité rénale chronique ou aiguë ni de problèmes d'ordre hématologique. Par contre, les patients atteints d'une infection hépatique restent plus difficilement traitables (Lopez-Berestein et al;1987). Les L-AmB sont moins toxiques pour les cellules de mammifères, sont non hémolytiques (Mehta et al;1984) et moins pyrogéniques (Lopez-Berestein et al;1985). Les L-AmB restent efficaces contre les infections à *Candida albicans* et plus que Fungizone® contre des infections à *Leishmania* (Lopez-Berestein et al;1987). Chez la souris, les doses toxiques d'AmB sont 10 à 15 fois plus grandes pour les L-AmB par rapport au Fungizone®. Sur des tests de LD 50 effectués sur des souris infectées, la LD 50 est de 40mg/kg pour les L-AmB contre 3 mg/kg pour Fungizone® (Clark et al;1991). On s'entend donc pour dire que les L-AmB réduisent considérablement la toxicité et sont moins létales que la forme commerciale d'AmB (Tremblay et al; 1984).

Cette diminution de toxicité *in vivo* envers les cellules de l'hôte ne semble pas affecter le pouvoir antifongique de l'AmB car des bienfaits thérapeutiques sont observés. Cependant, *in vitro*, l'efficacité antifongique des L-AmB est variable comme le rapportent différentes études (Szoka et al;1987)(Julien et al;1989). Cette variabilité s'explique par le fait que les différentes études étaient menées dans des conditions expérimentales très différentes. De ces expériences, il en ressort que les L-AmB tuent plus lentement les levures que l'AmB libre (Ralph et al;1991) mais pas moins efficacement pourvu que les L-AmB soient maintenus en étroit contact avec les levures *in vitro* par une agitation constante (Szoka et al;1987).

Un fait intéressant à souligner est que les ampholiposomes augmentent la possibilité de prise en charge préférentielle par les cellules du système réticulo-endothélial (Ghosh et al;1982) (rate, foie, poumon et moëlle osseuse). Toute la question de la pharmacocinétique reste à considérer de même que l'augmentation de la résistance à l'infection fongique reliée à l'action synergique des L-AmB et des cellules phagocytantes qui possèdent un grand appétit pour les liposomes et les



microorganismes infectieux et qui sont concentrées dans les tissus du système réticulo-endothélial. On suppose que les phagocytes livrent l'AmB aux sites infectieux (Lopez-Berestein et al;1987). L'implication de cellules de défense antimicrobienne capables de voir à l'élimination de l'agent infectieux et capables de livrer la substance antifongique sur les sites d'infection pourrait être déterminante dans l'exercice des propriétés antifongiques des L-AmB ( Mehta et al; 1985).

### 1.5.2 Implication de l'activation du macrophage:

#### 1.5.2.1. Activation du macrophage:

La défense naturelle contre les microorganismes pathogènes s'inscrit dans un contexte phylogénique et fait intervenir un mécanisme non spécifique de reconnaissance allo-immune qui est apparu bien avant les cellules T et les immunoglobulines. Cette fonction antimicrobienne est assurée par des phagocytes <<professionnels>> incluant les neutrophiles ou PMN et les leucocytes mononucléaires (monocytes/macrophages). Pour assurer leur rôle de surveillance, les macrophages se retrouvent dans une variété de tissus dans lesquels ils forment un réseau organisé de cellules, le système réticulo-endothélial. Ils bordent aussi les portes d'entrée de l'organisme et les endroits plus vulnérables à l'intrusion par des organismes pathogènes. Ces macrophages dits résidents prolifèrent peu et sont continuellement remplacés par d'autres cellules précurseurs du pool circulant, les monocytes du sang, provenant originellement de la moëlle osseuse. En présence d'un agent infectieux, les macrophages sont recrutés en très grand nombre vers le site inflammatoire. Initialement résidents et non activés, les macrophages sollicités par la présence du matériel étranger deviennent suractivés. Ces macrophages ainsi transformés sont appelés macrophages inflammatoires. Les mécanismes à l'origine de cette réaction inflammatoire demeurent encore mal élucidés mais semblent en partie reliés à l'action adjuvante de sucres complexes retrouvés (glycans) à la surface des microorganismes. Comme au cours d'une infection, l'effet adjuvant des extraits bactériens tels les bacilles de Calmette-Guérin (BCG), les lipopolysaccharides (LPS) ou d'autres composés d'origine synthétique activent directement le macrophage, et cette activation se traduit par l'expression de changements morphologiques, biochimiques et fonctionnels chez ces cellules (Kamisato et Nowakowski;1988) et par

la production de facteurs non spécifiques qui intensifient la réponse immune à médiation cellulaire. En présence de ces produits inflammatoires, les macrophages deviennent activés et se transforment en cellules hautement microbicides et tumoricides ayant un pouvoir de phagocytose accru. Ces cellules activées augmentent donc les défenses de l'organisme de même que sa résistance aux infections

La plupart des microorganismes pathogènes qui envahissent l'organisme sont phagocytés i.e. sont inclus dans le phagosome de la cellule phagocytante pour être finalement tués et dégradés par des substances hautement réactives susceptibles d'interférer avec leur métabolisme. La phagocytose s'accompagne chez les macrophages de la stimulation d'évènements biochimiques aboutissant à la formation de métabolites réactifs de l'oxygène. Ce complexe de réactions biochimiques est connu sous le nom "respiratory burst" ou explosion respiratoire. La première réaction implique la réduction d'un oxygène moléculaire en anion superoxyde ( $O_2^-$ ). Cette réaction est catalysée par une enzyme du phagosome, la NADH oxydase qui utilise le NADPH ou le NADH comme substrat. Cette réaction produit des radicaux hydroxyles (OH), de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Ces métabolites oxygénés générés par les phagocytes sont utilisés pour détruire les bactéries, les levures et les protozoaires dans le phagosome. Au cours du processus, il se produit une fusion du lysosome avec le phagosome qui devient le phagolysosome. La fusion lysosomiale fait intervenir des enzymes (lysozyme et autres) permettant de digérer les résidus microbiens. C'est d'ailleurs par ces deux types de mécanisme (production de dérivés actifs de l'oxygène et d'un important bagage d'enzymes hydrolytiques) que les macrophages sont capables de lyser des cellules tumorales (Chung et Kim;1988).

Les phagocytes sont aussi pourvus d'un mécanisme de protection pour se prémunir contre l'autooxydation car, des dérivés réactifs de l'oxygène peuvent tout aussi bien attaquer les structures membranaires et cytoplasmiques du phagocyte lui-même. Pour contrer l'autooxydation, le macrophage possède plusieurs enzymes telles, la superoxyde dismutase (SOD) capable d'inactiver l'anion superoxyde, la peroxydase du glutathion et la catalase capables de dégrader le peroxyde d'hydrogène.

### 1.5.2.2. Propriété adjuvante de l'AmB sur le macrophage:

L'amphotéricine B active les mécanismes d'action antimicrobienne ci-haut mentionnés en stimulant le macrophage. L'AmB attire les macrophages au site d'inflammation (Lin et al;1987). La réponse inflammatoire qu'elle induit n'est pas aussi accentuée que celle provoquée par les lipopolysaccharides ( LPS ) (Chia et al;1989) mais est comparable à celle provoquée par le BCG (Little et Wolf;1987). *In vitro* elle a un effet direct sur l'activité antitumorale des macrophages induits au BCG (Chapman et Hibbs;1978). L'AmB rehausse l'activité phagocytante des macrophages péritonéaux et restaure l'activation de macrophages après infection à *Listeria monocytogenes* (Lin et al;1977) (Mc Harell et al; 1973), un type d'infection qui neutralise complètement les fonctions du macrophage. Il existe une corrélation *in vitro* et *in vivo* entre l'activation des macrophages en cellules effectrices de toxicité envers *Candida albicans* et l'augmentation de la résistance aux infections à *Candida albicans* (Vecchiarelli et al;1986). Il y a aussi une corrélation des effets observés *in vivo* et *in vitro* sur la production des dérivés de l'acide arachidonique: on observe une augmentation de la production de prostaglandines (PGE<sub>2</sub>) et des effets pyrogéniques indirectement associés à cette production de PGE<sub>2</sub>. Comme pour la stimulation aux LPS, les macrophages stimulés *in vitro* avec l'AmB (1µg/mL) produisent cinq à sept fois plus de PGE<sub>2</sub> (Gigliotti et al;1987)

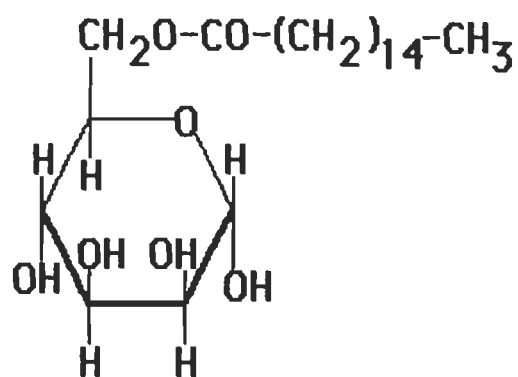
### 1.6. L'ester de mannose:

Le but du projet présenté consistait à vérifier l'influence de l'ester de mannose ou palmityl mannose (figure 6) sur les propriétés toxiques et immunoadjuvantes de l'AmB par leur complexation. Plusieurs raisons justifiaient le choix de ce dérivé mannosylé de l'acide palmitique. D'abord, le palmityl mannose comme le lauryl sucrose (LS) est un détergent doux, susceptible d'agir sur la molécule d'AmB en modifiant son état d'agrégation et son interaction avec les membranes cellulaires. La structure semblable de ces deux composés glycolipidiques nous permettent d'espérer une action analogue quant à la sélectivité de l'AmB pour les stérols membranaires. La diminution de l'affinité de l'AmB pour le cholestérol devrait permettre de trouver une fenêtre de concentrations du complexe AmB-ester alliant la toxicité envers les levures et stimulation des propriétés de cellules de l'hôte, phénomènes observés avec

l'AmB seule à forte et à faible concentrations respectivement. L'activation exercée par l'AmB particulièrement sur les cellules du système immunitaire (macrophages et lymphocytes) permettrait ainsi de renforcer la synergie entre les propriétés antimycotiques de l'antifongique et les mécanismes naturels de défense de l'organisme.

La chaîne d'acide palmitique responsable du caractère surfactant de la molécule a aussi été prise en considération dans le choix du palmityl mannose. En fait, le choix de l'acide palmitique découle d'une étude antérieure faite dans notre laboratoire sur les propriétés adjuvantes de glycolipides simples (Thérien et al;1988). Cette étude effectuée sur une série d'ester de sucrose variant par la longueur de la chaîne d'acide gras (8-18 C) a permis de démontrer que les chaînes à 16 et à 18 C avaient un potentiel mitogénique sur les lymphocytes supérieur à celui des chaînes plus courtes.

Le potentiel adjuvant de la chaîne d'acide palmitique sur la prolifération lymphocytaire n'était pas l'unique raison qui nous a fait opter pour le palmityl mannose. Le choix du sucre mannose était fondé sur l'activation potentielle du macrophage via un mécanisme de reconnaissance non spécifique où interviennent des résidus mannosylés. Le macrophage exprime à sa surface un récepteur bien caractérisé, le récepteur fucose/mannose (Shepherd et al;1990) (Stahl et Gordon;1982) (Muller et Schuber;1989) (Warr;1980) (Lennartz et al 1989) (Masayuki et al 1988) lequel est intimement associé à ses fonctions microbicides. C'est grâce à ce récepteur impliqué physiologiquement dans la phagocytose des agents pathogènes tels les levures que les macrophages deviennent plus aptes à protéger l'organisme contre les mycoses. L'interaction entre le mannose et ce récepteur complémentaire devait donc favoriser le ciblage direct de l'AmB aux macrophages et reproduire ainsi l'efficacité de la formulation liposomale de l'AmB quant à l'action antimycotique médiée par les macrophages.



Palmityl Mannose

Figure 6. Structure chimique de l'ester de mannose ou palmityl mannose.

## MATERIEL ET METHODES

### 2.1. Synthèse régiosélective du palmityl mannose monosubstitué:

(C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>7</sub>)

#### 2.1.1. Synthèse:

La synthèse du palmityl mannose a été faite selon la méthode d'Asselineau, J.;1955 et modifiée selon (Yoshimoto,K. et al;1979)

La synthèse du palmityl mannose monosubstitué consiste à former un lien ester entre la fonction hydroxyle du résidu mannose (carbone en position 6) et la fonction carboxylique d'une chaîne d'acide palmitique. L'estérification du mannose s'effectue sous l'action directe du chlorure de palmityle (Asselineau;1955) i.e. sans l'aide d'un catalyseur acide puisque les chlorures d'acides sont beaucoup plus réactifs que les acides eux-mêmes ( Roy; 1977). Le chlorure de palmityle est préparé à partir de 5 g d'acide palmitique par l'action d'un excès de chlorure de thionyle (SOCl<sub>2</sub>). Le chlorure de palmityle (5.36 g) est dissous dans 10 mL de benzène. La solution de chlorure de palmityle est introduite goutte à goutte dans une solution de D(+)-mannose anhydre (10 g) dissous dans 50 mL de pyridine qui est maintenue à une température de 4°C. La pyridine agit pour neutraliser l'acide chlorhydrique formé dans le milieu réactionnel. De cette manière, un pH alcalin peut être maintenu tout au long de la réaction sans quoi, un excès de protons H<sup>+</sup> déplacerait l'équilibre vers la réaction inverse de l'estérification soit, l'hydrolyse du lien ester. Puis, le mélange est laissé sous agitation constante, à température ambiante, pendant 24 heures. Le mélange est ensuite évaporé sous vide. En maintenant toujours le ballon à froid, la pyridine est éliminée par précipitation à l'aide d'eau distillée glacée. Ensuite, une filtration permet de séparer les cristaux de palmityl mannose insolubles dans l'eau d'avec la pyridine soluble dans l'eau. Les cristaux sont ensuite dissous dans un minimum de chloroforme-méthanol (19:1). Alors, apparaît une phase aqueuse au-dessus de la phase organique. Celle-

ci doit être enlevée puisqu'on conserve la phase organique laquelle est ensuite asséchée avec une petite quantité de sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ). Le tout est refiltré sur filtres Ultra-Fast de manière à enlever toutes traces résiduelles d'eau et toute odeur de pyridine. La préparation est finalement prête pour l'étape de la purification.

### 2.1.2. Purification:

Le palmityl mannose monosubstitué figure parmi de nombreuses impuretés dans la préparation. Les esters bi ou polysubstitués sont séparés de l'ester monosubstitué par chromatographie sur gel de silice. Une colonne de trois pouces de diamètre (environ 250 ml) est montée. On utilise pour la phase stationnaire, 30 g de gel de silice par gramme de produit à séparer et comme éluant, le chloroforme-méthanol (15:1). On laisse compacter le gel avec le solvant pendant toute une nuit. Le produit à séparer est dissous dans un minimum de chloroforme-méthanol (15:1) puis est déposé sur la colonne. Pour ce faire, le solvant est amené au niveau du gel et l'échantillon à séparer est déposé délicatement sur le gel. Une fois que l'échantillon a pénétré le gel, on ajoute du sable blanc (quartz) en saupoudrant au-dessus du gel et puis, on ajoute le chloroforme-méthanol (15:1) d'abord sur les parois de la colonne puis dans tout le réservoir de la colonne. La colonne doit couler à un faible débit de une goutte par seconde. Des fractions d'environ 50 mL sont recueillies. Chaque fraction recueillie est évaporée sous vide puis resubstituée dans un minimum de chloroforme-méthanol (15:1) afin de vérifier la composition par TLC (Thin Layer Chromatography) ou chromatographie sur couche mince. Après 300 mL d'éluat, du chloroforme-méthanol (15:2) est ajouté dans le réservoir de la colonne pour poursuivre l'élution. L'élution complète de l'ester de mannose monosubstitué peut être réalisée après passage d'environ 900 mL de solvant.

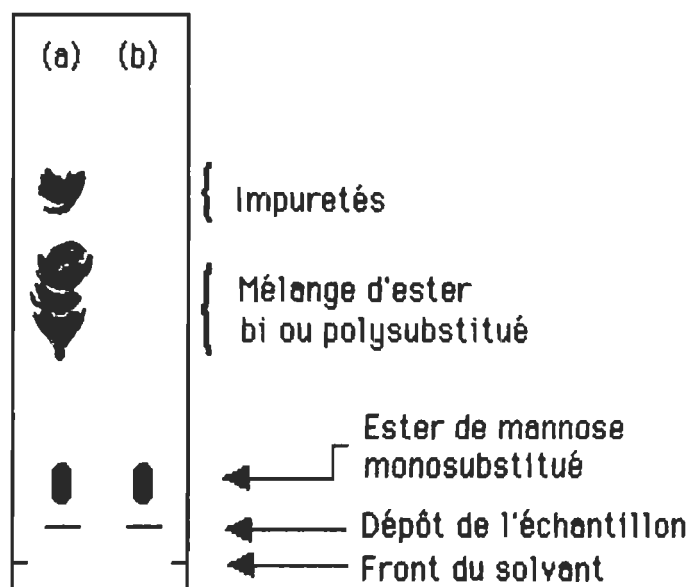
### 2.1.3. Détermination de la pureté de l'ester de mannose par chromatographie sur couche mince ou TLC:

La chromatographie sur couche mince permet de déterminer qualitativement la présence des différents constituants lipidiques contenus dans les fractions recueillies

par migration différentielle sur une mince couche de gel de silice. La méthode consiste à séparer différents types lipidiques suivant leur affinité pour un solvant organique. Plus l'affinité est grande pour le solvant de migration, c'est-à-dire plus son degré de solubilité dans un solvant donné est grand, plus grande sera sa migration sur la mince couche de gel de silice (bandelette TLC). Ainsi un composé possédant plus d'affinité pour le chloroforme-méthanol (15:1) migrera plus loin qu'un autre composé par exemple plus polaire.

Un aliquot de la fraction à analyser est prélevé à l'aide d'un petit capillaire et est déposé (2 à 3 gouttes) à environ 8 mm au bas d'une bandelette TLC (2,5 X 7,5 cm) soit juste au-dessus du front du solvant (environ 4 mm du bas de la bandelette). La bandelette est ensuite introduite verticalement dans un bécher contenant 4 mm de chloroforme-méthanol (15:1). On laisse le solvant de migration monter par capillarité jusqu'à 2 cm du haut de la bandelette. La bandelette est séchée puis aspergée d'un révélateur pour les sucres constitué d'éthanol: *p*-anisaldéhyde: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (18:1:1). La bandelette est séchée puis cuite au four à 100°C pendant 8 minutes. Différentes taches vertes apparaissent à différentes positions indiquant la présence des différents constituants lipidiques contenus dans la fraction. Une reproduction schématique d'une TLC effectuée sur une fraction contenant l'ester de mannose monopalmityl avec et sans impuretés est représentée en Figure 7.





FRACTIONS: ester de mannose (a) impur et (b) pur

Figure 7. Représentation schématique d'une bandelette TLC.

Les fractions contenant seulement l'ester de mannose monopalmityl (une seule tache) sont combinées puis évaporées. Les cristaux d'ester de mannose sont obtenus par précipitation dans un minimum d'acétone froid à  $-20^{\circ}\text{C}$  et par filtration sur filtre Ultra-Fast. Le solide recueilli est ensuite séché à l'éther pendant une journée complète. La pureté du produit obtenu a été vérifiée par analyse élémentaire ainsi que par spectroscopie infra-rouge et RMN.

## 2.2. Activité biologique de l'amphotéricine B en présence de l'ester de mannose:

### 2.2.1. Activité sur les macrophages péritonéaux:

#### 2.2.1.1. Traitement *in vivo* des cellules macrophagiques:

Les macrophages dits "inflammatoires" sont obtenus par prétraitement des souris au milieu thioglycollate. Des injections intrapéritonéales de milieu thioglycollate stérile (0,5 mL/souris) ont été données à des souris BALB/c mâles âgées de 2-4 mois, 4-5 jours avant la récolte des macrophages (Stahl et Gordon;1982). Cette injection permet d'augmenter jusqu'à dix fois le nombre de cellules péritonéales récoltées (Gordon; 1986). Les macrophages sensibilisés à l'amphotéricine B proviennent des souris d'abord traitées au milieu thioglycollate quatre jours avant la récolte des cellules puis ensuite sensibilisées avec des doses variables d'Amphotéricine B (1ml) contenant de (0,25 à 4 mg) et ce, 24 heures avant la récolte des cellules. Des souris-contrôles sont injectées avec les concentrations respectives de DMSO dans une solution de dextrose 5% p/v stérile (Wolf & Massof;1990). Les souris n'ayant reçu aucun traitement donnent des macrophages dits "résidents" ou "naturels".

#### 2.2.1.2. Traitement *in vitro* des cellules macrophagiques:

##### 2.2.1.2.1. Préparation des PEC (Peritoneal Exudate Cells):

Les cellules de l'exsudat péritonéal sont obtenues par lavage *in situ* de la cavité péritonéale de souris BALB/c prétraitées ou non. Ces lavages consistent en l'injection de 10 mL de milieu RPMI-1640 incomplet froid. Le terme incomplet est utilisé pour indiquer l'absence de sérum de veau foetal (FCS). Cependant tous les éléments tels le sulfate de streptomycine;(50 µg/mL), la pénicilline G;(50 UI/mL), la L-Glutamine;(2mM), l'HEPES;(20mM) et le bicarbonate de sodium ou NaHCO<sub>3</sub>;(2,2 g/L) sont présents. Après centrifugations (1500 rpm) et lavages (trois fois) dans ce même milieu, les cellules de la cavité péritonéale sont resuspendues dans du milieu RPMI-5 % FCS. Le sérum de veau foetal a subi préalablement un traitement à la chaleur, à 56°C pendant 30 minutes pour inactiver le complément.

### 2.2.1.3. Activité cytostatique des macrophages ou "Cytostase":

La cytostase désigne un test où les macrophages médient *in vitro* l'inhibition de la prolifération de cellules tumorales.

#### A) Macrophages péritonéaux (M $\phi$ )

La suspension de cellules de la cavité péritonéale est ajustée à  $1,25 \times 10^6$  PEC /mL. Leur nombre dans la suspension est déterminé sur hémacymètre. Des aliquots de 100  $\mu$ L/puits sont déposés dans les plaques à 96 puits Falcon Microtest III no. 3072 (puits  $\phi = 8$  mm). Après une incubation de 2 heures à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub>, les plaques sont rincées trois fois avec du milieu RPMI incomplet chaud afin de déloger les cellules non adhérentes. Les macrophages constituant les cellules adhérentes sont gardées dans 100  $\mu$ L de RPMI-10 %FCS et sont désormais prêts pour subir l'activation *in vitro* avec l'amphotéricine B.

#### B) Préactivation des macrophages péritonéaux (M $\phi$ ):

Les macrophages sont soumis à une incubation de 24 heures à 37°C et 5 % en CO<sub>2</sub> en présence d'amphotéricine B (P.M.= 924,1), de l'ester de Mannose (P.M.= 418,58) et du mélange des deux constituants, aux concentrations allant de 0,1 à 30  $\mu$ g/mL en AmB. L'amphotéricine B est solubilisée dans le DMSO de sorte qu'elle soit 1000 fois concentrée. Pour répartir également le DMSO dans les puits-tests à une concentration finale de 0,2% p/v par puits, on procède à une série de dilutions allant de 0,1 à 30 mg/mL toujours dans le DMSO. Pour les solutions d'AmB seule, on ajoute à chacun des tubes un volume égal de DMSO tandis que pour les solutions d'AmB en mélange, on ajoute un volume égal d'une solution d'ester de mannose 1000 fois concentrée. Chacun des tubes est ensuite dilué 250 fois, soit 40  $\mu$ L dans 10 mL de RPMI-10% FCS stérile (0,2 à 60  $\mu$ g/mL en AmB). Ces solutions se trouvant deux fois concentrées sont diluées par un facteur de deux lors de l'ajout dans chacun des puits-tests avec un volume égal de cellules tumorales ou de milieu selon le cas.

### C) Cellules tumorales

Les cellules tumorales utilisées pour le test de la cytostase proviennent d'une lignée syngénique de myélome murin, la lignée SP2. Les cellules tumorales sont cultivées dans un milieu RPMI-10 % FCS supplémenté de L-Glutamine ( 2mM ) lequel est rafraîchi tous les deux jours pendant leur phase logarithmique de croissance. C'est pendant cette phase de croissance que les cellules tumorales doivent être mises en coculture avec les macrophages.

Les cellules sont cocultivées avec les macrophages à trois rapports cellulaires E:C (Effectrices: Cibles) différents. Les macrophages (fixe à  $1,25 \times 10^5$ /puits) sont les cellules effectrices et les cellules tumorales SP2 sont les cellules-cibles. Un aliquot de la suspension de cellules SP2 est d'abord prélevé pour déterminer leur viabilité de départ au bleu trypan (0,2% p/v dans NaCl (0,9 %p/v) filtré surWhatmann et pour déterminer leur nombre sur l'hémacymètre. Les cellules tumorales SP2 sont ensuite lavées puis resuspendues à  $5 \times 10^5$ /mL ( E:C= 2,5:1), à  $2,5 \times 10^5$  /mL ( E:C= 5:1) et  $1,25 \times 10^5$ /mL ( E:C = 10:1) dans 12 mL de milieu RPMI-10 % FCS contenant  $5 \mu\text{Ci/mL}$  de [ $^3\text{H}$ ] Thymidine. Les macrophages sont préalablement rincés trois fois avec du milieu incomplet chaud. Les cellules SP2 sont ajoutées aux macrophages préactivés à l'AmB. Chaque (100 $\mu\text{L}$  ) de la suspension cellulaire contient  $0,5 \mu\text{Ci}$  en thymidine tritiée. Ensuite les solutions d'AmB à tester sont ajoutées à leurs puits respectifs comme pour la préactivation des macrophages 24 heures avant. Les plaques sont ensuite placées dans l'incubateur à 37°C pour une autre incubation de 24 heures.

Les cellules tumorales SP2 de chaque puits sont récoltées par rinçage-filtration (Cell-Harvester) sur papier de fibre de verre GFA avec une solution saline de 0,9% p/v. Les papiers filtres de chacun des puits sont séchés puis déposés dans les fioles à scintillation. Du liquide scintillant (toluène contenant du POPOP (0,005 %) et du PPO (0,4 %p/v) est ajouté dans chaque fiole (2,5mL). Les fioles sont placées dans un compteur à scintillation- $\beta$  pour la détermination du nombre de cpm (coups par minute) résultant de l'incorporation de [ $^3\text{H}$ ] thymidine par les cellules tumorales SP2 en prolifération.

Chacune des 6 concentrations d'AmB est testée en triplicata contre un contrôle (Mφ + SP2 + milieu) et (Mφ + SP2 + DMSO 0,2 %). Des contrôles (SP2 seules) en triplicata sont aussi effectués avec chacune des six concentrations d'AmB testées et de même qu'un contrôle (Mφ seuls + DMSO 0,2%) de sorte que la moitié droite de la plaque à 96 puits est consacrée aux (Mφ + SP2) moins trois puits pour (Mφ seuls) tandis que l'autre moitié gauche aux contrôles (SP2 seules) (Figure 8).

Le pourcentage de prolifération (- Mφ) des cellules tumorales SP2 désigne le pourcentage réel de prolifération sans la contribution des Mφ. Il est calculé comme suit:

$$\% \text{ de Prolifération } (-M\phi) = \frac{\text{cpm SP2 seules [AmB]} \times 100}{\text{cpm SP2 seules DMSO}}$$

Le pourcentage de prolifération (+ Mφ) des cellules tumorales SP2 désigne le pourcentage de prolifération avec la contribution des Mφ:

$$\% \text{ de Prolifération } (+M\phi) = \frac{\text{cpm M}\phi + \text{SP2 [AmB]} \times 100}{(\text{cpm SP2 seules DMSO}) + (\text{cpm M}\phi \text{ seuls DMSO})}$$

Le pourcentage de cytotase désigne l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales SP2 par la contribution des Mφ et de l'AmB:

$$\% \text{ Cytostase} = \frac{(\text{cpm SP2 seules DMSO} + \text{cpm M}\phi \text{ seuls DMSO}) - (\text{cpm M}\phi + \text{SP2 [AmB]}) \times 100}{(\text{cpm SP2 DMSO} + \text{cpm M}\phi \text{ seuls DMSO})}$$

Le Δ Cytostase désigne le pourcentage d'activité cytotatique réelle des macrophages péritonéaux tenant compte de l'inhibition de la prolifération causée par l'AmB (ou ses dérivés) seule.

$$\Delta \text{ Cytostase} = \% \text{ Cytostase} - (100 - \% \text{ Prolifération } (-M\phi))$$

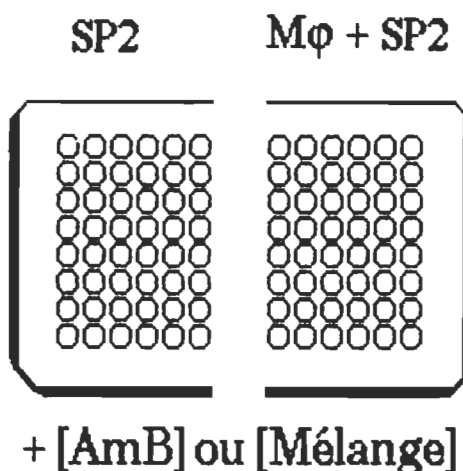


Figure 8. Modèle de plaque de culture utilisée pour l'essai de la cytostase.

#### 2.2.1.4. Activité bactéricide des macrophages péritonéaux:

L'activité bactéricide des macrophages est mesurée par la détermination de la sécrétion de peroxyde d'hydrogène *in vitro* par les cellules présensibilisées *in vivo* à l'AmB . Les cellules de l'exsudat péritonéal des souris prétraitées à l'AmB seule, en mélange avec l'ester de mannose ou sous forme de Fungizone ® sont obtenues par lavages de la cavité péritonéale avec du milieu RPMI incomplet et froid. Les cellules sont ensuite lavées au milieu HBSS (Hank's Balanced Salts Solution) sans rouge de phénol (trois fois centrifugées à 1500 rpm). La suspension cellulaire est ajustée à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL dans le milieu HBSS. Un mL de la préparation cellulaire est transféré dans chacun des puits d'une plaque Falcon à 24 puits . Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> pendant deux heures pour permettre l'adhérence des macrophages. Les puits sont ensuite lavés au milieu HBSS chaud pour déloger les cellules non adhérentes. Les cellules adhérentes sont par la suite activées à la PMA (Phorbol Myristate Acetate) solubilisée dans le HBSS contenant de l'azide de sodium (5mM) aux concentrations variant de 0 à 2 µg/mL (maximum 0.1% p/v final d'éthanol). La solution stock de

PMA (1 mg/mL) est faite dans l'éthanol et conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La PMA est un puissant agent stimulant la production et la sécrétion de peroxyde d'hydrogène chez les cellules phagocytantes tel le macrophage. La plaque Falcon à 24 puits est placée à l'étuve pour une incubation de 0 à 60 minutes. Après l'activation, les surnageants de chaque puits sont recueillis et placés à  $4^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière jusqu'au dosage du peroxyde d'hydrogène. Les plaques sont gardées pour l'estimation de la viabilité des macrophages au bleu trypan après activation.

#### 2.2.1.4.1. Détermination du peroxyde d'hydrogène:

La méthode utilisée pour déterminer la quantité de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sécrété par les macrophages est une méthode fluorométrique. Cette méthode fut développée par Keston & Brandt en 1965. Elle permet de mesurer des microquantités de  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les solutions aqueuses. Elle fut employée pour l'étude de l'activité bactéricide des cellules phagocytantes (Paul & Sbarra; 1968) et pour l'étude du métabolisme oxydatif chez les PMN ((Polymorphonucléaires) (Homan-Muller;1974) par cytométrie de flux (Bass et al.;1983). Cette méthode emploie la 2'7'dichlorofluorescéine diacétate (DCFH-DA), un composé stable et non fluorescent qui, une fois activé par hydrolyse alcaline ou par une estérase intracellulaire devient la 2'7'dichlorofluorescéine hydrolysée (DCFH) non fluorescente, laquelle est rapidement oxydée en un composé hautement fluorescent, la 2'7'dichlorofluorescéine (DCF) en présence de peroxyde d'hydrogène dans la solution aqueuse ou dans le cytoplasme cellulaire (Bass et al.; 1983) (figure 9). La réaction d'oxydation du DCF est amplifiée par la présence de la peroxydase de raifort (HRPO) (Horse Radish Peroxidase) dans cette même solution aqueuse. La peroxydase permet de démarrer l'oxydation (Paul & Sbarra;1968). Ce mécanisme de conversion du DCFH-DA en DCF est encore mal connu (Bass et al.;1983).

#### 2.2.1.4.2. Préparation des solutions:

La solution stock de DCFH-DA est préparée à 0.5 mM dans l'éthanol et est gardée à  $-20^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière. La solution mère de  $\text{H}_2\text{O}_2$  est fraîchement préparée à chaque dosage et est ajustée à 1mM (coefficient d'extinction molaire:  $81 \text{ cm}^{-1}\text{Mole}^{-1}$ )

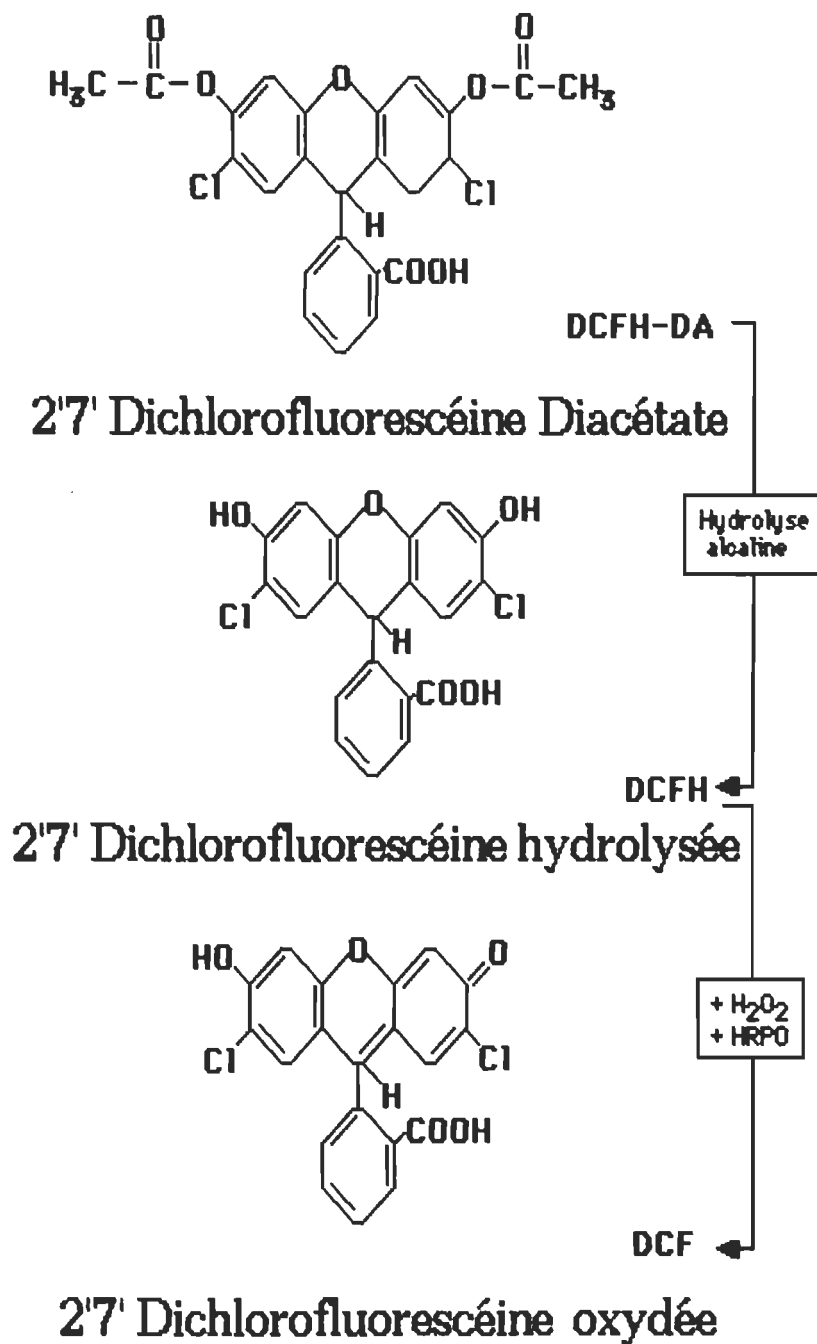


Figure 9. Principe chimique de la méthode de dosage du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:  
conversion du DCFH-DA en DCF fluorescent.



à 230 nm au spectrophotomètre. Le milieu réactionnel consiste en un tampon PBS (Phosphate Buffer Solution) 15mM (pH 7,4) contenant 0,8% de NaCl.

#### 2.2.1.4.3. Dosage:

Le DCFH-DA 0,5 mM est activé par une hydrolyse alcaline en DCFH par l'ajout de 4 volumes de NaOH 1N. Après avoir laissé réagir 15 minutes, un volume de 0,6 mL est dilué et neutralisé dans 150 mL de PBS-15mM pH 7,4 contenant 0,8% de NaCl et HRPO de type II (0,025 mg/mL). Ce milieu réactionnel de DCFH (0,5 $\mu$ M) est maintenu à l'abri de la lumière. La quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est estimée par référence à une courbe standard allant jusqu'à 300 picomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. On ajoute 2,8 ml de milieu réactionnel à 200  $\mu$ l d'échantillon à doser. La lecture en fluorométrie est prise immédiatement à une longueur d'onde ( $\lambda$ ) d'émission de 520 nm et  $\lambda$  d'excitation de 504 nm dans une cuvette de quartz de 3 ml. Les échantillons sont lus contre un blanc contenant 200  $\mu$ L d'eau distillée.

L'intensité de fluorescence mesurée est convertie en picomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dosées par le calcul de la pente de la courbe d'étalonnage ayant un coefficient de corrélation  $R > 0.994$ . La quantité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesurée est rapportée à 1 mL de surnageant initial et est exprimée en micromolaire ( $\mu$ M).

#### 2.2.2. Activité antifongique de l'AmB en présence d'ester de mannose:

L'efficacité antifongique de l'Amphotéricine B en mélange avec l'ester de mannose a pu être testée *in vitro* avec la collaboration du Laboratoire de Santé Publique du Québec par l'équipe du Dr Guy St-Germain. La méthode consiste à incuber différentes souches de levures en présence du composé antifongique et à mesurer leur indice de croissance (l'efficacité fongistatique) et de viabilité (l'efficacité fongicide). Les levures testées pour notre étude sont: *Candida albicans* (LSPQ 7124433), *Saccharomyces cerevisiae* (LSPQ 36375), *Cryptococcus neoformans* (LSPQ 210) et un contrôle résistant à l'Amphotéricine B; *Candida tropicalis* (Myc0 87).

#### 2.2.2.1. Solutions stocks:

Toutes les solutions stocks d'Amphotéricine B sont préparées à 10 mg/mL; le poids pesé est corrigé en fonction de la pureté du produit ou de la présence d'autres substances comme le DOC pour le Fungizone®. La solution stock d'ester de mannose est aussi préparée à 10 mg/mL. La concentration d'ester de mannose dans les essais est gardée constante (20 µg/mL) alors que celle de l'AmB varie.

#### 2.2.2.2. Préparation des solutions antifongiques:

Pour déterminer la Concentration Minimale Fongicide (CMF) et/ou la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI), des dilutions en série de l'AmB pure, du Fungizone®, du complexe Ester-AmB et de l'ester de mannose ont été effectués dans le bouillon de culture M<sub>3</sub>.

#### 2.2.2.3. Préparation de l'inoculum:

La suspension de levures est préparée à partir de cinq colonies isolées (>1 mm de diamètre) sur gélose Sabouraud modifiée. Les levures sont introduites dans 3 mL d'eau déionisée stérile. La suspension de levures est ajustée à  $1-5 \times 10^6$  cellules/mL par la mesure de la turbidité soit l'équivalent de la turbidité d'un Mc Farland (0,5 %T à 530 nm sur un spectrophotmètre). La suspension est ensuite diluée 100 fois dans un bouillon de culture M<sub>3</sub>. La concentration (nombre d'unités viables/mL) est vérifiée sur l'hémacytomètre.

#### 2.2.2.4. Inoculation :

Les levures sont inoculées (0,1 mL de la suspension) dans un volume de 0,9 mL de bouillon M<sub>3</sub> contenant l'antifongique à tester. Les tests sont effectués en triplicata. Les levures sont placées pour une incubation de 24 heures à 30°C. La CMI est la plus faible concentration d'antifongique capable d'inhiber la croissance des micromycètes. La CMI est déterminée par la mesure de turbidité de la suspension contre une contrôle sans antifongique.

La CMF est la plus faible concentration où l'on observe un effet fongicide. Après 24 heures d'incubation à 30°C, les levures sont bien resuspendues au vortex puis réinoculées (0,01 mL) sur gélose Sabouraud modifiée. La CMF est la concentration qui produit trois colonies et moins après une incubation de 48 à 72 heures à 30°C.

### 2.2.3. Influence de l'ester de mannose sur les propriétés physiques et physiologiques de l'AmB:

#### 2.2.3.1. Analyses spectrales du mélange Ester/AmB:

Nous avons étudié l'influence de l'Ester de Mannose sur l'AmB par des modifications enregistrées au niveau des spectres en UV. L'amphotéricine B est mélangée avec l'Ester de Mannose à différents rapports molaires Ester:AmB (1:1) (2:1) (5:1) (10:1) en utilisant une concentration fixe d'AmB de 10 µg/mL ( $1,08 \times 10^{-5}$ M). Les composés sont d'abord solubilisés dans le DMSO pour faire des solutions 500 fois plus concentrées puis sont dilués dans du milieu HBSS contenant 2 mM de L-Glutamine et 10 % de FCS. Le spectre dans l'ultraviolet-visible est effectué sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 4B, 30 minutes après la préparation des solutions.

#### 2.2.3.2. Toxicité aiguë du mélange Ester/AmB *in vivo*

Une dose toxique d'AmB (4,4 mg/kg) est infusée à dix souris femelles BALB/c ayant un poids moyen de 24 grammes par voie intraveineuse à un débit d'injection de 0,1 mL/minute. Les substances à injecter sont d'abord solubilisées dans le DMSO, diluées dans une solution de dextrose 5 % p/v stérile puis soniquées. Le mélange ester de mannose-AmB (rapport molaire 2:1) est testé comparativement avec une même dose d'AmB (Fungizone®). Le taux de survie des souris est rapporté en pourcentage (%) de survivants 1, 2, 3 et 5 jours après l'injection. Les solutions injectées sont soumises aux mêmes analyses spectrales que mentionnées ci-haut.

## RESULTATS

Dans le présent chapitre, les résultats des études sur l'influence de l'ester de mannose sur l'activité biologique de l'AmB seront exposés en trois sections. La première présentera l'influence de l'ester de mannose sur l'activité toxique de l'AmB à l'égard des cellules eucaryotes (cellules de mammifères et levures). La deuxième section parlera de l'activation *in vitro* et *in vivo* des macrophages péritonéaux et finalement, dans la troisième, on verra comment l'ester de mannose influence les spectres U V de l'AmB et quelques résultats préliminaires de la toxicité *in vivo* de l'AmB (Fungizone®) versus le mélange AmB-Ester (2:1).

### 3.1. Cytotoxicité de l'Amphotéricine B envers les cellules eucaryotes:

#### 3.1.1. Cytotoxicité de l'AmB envers les cellules de mammifères:

Comme déjà mentionné, les cellules tumorales SP<sub>2</sub> servent à la fois de cellules cibles pour la mesure de l'inhibition de la prolifération ou "cytostase" par les macrophages péritonéaux et de modèle de cellules de mammifères pour la mesure de la toxicité de l'AmB *in vitro*. La viabilité des cellules SP<sub>2</sub> est en relation directe avec leur capacité de proliférer. Leur prolifération est déterminée par l'incorporation de thymidine radiomarquée dans le DNA de leur noyau. Les cellules tumorales SP<sub>2</sub> sont donc mises en présence des différentes concentrations d'AmB complexée ou non à l'ester de mannose ou encore, en présence de Fungizone®. Ceci a permis de déterminer l'influence de ces composés sur la croissance même des cellules. Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de l'ester de mannose seul sur la viabilité des cellules en prolifération afin de déterminer la concentration maximale pouvant être utilisée dans le complexe Ester-AmB. Le pourcentage de la prolifération des SP<sub>2</sub> en fonction de la concentration en ester de mannose est représenté en figure 10. Les résultats démontrent qu'il est possible d'utiliser l'ester de mannose jusqu'à une concentration maximale de 25 µg/mL. La prolifération des SP<sub>2</sub> se maintient

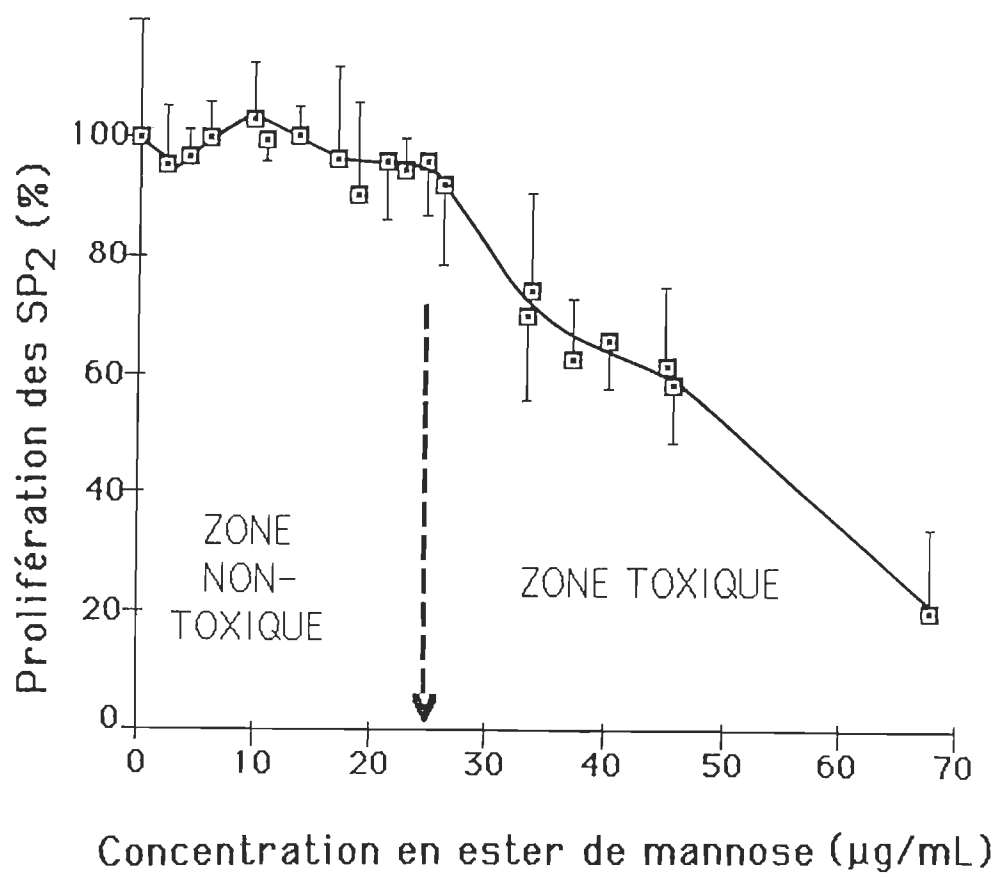


Figure 10. Prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> en fonction de la concentration en ester de mannose.

au-dessus de 90 % à des concentrations inférieures à 25 µg/mL et au-delà de cette concentration, celle-ci chute drastiquement. Donc, cette figure nous informe que pour utiliser l'ester de mannose dans notre mélange avec l'AmB, sa concentration ne doit pas dépasser 25 µg/mL.

L'ester de mannose à une concentration fixe de 25 µg/mL lorsque mélangé avec de fortes concentrations d'AmB protège les cellules contre l'effet visiblement toxique du polyène. A la figure 11, les résultats démontrent qu'à environ 5 µg/mL en AmB, la viabilité des cellules est gravement affectée en 24 heures d'exposition au polyène et est pratiquement nulle après 48 heures d'incubation avec l'AmB. La préparation commerciale Fungizone® se comporte de façon identique à l'Amphotéricine B pure quoique sa toxicité soit moins prononcée après 24 heures. La toxicité est entièrement reliée à l'AmB si l'on compare avec le contrôle de la viabilité avec le DOC, le détergent du Fungizone® qui, aux mêmes concentrations n'affecte pas la prolifération des cellules. Dans les mêmes conditions de culture, l'ester de mannose à 25 µg/mL protège les SP<sub>2</sub> contre la toxicité de l'AmB et la prolifération des SP<sub>2</sub> se maintient au-dessus de 80 % sur toute la gamme des concentrations expérimentées.

A la figure 12, nous pouvons mieux visualiser l'influence de l'ester de mannose sur la variation de la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> en présence de fortes concentrations d'AmB. A une concentration de 5 µg/mL en AmB, la prolifération des cellules tumorales passe de 45 % à 100 % avec l'ajout de seulement (2 µg) d'ester de mannose. A une concentration de 10 µg/mL en AmB, la prolifération passe de 25 % à plus de 90 % avec (4 µg) d'ester de mannose alors qu'il faut 25 µg pour atteindre une prolifération maximale de 85 % à 20 µg/mL en AmB et de 60 % à 30 µg/mL d'AmB. Au delà de 25 µg/mL en ester de mannose, la diminution de la prolifération des SP<sub>2</sub> est attribuable à l'effet toxique de l'ester de mannose. Les mêmes résultats sont présentés sous une autre forme à la figure 13. Il s'agit de la variation de la prolifération des cellules SP<sub>2</sub> en fonction des rapports molaires Ester/AmB. Ces résultats nous montrent que des rapports molaires (1:1) ou (2:1) Ester:AmB sont suffisants pour maximiser la prolifération. Ces rapports ont été utilisés pour les expérimentations *in vivo*

La concentration en ester de mannose qui protège contre l'action toxique de l'AmB n'est pas une valeur absolue puisqu'elle varie en fonction de la concentration en AmB suggérant ainsi, une modification des propriétés de l'AmB par l'ester. A la figure 14, nous pouvons observer une relation linéaire ( $R= 0,987$ ) entre la concentration en ester de mannose et celle de l'AmB permettant une prolifération cellulaire de 50 %.

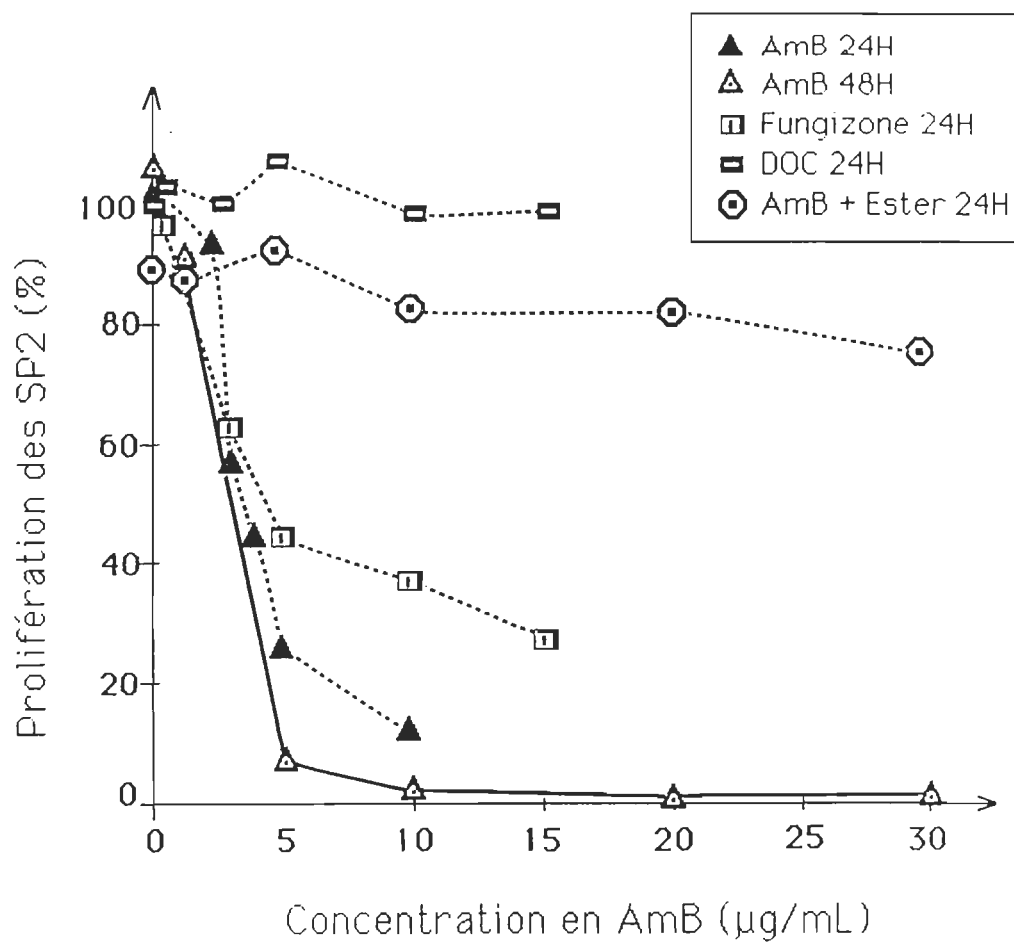


Figure 11. Prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> en fonction de la concentration d'AmB pure ou complexée au DOC (Fungizone®) ou à l'ester de mannose (25 µg/mL).



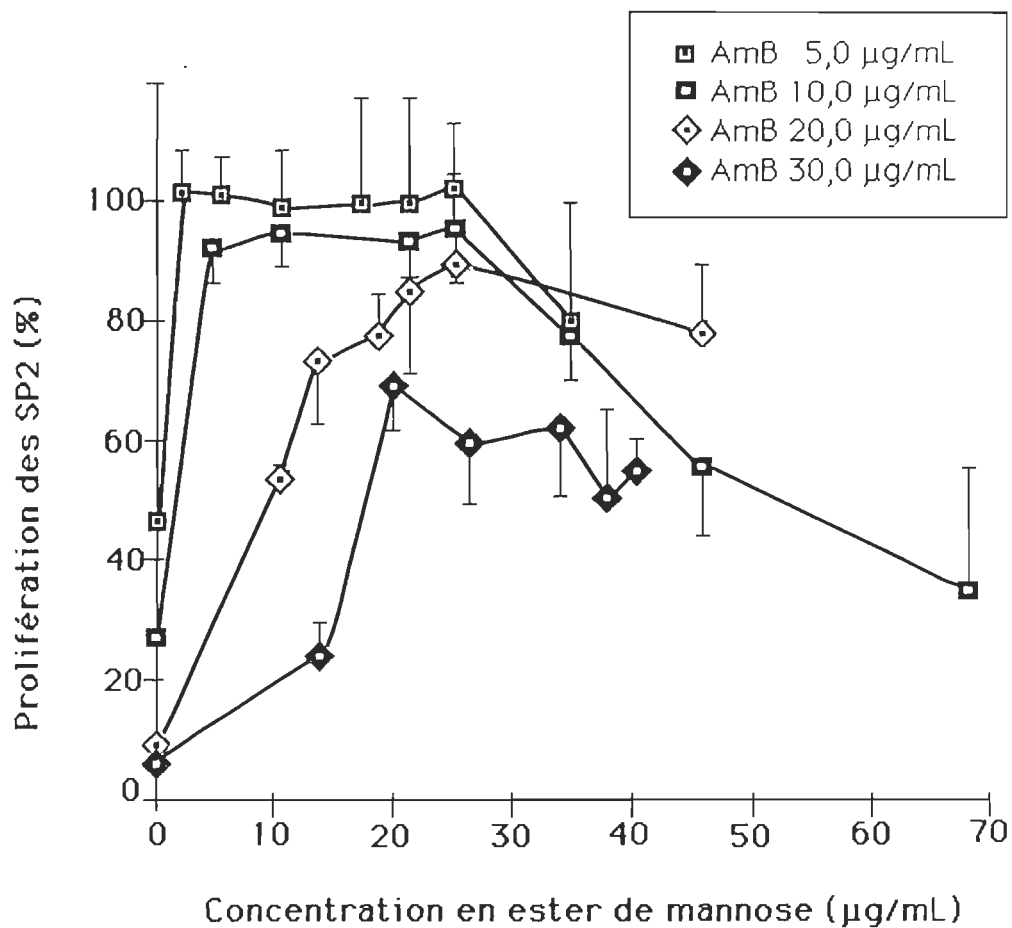


Figure 12. Influence de la concentration en ester de mannose sur la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> en présence de fortes concentrations d'AmB.

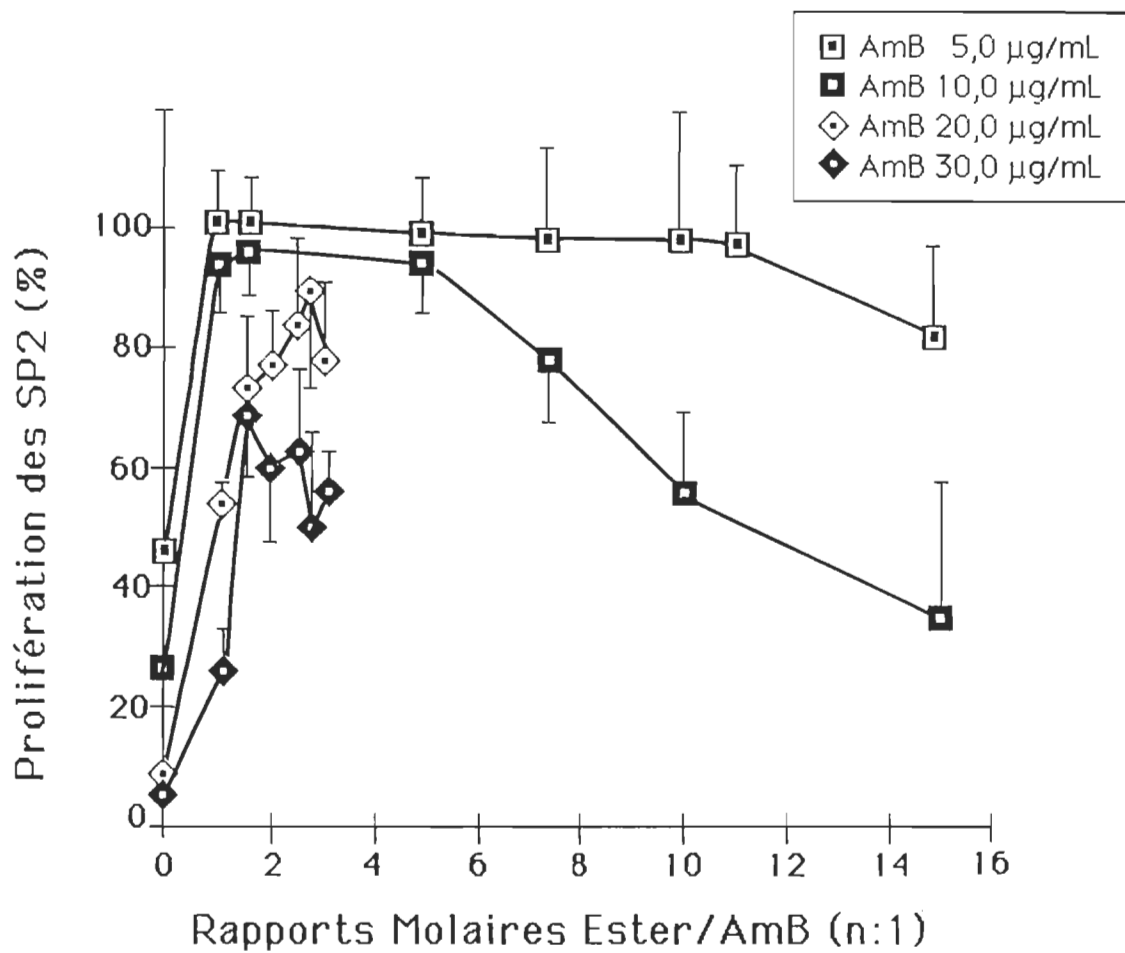


Figure 13. Influence du rapport molaire Ester: AmB sur la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub>.

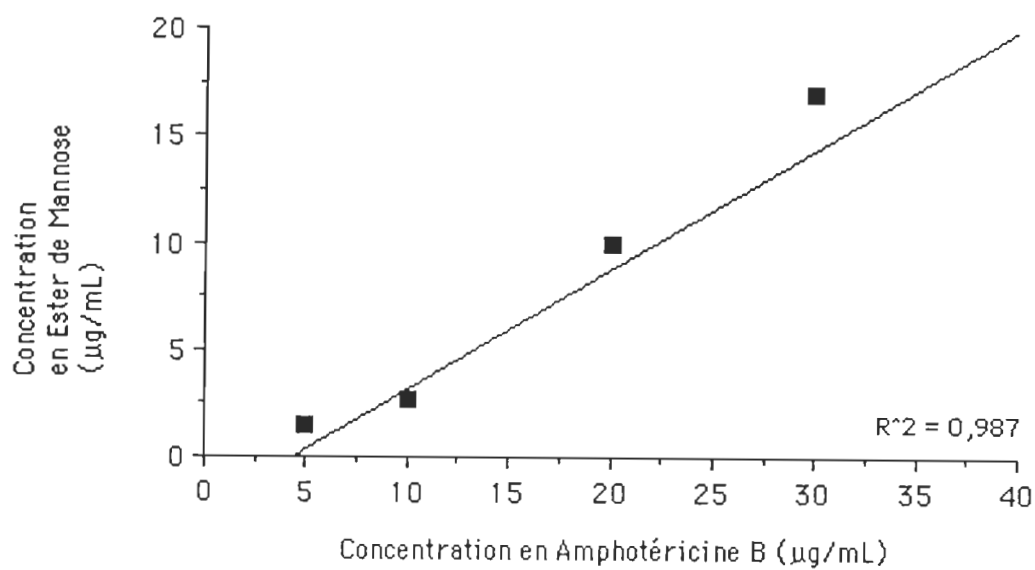


Figure 14. Concentration d'ester de mannose requise pour obtenir 50 % de prolifération cellulaire en présence de concentrations toxiques d'AmB.

### 3.1.2. Cytotoxicité de l'AmB envers les levures:

Sans une conservation du pouvoir antifongique de l'AmB complexé à l'ester de mannose, la diminution de la toxicité envers les cellules de mammifères ne serait d'aucun bénéfice du point de vue thérapeutique. En collaboration avec le laboratoire de Santé Publique du Québec, nous avons donc vérifié si la complexation AmB-Ester de mannose apportait des changements importants sur l'activité antifongique du polyène par de tests sur différentes souches de levures *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans* dont l'une *Candida tropicalis* est résistante à l'action de l'AmB. L'action du complexe a été comparée à celle de l'AmB pure, de la forme commerciale de l'AmB i.e. complexée au DOC et de l'ester de mannose.

Si nous nous reportons au tableau 1, nous retrouvons la concentration minimale d'AmB nécessaire pour inhiber la croissance des levures (CMD) pour l'AmB pure, le Fungizone®, l'ester de mannose seul et le mélange Ester/AmB. Les résultats s'expriment en mg/L et proviennent de deux expériences indépendantes chacune faite en triplicata. Dans le tableau I, on peut constater que l'AmB complexé à l'ester conserve son pouvoir fongistatique. Ce pouvoir est comparable à celui de l'AmB pure pour la souche *C. albicans* (0,08) et supérieur pour *S.cerevisiae* et très supérieur pour *C. neoformans*. L'ester de mannose seul est quant à lui tout à fait inefficace (> 80). *C. tropicalis* demeure résistant à l'action toxique de l'AmB qu'elle soit ou non complexée à l'ester de mannose.

Dans le tableau 2, nous retrouvons l'effet fongicide i.e. la concentration minimale fongicide (CMF) du complexe Ester-AmB vis à vis l'AmB pure et le Fungizone®. Dans tous les cas, on constate qu'en complexe avec l'ester, l'AmB perd de son efficacité fongicide et ce, de façon plus marquée pour la souche de *C. albicans*. Le complexe Ester-AmB tue moins efficacement la souche de levures *C. albicans*, *S.cerevisiae* et *C.neoformans* que l'AmB pure et le Fungizone®. Ces résultats indiquent que l'ester de mannose exerce un léger effet protecteur sur la viabilité de levures en altérant légèrement le pouvoir fongicide de l'AmB. Donc le complexe Ester-AmB n'est pas aussi fongicide que l'AmB pure ou le Fungizone® mais il est autant sinon plus efficace comme agent fongistatique.

Tableau 1. Efficacité *In Vitro* de l'activité fongistatique de l'AmB en présence de l'ester de mannose.

CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) (mg/L)				
	<i>Candida albicans</i> LS PQ 71 ATCC 24433	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LS PQ 15 36375	<i>Candida tropicalis</i> Myco 87	<i>Cryptococcus neoformans</i> LS PQ 210
AmB pure	0.08 (0.04)	0.04 (0.04)	10 (10)	0,04 (0.02)
Fungizone®	0.04 (0.08)	0.04 (0.08)	20 (20)	0.04 (0.08)
Ester de mannose	>160 (>80)	>160 (20)	>160 (>80)	>160 (10)
AmB + Ester de mannose	0.08 (0.08)	<0.00125 (0.02)	80 (>80)	<0.00125 (<0.00125)

Tableau 2. Efficacité *In Vitro* de l'activité fongicide de l'AmB en présence de l'ester de mannose.

CONCENTRATION MINIMALE FONGICIDE (CMF) (mg/L)				
	<i>Candida albicans</i> LS PQ 71 ATCC 24433	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> LS PQ 15 36375	<i>Candida tropicalis</i> Myco 87	<i>Cryptococcus neoformans</i> LS PQ 210
AmB pure	0.16 (0.16)	0.08* (0.08)*	>160 (>80)	0.32 (0.32)
Fungizone®	0.16 (0.32)	0.08* (0.16)*	>160 (>80)	0.16 (0.32)
Ester de mannose	>160 (>80)	>160 (>80)	>160 (>80)	>160 (>80)
AmB + Ester de mannose	5.0 (>2.5)	1.25 (0.63)	>160 (>80)	1.25 (>0.32)

\* Effet de Eagle

### 3.2. Activation des macrophages péritonéaux par l'AmB:

Les macrophages péritonéaux sont des cellules à haut pouvoir tumoricide et microbicide. Lorsque stimulés, les macrophages deviennent plus fonctionnels et plus aptes à phagocyter à détruire des particules bactériennes ou à tuer des cellules tumorales. Dans la présente partie, nous verrons dans un premier temps, si le complexe AmB-Ester est susceptible d'amplifier directement *in vitro* l'activité antitumorale des macrophages résidents et inflammatoires envers les cellules tumorales SP<sub>2</sub> (cytostase) et dans un deuxième temps, nous verrons l'influence du mélange sur l'activation *in vivo* des macrophages par détermination *in vitro* de la sécrétion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 3.2.1. Activité antitumorale des macrophages:

La cytostase est une activité antitumorale qui consiste à inhiber la croissance des cellules tumorales. L'activité antitumorale i.e l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> n'a aucun rapport avec l'activité toxique de l'AmB comme il a été décrit dans la partie précédente. C'est une activité cytotatique spontanée et sans spécificité antigénique, médiée par les macrophages péritonéaux via la sécrétion d'un facteur toxique, le TNF (Tumor Necrosis Factor) ou la sécrétion d'autres substances toxiques ou inhibitrices comme le peroxyde d'hydrogène (Chung et Kim;1988). En absence d'AmB, on constate que les macrophages inhibent la croissance des cellules tumorales d'environ 20 % et que ni l'ester de mannose, ni l'AmB à des concentrations inférieures à 5 µg/mL n'affectent cette activité cytotatique. Lorsque l'AmB est ajouté aux puits-tests à des concentrations supérieures à 5 µg/mL, l'activité cytotatique est diminuée. Cette diminution est due au pouvoir toxique de l'AmB sur les cellules de mammifères. Cet effet toxique de l'AmB sur les macrophages péritonéaux est visible à la figure 15 par les deux courbes de prolifération de SP<sub>2</sub> en présence (+Mφ) et en absence (-Mφ) de macrophages qui se rejoignent aux concentrations supérieures à 5 µg/mL en AmB. Aux mêmes concentrations d'AmB, lorsque l'on ajoute l'ester de mannose (25 µg/mL), nous pouvons observer à la fois la protection de la viabilité des cellules tumorales et le maintien d'une activité cytotatique basale (20 à 40 %)

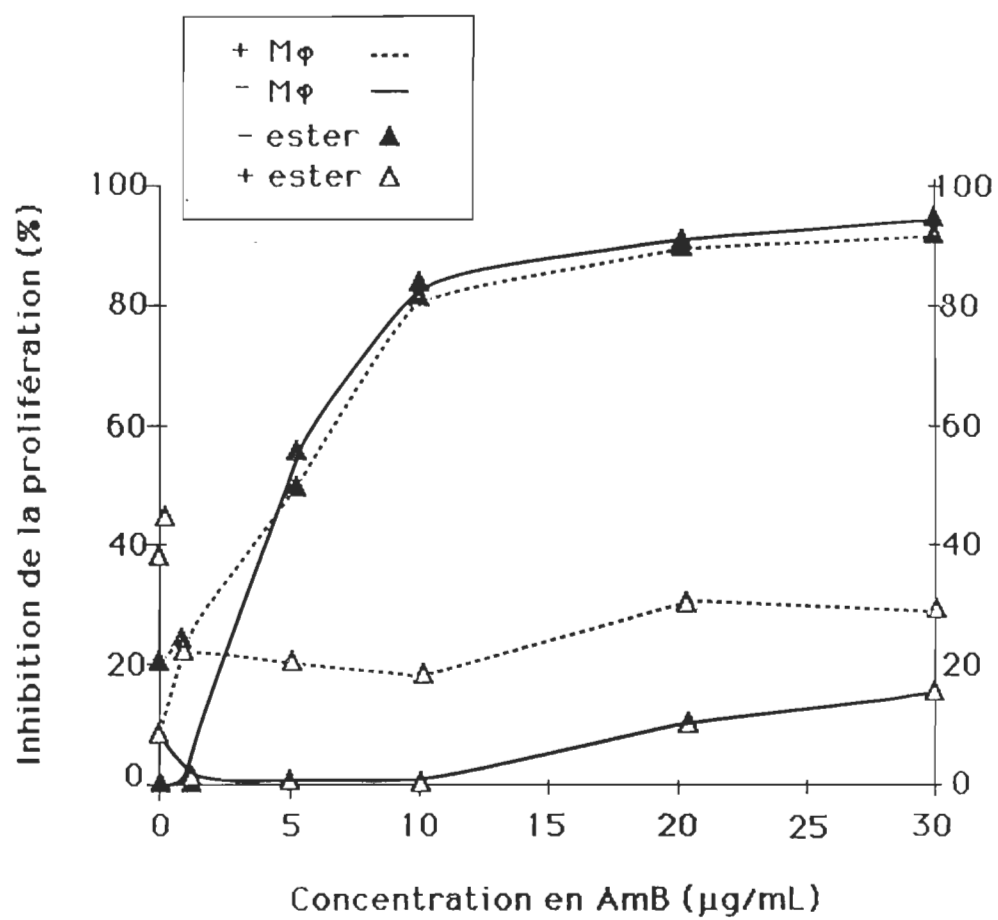


Figure 15. Contribution de l'AmB et des macrophages à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub>.



par les macrophages aux concentrations inférieures à 10  $\mu\text{g/mL}$  d'AmB. Aux concentrations supérieures à 10  $\mu\text{g/mL}$  i.e. à 20 et à 30  $\mu\text{g/mL}$  d'AmB, l'effet protecteur de l'ester complexé à l'AmB sur la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> diminue légèrement (10 à 20 %) alors qu'en présence de macrophages, on observe aucun changement. Ces résultats suggèrent que ni l'AmB, ni le complexe Ester-AmB n'augmentent le pouvoir cytostatique des macrophages vis à vis les cellules tumorales SP<sub>2</sub>. En fait, l'ester ne semble que maintenir l'activité des macrophages démontrant encore une fois l'effet protecteur de l'ester sur la toxicité de l'AmB envers les cellules de mammifères.

Compte tenu de ce fait, nous avons voulu vérifier si l'état de différenciation ou l'état de réceptivité du macrophage ou "Priming" pouvait influencer la réponse cytostatique et vérifier l'implication du mannose sur l'effet observé (Danley & Hilger;1981). Nous avons répété l'expérience en comparant cette fois-ci, les macrophages résidents (non stimulés *in vivo*) et les macrophages inflammatoires (stimulés *in vivo* avec du milieu thioglycollate), sachant que la stimulation au thioglycollate augmente le taux de récepteur du mannose à la surface des macrophages (Afroun et al; 1988). Ici, à la figure 16, nous avons l'activité cytostatique des deux types de macrophages en absence (traits pleins) et en présence (traits pointillés) de macrophages résidents ( $\Delta$ ) et inflammatoires ( $\blacktriangle$ ) sur toute la gamme des concentrations en AmB en présence d'ester de mannose (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Les résultats nous indiquent que l'activité cytostatique se maintient à un niveau basal en présence du mélange Ester-AmB et que cet effet est le même avec les deux types de macrophages. Donc les macrophages ne sont pas activés *in vitro* par l'AmB complexée à l'ester de mannose. Toutefois, l'activité cytostatique basale est maintenue en accord avec une baisse de la toxicité de l'AmB à l'égard des cellules de mammifères par l'ester de mannose (figure 17). L'inhibition de la prolifération causée par les macrophages indépendamment de la toxicité de l'AmB ou de l'ester est mieux exprimée par le  $\Delta$  cytostase. En résumé, lorsque l'AmB est complexée avec 25  $\mu\text{g/mL}$  d'ester de mannose (blanc), le  $\Delta$  Cytostase et le pourcentage de prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> sont maintenus constants et ce, sur toute la gamme des concentrations testées d'AmB alors que ces deux phénomènes sont diminués en présence de l'AmB seule (noir).

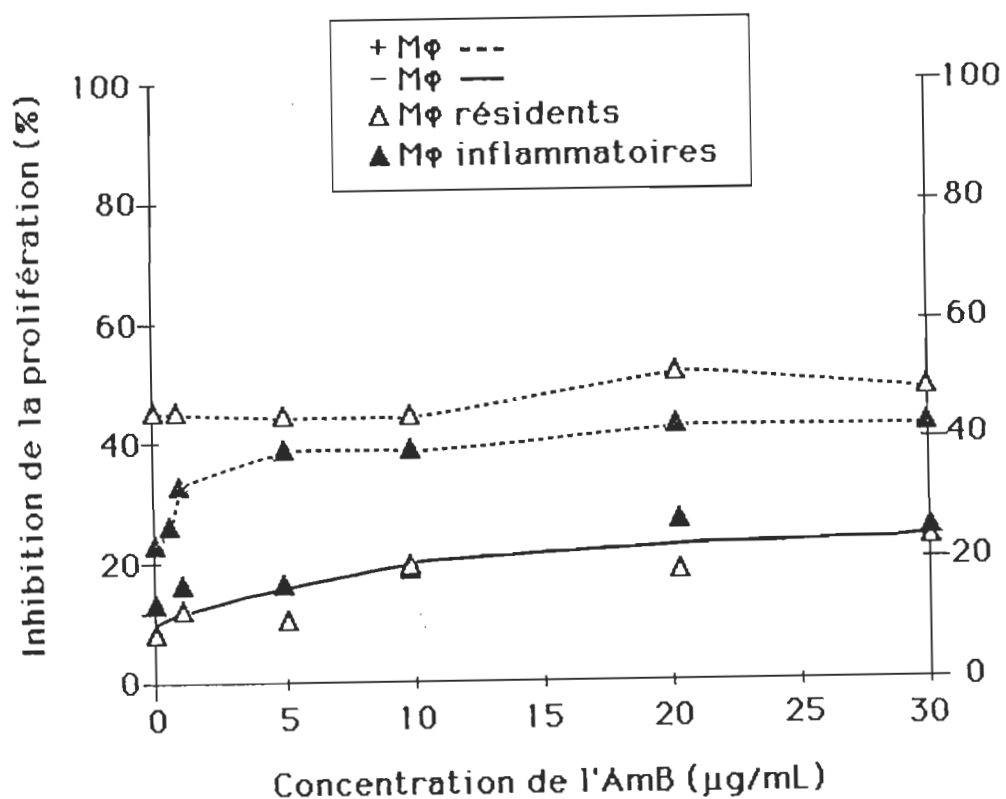


Figure 16. Contribution des macrophages inflammatoires et résidents à l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales SP<sub>2</sub> en présence d'AmB mélangée à l'ester de mannose (25 µg/mL).

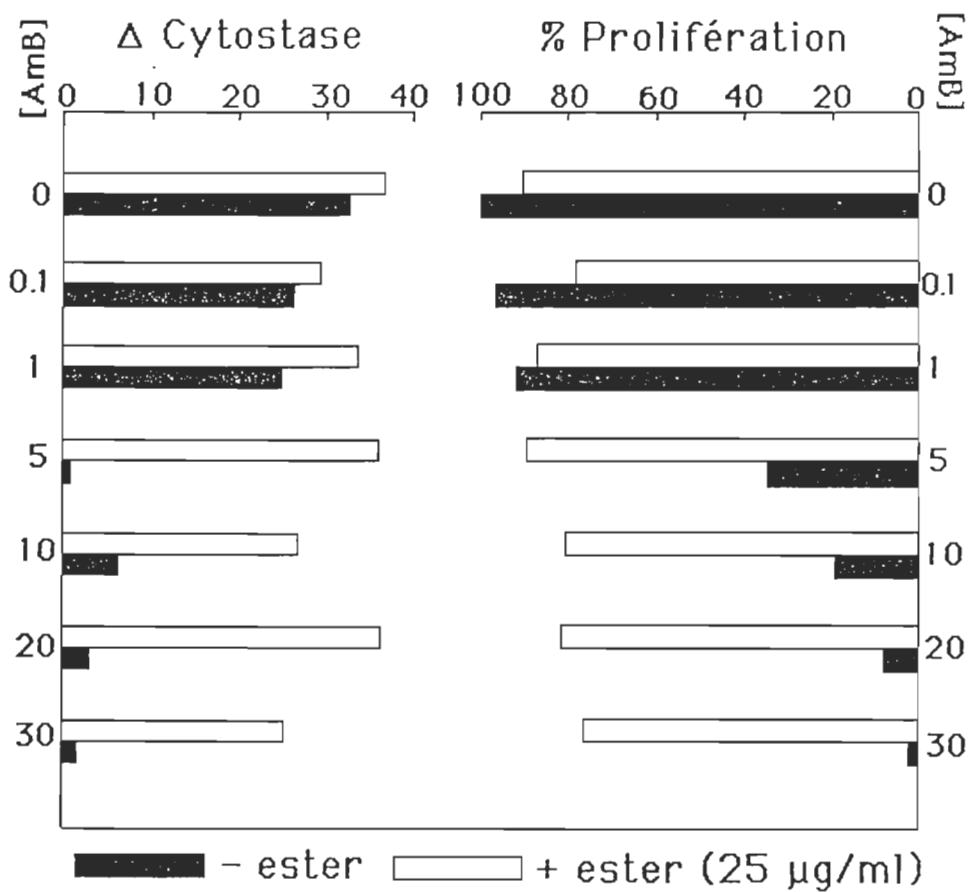


Figure 17. Effet de protection sur la viabilité des cellules de mammifères par la complexation de l'ester de mannose (25 µg/mL) à l'AmB.

### 3.2.2. Activité microbicide des macrophages:

L'AmB a été reconnue depuis peu comme une substance pouvant augmenter grandement l'activité microbicide des macrophages. *In vitro*, l'AmB à des concentrations inférieures à 2,5 µg/mL augmente différentes propriétés du macrophage (Vecchiarelli et al;1986) (Mc Harell et al;1983) (Stewart et al;1981) (Lin & Medoff;1977) et *in vivo*, (Wolf & Massof;1990) des doses intrapéritonéales de 0,5 mg stimulent la production de l'anion superoxyde par les macrophages péritonéaux. Dans ce même contexte, nous avons voulu vérifier si l'ester de mannose en mélange avec l'AmB pouvait avoir le même pouvoir d'activation sur les macrophages péritonéaux en injectant le polyène par voie intrapéritonéale. Pour évaluer ce potentiel activateur, nous avons prélevés des macrophages péritonéaux sur des souris préstimulées à l'AmB (AmB pure, Fungizone® et mélange AmB-ester de mannose) et sur des souris contrôles qui ont reçu le diluant, le DMSO dans une solution de Dextrose 5 % p/v stérile. Nous avons restimulé les cellules macrophagiques *in vitro* avec la PMA (Phorbol Myristate Acétate) pour induire la sécrétion de peroxyde d'hydrogène. Les différentes doses et les différentes formulations d'AmB furent données aux souris 24 heures avant les essais *in vitro* (tableau 3). Les résultats compilés de ces expériences nous indiquent que les macrophages stimulés *in vivo* à l'AmB sécrètent le peroxyde d'hydrogène de façon significativement plus importante que les macrophages non stimulés (contrôles DMSO). L'intensité de la sécrétion est fonction du temps d'exposition à la PMA ainsi que de la dose (figure 18). Les macrophages qui ont été exposés *in vivo* à l'AmB répondent plus activement à la PMA et sécrètent jusqu'à un maximum de 15 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pick et Kesari;1981). Les macrophages ayant été stimulés avec le mélange AmB-ester de mannose se comportent de la même manière que ceux qui ont été stimulés par l'AmB pure et le Fungizone®. Ce qui veut dire que l'AmB est le facteur déterminant de cette activation des macrophages et que, la complexation avec le DOC ou avec l'ester n'influence pas cette activation par le polyène. Ce manque d'effet positif de l'ester sur la stimulation des macrophages par l'AmB n'est pas la conséquence d'une toxicité du peroxyde d'hydrogène sécrété puisque dans tous les cas, la viabilité des macrophages était supérieure à 95 %.

Tableau 3. Sécrétion de peroxyde d'hydrogène par les macrophages *in vitro* après stimulation *in vivo* avec différentes formulations d'AmB.

STIMULATION IN VIVO	SECRETION DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μM)				
	STIMULATION IN VITRO (PMA 2 μg/mL) TEMPS (min.)				
	0	15	30	45	60
DMSO 1%	0.135	2.24 ± 1.7	2.95 ± 1.7	—	4.41 ± 2.2
DMSO 2%	0.146	4.07 ± 0.3	5.5 ± 0.64	6.3 ± 0.99	—
AmB 0.25 mg	0.037	9.58 ± 1.64*	13.4 ± 2.81*	15.9 ± 2.9*	—
AmB 0.50 mg	0.196	5.67 ± 1.8	8.02 ± 2.3*	9.62 ± 4.3*	—
AmB 1.0 mg <sup>a</sup>	—	7.81 ± 0.61*	12.1 ± 0.53*	15.6 ± 1.5*	—
Fungizone®					
0.25 mg	0.026	5.7 ± 0.59	8.77 ± 0.55*	11.71	—
0.50 mg	0.25	4.63 ± 0.46	7.6 ± 0.28*	—	14.4 ± 0.72*
1.0 mg	0.013	7.11 ± 0.23*	10.6 ± 1.08*	13.6 ± 1.14*	—
Mélange E/AmB					
8:1 <sup>b</sup>	0.15	4.3 ± 0.06	6.75 ± 0.33	—	9.3 ± 0.53
4:1 <sup>c</sup>	0.008	7.0 ± 2.97*	10.17 ± 2.81*	12.04 ± 1.7*	—
1.86:1 <sup>d</sup>	0.197	7.0 ± 1.57*	9.79 ± 2.12*	14.47 ± 0.97*	—
1:1 <sup>ae</sup>	0.026	6.74 ± 0.35*	9.96 ± 0.39*	11.56 ± 2.72*	—

\* différence statistique significative  $P < 0.005$  par rapport au contrôle DMSO.

a) contrôle DMSO 2% b) AmB= 0.5mg c) AmB= 0.25 mg d) AmB= 0.5mg

e) AmB= 1.0mg.

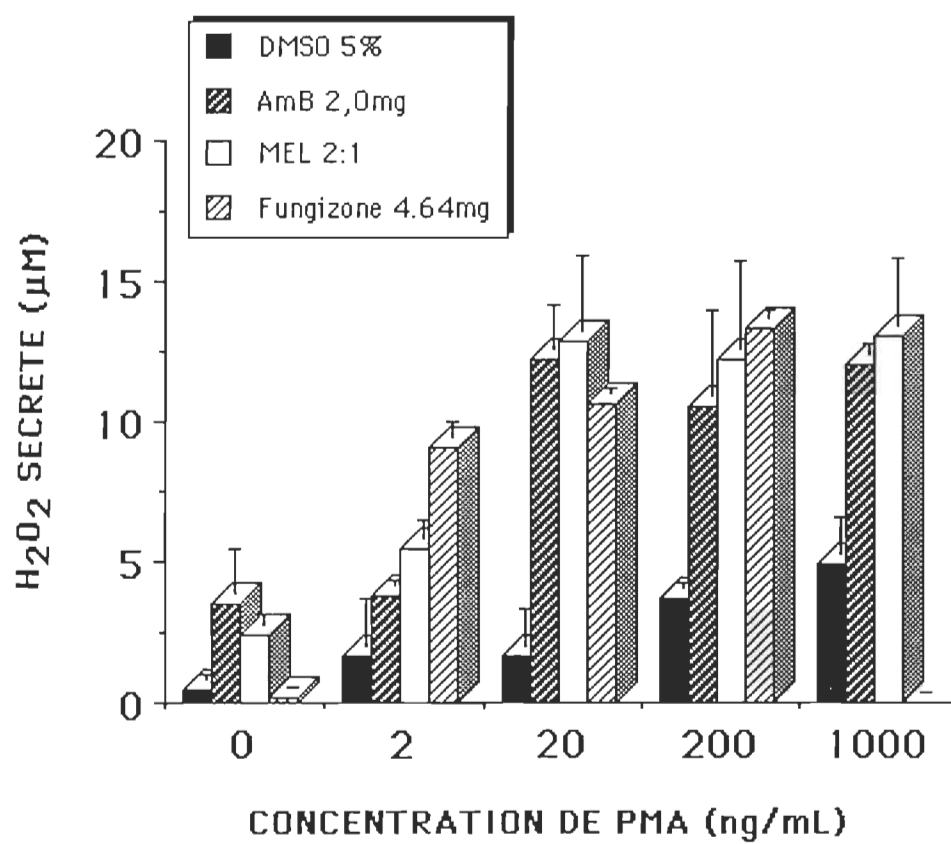


Figure 18. Sécrétion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux stimulés *in vivo* avec différentes préparations d'AmB en fonction de la concentration de PMA.

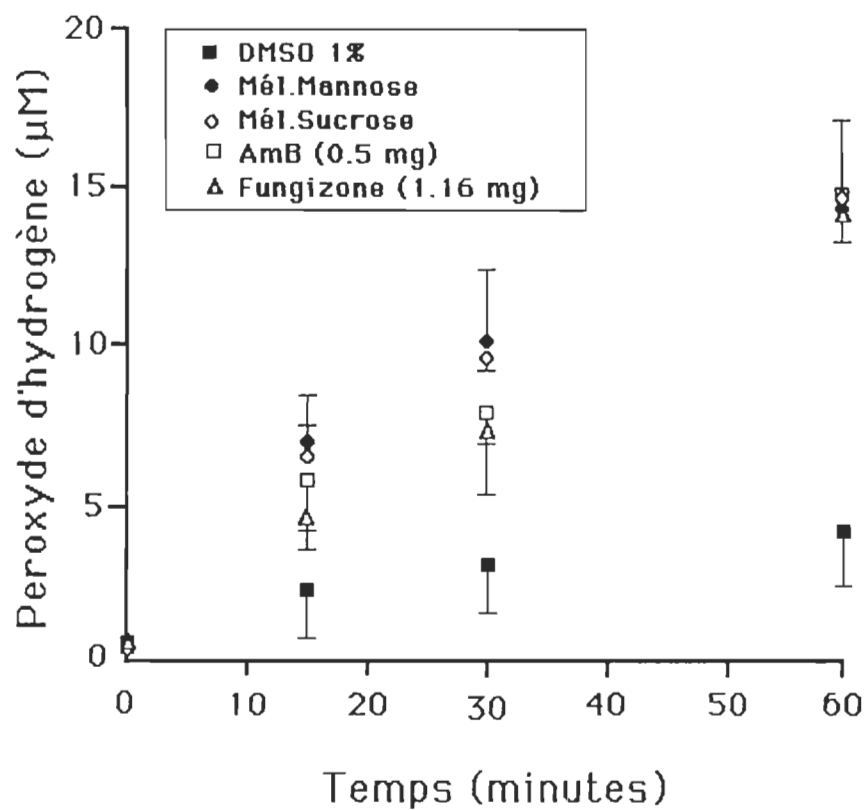


Figure 19. Influence d'un ligand mannosylé sur la sécrétion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux présensibilisés à l'AmB.

Tableau 4. Influence de l'ester de mannose en mélange avec des doses toxiques d'AmB sur la stimulation de la sécrétion de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux.

STIMULATION IN VIVO	SECRETION DE H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ( $\mu$ M)			MORTALITES avant 24 heures
	STIMULATION IN VITRO PMA (ng/mL)			
	0	2	200	
DMSO 5%	0.38 $\pm$ 0.185	0.33 $\pm$ 0.036	0.88 $\pm$ 0.056	P<0.05 0/4
AmB 4.0mg	0.43 $\pm$ 0.05	6.22 $\pm$ 1.057	10.97 $\pm$ 1.98	P<0.001 2/5
Mélange 2:1	0.522 $\pm$ 0.486	7.42 $\pm$ 1.30	13.49 $\pm$ 1.80	P<0.001 1/3
Mélange 0.5:1	0.576 $\pm$ 0.48	5.68 $\pm$ 1.15	17.45 $\pm$ 0.75	P<0.01 0/3
Fungizone ® 9.28 mg	0.284 $\pm$ 0.02	12.8 $\pm$ 1.096	16.05 $\pm$ 3.17	P<0.02 1/3
Ester de Mannose 3.2mg	0.712 $\pm$ 0.88	1.94 $\pm$ 0.19	3.16 $\pm$ 0.34	P<0.05 0/2
Ester de Mannose 0.8mg	1.131 $\pm$ 0.151	2.41 $\pm$ 0.76	3.17 $\pm$ 0,15	P<0.005 0/2

Résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de 2-3 expériences les plus significatives.

Stimulation in vitro: 30 minutes en durée.

Test de T: stimulation à PMA (200 ng/mL) par rapport à leur contrôle milieu respectif.

Mortalités sur le nombre total d'expériences.



Donc, les macrophages sont plus activés et plus microbicides après une exposition *in vivo* au polyène. Pour vérifier l'effet d'un ligand mannosylé sur l'activation des macrophages, nous avons aussi testé le mélange AmB-ester de sucrose (figure 19). Les deux types de mélange, (mannose et sucrose) en proportion molaire de 2:1 stimulent les macrophages à sécréter d'importantes quantités de  $H_2O_2$  lorsqu'exposés *in vitro* à une concentration de PMA de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Les résultats obtenus pour ces deux types de mélange ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec le Fungizone® et l'AmB pure à la même dose. L'activation du potentiel microbicide des macrophages semble donc être une conséquence de la stimulation à l'AmB car ni la complexation de l'AmB à un ester de sucre (mannose et sucrose) ni la complexation au détergent DOC ne modifie l'intensité de cette réponse. Ces résultats semblent confirmer le rôle négligeable du mannose sur le ciblage du polyène vers les macrophages.

A la suite de ces expériences, nous avons choisi de tester des doses toxiques d'AmB afin de vérifier l'effet protecteur de l'ester de mannose dans ce même contexte *in vivo*. Nous avons injecté par voie intrapéritonéale des doses de 4,0mg d'AmB (200 mg/kg). A ces concentrations, les souris présentaient des symptômes associés à la toxicité des formulations. Nous avons d'ailleurs obtenu quelques mortalités dans tous les groupes traités: 2/5 pour l'AmB, 1/3 pour le Fungizone® et le mélange ester-AmB et 2/2 avec le DOC seul. Ici aussi, les résultats montrent que l'AmB est seule responsable de la stimulation de la sécrétion de peroxyde d'hydrogène induite par la PMA.

### 3.3. Influence de l'ester de mannose sur les propriétés physiques et physiologiques de l'AmB:

Nous avons voulu vérifier en collaboration avec l'équipe du Dr Ilona Gruda, comment l'ester de mannose modifie les spectres UV de l'AmB et de quelle manière il influence les propriétés physiologiques de l'AmB *in vivo* à une dose toxique de 4.4 mg/kg.

### 3.3.1. Influence de l'ester de mannose sur l'état physique de la molécule d'AmB:

Par l'analyse des spectres UV de l'AmB, nous pouvons observer d'importantes modifications spectrales associées à la présence de l'ester de mannose et au sérum de veau (FCS). A la figure 20, en absence de sérum de veau, l'AmB seule est très fortement agrégée tel qu'indiqué par une absorbance de forte intensité dans la région 330-350 et par la présence du pic à 421 nm. Cependant, en complexe avec l'ester, un pic à 416 nm apparaît, indiquant la formation d'un complexe. En présence de sérum de veau (figure 21), le spectre de l'AmB seule change de façon importante. On observe une diminution des agrégats et la formation d'un complexe absorbant à 415 nm alors que, dans les mêmes conditions, le FCS influence peu le spectre du complexe Ester-AmB. Ces résultats suggèrent que l'association de l'ester de mannose à l'AmB diminue possiblement l'interaction du polyène avec d'autres constituants comme les lipoprotéines présentes dans le sérum de veau.

### 3.3.2. Influence de l'ester de mannose sur la toxicité aiguë de l'AmB:

A la figure 22, les résultats préliminaires de toxicité aiguë sont présentés. La dose utilisée (4.4 mg/kg) de Fungizone® ou d'AmB complexée à l'ester de mannose est une dose extrêmement toxique pour les souris. Cette dose donnée en injection intraveineuse sous forme d'AmB pure provoque la mort dans les minutes suivant l'injection. La mesure du taux de survie en fonction du temps nous permet donc d'estimer une toxicité aiguë pour ces deux formulations. Après 4 jours, on constate qu'il n'y a pas de différences entre la toxicité aiguë du complexe Ester-AmB et celle du Fungizone®. On observe par contre, plus de survivants dans les premières 48 heures avec le complexe Ester-AmB. Compte tenu du fait que ces résultats proviennent d'un petit échantillon (dix souris), ils ne peuvent qu'être interprétés comme l'indication d'une tendance protectrice de l'ester sur la survie de l'organisme.

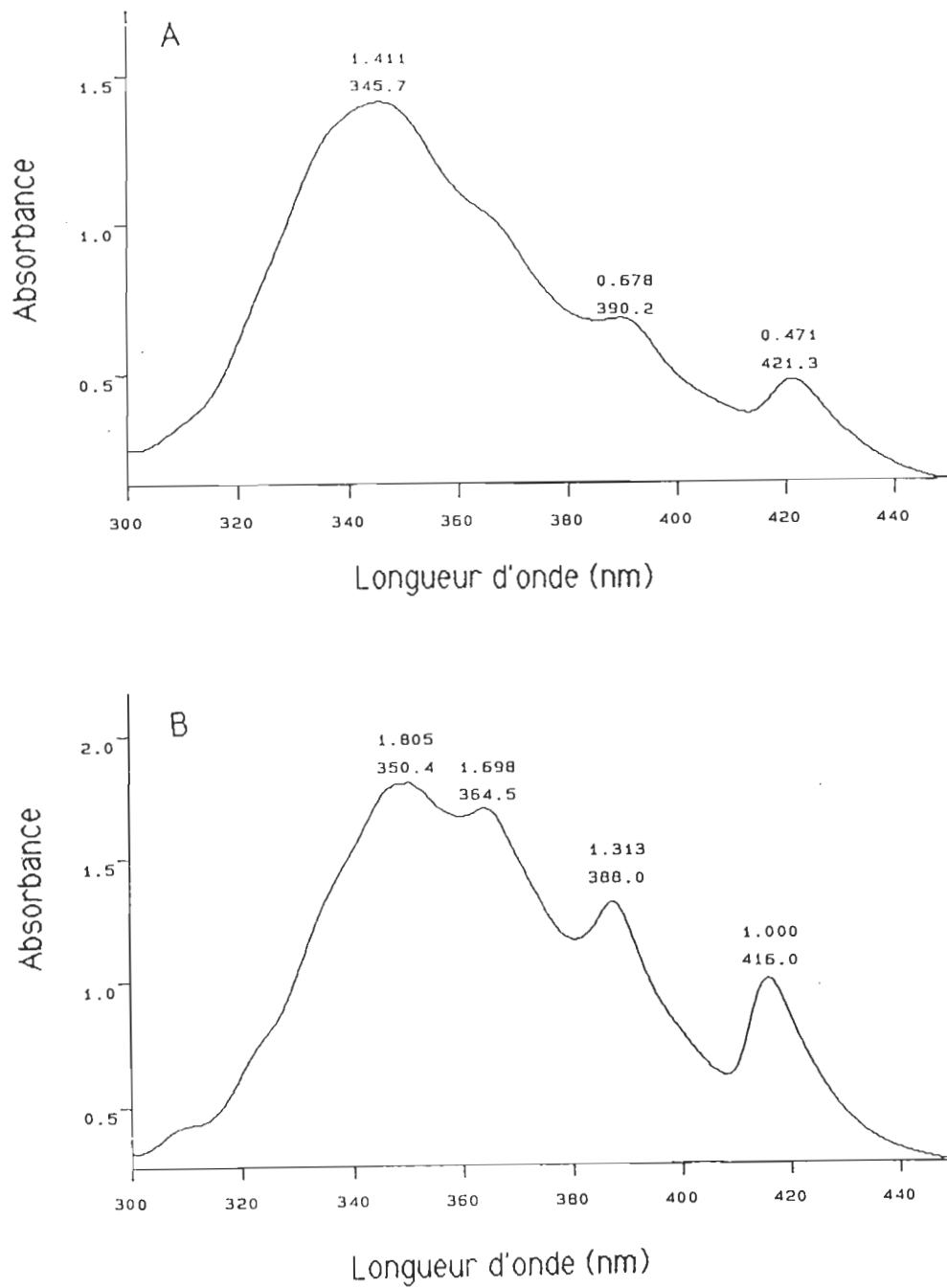


Figure 20. Spectres d'absorption de l'AmB ( $4 \times 10^{-5} M$ ) dans une solution aqueuse de dextrose 5% A) AmB seule B) mélange Ester/AmB (2:1).

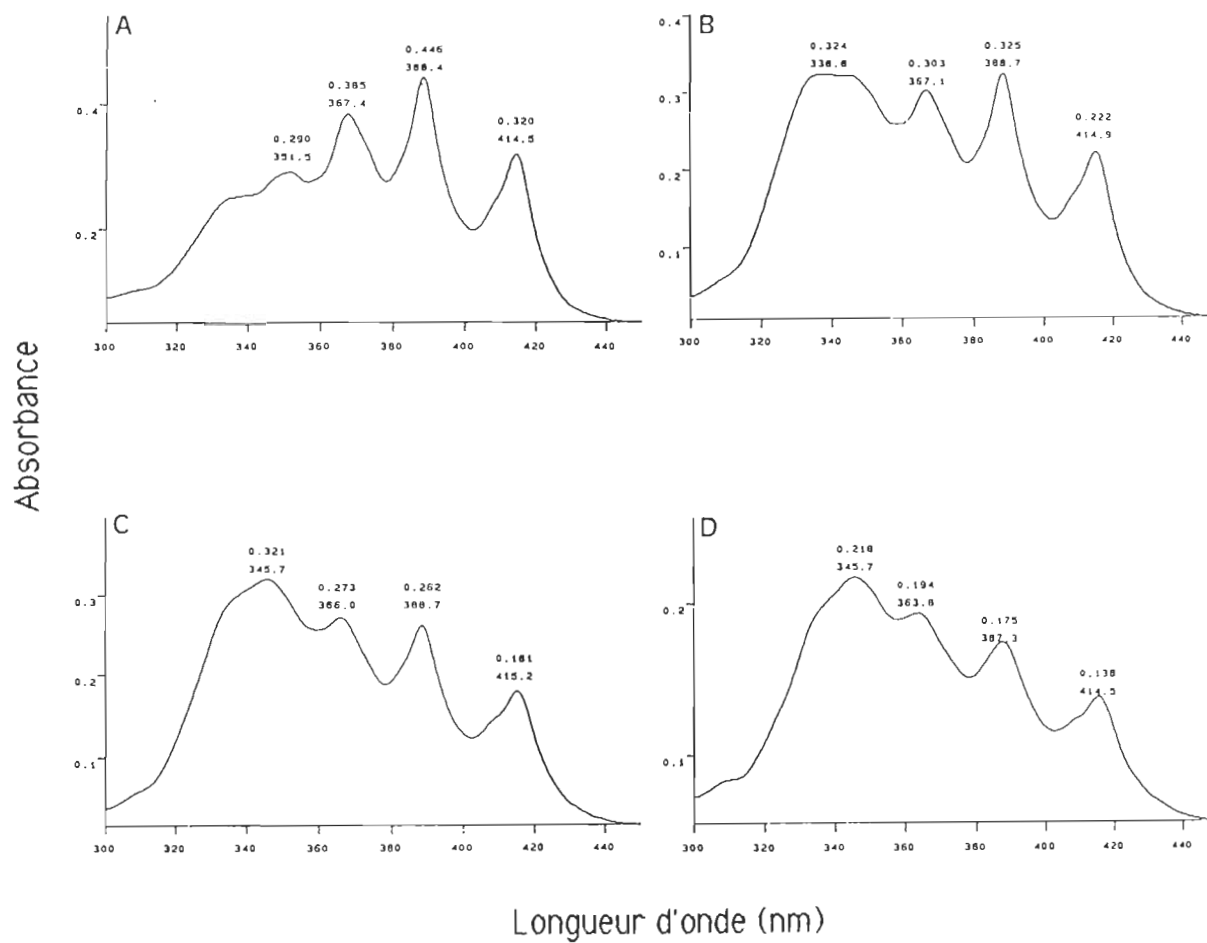


Figure 21. Spectres d'absorption de l'AmB en présence de 10 % de FCS A) AmB seule ( $4 \times 10^{-5}$  M) et B) C) D) Ester/AmB (1:1) (2:1) (10:1).

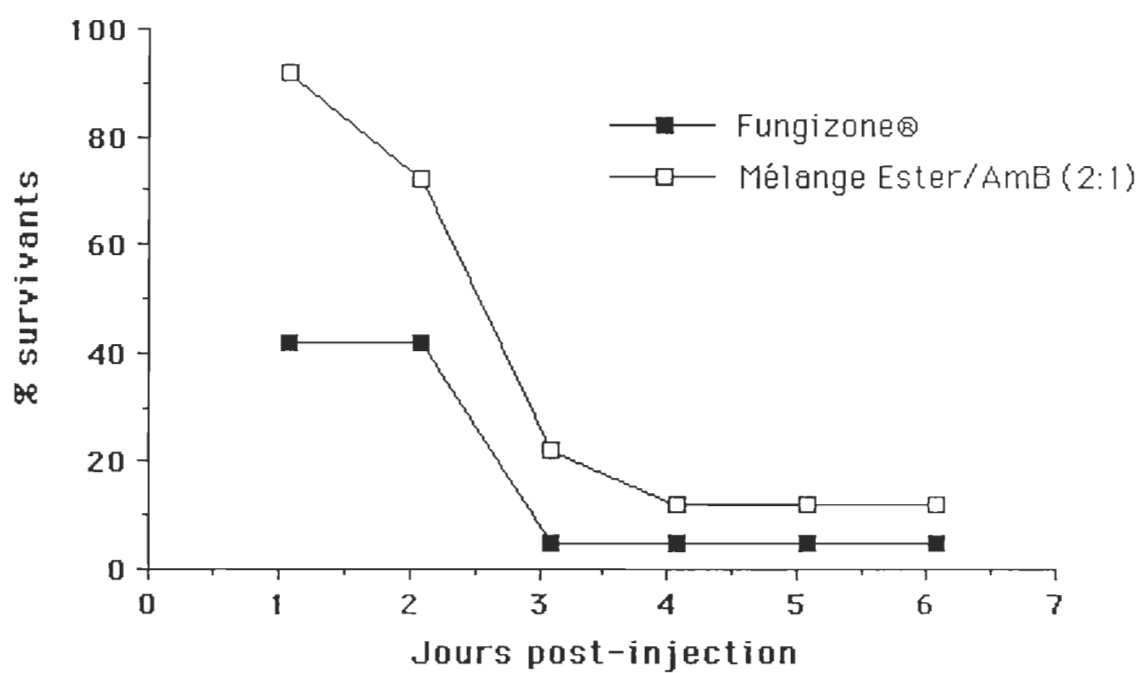


Figure 22. Toxicité *in vivo* de l'AmB (Fungizone®) (4,4 mg/kg) et du mélange Ester/AmB (2:1).

## DISCUSSION

Un des principaux aspects concluants qui émanent de cette étude, est que l'AmB sous la forme complexée au palmityl mannose est moins toxique à l'égard des cellules de mammifères que la forme libre et la forme commerciale. Cette diminution de toxicité a été démontrée *in vitro* sur deux types de cellules de mammifères et s'exprime d'une part, en terme de prolifération pour les cellules tumorales SP<sub>2</sub> et d'autre part, par le maintien des fonctions cytotostatiques des macrophages. La complexation du palmityl mannose à l'AmB diminue en moyenne d'un facteur de 10, la toxicité du polyène. L'effet du palmityl mannose sur le changement de la toxicité de l'AmB est comparable sinon équivalent à celui apporté par les phospholipides dans la forme liposomale (Mehta et al;1985). Une concentration supérieure à 2,5 µg/mL d'AmB ( Mehta et al; 1985) ( Chia et Pollack;1986) induit la perte des fonctions et entraîne la mort de la plupart des cellules murines, effets toxiques qui peuvent être considérablement réduits en présence du palmityl mannose. Lorsque complexé à l'AmB, l'ester permet à ces mêmes cellules de tolérer tout en demeurant pleinement fonctionnelles, des doses pouvant aller jusqu'à 30 µg/mL. L'effet protecteur sur les cellules de mammifères repose sur une juste proportion des quantités d'ester et d'AmB, i.e le rapport molaire dans lequel les deux constituants se trouvent complexés dans la préparation. Notre modèle expérimental nous a permis de démontrer qu'un rapport de deux molécules d'ester pour une molécule d'AmB diminue de façon optimale la cytotoxicité de l'AmB envers les cellules tumorales SP<sub>2</sub>. Ces résultats mettent en relief le rôle d'une association Ester-AmB sur la modification de l'état physique du composé antifongique et de ses capacités d'interaction avec ses principales cibles d'action, les stéroïdes membranaires. Ces faits démontrés sur les cellules de mammifères s'apparentent aux phénomènes observés par spectroscopie UV où l'on constate que la présence de constituants sériques affecte considérablement le profil spectral de l'AmB libre alors qu'elle influence de façon négligeable celui de l'AmB complexée à l'ester.

Hélas, cette influence protectrice de l'ester de mannose sur le changement du comportement toxique de l'AmB se répète aussi envers les cellules fongiques bien que son pouvoir fongistatique ne soit pas altéré voire même augmenté. Comparativement à l'AmB libre et au Fungizone®, la complexation de l'ester à l'AmB entraîne une diminution de son pouvoir fongicide de 12,5 fois envers *S. cerevisiae* et jusqu'à 25 fois dans le cas de *C. albicans*. Cette constatation, à première vue, semble vouloir indiquer qu'en matière de toxicité sélective, on ne peut parler *a priori* d'un gain net pour le complexe Ester-AmB. Mais, d'autres considérations nous portent à croire que, la baisse du pouvoir fongicide attribuée à la présence de l'ester n'est pas alarmante et ne constitue pas un argument permettant de conclure quant à son efficacité thérapeutique. Une perte similaire du pouvoir fongicide a été observée pour la préparation liposomale qui, pourtant, représente actuellement la forme la plus thérapeutiquement efficace (Ralph et al;1991). De plus, les concentrations fongicides trouvées pour le complexe Ester-AmB demeurent en deça des limites acceptables pour la cure antimycotique chez l'humain, l'organisme pouvant facilement tolérer des concentrations plasmatiques de 10 µg/mL d'AmB libre (Hoeprich et Huston;1975) (Blanke et al;1977) (Collette et al; 1990). Or, la CMF trouvée pour venir à bout de *C. albicans*, la souche de levure la plus couramment rencontrée dans les mycoses, est de 5 µg/mL.

Les effets toxiques de l'AmB libre ne se limitent pas qu'aux micomycètes mais ont des répercussions majeures sur l'ensemble des fonctions de l'organisme y compris celles qui assurent la défense naturelle contre ces microorganismes pathogènes (McCurdy et al;1968) (Ferrante et al;1979) (Stewart et al;1981). Or, le maintien des fonctions défensives est un atout non négligeable et ne peut qu'être bénéfique pour l'hôte, lui permettant d'accroître ses chances de guérison et sa résistance aux infections. C'est d'ailleurs en partie pour ces bienfaits qu'on attribue à la préparation liposomale d'AmB toutes ses lettres de noblesse (Ahmad et al; 1989) (Mc Harrell et al;1973). Comme la principale ligne de défense antimicrobienne est assurée par les macrophages, une altération des fonctions macrophagiques serait donc préjudiciable à l'acquisition d'une résistance à l'infection. Il a été démontré que des faibles doses d'AmB, inférieures à 2,5 µg/mL, activent les macrophages (McHarell et al;1973). A des doses supérieures, les macrophages perdent progressivement leur propriété d'adhérence et leur viabilité est sérieusement

compromise. Un très faible écart sépare donc les doses stimulantes des doses létales. Par contre, en présence d'ester, on observe le maintien de la viabilité et des fonctions macrophagiques jusqu'à une concentration de 30 $\mu$ g/mL. Ainsi, l'amélioration apportée par l'ester de mannose constitue donc un point positif à l'augmentation de l'indice thérapeutique de l'AmB.

Deux propriétés des macrophages ont été analysés en présence des différentes formulations d'AmB et dans deux contextes d'expérimentation différents: *in vitro* et *in vivo*. Comme il a été souligné ci-dessus, le complexe Ester-AmB permet le maintien de l'activité cytostatique des macrophages mais ne les stimule pas. Bien qu'il induise l'augmentation de la sécrétion de peroxyde d'hydrogène, cette sécrétion n'est cependant pas significativement différente de celle induite par l'AmB libre et le Fungizone®. Le manque de stimulation des macrophages *in vitro* s'explique possiblement par l'absence d'un facteur de costimulation des macrophages normalement retrouvé *in vivo*. Cette hypothèse est basée sur plusieurs observations qui soulignent l'importance des lymphocytes dans le processus d'activation des macrophages (Chapman et Hibbs;1977) (Storm et al;1991). En présence de lymphocytes ou d'un facteur élaboré et sécrété par eux (ex:IFN- $\gamma$ ), les macrophages sensibilisés à l'AmB deviennent plus tumoricides envers plusieurs types de cellules tumorales. Cette augmentation de la tumoricidie se traduit par la production accrue de TNF- $\alpha$  et de peroxyde d'hydrogène, deux produits de sécrétion des macrophages auxquels les cellules tumorales sont particulièrement sensibles (Collart et al;1986) (Adams et al;1981) (Chen et al;1987) (Klostergaard et al;1990). De plus, l'interféron-gamma est capable de mimer la présence des lymphocytes et de contribuer à l'augmentation du pouvoir microbicide des macrophages contre *C. albicans* (Brummer et Stevens;1989) (Lin et Medoff;1977). Mais, les résultats de cette étude *in vitro* ne permettent pas de conclure qu'une activation des lymphocytes par l'AmB précède celle des macrophages.

Les études menées sur la sécrétion de peroxyde d'hydrogène témoignent du manque d'effet positif de l'ester de mannose sur l'activation des macrophages et sur la toxicité de l'AmB. Quelle que soit la forme administrée au souris, la réponse faite par les macrophages est attribuable à la présence du polyène seulement.



L'effet bénéfique de l'ester a été néanmoins observé sur la qualité des exsudats péritonéaux obtenus suite à la sensibilisation avec les différentes préparations d'AmB. Il a été possible d'observer une différence dans l'inflammation locale en présence d'AmB complexée à l'ester, telle qu'indiquée par le nombre de cellules recueillies qui est deux fois moindre à celui de l'AmB libre.

Dans cette même étude, il est impossible de conclure sur l'importance du mannose quant au ciblage des complexes vers les macrophages (Vecchiarelli et al;1991). Le sucre mannose devait permettre de diriger l'AmB vers les macrophages afin de favoriser la phagocytose des complexes par l'intermédiaire de leur récepteur spécifique pour ce sucre (Shepherd et al;1990) (Afroun et al;1988) (Chung et Kim;1988) (Stahl et Gordon;1982). Des effets semblables au palmityl mannose sur la sécrétion de peroxyde d'hydrogène ont été obtenus pour la molécule apparentée, le palmityl sucrose. La question du ciblage de l'AmB par le mannose reste donc en suspens. Le modèle expérimental le plus approprié pour démontrer l'avantage de ce sucre serait un modèle d'infection fongique murin ou une étude sur la phagocytose des complexes (Tremblay et al;1984).

Les résultats obtenus en toxicité aiguë, bien que préliminaires, révèlent à nouveau les bienfaits de la complexation de l'AmB à l'ester. Les souris survivent en plus grand nombre dans les courts délais suivant l'injection de doses massives d'AmB complexée à l'ester que les souris injectées au Fungizone®. Mais cette survie n'est pas prolongée démontrant ainsi la toxicité non négligeable du complexe Ester-AmB sinon équivalente à celle observée pour le Fungizone®.

Sans prétendre que l'ester de mannose constitue le substitut idéal au Fungizone®, il possède toutefois sur la formulation actuelle des avantages certains tels que confirmé par la toxicité diminuée sur les cellules de mammifères. Il permet de conserver une gamme de concentrations acceptables pour le maintien des fonctions défensives de l'organisme en élargissant le spectre des doses thérapeutiques. Mais, l'intérêt qu'il présente, réside principalement en ce qu'il peut apporter des éléments nouveaux à une meilleure compréhension des mécanismes à la base de l'interaction entre l'AmB et les cellules laquelle va, par la suite, permettre le développement de nouvelles formulations plus efficaces et moins toxiques.

Il a été récemment démontré que les molécules surfactantes favorisent la monomérisation de l'AmB et, conséquemment, l'augmentation de la toxicité sélective (Brajtburg et al;1989) (Tancredi et al;1990) (Gruda et al;1991). Il en est cependant pas le cas pour notre étude puisque le palmityl mannose n'induit aucune monomérisation de l'AmB aux proportions molaires où la diminution de toxicité envers les cellules de mammifères a été appréciée. Des raisons, autres que la seule monomérisation semblent donc être impliquées dans la diminution de la toxicité du polyène. Sur la base des résultats spectroscopiques très limités obtenus en présence de sérum de veau, supportés par des résultats plus complets obtenus ultérieurement dans le laboratoire, il est proposé que la diminution de la toxicité de l'AmB est reliée à la forte affinité de l'ester pour l'AmB qui modifie l'affinité de l'AmB pour les stérols en général et en particulier, le cholestérol.

De façon générale, on peut conclure que cette étude sur l'AmB a permis de montrer que la complexation de l'AmB à un surfactant glycosylé, tel le palmityl mannose engendre une altération des propriétés toxiques et fongicides de l'AmB sans modifier son pouvoir fongistatique sur les levures et son effet immunoadjuvant sur les macrophages. Ce changement des propriétés toxiques de l'AmB est conséquent à un changement de ses capacités d'interaction avec les stérols (Barwicz et al;1991).

## CONCLUSION

Nous avons analysé l'influence de l'ester de mannose sur diverses propriétés biologiques de l'amphotéricine B. Cette analyse nous a permis de constater que l'ester diminue la toxicité de l'AmB à l'égard des cellules de mammifères comme à l'égard des levures. Par contre, en présence de l'ester, les propriétés inflammatoires de l'AmB sont conservées, les propriétés immunoadjuvantes sont maintenues alors que les propriétés fongistatiques sont soit maintenues, soit augmentées. De plus, la complexation à l'ester ne semble pas augmenter la sélectivité de l'AmB envers l'ergostérol des levures mais plutôt engendrer la diminution générale des interactions AmB-stérols à laquelle serait reliée la diminution du potentiel toxique envers les cellules de mammifères comme envers les cellules fongiques. Ces effets sont dans un sens comparables à ceux observés avec la forme liposomale de l'AmB (L-AmB), la forme la plus thérapeutiquement efficace présentement disponible. Dans le cas de la L-AmB, il semble que cette diminution de toxicité envers les cellules de l'hôte, même accompagnée d'une toxicité directe diminuée chez les levures constituerait un aspect non-négligeable des bienfaits thérapeutiques de cette formulation particulière d'AmB. Compte tenu des résultats obtenus avec le complexe palmityl mannose-AmB, une situation analogue est envisageable. Ainsi, cette formulation, en assurant le maintien des fonctions défensives de l'organisme, pourrait contribuer à augmenter la résistance de l'hôte à l'infection.

## BIBLIOGRAPHIE

Adams, D.O., W. J. Johnson, E. Fiorito and C.F. Nathan.1981. Hydrogen peroxide and cytolytic factor can interact in effecting cytolysis of neoplastic targets. J.Immunol. 127:1973-1977.

Ahmad, I., A. K. Sarkar and B. K. Bachhawat.1989. Design of liposomes to improve delivery of amphotericin-B in the treatment of aspergillosis. Mol.Cell.Biochem. 91:85-90.

Afroun, S., J.P. Tenu and G. Lemaire. 1988. Modifications of glycosylation patterns in macrophages upon activation. Biochim.Biophys.Acta.971:137-147.

Andreoli, T. E., 1974. The structure and function of Amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. Annals N.Y.Acad.Sc.235:448-468.

Asselineau, J. 1955. Sur l'estérification partielle par l'acide palmitique du glucoside de méthyle et du glucose. Soc.Chem. 5e série:62-69

Asselineau, J., et J. P. Zalta.1973. Les antibiotiques: Structures et exemples de mode d'action, Hermann. pp.84-88.

Barwicz, J., R.Gareau, A. Audet, A. Morisset, J. Villiard and I. Gruda. 1990. Inhibition of the interaction between lipoproteins and Amphotericin B by some delivery systems. Biochem.Biophys.Res.Com. 181:722-728.

Bass, D. A., J. W. Parce, L. R. Dechatelet, P. Szejda, M. C. Seeds and M. Thomas. 1983. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. J.Immunol. 130(4):1910-1917.

Bennett, J. E., G. J. Hill II, W. T. Butler and C. W. Emmons. 1963. Correlation of particle size of intravenous Amphotericin B with toxic and chemotherapeutic effects. Antimicrob.Agents Chemoth.:745.

Bernaudin, F., J. Hathorn, R. Schaufele and P. A. Pizzo. 1987. Effet *in vivo* de l'amphotéricine B sur le chimiotactisme des polynucléaires et des "Large Granular Lymphocytes" à activité "Natural Killer" Pathologie Biologie.35:1403-1407.

Bindschadler, D. D., and J. E. Bennett.1969. A pharmacological guide to the clinical use of Amphotericin B. J.Infect.Dis.120:427-435.

Blanke, T. J., J. R. Little, S. F. Shirley, and R. G. Lynch. 1977. Augmentation of murine immune responses by amphotericin B. Cell.Immunol. 33:180-190.

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

Brajtburg, J., S. Elberg, K. B. Schechtman and G. Medoff. 1990. Lysis of human promyelocytic HL-60 cells by amphotericin B in combination with 2-chloroethyl-1-nitrosoureas: role of the carbamoylating activity of nitrosoureas. Cancer Res.30:3274-3278.

Brajtburg, J., I. Gruda, I. Daigle and G. Medoff. 1989. Concentration dependent dual effect of the monolauryl ester of sucrose on the antifungal activity and absorption spectra of amphotericin B (Fungizone). Biochim.Biophys.Acta. 985:307-312.

Brajtburg, J., S. Elberg, J. Bolard, G. S. Kobayashi, R. A. Levy, R. E. Ostlund Jr, D. Schlessinger and G. Medoff. 1984. Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. J.Infect.Dis.149(6):986-997.

Briand, Y. M., 1986. Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques, Biologie moléculaire 6. Masson. pp. 313-323.

Brummer, E., and D. A. Stevens. 1989. Candidacidal mechanisms of peritoneal macrophages activated with lymphokines or  $\gamma$ -interferon. J.Med.Microbiol.28:173-181.

Chapman, H. A Jr, and J. B. Hibbs Jr. 1978. Modulation of macrophage tumoricidal capability by polyene antibiotics: Support for membrane lipid as a regulatory determinant of macrophage function. Proc.Natl.Acad.Sci. 75(9):4349-4353.

Chapman Jr, H. A. and J. B. Hibbs Jr. 1977. Macrophage tumor killing: Influence of the local environment. Science 197:279-282.

Chapman Jr, H. A. and J. B. Hibbs Jr. 1977. Modulation of macrophages tumoricidal capability by components of normal serum: a central role of lipid. Science 197:282-284.

Chia, J. K. S. and M. Pollack. 1989. Amphotericin B Induces tumor necrosis factor production by murine macrophages. J.Infect.Dis. 159(1):113-116.

Chen, L. Y. Suzuki and E. F. Wheelock. 1987. Interferon- $\gamma$  synergizes with tumor necrosis factor and interleukin-1 and requires the presence of both monokines to induce antitumor cytotoxic activity in macrophages. J.Immunol. 139:4096-4101.

Chung, T., and Y. Kim. 1988. Two distinct cytolytic mechanisms of macrophages and monocytes activated by phorbol myristate acetate. J.Leukocyte Biol44:329-336.

Clark, J. M., R. R. Whitney, S. J. Olsen, R. J. George, M. R. Swerdel, L. Kunselman, and D. P. Bonner. 1991. Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in Mice. Antimicrob.Agents Chemoth. 35(4):615-621.

Collart, M.A., D. Belin, J. D. Vassalli, S. de Kossodo and P. Vassalli. 1986. Interferon enhances macrophages transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin-1 and urokinase genes, which are controlled by short lived repressors. J.Exp.Med. 164:2113-2118.

Collette, N., P. Van der Auwera, A. P. Lopez, C. Heymand and F. Meunier. 1989. Tissue concentrations and bioactivity of amphotericin B in cancer patients treated with amphotericin B-deoxycholate. Antimicrob.Agents Chemoth. 33(3):362-368.

Czerwinski, A., T. Zieniawa and E. Borowski. 1990. Amphotericin B 2-morpholinoethylamide diaspertate, a new water soluble derivative of the antibiotic synthesis and biological properties. J.Antibiotics. XLIII (6):680-683.

Danley, D.L., and A. E. Hilger. 1981. Stimulation of oxidative metabolism in murine polymorphonuclear leucocytes by unopsonized fungal cells: evidence for a mannose-specific mechanism. J.Immunol. 127(2):551-556.

De Kruijff, B., W. J. Gerrtsen, A. Oerlemans, R. A. Demel and L. L. M. Van Deenen. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawi* cells and lecithin liposomes. I: Specificity of the membrane permeability changes induced by polyene antibiotics. Biochim.Biophys Acta339:30-43.

De Kruijff, B., W. J. Gerrtsen, A. Oerlemans, R.A. Demel and L.L.M. Van Deenen. 1974. Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawi* cells and lecithin liposomes.II: Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. Biochim.Biophys Acta339:44-56.

Deuticke, B., M. Kim, and Chr. Zöllner. 1973. The influence of amphotericin B on the permeability of mammalian erythrocytes to non electrolytes, anions and cations. Biochim.Biophys.Acta. 318:345-359.

Ferrante, A., B. Rowan-Kelly, and Y. H. Thong. 1979. Suppression of immunological responses in mice by treatment with amphotericin B. Clin.Exp.Immunol. 38: 70-76.

Fidler, I.J. and A. J. Schroit. 1988. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered selfs. Biochim.Biophys.Acta. 948:151-173.

Fields, B. T., J. H. Bates and R. S. Abernathy. 1971. Effects of rapid intravenous infusion on serum concentrations of amphotericin B. Appl.Microbiol. 22:615-617.

Gigliotti, F., J. L. Shenep, L. Lott and D. Thornton. 1987. Induction of prostaglandin synthesis as the mechanism responsible for the chills and fever produced by infusing amphotericin B. J.Infect.Dis. 156(5):784-789.

Gordon, S. 1986. Biology of the macrophage. J.Cell.Sci.Suppl. 4:267-286.

Gottlieb, D., H. E. Carter, J. H. Slonekar, and A. Ammann. 1958. Protection of fungi against polyene antibiotics by sterols. Science 128:361.

Gruda, I., D. Milette, M. Brother, G. S. Kobayashi, G. Medoff and J. Brajtburg. 1991. Structure-activity study of inhibition of amphotericin B (Fungizone) binding to sterols, toxicity to cells, and lethality to mice by esters of sucrose. Antimicrob.Agents Chemoth. 35(1):24-28.

Gruda, I., E. Gauthier, S. Elberg, J. Brajtburg and G. Medoff. 1988. Effects of the detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells. Biochim.Biophys.Res.Com. 154(3):954-958.

Gruda, I., and N. Dussault. 1987. Effect of the aggregation state of amphotericin B with ergosterol. Biochem.Cell. Biol. 66:177-183.



Gruda, I., P. Nadeau, J. Brajtburg and G. Medoff. 1980. Application of differential spectra in the ultraviolet-visible region to study the formation of amphotericin B-sterol complexes. Biochim.Biophys.Acta.602:260-268.

Hamilton, K. S., K. R. Barber, J. H. Davis, K. Neil and Chr.W. M. Grant. 1991. Phase behaviour of amphotericin B multilamellar vesicles. Biochim.Biophys.Acta.1062:220-226.

Hammarström, L., and E. Smith.1976. Mitogenic properties of polyene antibiotics for murine B cells. J.Immunol. 5:37-43.

Hauser, W. E. Jr., and J. S. Remington. 1983. Effect of Amphotericin B on Natural Killer in vitro. J.Antimicrob.Chem. 11:257-262.

Henry-Toulmé, N., B. Hermier and M. Seman. 1989 Immunomodulating properties of the N-(1-deoxy-D-fructos-yl) derivative of amphotericin B in mice. Immunol.Letters 20:63-67.

Hoeprich, P. D., and A. C. Huston. 1975. Susceptibility of *Coccidioides immitis*, *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* to Amphotericin B, Flucytosine, and Clotrimazole. J.Infect.Dis.132(2):133-140.

Holz, R.W.,1974. The effects of the polyene antibiotics Nystatin and Amphotericin B on thin lipid membranes. Annals N.Y.Acad. Sc.235:469-479.

Homan-Müller, J.W.T., R. S. Weening and D. Roos. 1974. Production of hydrogen peroxide by phagocytizing human granulocytes. J.Lab.Clin.Med. 85:198-207.

Johnson, E. M., D. W. Warnock, M. D. Richardson and C. J. Douglas. 1986. *In-vitro* effect of itraconazole, ketoconazole and amphotericin B on the phagocytic and candidacidal function of human neutrophils. J.Antimicrob.Chem. 18:83-91.

Jullien, S., A. Contrepois, J. E. Sligh, Y. Domart, P. Yeni, J. Brajtburg, G. Medoff and J. Bolard. 1989. Study of the effects of liposomal amphotericin B on *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and erythrocytes by using small unilamellar vesicles prepared from saturated phospholipids. Antimicrob. Agents Chemoth. 33(3):345-349.

Kamisato, J. K. and M. Nowakowski. 1988. Morphological and biochemical alterations of macrophages produced by a glycan, PSK. Immunopharmacol. 16:89-86.

Klostergaard, J., P. A. Stoltje and F. C. Kull Jr. 1990. Tumoricidal effector mechanisms of murine BCG-activated macrophages: role of TNF in conjugation-dependent and conjugation-independent pathways. J. Leukocyte Biol. 48:220-228.

Keston, A.S. and R. Brandt. 1965. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. Analytical Biochemistry. 11:1-5

Kinsky, S. C., J. Avruch, M. Permeth, H. B. Rogers and A. A. Schonder. 1962. The lytic effects of polyene antifungal antibiotics on mammalian erythrocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 9:503-507.

Kotler-Brajtburg, J., G. Medoff, G. S. Kobayashi, D. Schlessinger, and A. Atallah 1977. Sensitivity to amphotericin B and the cholesterol: phospholipid molar ratios of 3T3, L, BHK and HeLa cells. Biochem. Pharmacol. 26:705-710.

Lampen, J. P., Arnow and R. Safferman. 1960. Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. J. Bacteriol. 80:200-206.

Lennartz, M.R., F. S. Cole and P. D. Stahl. 1989. Biosynthesis and processing of the mannose receptor human macrophages. J. Biol. Chem. 264(4):2385-2390.

Lin, H. S., G. Medoff, and G. S. Kobayashi. 1977. Effects of Amphotericin B on Macrophages and Their Precursors Cells. Antimicrob. Agents Chemoth. 11(1):154-160.

Little, J. R., and J. E. Wolf 1987. Immunologic effects of Amphotericin B. Clin.Immunol.Newsl . 8(12): 183-185.

Little, J. R., and V. Shore. 1985. Modulation by Lipoproteins of Amphotericin B-induced Immunostimulation. Cell.Immunol. 93:212-221.

Little, J. R., E. J. Plut, J. Kotler-Brajtburg, G. Medoff and G. S. Kobayashi. 1978. Relationship between the antibiotic and immunoadjuvant effects of Amphotericin B Methyl Ester. Immunochem .15:219-224.

Lopez-Berestein, G. 1987. Minireview: Liposomes as carriers of antimicrobial agents. Antimicrob.Agents Chemoth.31(5):675-678.

Lopez-Berestein, G., G. P. Bodey, L. S. Frankel and K. Mehta.1987. Treatment of Hepatosplenic Candidiasis With Liposomal-Amphotericin B. J.Clin.Oncol. 5(2):310-317.

Lopez-Berestein, G., V. Fainstein, R. Hopher, K. Mehta, M. P. Sullivan, M. Keating, M. G. Rosenblum, R. Mehta, M. Luna, E. M. Hersh, J. Reuben, R. L. Juliano, and G. P. Bodey.1985. Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Systemic Fungal Infections in Patients with Cancer: A preliminary Study. J.Infect.Dis. 151(4):704-710.

Lopez-Berestein, G., R. Mehta, R. L. Hopher, K. Mills, L. Kasi, K. Mehta, V. Fainstein, M. Luna, E. M. Hersh, and R. Juliano.1983. Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated Amphotericin B. J.Infect.Dis. 147(5):939-944.

Masayuki, I., M.Wada, T. Kawasaki and I. Yamashina. 1988. Isolation and characterization of lectins specific for mannose/fucose/N-acetylglucosamine from rat peritoneal macrophages. J.Biochem.104:587-590.

McCurdy, D. K., M. Frederic, and J. R. Elkinton.1968. Renal tubular acidosis due to amphotericin B. N.Engl.J.Med .268:124-131.

Mc Harrell, T. Z., G. Medoff and G. S. Kobayashi. 1973. Changes in murine resistance to *Listeria monocytogenes* infection induced by Amphotericin B. J.Infect.Dis. 127(4):373-377.

Medoff, G., J. Brajtburg, G. S. Kobayashi, and J. Bolard.1983. Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 23:303-360.

Medoff, G., J. Brajtburg, G. S. Kobayashi, and J. Bolard.1983. Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 23:303-360.

Mehta, R. T., K. Mehta, G. Lopez-Berestein and R. J. Juliano. 1985. Effect of Liposomal Amphotericin B on Murine Macrophages and Lymphocytes. Infect.Immun. 47(2):429-433.

Mehta, R., G. Lopez-Berestein, R. Hopfer, K. Mills and R. L. Juliano.1984. Liposomal Amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells.Biochim.Biophys.Acta. 770:230-234.

Meunier, F., J. P. Sculier, A. Coume, C. Brassinne, C. Heyman, C. Laduron, N. Collette, C. Hollaert, D. Bron and J. Klastersky. 1988. Amphotericin B Encapsulated in Liposomes Administered to Cancer Patients. Ann.N.Y.Acad. Sc. 544:598-610.

Muller, C. D. and F. Schuber. 1989. Neo-mannosylated liposomes: synthesis and interaction with mous Kupffer cells and resident peritoneal macrophages. Biochim.Biophys.Acta. 986:97-105.

Nair, M. P. N., and S. A. Schwartz. 1982. Immunomodulatory effects of Amphotericin B on cellular cytotoxicity of normal human lymphocytes. Cell.Immunol. 70:287-300.

Norman, A.W., A.M. Spielvogel and R. G. Wong. 1976. Polyene Antibiotic-Sterol Interaction. Adv.Lipid.Res. 14:127-170.

Paul, B., and J. Sbarra.1968. The role of the phagocyte in host-parasite interactions. XIII.The direct quantitative estimations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in phagocytizing cells. Biochim.Biophys.Acta. 156:168-178.

Pick, E., and Y. Kesari. 1981. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages-induction by multiple nonphagocytic stimuli. Cell.Immunol. 59:301-318.

Raatikainen, O., R. A. Kauppinen, H. Komulainen, H. Taipale, and T. Pirttilä.1991. Polyene antibiotics increase the ionic permeability of synaptosomal plasma membranes. Biochem.Pharmacol. 41(9):1345-1350.

Racis, S. P., O. J. Plescia, H. M. Geller and P. Schaffner. 1990. comparative Toxicities of Amphotericin B and Its Monomethyl Ester Derivative on Glial Cells in Culture. Antimicrob.Agents Chemoth34(7):1360-1365.

Ralph, E. D., A. M. Khazindar, K. R. Barber and C. W. M. Grant. 1991. Comparative in vitro effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-desoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves. Antimicrob Agents Chemoth. 35(1):188-191.

Ramos, H., A. Attias de Murciano, B. E. Cohen and J. Bolard 1989. The polyene antibiotic Amphotericin B acts as a Ca<sup>2+</sup> ionophore in sterol-containing liposomes. Biochim.Biophys Acta.982:303-306.

Roy, G. 1977. Chimie organique: apprentissage individualisé. Ed. du Griffon d'Argile Inc. 478p.

Sculier, J. P., J. Klastersky, P. Libert, P. Ravez, D. Brohee, G. Vandermoten, J. Michel, J. Thiriaux, G. Bureau, J. Schmerber, R. Sergysels and A. Coune. 1990. Cyclophosphamide, Doxorubicin and Vincristine with Amphotericin B in sonicated Liposomes as Salvage Therapy for small Cell Lung Cancer. Eur.J. Cancer. 26(8):919-921.

Shepherd, V. L., R. Abdolrasulnia, M. Garrett, and H. B. Cowan. 1990. Down-regulation of mannose receptor activity after treatment with lipopolysaccharide and phorbol esters. J.Immunol. 145(5):1530-1536.

Shirley, S. F., and J. R. Little. 1979. Immunopotentiating effects of Amphotericin B . I. Enhanced Contact Sensitivity in Mice. J.Immunol. 123(6):2878-2882.

Shirley, S. F., and J. R. Little. 1979. Immunopotentiating effects of Amphotericin B . II. Enhanced *in vitro* Proliferative Responses of Murine Lymphocytes. J.Immunol. 123(6):2883-2889.

Stahl, P., and S. Gordon. 1982. Expression of a mannosyl-fucosyl receptor for endocytosis on cultured primary macrophages and their hybrids. J.Cell.Biol. 93:49-56.

Stein, S. H., J. R. Little, and K. D. Little. 1987. Parallel inheritance of tissue catalase activity and immunostimulatory action of Amphotericin B in inbred mouse strains. Cell.Immunol. 105:99-109.

Stewart, S. J., P. J. Spagnuolo, and J. J. Ellner. 1981. Generation of suppressor T lymphocytes and monocytes by Amphotericin B. J.Immunol. 127(1):135-139.

Storm, G., H. P. Wilms and D. J. A. Crommelin. 1991. Liposomes and biotherapeutics. Biotherapy. 3:25-42.

Sokol-Anderson, M. L., J. Brajtburg and G. Medoff. 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. J.Infect.Dis.154(1):76-83.

Szoka Jr, F. C., D. Milholland and M. Barza. 1987. Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and in vitro fungicidal activity of liposome-intercalated amphotericin B. Antimicrob.Agents Chemoth. 31(3):421-429.

Tancrède, P., J. Barwicz, S. Jutras and I. Gruda 1990. The effect of surfactants on the aggregation state of Amphotericin B. Biochim.Biophys.Acta. 1030:289-295.

Tärnvik, A and S. Anséhn. 1974. Effect of amphotericin B and clotrimazole on lymphocyte stimulation. Antimicrob. Agents Chemother.6(5):529-533.

Thérien, H. M., I. Gruda, L. Bouchard, and I. Daigle. 1989. Stimulation of lymphoproliferation by sucrose esters. Immunopharmacol.Immunotoxicol . 11(4):603-609.

Tremblay, C., M. Barza, C. Fiore and F. Szoka.1984. Efficacy of liposome-intercalated amphotericin B in the treatment of systemic candidiasis in mice. Antimicrob.Agents Chemoth.26(2):170-173.

Valeriote, F., G. Medoff and J. Dieckman. 1979. Potentiation of anticancer agent cytotoxicity against sensitive and resistant AKR leukemia by Amphotericin B. Cancer Res.39:2041-2045.

Vecchiarelli, A., M. Puliti, A. Torosantucci, A. Cassone and F. Bistoni. 1991. *In Vitro* production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. Cell.Immunol. 135:65-76.

Vecchiarelli, A., S. Perito, F. Vecchini, S. Farinelli and R. Mazzolla. 1987. Further studies on the relative contributions of chemotherapeutic and immunostimulant activity of amphotericin B to its efficacy as an antifungal agent. Chemoterapia 2:170-172.

Vecchiarelli, A., G. Verducci, S. Perito, P. Puccetti, P. Marconi and F. Bistoni. 1986. Involvement of host macrophages in the immunoadjuvant activity of amphotericin B in a mouse fungal infection model. J. Antibiotics XXXIX(6):846-855.

Vertut-Croquin, A., J. Bolard, M. Chabbert and C. Gary-Bobo. 1983. Differences in the interaction of the polyene antibiotic Amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles; A circular dichroism and permeability study. Biochem. 22:2239-2944.

Warr, G. A., 1980. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine)-glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. Biochem. Biophys. Res. Comm. 93(3):737-745.

Walls, E. V., and J. E. Key. 1982. Inhibition of a murine myeloma cell line and mitogen-stimulated B lymphocytes by the antibiotics Amphotericin B. (Fungizone). Immunol. 47:115-121.

Wolf, J. E., and S. E. Massof. 1990. *In Vivo* activation of macrophages oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. Infect. Immun. 58(5):1296-1300.

Yoshimoto, K., K. Tahara, S. Suzuki, K. Sasaki, Y. Nisikawa and Y. Tsuda. 1979. Regioselective syntheses of mono-O-acylglucoses. Chem. Pharm. Bull. 27 (11):2661-2674.