

# Evaluation de quinoxalines et benzimidazoles à activité antifongique.



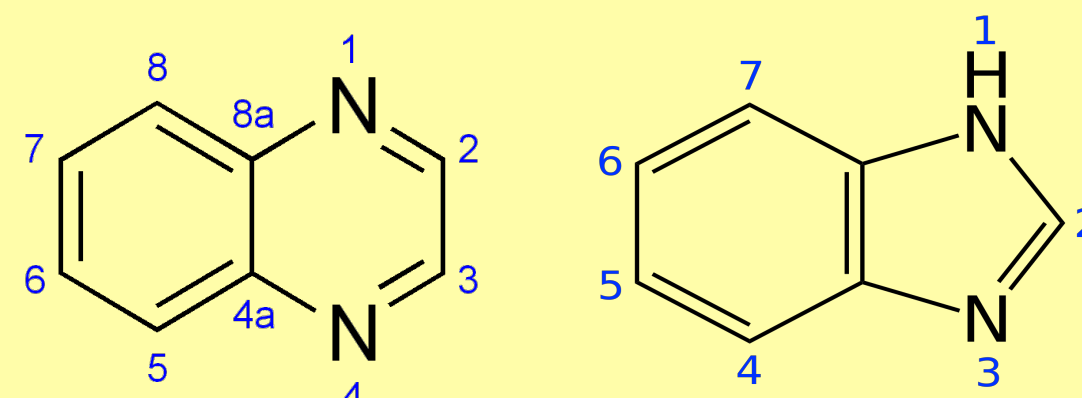
Valentin Legrand Sourdillon, Rafael Ximenes, Carine Picot, Patrice Le Pape.  
Département de parasitologie et mycologie médicale - EA1155 – IICiMed – Nantes – France.  
Departamento de antibioticos, centro de ciencias biologicas, Universidad de Pernambuco, Recife, Brésil



## Introduction

L'incidence des infections fongiques invasives augmente chaque année depuis plus de 10 ans. L'augmentation pourrait s'expliquer par le fait que ces infections touchent un éventail d'hôtes de plus en plus large, et que la diversité des espèces est extrêmement élevée. Par ailleurs, le fait que le nombre d'immunodéprimés augmente au sein de la population, participe aussi à l'augmentation de l'incidence. En effet, les patients en unités de soins intensifs, neutropéniques, atteints du VIH, ou les grands brûlés, etc sont les sujets les plus à risque. Sans traitement efficace, ces infections aboutissent généralement au décès du patient. Actuellement, l'arsenal thérapeutique ne présente pas une très grande diversité moléculaire pour prendre en charge ces infections. De plus, l'émergence de souches résistantes aux azolés et/ou les effets indésirables de ces traitements augmentent le besoin de développer de nouveaux antifongiques.

Le laboratoire IICiMed effectue des recherches sur les nouvelles stratégies thérapeutiques et dans ce cadre identifie de nouvelles cibles et évalue des molécules synthétisées par le laboratoire ou provenant de collaborations nationales et internationales. Ainsi nous avons participé à un projet en collaboration avec l'université de Pernambuco - Recife visant à évaluer l'activité antifongique de molécules appartenant aux familles des Quinoxalines et des Benzimidazoles sur plusieurs genre de fungi.



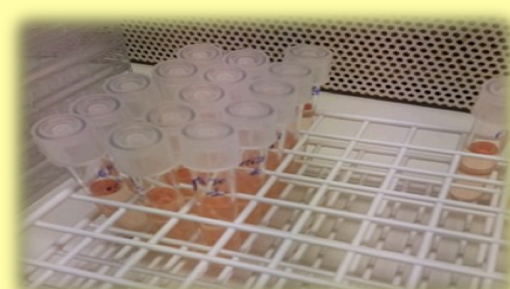
### Objectifs :

- Détermination de l'activité fongique de nouvelles molécules chimiques.
- Explorer leur spectre d'action sur différentes souches fongiques.
- Évaluer leur cytotoxicité sur des cellules humaines adhérentes HeLa et A549.

## Matériels et Méthodes

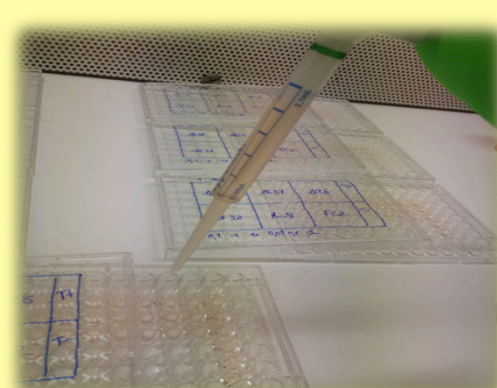
### Etape 1 : Préparation des plaques

- Dilution des molécules à tester dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- Dilution au 50<sup>e</sup> de la solution dans du milieu RPMI EUCAST.
- Introduction de chaque molécule en triplicat sur des microplaques de 96 puits, pour obtenir 3 concentrations finales différentes (1, 10, et 100 µM).
- Utilisation de l'amphotéricine B, Fluconazole et/ou Voriconazole comme molécules de référence.



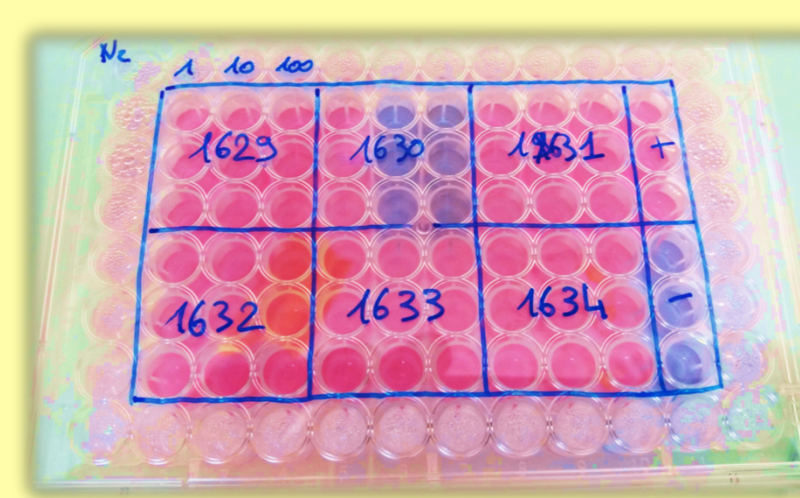
### Etape 2 : Inoculation des plaques

- À l'aide d'un microscope objectif x40 et d'une cellule de Malassez, préparation d'une suspension fongique dans du milieu RPMI 1640, avec comme concentration 3\*10<sup>3</sup> spores/mL pour *Candida sp.*, et 2\*10<sup>4</sup> spores/mL pour *Aspergillus sp.*
- Ajout de 100 µL de la suspension dans chaque puits à l'exception du témoin négatif.



### Lecture des plaques

- Après 24h, ajout de 10 µL de résazurine dans chaque puits
- Puis, au bout de 3h ou 4h pour *Candida sp.* et 15h à 20h pour *Aspergillus sp.* lire la plaque au spectrofluorimètre.
- Enfin, analyse des données et calcul des CI 50



### Toxicité

- Préparation des cellules
- Lavage et trypsination
- Numération des cellules
- Ensemencement
- Préparation des molécules à inoculer
- Faire une gamme en DMSO 100 fois plus concentrée que la gamme finale désirée.
- Les concentrations sont fonctions des CI50.
- Diluer au 1/50<sup>e</sup> pour une plaque
- Remplir les 96 puits de la plaque

## Résultats et Discussion

### Démarche & Observations

Un total de 16 molécules ont été testées sur la souche de *Candida albicans* CAAL 146. Ceci a permis de sélectionner 4 molécules (1626, 1627, 1628, 1630) ayant une activité antifongique intéressante (Tableau 1).

Le spectre d'activité de ces 4 molécules a ensuite été exploré sur 7 autres souches fongiques appartenant à des espèces différentes sensibles ou ayant des résistances connues. Les résultats montrent que la molécule 1630 possède une activité antifongique élevée une CI 50 inférieure à 3µM pour toutes les souches testées de *Candida sp.*, et les molécules 1626, 1627, 1628, une CI 50 variant entre 15µM et 50µM selon les souches (Figure 1 à 5).

Ces résultats nous ont amené à élargir l'évaluation en incluant une souche d'*Aspergillus fumigatus* de référence ATCC. Nous remarquons que seule la 1630 possède une activité sur ce genre avec une CI 50 inférieure à 4µM (Tableau 1).

Puisque la molécule 1630 est particulièrement active, nous avons aussi étudié sa toxicité sur deux lignées cellulaires humaines différentes. Les cellules HeLa : cellules cancéreuses du col de l'utérus, et les cellules A549 : pneumocytes

### Détermination de l'activité antifongique

Molécules	Souches fongiques									
	CAAL2	CAAL117	CAAL111	CATR1	CAKR1	CAPA1	CAAL 146	ASFU ATCC	CAGL1	AmB
1626	39,45	37,41	45,20	-	39,04	34,87	40,59	-	33,83	
1627	30,17	25,48	21,49	29,73	28,99	28,97	32,71	-	29,78	
1628	34,17	28,18	35,49	50,33	29,89	32,86	29,49	-	31,34	
1630	2,59	1,22	1,95	2,27	1,15	0,27	1,81	3,25	2,09	
AmB	0,36	0,26	0,30	0,43	0,23	0,16	0,34	0,31	0,89	

Tableau 1 : Évaluation de l'activité antifongique de nouvelles molécules avec les CI 50 (µM) pour chaque souche, et l'Amphotéricine B comme référence.

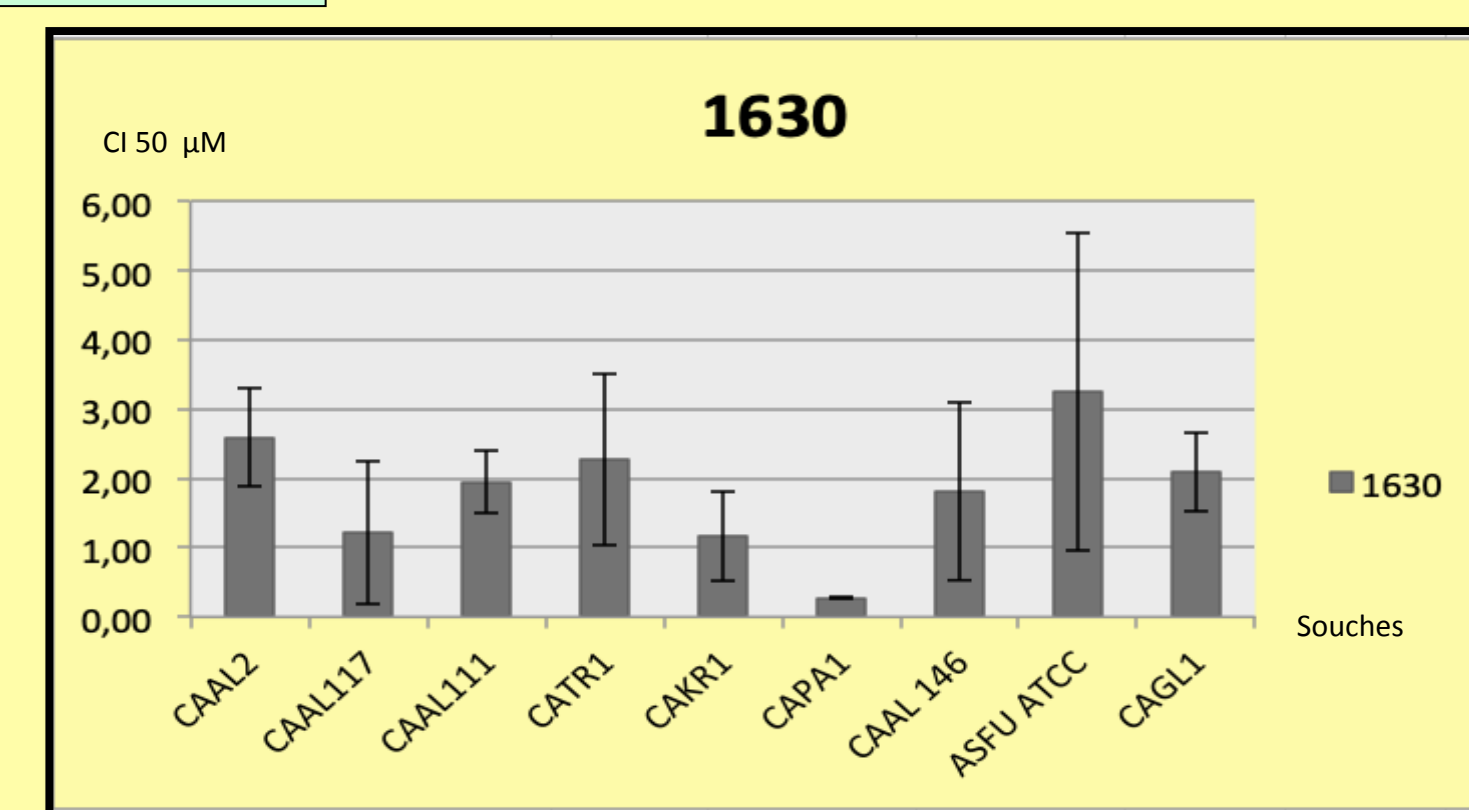


Figure 4 : Activité antifongique évaluée avec la CI 50 (µM) de la molécule 1630 sur différentes souches.

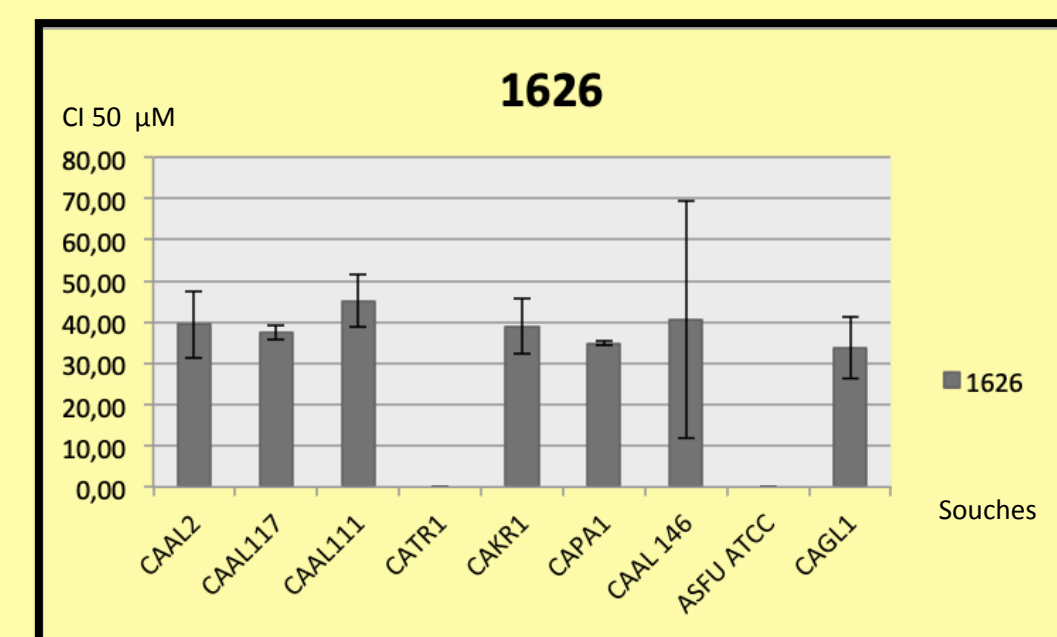


Figure 1 : Activité antifongique évaluée avec la CI 50 (µM) de la molécule 1626 sur différentes souches.

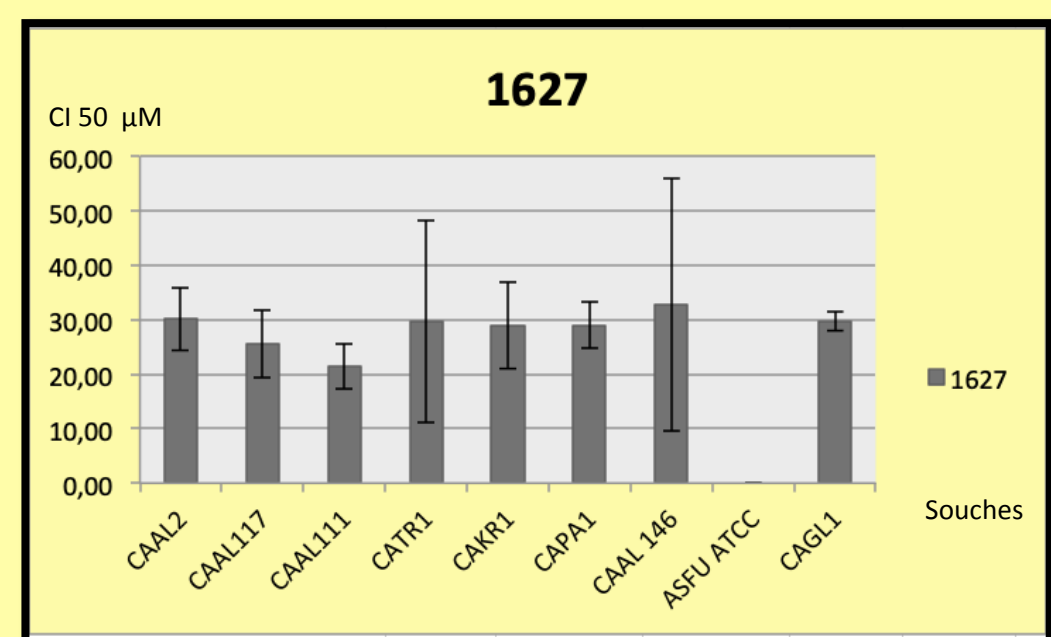


Figure 2 : Activité antifongique évaluée avec la CI 50 (µM) de la molécule 1627 sur différentes souches.

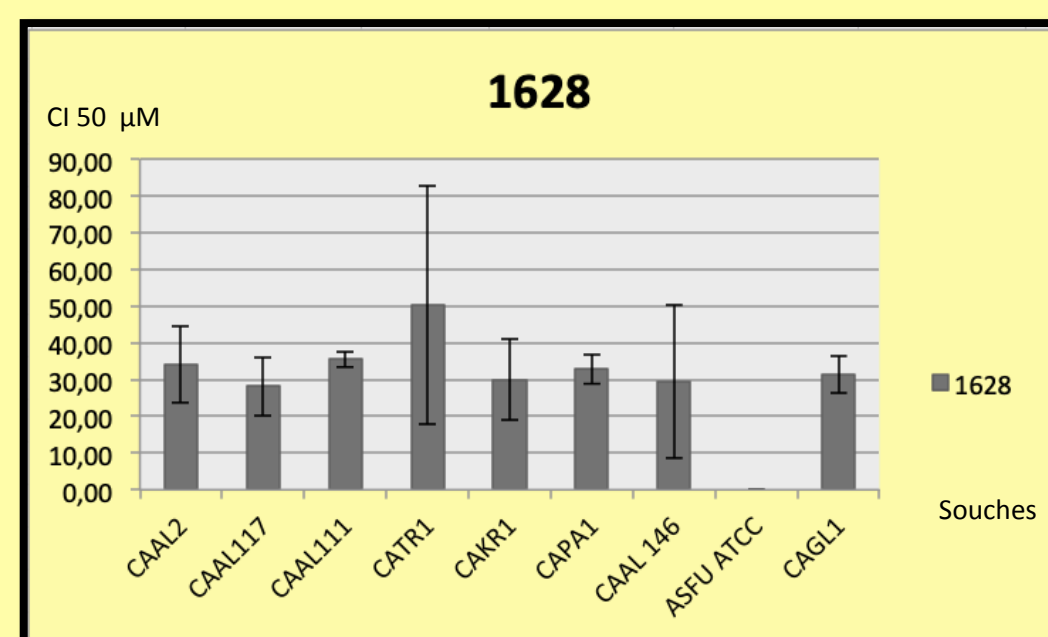


Figure 3 : Activité antifongique évaluée avec la CI 50 (µM) de la molécule 1628 sur différentes souches.

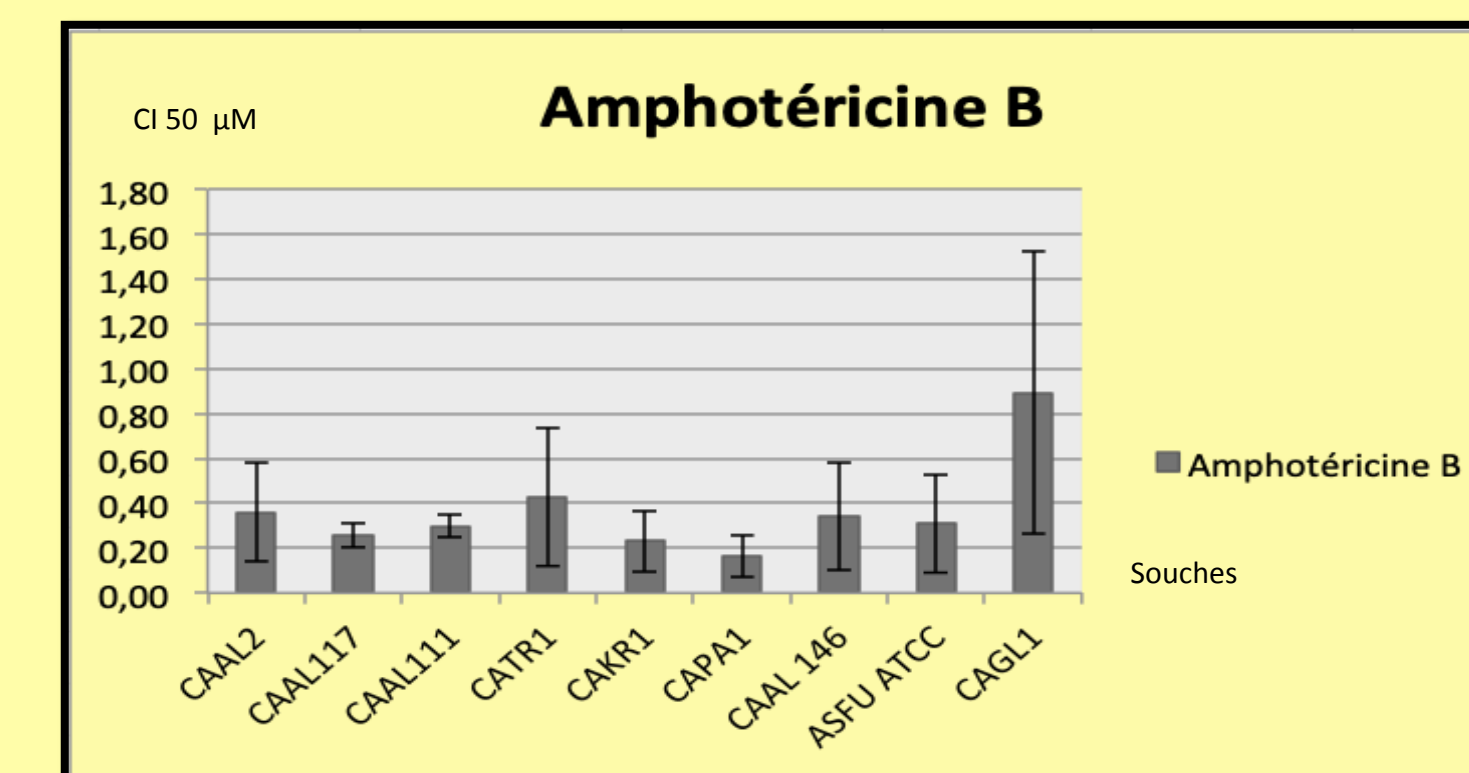


Figure 5 : Activité antifongique évaluée avec la CI 50 (µM) de l'Amphotéricine B comme témoin sur différentes souches.

### Évaluation de la cytotoxicité

Nos résultats d'évaluation de la cytotoxicité de la molécule 1630 ont été obtenus en réalisant deux séries de test sur deux lignées cellulaires différentes. Nous obtenons une Concentration Inhibitrice 50% des cellules supérieure à 25µM pour les deux lignées cellulaires (Tableau 2).

Cette CI50 sur les cellules humaines est à comparer avec la CI50 de la molécule sur chaque souche. Ce parallèle permet de calculer un premier Index thérapeutique = (CI50 sur cellules humaines) / (CI50 sur les souches) (Tableau 3).

La marge de manœuvre indiquée par l'index thérapeutique sur chaque souche semble intéressante et incite à continuer les explorations de cette molécule 1630.

Toxicité de 1630		
Lignées cellulaires	Souches	
	HeLa	A549
CI50		
Série 1	26,98	22,37
Série 2	32,57	29,61
Moyenne	29,775	25,99

Tableau 2 : Evaluation de la toxicité de la molécule 1630 via la CI50 (µM) sur deux lignées cellulaires

Index thérapeutique de 1630		
Souches	Lignées cellulaires	
	HeLa	A549
IT CAAL2	11,51	10,04
IT CAAL111	15,30	13,36
IT CAAL117	24,41	21,31
IT CAPA1	109,01	95,15
IT CAGL1	14,23	12,42
IT CATR1	13,10	11,44
IT CAKR1	25,79	22,51
IT CAAL146	16,45	14,36
IT ASFU ATCC	9,16	8,00

Tableau 3 : Calculs de l'index thérapeutique à partir du rapport de la CI50 des lignées cellulaires sur la CI50 de chaque souche

## Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons pu identifier une molécule possédant une activité antifongique élevée et une faible toxicité permettant d'envisager des évaluations *in vitro* plus large, une évaluation sur un modèle expérimental de candidose invasive et une pharmacomodulation du composé 1630