

REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union – Discipline-Travail

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année : 2012-2013

N° :1626/13

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Madame GNAGON Epse DIBY Aya Denise Paule

*Activités antifongiques de nouvelles
chalcones benzimidazoliques
vis-à-vis de trois espèces de Candida
chimiorésistantes aux azolés*

Soutenue publiquement le 21 Décembre 2013

COMPOSITION DU JURY

Président : Monsieur MONNET DAGUI, Professeur Titulaire

Directeur de thèse : Monsieur OUATTARA MAHAMA, Maître de Conférences Agrégé

Assesseurs : Madame KOUAKOU SIRANSY G, Maître de Conférences Agrégé

: Monsieur OGA AGBAYA STEPHANE, Maître de Conférences Agrégé

INTRODUCTION

Les infections fongiques sont actuellement une cause importante de mortalité à travers le monde avec l'augmentation des situations d'immunodéficience [1,2]. Ces infections sont provoquées surtout par des levures dont le genre *Candida* reste de loin le plus virulent. Il est effectivement à l'origine de tableaux cliniques extrêmement variés, allant des candidoses superficielles aux candidoses profondes ou systémiques [3].

De plus, l'augmentation de la fréquence de ces mycoses durant les trois dernières décennies s'est accompagnée d'une augmentation de l'incidence de certaines espèces auparavant peu représentées [3]. Ainsi, si *C. albicans* reste de loin le principal agent responsable des candidoses avec 80 % des isolats [4], l'on constate l'émergence d'espèces non-albicans qui sont souvent plus réfractaire aux traitements classiques, telles que *C. glabrata*, *C. tropicalis* [3].

En effet la prise en charge médicamenteuse des candidoses, autrefois très efficace avec l'utilisation des antifongiques azolés, se heurte actuellement à une forte chimiorésistance de souches de *Candida* [4,5]. Du coup, un autre problème de santé publique a émergé avec le risque d'une pandémie sans recours d'une thérapeutique antifongique efficace.

Face à cette situation alarmante, plusieurs solutions peuvent être envisagées :

- ✓ L'application de mesures hygiéno-diététiques appropriées
- ✓ L'utilisation rationnelle des médicaments antimycosiques encore efficaces au travers de bonnes pratiques de prescription.
- ✓ La mise au point de nouveaux antifongiques plus efficaces et capables de contourner la chimiorésistance induite par les espèces de *Candida*.

C'est dans cette perspective que nous nous sommes proposé d'évaluer les activités antifongiques de quelques nouvelles chalcones à support benzimidazolique

L'objectif général assigné à ce travail est dès lors, de mettre au point des candidat-médicaments antifongiques à profil général de chalcone à vecteur benzimidazole.

Quant aux objectifs spécifiques, il s'agit pour nous de :

- ✓ déterminer les concentrations minimales inhibitrices des nouvelles chalcones vis-à-vis de *C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*
- ✓ établir les éléments structuraux favorables aux activités antifongiques attendues suite à une étude de relations structure-activité.

Aussi, le présent travail se décline en deux parties:

- la première est relative à la revue de littérature concernant des généralités sur les candidoses. Cette même revue abordera la classe chimique des azolés antifongiques ainsi que la résistance fongique à ces médicaments.
- la seconde partie, de type expérimentale, elle abordera successivement :
 - la description de la méthodologie y compris la conceptualisation et la synthèse des chalcones benzimidazoliques,
 - l'analyse des résultats obtenus suivie de discussions de type relations structure-activité,
 - la conclusion et les perspectives qui découlent du présent travail.

Première partie :
REVUE DE LA LITTÉRATURE

CHAPITRE 1 : CANDIDOSES ET CHIMIOThERAPIE

I. GENERALITES SUR LES CANDIDOSES

I.1. Définition

Les candidoses sont des infections fongiques cosmopolites à localisation superficielle ou profonde, provoquées par des levures du genre *Candida*. L'espèce la plus fréquente à savoir *Candida albicans*, fait partie de la flore habituelle de l'oropharynx et du tube digestif. Elle peut aussi être présente en faible quantité dans la flore vaginale normale [6,7]

I.2. Différents types de candidoses

Les candidoses sont le plus souvent classées en fonction de leur localisation. Ainsi l'on distingue les candidoses superficielles et les candidoses profondes ou systémiques [6, 7].

I.2.1. Candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont localisées au niveau du revêtement cutané, des ongles et des muqueuses. Elles peuvent être chroniques ou aiguës.

I.2.1.1. Candidoses de la peau et des ongles

Ces candidoses se présentent sous plusieurs formes cliniques à savoir l'intertrigo à *Candida*, la folliculite à *Candida* et l'onychomycose.

✓ L'intertrigo à *Candida*

Ce type de mycose siège au niveau des grands plis cutanés (inter fessiers, inguinaux, sous-mammaires, axillaires...) ou des petits plis cutanés (interdigitaux des mains ou des pieds). Ce type d'intertrigo se manifeste par un érythème suintant, lisse, prurigineux et parfois douloureux. Il débute au fond du

pli puis il s'étend. Les bords sont irréguliers avec des papules ou pustules satellites. Le fond du pli est parfois recouvert d'un enduit blanchâtre. L'évolution est chronique et récidivante chez le sujet obèse, le diabétique et les individus en contact avec l'eau.

✓ **Folliculites à *Candida***

Ces mycoses siègent à la barbe, au cuir chevelu ou dans les régions poilues fréquemment couvertes comme le thorax. Ce sont des lésions à types de papules folliculaires ou pustules touchant les zones séborrhéiques. Elles sont particulièrement associées à l'héroïnomanie [6].

✓ **Onychomycose à *Candida***

Elle atteint préférentiellement les ongles des doigts mais ces atteintes sont rares aux orteils. Elle débute par un périonyxis et se traduit par une tuméfaction tendue, érythémateuse parfois douloureuse, entourant la tablette unguéale. La pression de l'œdème fait sourdre une sérosité, voire du pus. L'atteinte de l'ongle est secondaire; des dépressions transversales de son bord apparaissent au fur et à mesure des poussées évolutives. Un autre type d'atteinte est l'onycholyse dans laquelle la tablette de l'ongle n'adhère plus à son lit. Elles sont le plus souvent chroniques chez la femme ménagère ayant un contact prolongé avec l'eau [6].

I.2.1.2.Candidoses des muqueuses

Ces candidoses se manifestent au niveau digestif, génital et urinaire.

✓ **Candidoses de l'appareil digestif**

Il s'agit de mycose insidieuse qui se traduit par un état érythémateux inflammatoire. Ces candidoses atteignent un ou plusieurs segments du tube digestif à savoir l'oropharynx, l'œsophage et la muqueuse gastro-intestinale.

- **Candidoses oropharyngées**

Les manifestations les plus fréquentes de ce type de candidose sont le « muguet » et la perlèche. En ce qui concerne le muguet, c'est une forme pseudomembraneuse localisée à la face interne des joues. Il peut intéresser toutes les muqueuses orales, et envahir le pharynx et l'œsophage chez l'immunodéprimé. Il débute par un érythème de la muqueuse, conduisant à des granulations blanchâtres qui vont confluer, pour donner des membranes blanc-jaunâtres d'où le nom de «muguet». Il est particulièrement fréquent chez le sujet infecté par le VIH où il est plus ou moins envahissant. Les signes fonctionnels sont une sécheresse, une sensation de goût métallique et de cuisson de la bouche. L'importance des signes fonctionnels chez les personnes vivants avec le VIH peut conduire à une réduction des apports nutritionnels liquides et solides majorant ainsi l'état de dénutrition. Quant à la perlèche ou chéilite angulaire, elle peut être uni ou bilatérale. Il s'agit d'un intertrigo localisé au niveau de la commissure labiale. Elle correspond à une inflammation de la commissure labiale qui devient érythémateuse, fissurée, squameuse ou croûteuse pouvant s'étendre à la peau adjacente et au reste de la lèvre. Elle évolue souvent sous le mode subaigu ou chronique [6].

- **Candidoses œsophagiennes**

Elles sont localisées au niveau de l'œsophage et surviennent généralement après une candidose oropharyngée surtout chez le sujet atteint du SIDA. Elles se présentent sous forme d'œsophagite avec dysphagie, brûlures rétro sternales, hoquet et une anorexie. La *candidose œsophagienne* est l'une des infections opportunistes les plus fréquentes au cours de l'infection du SIDA [6].

- **Candidoses gastro-intestinales**

Ce genre de mycose provoque des ulcérations au niveau des muqueuses gastriques et intestinales à l'origine de diarrhées fréquentes, inodores et liquides,

pouvant entraîner des déshydratations notamment chez le nourrisson. Ce type de candidose est fréquent chez les sujets ayant reçu une antibiothérapie en particulier aux âges extrêmes de la vie.

- Candidose anale

Cette infection mycosique se manifeste en particulier dans la zone péri-anale et peut s'étendre aux fesses et aux plis inguinaux. Elle se traduit par un prurit intense avec sensation de brûlure et un érythème suintant. Elle est fréquente chez les nourrissons où l'atteinte s'installe volontiers sur une dermatite préexistante (dermatite fessière du nourrisson).

✓ Candidoses génitales

Ce type d'infection fongique est représenté essentiellement par les candidoses vulvo-vaginales chez la femme et par les balanites chez l'homme.

- Vulvo-vaginites candidosiques

Localisées au niveau vulvaire et au niveau de la muqueuse vaginale, ces mycoses sont caractérisées par un prurit et des brûlures associés à des leucorrhées d'abondance variable classiquement blanchâtres et « caillebotées ». Cependant, cet aspect n'est pas toujours retrouvé et les leucorrhées peuvent être absentes. Une dysurie et une dyspareunie sont souvent signalées. L'examen clinique peut retrouver un érythème et un œdème de la vulve, parfois des fissures ou des excoriations [6].

- Balanites candidosiques

Elle est parfois compliquée d'une urétrite ou d'une cystite. Le début se fait dans le sillon balano-préputial par un érythème qui va intéresser le gland et le prépuce. De petites vésicules sont présentes à leur surface, ainsi que des papules

avec souvent des plaques blanchâtres. L'éruption peut s'étendre au pénis, au scrotum et à l'aîne chez l'obèse.

✓ **Candidoses urinaires**

Les atteintes candidosiques de l'appareil urinaire se caractérisent par des infections urinaires hautes (rein et uretères) ou basses (vessie et urètre). Les localisations symptomatiques de l'appareil urinaire bas sont rares et se traduisent par des signes d'irritation vésicale avec dysurie, hématurie et douleurs sous-pubiennes. Les infections hautes, ascendantes, sont indiscernables des pyélonéphrites bactériennes; elles sont favorisées par une lithiase. La candidurie asymptomatique est le cas de figure prédominant. Elle concerne des patients hospitalisés le plus souvent sondés et est alors liée à la colonisation de la sonde urinaire. La candidurie peut être le premier signe d'une colonisation profonde ou disséminée [6].

I.2.2. Candidoses profondes ou systémiques

Les candidoses profondes sont des infections fongiques dues au passage de la levure du genre *Candida* dans le sang, point de départ de leur propagation à d'autres organes. Ainsi on distingue trois types de candidoses systémiques à savoir les candidémies, les candidoses invasives et les candidoses disséminées. Les candidémies sont des infections du sang par les levures du genre *Candida* tandis que, les candidoses invasives correspondent à l'atteinte d'un seul organe ne comportant pas habituellement de souche de *Candida*. Quant aux candidoses disséminées, elles sont caractérisées par l'atteinte d'au moins deux organes non contigus ne comportant pas de *Candida* normalement [6].

La symptomatologie des infections systémiques à *Candida* n'est pas spécifique. Ces infections fongiques systémiques se manifestent habituellement par une fièvre persistante et ne répondent pas à une antibiothérapie à large spectre. A

cela il faut ajouter une dégradation de l'état général associée à des douleurs diffuses et une leucocytose. Cet état peut entraîner un choc septique conduisant à la mort du patient. Ces candidoses surviennent surtout chez des patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs et spécialisés.

I .3. Epidémiologie et impact sur la santé publique

L'épidémiologie des candidoses a considérablement évolué ces dernières années avec l'apparition d'infections invasives et de nouvelles espèces non-*albicans*, notamment *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis* [15-17]. Certaines de ces espèces sont résistantes ou de sensibilité diminuée aux différentes classes d'antifongiques [11-14], à l'origine d'un impact majeur sur la mortalité et la morbidité, ainsi que sur la durée et le coût de l'hospitalisation des patients [8]. De plus l'augmentation des patients immunodéprimés et les transplantations d'organes, a accentué l'incidence des candidoses [17]. Les facteurs favorisant la survenue des candidoses sont multiples.

Les candidoses oropharyngées sont favorisées par toute altération de la muqueuse buccale consécutive au port d'une prothèse, par la survenue d'un cancer et à une ulcération due à des cytotoxiques anticancéreux. D'autres facteurs notamment la corticothérapie, les antibiotiques à large spectre et les traitements immunosuppresseurs facilitent aussi la survenue de cette infection. Les candidoses oropharyngées sont les formes les plus courantes chez les personnes vivant avec le VIH. Ainsi environ 80% de ces patients développent une candidose orale à tous les stades de la maladie.

Le passage vers une candidose clinique est l'un des meilleurs marqueurs de l'évolution de la maladie. L'importance des signes fonctionnels chez les personnes vivant avec le VIH conduit à une réduction des apports liquides et

solides majorant la dénutrition et peut être responsable d'une inobservance du traitement [6]. Une étude récente menée en Côte d'Ivoire chez 151 personnes vivant avec le VIH et porteuses de candidoses oropharyngées a montré la prédominance de l'espèce *Candida albicans* [18].

Dans le cas des candidoses cutanées, formes de mycoses communes favorisées par l'humidité et la macération, l'atteinte se fait préférentiellement au niveau des plis chez le sujet en surpoids [6]. Cette forme clinique peut résulter de l'extension d'une candidose digestive ou génitale où l'on retrouve des facteurs favorisants comme le très jeune âge, les personnes âgées, le diabète, la prise d'antibiotiques et de corticoïdes [6]. En outre, certaines professions et occupations favorisent la survenue d'un intertrigo à *Candida* localisé au niveau des mains, c'est le cas chez les cuisiniers, les aides ménagères et les blanchisseurs.

Quant aux onychomycoses à *Candida*, la prédominance féminine est nette. En effet, les femmes sont plus exposées aux principaux facteurs de risque locaux en raison des contacts prolongés, répétés avec l'eau et les produits d'entretien et de l'abus des soins de manucure. La contamination due le plus souvent à l'espèce *Candida albicans*, résulte d'une auto-inoculation à partir d'un foyer digestif ou génital.

En ce qui concerne l'impact de la candidose vulvo-vaginale, c'est l'une des infections gynécologiques les plus fréquentes chez la femme en période d'activité sexuelle. On estime qu'entre 40 % à 75% des femmes connaîtront au moins un à plusieurs épisodes de candidose vaginale durant leur vie [19]. Rare avant la puberté, sa prévalence décroît après la ménopause, sauf chez les femmes sous traitement hormonale de substitution. De plus la candidose vaginale est

suspectée de favoriser l'infection du VIH chez les femmes à cause de la réaction inflammatoire au niveau de la muqueuse [20].

Quant aux formes les plus graves à savoir les candidoses profondes, elles sont responsables d'un taux de mortalité élevée dans le monde. Ainsi en Europe le taux de mortalité due aux candidoses disséminées oscille entre 28-59 % [9]. Aux Etats-Unis, jusqu' à 28 000 candidémies surviennent chaque année, elles sont responsables de 11 200 décès par an et bien que les taux de mortalité par candidose invasive aient tendance à diminuer depuis une quinzaine d'années, ils restent encore très élevés [10].

Au vue de ce qui précède nous pouvons affirmer que les infections candidosiques constituent un véritable problème de santé publique car elles touchent de nombreuses couches sociales professionnelles et affectent aussi bien les sujets immunocompétents que les sujets immunodéprimés. De plus, elles compliquent la prise en charge thérapeutique et nutritionnelle de personnes vivant avec VIH.

II. GENERALITES SUR TROIS ESPECES DU GENRE CANDIDA

Les espèces du genre *Candida* sont des levures asexuées classées parmi les fungi imperfecti [21]. Ce genre comporte environ 248 espèces et 8 biovars dont actuellement 23 espèces ont été reconnues pathogènes pour l'homme [22]. L'espèce prédominante à savoir *Candida albicans* est le plus souvent isolée au niveau des muqueuses vaginales et/ou oropharyngées. A côté de cette espèce, d'autres émergentes telles que *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. lusitanae*, ont vu leur prévalence modifiés au fil des années [22].

Même si *C. albicans* reste la levure la plus souvent en cause, son statut est passé d'un quasi monopole dans les années 1970 à une faible majorité dans les années 1990. L'ensemble des espèces non *albicans* représente maintenant un peu moins de 50 % des infections sévères avec *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, représentant chacun 10 à 20 % des espèces suivant les études [22].

II.1 *Candida albicans*

L'espèce *Candida albicans* est une levure cosmopolite, commensale des muqueuses oro-pharyngées, gastro-intestinales et génito-urinaires. Elle peut occasionnellement coloniser la peau [21].

II.1.1 Morphologie, Organisation cellulaire et moléculaire (Figure 2)

C'est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère, formant ainsi des colonies blanches crémeuses. Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains

paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* [23]. Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés : la forme blastospore, ronde ou ovale, la forme pseudomycélium et la forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *C. albicans* ; Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte [23].

Candida albicans possède tous les organites intracellulaires caractéristiques des eucaryotes à savoir, un noyau, délimité par une double membrane nucléaire et renfermant huit chromosomes, un nucléole, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi. La seule structure différenciant la levure d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'un système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation avec le cycle cellulaire et la division, et impliqué en majeure partie dans la synthèse de la paroi [23].

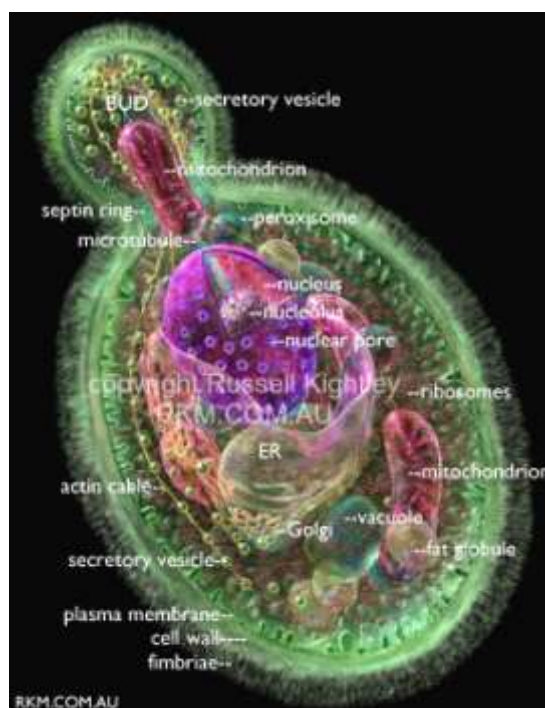


Figure 1 : Morphologie, organisation cellulaire et moléculaire de *C. albicans*

II.1.2 Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence

De façon générale, le rôle infectieux de *C. albicans*, pathogène opportuniste, semble favorisé par une combinaison de facteurs liés aux statuts immunologique et physiologique de l'hôte, ainsi qu'à des facteurs liés au microorganisme, plutôt qu'à un facteur de virulence unique. Les infections candidosiques sont ainsi probablement initiées par une diminution des défenses de l'hôte qui modifie l'équilibre de commensalisme au profit de la levure, et entraîne le basculement du stade de colonisation à celui de l'infection [23].

Les infections de la peau et des muqueuses telles que les candidoses vaginales par exemple, sont principalement dues à des modifications du pH et de l'environnement microbien, alors qu'une atteinte systémique est habituellement associée à une insuffisance des défenses de l'hôte, telle que celle présentée par les patients hospitalisés en cancérologie soumis à une chimiothérapie ou à une antibiothérapie à large spectre. La séquence des événements qui contribuent à l'installation de *Candida albicans* chez son hôte peut se résumer en trois étapes clés à savoir l'adhérence et colonisation, l'invasion au niveau des tissus et enfin la multiplication et survie chez l'hôte [23]. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la virulence de *Candida albicans* :

- ✓ L'adhérence aux surfaces
- ✓ La formation de mycéliums vrais et de pseudomycéliums
- ✓ L'interférence avec la phagocytose
- ✓ L'interférence avec le complément
- ✓ Les enzymes

II.2 *Candida glabrata*

Anciennement appelé *Torulopsis glabrata*, *Candida glabrata* est une levure haploïde qui ne présente pas de dimorphisme. Jusqu'à récemment, on pensait que *C. glabrata* n'était pas un pathogène. Toutefois, avec l'augmentation du

nombre de patients immunodéprimés (HIV positifs, transplantés, patients soumis à une chimiothérapie...), il s'est avéré que *C. glabrata* est un pathogène opportuniste du tractus urogénital. De plus, lorsque *C. glabrata* s'infiltré dans le flux sanguin, il peut y avoir le développement d'une candidémie [3].

II.2.1 Morphologie (Figure 3)

L'espèce *Candida glabrata* est organisée en 13 chromosomes nucléaires qui comportent tous un centromère. *C. glabrata* se présente sur milieu standard sous la forme de colonies lisses et brillantes de couleur blanc ou crème. Cette espèce qui se présente uniquement sous forme levure, produit de petites blastospores ovoïdes de 1 à 4 μm , se multipliant par bourgeonnement. L'absence de filaments mycéliens est caractéristique [3].

Le génome mitochondrial de *C. glabrata* est un des plus petits génomes mitochondriaux connus chez les hémi-ascomycètes. La principale particularité de ce génome mitochondrial est son caractère non-indispensable. En effet, par opposition aux autres levures du genre du genre *Candida*, la perte totale ou partielle du génome mitochondrial est viable chez *C. glabrata*, et représenterait même un avantage sélectif en présence d'antifongiques azolés, puisque cette mutation petite s'accompagne d'une résistance à ces antifongiques par surexpression des protéines d'efflux de type ABC [3].



Figure 2 : Morphologie de *Candida glabrata*

II.2.2 Pathogénicité et facteurs de virulence

C. glabrata est considérée comme un constituant naturel de la flore microbienne des muqueuses des mammifères et n'est en revanche pas retrouvée dans l'environnement. Si cette espèce était considérée à l'origine comme non pathogène, elle est devenue aujourd'hui la deuxième espèce en fréquence dans les candidoses, après *C. albicans*. En outre, les candidoses à *C. glabrata* sont associées à un taux de mortalité particulièrement élevé dans les formes systémiques [3].

L'absence de croissance mycélienne et d'expression de certains antigènes de surface dont le rôle dans la virulence a été démontrée chez *C. albicans*, ainsi que la faible capacité d'adhérence aux cellules endothéliales ne laissent pas présager une virulence élevée chez *C. glabrata*. Pourtant, le pronostic vital des patients présentant une candidose profonde ou systémique ou une septicémie à *C. glabrata* est souvent compromis [3].

La première raison est certainement la faible sensibilité de cette espèce aux antifongiques azolés, dont l'utilisation prophylactique est à l'origine non seulement de l'augmentation de l'incidence de *C. glabrata*, mais également de la sélection fréquente d'isolats résistants à ces antifongiques. En effet des azolés tels que le Fluconazole ou le Kétoconazole sont inefficaces dans 15 à 20 % des cas contre *C. glabrata*. Par contre, *C. glabrata* reste très sensible à l'action des polyènes (Amphotéricine B, Nystatine) et des drogues comme la 5-Fluorocytosine et la Caspofongine présentent une efficacité variable.

Plusieurs facteurs dont le rôle dans la virulence a été démontré pour d'autres espèces ont été identifiés chez *C. glabrata*.

- ✓ La capacité d'adhérer aux cellules de l'hôte. Ce mécanisme est impliqué dans la formation de biofilm sur les cathéters et sur les prothèses dentaires.
- ✓ Sécrétion d'hydrolases qui déterminent ses capacités d'envahissement des tissus de l'hôte.
- ✓ Production d'enzyme à activité hémolytique [3].

II.3 *Candida tropicalis*

Cette levure a une forme variable, ronde à allongée et ces colonies poussent rapidement. Elles sont crémeuses, blanches, lisses ou légèrement plissées (**Figure 4**). Le pseudomycélium peut être absent, rudimentaire ou abondant et il y a parfois présence de vrai mycélium. La reproduction se fait par bourgeonnement multilatéral. Un milieu chromogène (*Albicans ID*) permet de les identifier, les colonies sont de couleur rose. *Candida tropicalis* est isolé dans la nature, le sol, les végétaux et l'eau. Son pouvoir pathogène et son génome sont comparables à celui du *Candida albicans*. [4, 25]



Figure 3 : Morphologie de *Candida tropicalis*

III. CHIMIOThERAPIE ANTI-CANDIDA : LES AZOLES ANTIFONGIQUES

III.1 Définition - Structure

Les azolés constituent une famille relativement homogène d'antifongique de synthèse totale, possédant des activités thérapeutiques de nature fongistatique. Du point de vu de leur constitution chimique, ils possèdent tous dans leurs molécules respectives un hétérocycle pentagonale porteur de deux (imidazole) ou trois atomes d'azote (triazole) d'où leur nom d'azolé. Cet hétérocycle azoté est le plus souvent relié à une chaîne latérale de type β -arylalkyloxy β -dichlorophényléthyl au niveau de l'atome d'azote en position 1 [7,14,26] (Figure 4).

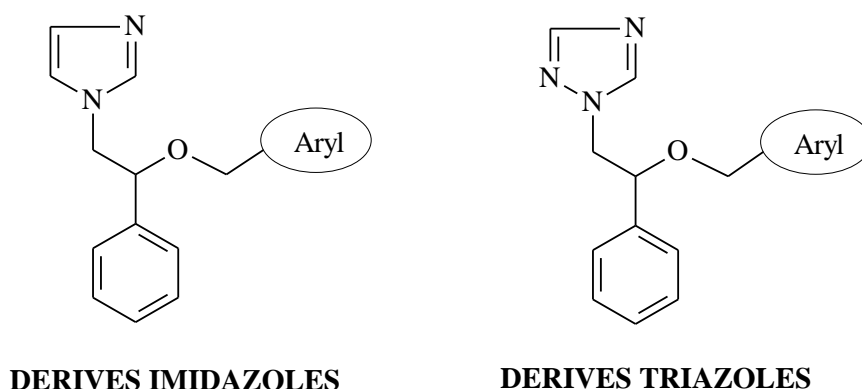


Figure 4 : Structure générale des azolés antifongiques

III.2. Origine et développement de série

L'histoire des antifongiques azolés commence en 1944 avec la mise en évidence par Woolley [27] des activités antifongiques du 1-(4-chlorobenzyl)-2-methyl benzimidazole ou Chlormidazole. Mais ce n'est qu'en 1958 que ce dernier sera utilisé en médecine humaine en tant que premier médicament antifongique de synthèse totale. Très vite le Chlormidazole montra des limites d'utilisation notamment son activité uniquement par voie locale et non générale.

Dès lors, d'intenses investigations pour la mise au point d'antifongiques plus efficaces conduiront à la suppression de l'homocycle benzénique du noyau benzimidazole et à l'avènement en 1967, des imidazolés antifongiques de première génération en thérapeutique. Ces derniers, bien qu'actifs par voie systémique vont cependant présenter deux inconvénients majeurs à savoir :

- ✓ un puissant effet d'inhibiteur enzymatique à l'égard des autres médicaments ;
- ✓ un effet de premier passage hépatique non négligeable, de sorte qu'ils seront eux-aussi utilisés préférentiellement par voie locale.

En 1977, d'autres pharmacomodulations aboutiront à la découverte des analogues structuraux des imidazolés de première génération. Ces molécules se sont révélées être de puissants antifongiques en raison de leur grande efficacité dans les mycoses systémiques par voie orale et parentérale. Toutefois, à l'instar des imidazolés de première génération, les analogues structuraux présentent des inconvénients, notamment une faible biodisponibilité et un faible taux plasmatique nécessitant des doses élevées et rapprochées. De sorte qu'en pratique ceux-ci seront également réservés à l'usage local à l'exception du Kétoconazole [7, 26].

Les nouvelles variations structurales entreprises en série des imidazolés antifongiques aboutiront en 1985, au remplacement du noyau imidazole par un isostère triazolique et à l'avènement des antifongiques triazolés qui se révélèrent être plus stable à la métabolisation et actif dans les mycoses systémiques tant par voie orale que par voie parentérale à l'instar du Fluconazole.

III.3. Classification - Produits utilisés

Les azolés antifongiques sont classés en fonction de la nature de leur hétérocycle azoté d'une part en dérivés imidazolés et leurs analogues structuraux et, d'autre part en dérivés triazolés et leurs analogues structuraux [7].

III.3.1 Les imidazolés antifongiques et analogues structuraux.

Deux sous classes sont identifiées : les aryl-phénylméthyl imidazolés et les β -arylalkyloxy β -dichlorophényléthyl imidazolés.

✓ Aryl-phénylméthyl imidazolés (Figure 5)

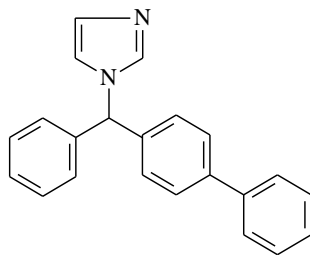


Figure 5 : Structure du Bifonazole

✓ β -arylalkyloxy β -dichlorophényléthyl imidazolés (Figure 6)

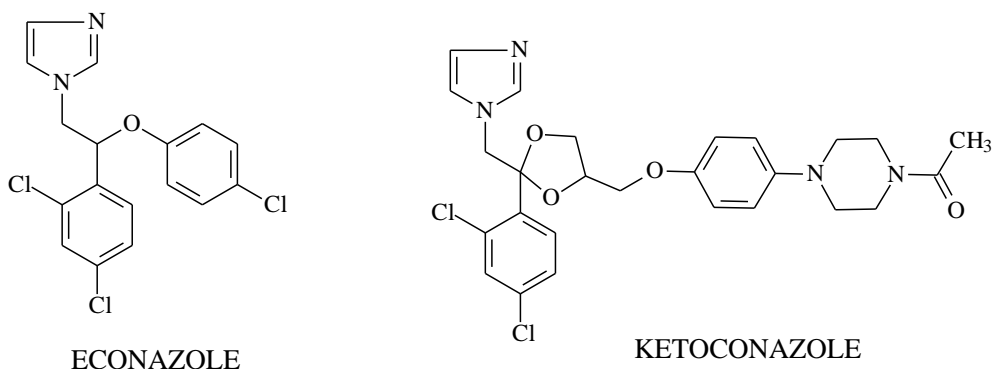


Figure 6: Structure de quelques β -arylalkyloxy β -dichlorophényléthyl imidazolés

III.3.2 Les triazolés antifongiques et leurs analogues structuraux (Figure 7).

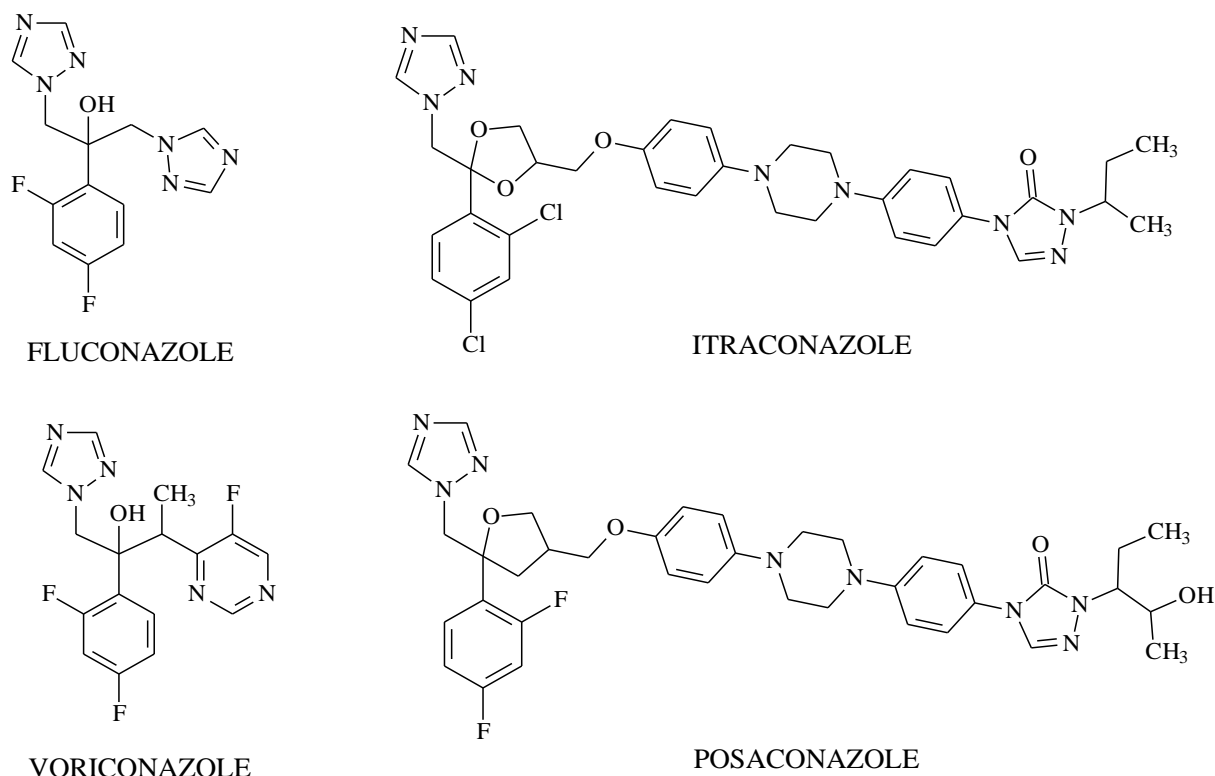


Figure 7: Structures de quelques triazolés antifongiques

Une classification pharmaco-thérapeutique des azolés antifongiques permet de distinguer ceux qui sont utilisés pour les traitements mycosiques locaux et ceux à usage systémique :

- azolés antifongiques à effet locale : ils regroupent généralement les dérivés imidazolés, excepté le Kétoconazole,
- azolés antifongiques à effet systémique : ce sont tous les dérivés triazolés antifongiques [7].

III.4 Mécanisme et spectre d'action

Les azolés antifongiques agiraient au niveau des stérols membranaires en bloquant la biosynthèse de l'ergostérol par suite de l'inhibition de 14 α -stérol déméthylase enzyme à cytochrome P-450 à l'origine de la transformation du lanostérol en ergostérol indispensable à l'édification de la membrane des champignons [7, 23].

La réaction de nature oxydative se déroulerait par suite de l'interaction entre les azolés au niveau de leur atome d'azote pyridinique en position 3 ou 4 et le fer hémique du cytochrome P-450. Ce complexe ainsi formé serait à l'origine du blocage du site d'occupation de l'oxygène, d'où l'action oxydative. Cette dernière se traduirait par une déplétion en ergostérol et une accumulation du lanostérol et d'autres stérols méthylés en position 14 [7].

Ces changements rendent la membrane plus fragile et altèrent l'activité de plusieurs enzymes liées à la membrane à l'origine des activités fongostatiques des azolés.

Ce mécanisme d'interaction des azolés avec le cytochrome P-450 tant chez les microorganismes que chez les mammifères serait responsable des effets indésirables et de l'hépatotoxicité imputés à certains azolés (Kétoconazole).

Les antifongiques azolés présentent un spectre d'action large incluant les levures du genre *Candida* sauf *Candida krusei*, les champignons dimorphes, *Cryptococcus neoformans*, les dermatophytes et le genre *Aspergillus* dont la sensibilité est inconstante d'une molécule à une autre [7].

III.5 Indications thérapeutiques

Les azolés antifongiques sont préconisés en thérapeutique antimycosique par voie locale pour le traitement des candidoses cutanéomuqueuses surinfectées ou non et les dermatophyties à germes sensibles. Par voie systémique, ils sont (les triazolés) proposés en thérapeutique pour le traitement des candidoses systémiques, vaginales, ano-rectales, bucco-pharyngées, des méningites à *Cryptococcus* et des aspergilloses [7, 23].

III.6 Contre-indications

Les azolés antifongiques seront contre-indiqués en cas d'insuffisance rénale, d'insuffisance hépatique, d'allergie à ces médicaments, chez la femme enceinte et la femme en période d'allaitement.

III.7 Effets indésirables

Les antifongiques azolés présentent de nombreux effets indésirables : une hépatotoxicité au long court, des troubles digestifs (nausées, vomissement, diarrhée), des troubles neurologiques et des troubles cutanéomuqueux à type d'allergies [7, 23].

III.8 Interactions médicamenteuses

Les azolés sont des inhibiteurs enzymatiques. Ainsi, ils peuvent diminuer le métabolisme hépatique des médicaments auxquels ils sont associés, entraînant une augmentation des concentrations plasmatiques de ceux-ci à l'origine d'un surdosage.

CHAPITRE 2 : RESISTANCES ET LIMITES D'UTILISATION DES ANTIFONGIQUES

Malgré leur diversité, l'efficacité des molécules antifongiques est limitée par l'émergence de souches résistantes. En effet, ces souches développeraient des stratégies pour échapper à l'action des antifongiques sous l'effet de divers facteurs. Ainsi nous exposerons les facteurs et mécanismes de résistance mis en jeu dans la classe des azolés antifongiques.

I. Définition

La résistance aux antifongiques se définit comme étant l'insensibilité d'une souche fongique à un ou plusieurs antifongiques. La souche fongique résistante, est capable alors de supporter des concentrations d'antifongiques supérieures à celle qui inhibe le développement de la majorité des souches de la même espèce. Cette résistance peut être primaire (intrinsèque) ou secondaire (acquise) [28].

La résistance primaire est celle que développe une souche fongique à l'égard d'un antifongique sans jamais avoir été en contact avec celui-ci. Autrement dit, il s'agit d'une insensibilité existante naturellement chez tous les champignons d'un même genre ou d'une même espèce. Elle fait partie généralement du patrimoine génétique normal du champignon. C'est par exemple le cas de la résistance de *C. krusei* au Fluconazole et celle du *Cryptococcus neoformans* aux échinocandines.

La résistance secondaire est développée par une souche de champignon à l'égard d'un antifongique auquel elle était auparavant sensible. Cette résistance ne touche que certaines souches au sein d'une espèce et peut être due à une mutation ou à l'altération d'un gène. La résistance des espèces de *C. albicans* et de *Cryptococcus neoformans* au Fluconazole illustre bien ce type de résistance [3,29].

II. Epidémiologie et facteurs de résistance

L'épidémiologie des levures du genre *Candida* s'est considérablement modifiée ces dernières années avec l'apparition d'espèces résistantes à un ou plusieurs antifongiques. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la survenue de ses résistances aux antifongiques [30].

La résistance des souches du genre *Candida* aux antifongiques azolés est fréquemment rapportée, en raison de la sélection d'espèces résistantes due à l'utilisation croissante des antifongiques azolés. Toutefois, la prévalence des résistances primaires aux triazolés de première génération chez les souches du genre *Candida* est faible [31,32]. Elle a été décrite dans moins de 2,5 % des cas pour le Fluconazole et dans moins de 9 % des cas pour l'Itraconazole [29]. Les souches *C. albicans* sont le plus souvent sensibles, *C. glabrata* est souvent «sensible-dose dépendant», *C. krusei* est le plus souvent résistant [29].

Quelques résistances secondaires ont été décrites chez des patients sous prophylaxie au Fluconazole, notamment chez les patients vivant avec le VIH ayant une candidose oropharyngée [32] et les patients greffés de la moelle [29]. Par ailleurs, des résistances croisées entre différents azolés ont également été décrites [33]. En fait, plusieurs facteurs contribueraient à la résistance clinique aux antifongiques azolés. Des études ont mis en cause la pression de l'environnement imposée par l'exposition au Fluconazole [34]. D'autres facteurs, tels que l'exposition à des agents antibactériens, à des traitements immunosuppresseurs et la condition médicale sous-jacente de l'hôte, pourraient se révéler être de meilleurs facteurs prédictifs de la distribution des espèces de *Candida* que l'utilisation du Fluconazole [35,36].

III. Mécanismes de résistance

Plusieurs mécanismes de résistance des levures aux dérivés azolés ont été décrits, incluant la diminution de l'accumulation intracellulaire des dérivés azolés, l'altération de la composition en stérols de la membrane et la surproduction ou la mutation des cibles enzymatiques des dérivés azolés [28].

III.1 Diminution de l'accumulation intracellulaire des dérivés azolés

L'accumulation intracellulaire des dérivés azolés peut être réduite par un manque de pénétration, à cause d'un faible taux d'ergostérol dans la membrane. Une possible diminution du ratio entre la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine dans le plasma peut changer les fonctions barrières de la membrane. De plus, une importante cause de la réduction de l'accumulation des drogues est la présence d'un système actif d'efflux sortant qui tente de refouler ces azolés hors de la cellule. Pour les souches résistantes, ce système d'efflux est très développé. Ceci est dû à la surexpression des gènes codant pour ces systèmes d'efflux [3, 31,14].

III.2 Altération de la composition en stérols de la membrane

Les levures résistantes sont capables de modifier la voie de biosynthèse de l'ergostérol, qui de ce fait supprime l'effet délétère des azolés, en évitant ainsi la formation par ces derniers de métabolites toxiques à partir de stérols méthylés en position 14- α . Chez *C. albicans*, le 14 α -méthyl fécostérol peut être métabolisé par l'enzyme Δ -5-6 désaturase (codé par le gène *ERG3*) en un produit toxique. Cette étude a montré que les souches résistantes aux dérivés azolés avaient une mutation dans le gène *ERG3* [3, 31,14].

III.3 Altération ou surproduction de la cible enzymatique des azolés

Certaines mutations du gène *ERG 11* ont été révélées dans plusieurs études comme étant la cause de la diminution d'affinité entre les dérivés azolés et les enzymes (14 α -déméthylase) ou une surexpression du gène *ERG11*, mais ce mécanisme de résistance aurait un effet plus réduit [3, 31,14].

Deuxième partie :
ETUDE EXPERIMENTALE

CHAPITRE 1 : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1.Type d'étude et cadre de travail

- ✓ Ce travail de type expérimental a eu lieu en ce qui concerne la synthèse chimique totale des biomolécules potentielles, au Laboratoire de Chimie Thérapeutique et Biomolécules de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques d'Abidjan. Au total, ce sont 10 chalcones à support benzimidazolique qui ont été conceptualisés puis édifiés.
- ✓ Leurs structures respectives ont été confirmées par les méthodes spectrométriques habituelles (RMN : ¹H, ¹³C ; ESI Masse ; FT-IR) au Laboratoire CEISAM de Nantes.
- ✓ Quant à l'évaluation des activités antifongiques de ses hybrides benzimidazolyl-chalcones, elle a été réalisée durant deux mois (du 1^{er} Aout au 30 septembre 2013) au Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie du Centre Suisse de Recherche Scientifique (CSRS) en Côte d'Ivoire.

I.2. Matériel de laboratoire

La réalisation de ce travail a nécessité le matériel de laboratoire suivant :

- Plaques de silicagel 60 F254 sur verre (Merck)
- Milieux de culture: Sabouraud 4% Glucose Agar, (Fluka, bouillon)
- Tryptone Soja (OXOID), Sabouraud Agar Maltose (OXOID)
- Bain-marie
- Flacon de culture en verre et Boîtes de Pétri
- Plaque chauffante et Incubateur
- Méthyl Thiazolyl Tétrazolium (MTT)

- Solvants (hexane, acétate d'éthyle, éthanol, méthanol, DMSO, eau distillée)
- Bacs en polyéthylène
- Balance de précision
- Embouts, Micropipettes graduées et Microplaque (96 puits)

I.3. Molécules à tester

I.3.1. Molécules de synthèse

Les chalcones à support benzimidazolique, soumis à l'évaluation anti-*Candida*, sont sous forme de poudre pure.

I.3.2. Substance de référence

Pour mettre en évidence l'efficacité antifongique de nos chalcones, nous avons utilisé deux substances médicamenteuse à savoir le Fluconazole et le Kétoconazole en raison de leurs indications thérapeutiques contre les infections fongiques à *Candida*. Ces médicaments proviennent de chez SIGMA Chimical Co. (USA).

NB : Les solutions mères de tous les produits ont été obtenues en dissolvant 1 mg de produit dans 1 ml de méthanol ou de DMSO.

I.4. Matériel microbiologique

Pour évaluer l'activité antifongique des produits nous avons utilisé une souche clinique de *Candida albicans*, de *Candida glabrata* et une souche de *Candida tropicalis*, toutes provenant du Laboratoire National de la Santé Publique de Côte d'Ivoire (LNSP-CI).

Par ailleurs, pour déterminer la sensibilité de ces trois espèces de *Candida* aux antifongiques et en particulier à deux azolés antifongiques (Kétoconazole,

Fluconazole), un antifongogramme a été réalisé par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats dudit test sont consignés dans le **tableau I**.

Tableau I: Antifongogramme de trois espèces de *Candida* vis-à-vis de deux azolés antifongiques

| Azolés antifongiques | Souches cliniques de <i>Candida</i> | | |
|---------------------------------|--|-------------------------|---------------------------|
| | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
| Kétoconazole | R | R | I |
| Fluconazole | R | R | R |

R : Résistant
S : Sensible
I : Intermédiaire

L'antifongogramme montre que les souches cliniques de *Candida* sont toutes résistantes au Kétoconazole et au Fluconazole. En effet, aucune de ces deux molécules n'a inhibé la pousse des champignons sauf le Kétoconazole qui a moyennement réduit la prolifération de *C. tropicalis* (sensibilité intermédiaire).

II-Méthodes

II.1. Méthode chimique : Synthèse des chalcones benzimidazoliques

II.1.1. Conceptualisation

Dans le contexte de résistance des champignons à la plupart des antifongiques, l'élaboration de nouvelles molécules susceptibles d'être plus efficaces reste une arme essentielle. Aussi, nous nous sommes intéressés à la série chimique des chalcones dans le cadre de nos activités de recherche pour la mise au point de nouvelles biomolécules à visée antimicrobienne.

Ainsi nous avons proposé un nouveau profil chimique de chalcone selon les méthodologies pharmacochimiques de juxtaposition d'entités bioactives et de modélisation moléculaire. Dans ce profil, un groupement fonctionnel carbonyle α,β -éthylénique à support aryle en occurrence une phénylpropénone, est porteur en sa position 1' d'un diaza-hétéroaryle de nature benzimidazolique diversement substitué ou non en sa position C5 (**Figure 9**).

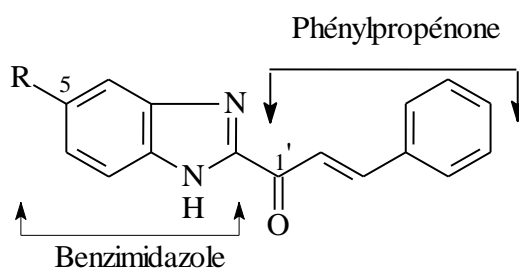


Figure 8 : Entités chimiques des chalcones benzimidazoliques

Le choix de ces deux entités chimiques se justifie par leur forte aptitude intrinsèque à induire des activités biologiques d'intérêt thérapeutique.

Le benzimidazole est un hétérocycle diazoté qui possèdent de nombreuses propriétés se déclinant en activités anti-infectieuses (antiparasitaires, antibactériennes, antifongiques, antivirales), antiulcéreuses, anti-inflammatoires, inodilatateurs et anticancéreuses [37-41]. L'on comprend dès lors pourquoi le benzimidazole constitue à l'heure actuelle le vecteur pharmacophore de nombreuses molécules médicamenteuses ou à visée médicamenteuse.

En ce qui concerne particulièrement les propriétés antifongiques du noyau benzimidazole, elles ont été rapportées pour la première fois par Woolley [26, 27]. Ces travaux ont permis la mise au point du premier médicament antifongique, le Chlormidazole (**Figure 10**) à vecteur pharmacophore benzimidazolique.

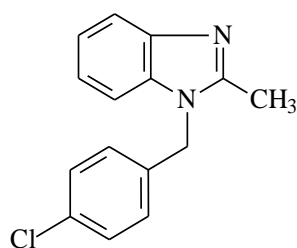


Figure 9 : Structure du Chlormidazole

Pour ce qui est des chalcones ou 1,3-diphénylpropénones (**Figure 11**), elles tiennent leurs multiples activités biologiques en particulier anti-infectieuses (antimalarique, antibactérienne, antifongique et antivirale) [42, 43] de la présence dans leur molécule du groupement fonctionnel de type propénone.

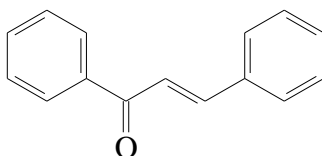


Figure 10 : Structure des Chalcones ou 1,3-diphénylpropénones

Cet enchaînement fonctionnel porté par un groupement aryle, serait en effet responsable de l'inhibition par complexation de certaines enzymes microbiennes et cancéreuses à fonction thiol [42, 43].

Dès lors, de nombreux pharmacochimistes se sont investis dans des travaux de recherche médicamenteuse autour du noyau benzimidazole et de l'enchaînement arylpropénone des chalcones du fait de leurs multiples potentialités pharmacologiques en particulier antifongiques.

Aussi pour notre part, il nous a semblé logique de concevoir un nouveau profil chimique hybride en associant le benzimidazole et l'arylpropénone. Ces nouveaux hybrides benzimidazolyl-chalcones (**Figure 12**) pourraient posséder eux-aussi, des activités antifongiques potentielles.

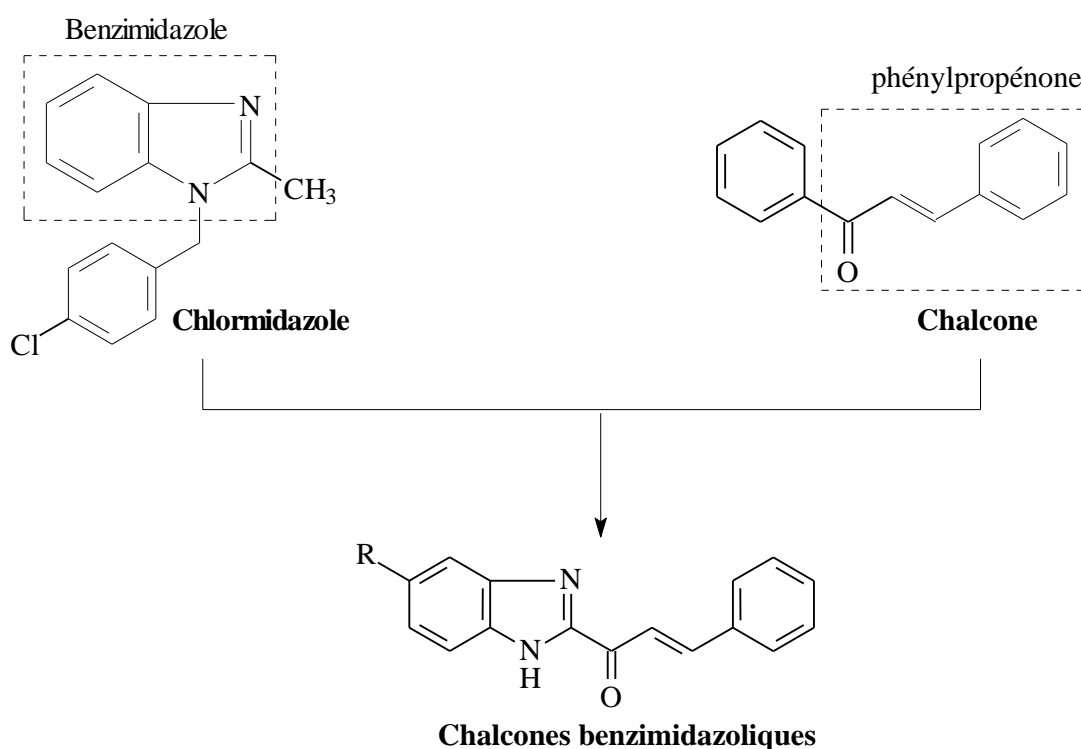


Figure 11 : Conception des chalcones benzimidazoliques à visée antifongique

II.1.2. Synthèse des chalcones benzimidazoliques

La préparation des nouvelles chalcones à été réalisé en deux grandes étapes :

- ✓ La première étape a consisté à préparer une méthyl-cétone à support benzimidazole diversement substitué ou non en l'occurrence des dérivés 2-acétylbenzimidazoles (**composé 1**).
- ✓ La seconde étape est l'accès aux chalcones benzimidazoliques (**composés 2a-2j**).

II.1.2.1 Preparation des 2-acétylbenzimidazoles : composé 1

La préparation des composés **1** (**Schéma 1**) a été réalisée par condensation selon la méthode de Phillips [44] entre divers orthophénylènediamines convenablement choisis (**a**) et de l'acide lactique (**b**) à reflux dans l'acide chlorhydrique dilué. Elle permet d'accéder après neutralisation à l'aide d'une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH_4OH) aux 2-hydroxyéthyl benzimidazoles (**c**). Ces derniers sont ensuite oxydés en méthyl-cétones en milieu acide acétique par le dichromate de potassium pour conduire aux 2-acétylbenzimidazoles attendus (**1**).

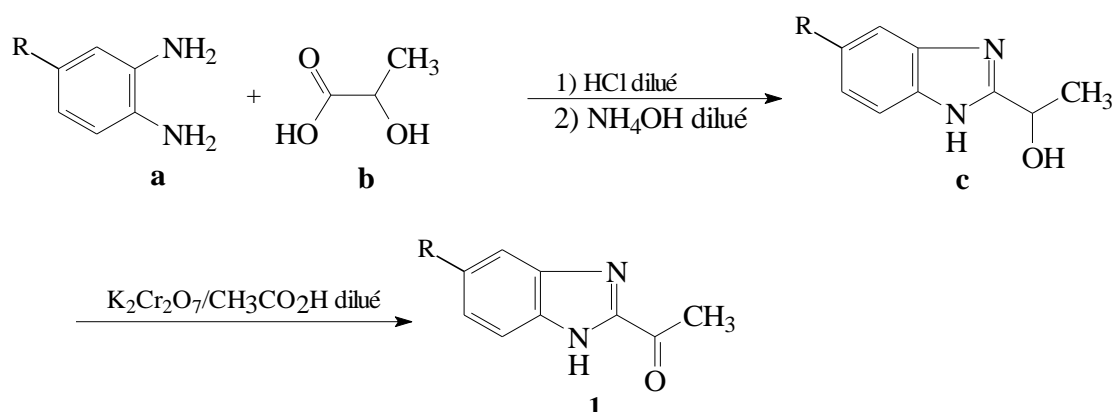


Schéma 1 : Synthèse des dérivés 2-acétylbenzimidazoles (**1**)

II.1.2.2 Accès aux chalcones benzimidazoliques : composés 2a-2j

Les 2-acetylbenzimidazoles (**1**) précédemment préparés ont été par la suite engagés dans une réaction de condensation en milieu basique de type Claisen-Schmidt avec le benzaldéhyde ou avec son analogue pyridinique (nicotinaldéhyde) (**d**) pour conduire aux nouvelles chalcones à support benzimidazolique diversement substitué ou non en C5 (**composés 2a-2j**) (**Schéma 2**).

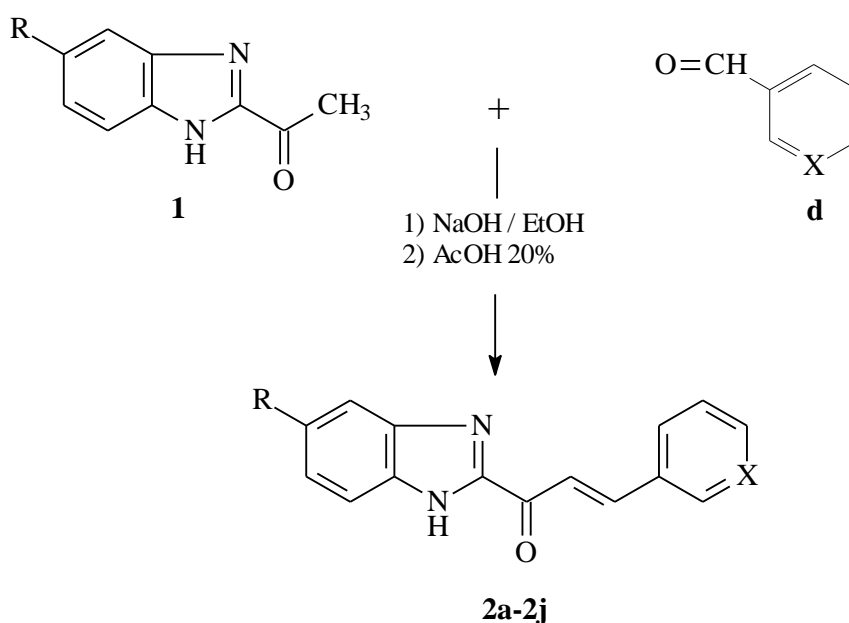


Schéma 2 : Synthèse des chalcones benzimidazoliques (2a-2j)

Tous ces dérivés de chalcones ont été synthétisés et caractérisés grâce à la collaboration de deux laboratoires à savoir le Laboratoire de SSMT de l'université Félix Houphouët Boigny de Cocody et le Laboratoire CIESAM de Nantes

Pour notre part nous sommes uniquement focalisé sur l'évaluation des activités antifongiques de ces dérivés préalablement synthétisés.

II.2. Méthode biologique : Evaluation des activités antifongiques

Pour mettre en évidence les activités antifongiques de nos chalcones, un screening a été réalisé grâce à la technique de bioautographie « agar overlay » [45]. Ce screening sommaire avait pour objectif de sélectionner les produits actifs sur chaque souche de *Candida* à la Quantité Minimale Inhibitrice (QMI) seuil de 10 µg. Par la suite nous avons déterminé en milieu liquide les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) des chalcones sélectionnées comme étant actives.

II.2.1. Screening antifongiques par la technique de bioautographie.

II.2.1.1 Principe de la technique de bioautographie « agar overlay ».

C'est une méthode qui consiste à mettre en contact un inoculum avec un chromatogramme sur couche mince, préalablement développé à partir des produits à tester. Il s'agit d'un test simple utilisant *Candida albicans* comme organisme indicateur pour la détection d'activités de composés antifongiques par chromatographie sur couche mince (CCM). L'inhibition de la croissance fongique a été évaluée par la détection colorée de l'activité déshydrogénasique des germes à l'aide du Chlorure de Méthyl Thiazolyl Tétrazolium (MTT). Cette coloration (violette) provient de l'activité des mitochondries des cellules vivantes actives.

La bioautographie a l'avantage de permettre le screening de plusieurs produits à la fois (10 produits par plaque) et l'évaluation de l'activité des produits par la détermination des Quantités Minimales Inhibitrices (QMI). Celles-ci sont définies comme étant les plus petites quantités de produits capables de s'opposer à la prolifération des souches de *Candida albicans* [45].

II.2.1.2. Préparation de l'inoculum

On prépare une culture de *Candida albicans* sur de la gélose de Sabouraud glucosée (Sabouraud 4% glucose agar, Fluka) en boîte de Pétri, incubée à 30°C pendant 24 à 48 heures. Une à trois colonies sont ensuiteensemencées dans 50 ml de bouillon de Tryptone Soja (OXOID), puis laissées sous agitation pendant une nuit à température ambiante. On prélève ensuite 1 ml du bouillon que l'on transfère dans un nouveau bouillon, laissé sous agitation pendant 6 heures (temps nécessaire pour atteindre une croissance exponentielle de *C. albicans*). Au moment du test, on ajoute 5 ml du bouillon d'environ 6 heures dans 50 ml d'agar à l'extrait de malt (Sabouraud agar maltose, OXOID), maintenu fondu au bain-marie à 45°C pour obtenir un inoculum contenant environ 10^5 cellules /ml [45].

II.2.1.3. Détection des activités

Des solutions méthanoliques de nos benzimidazolyl-chalcones ainsi que le Fluconazole et le Kétoconazole substances médicamenteuses de référence ont été préparées à la concentration de 1mg/ml. Par la suite, 10 µl de chaque solution, soit 10 µg de produit, sont déposés sur les plaques de verre en silicagel 60 F254. Les chromatogrammes sont développés dans un système d'élution composé d'hexane-acétate d'éthyle (1/1). Ces chromatogrammes sont ensuite séchés sur une plaque chauffante et maintenus à 35-40°C environ.

Sur chaque chromatogramme, on étale rapidement l'inoculum à raison de 10 ml par portion de plaque de silicagel (10 cm x 10 cm).Après la solidification de l'agar les plaques sont incubées à 30°C dans des bacs de polyéthylène pendant une nuit, en atmosphère humide. Pour la révélation, les plaques ainsi préparées sont imprégnées de solution aqueuse de Chlorure de Méthyl Thiazolyl Tétrazolium (MTT) à la concentration de 2,5 mg/ml. A la suite d'une nouvelle incubation de 2 à 4 heures environ, des zones d'inhibition de croissance

apparaissent sous forme de taches blanches sur un fond violet. Avant la lecture à la lumière ultraviolette, les plaques sont giclées avec de l'éthanol par mesure de sécurité, afin de tuer les souches levures non inhibées [45].

Les différentes étapes nécessaires à la réalisation de la technique de bioautographie sont résumées dans le **schéma 3**.

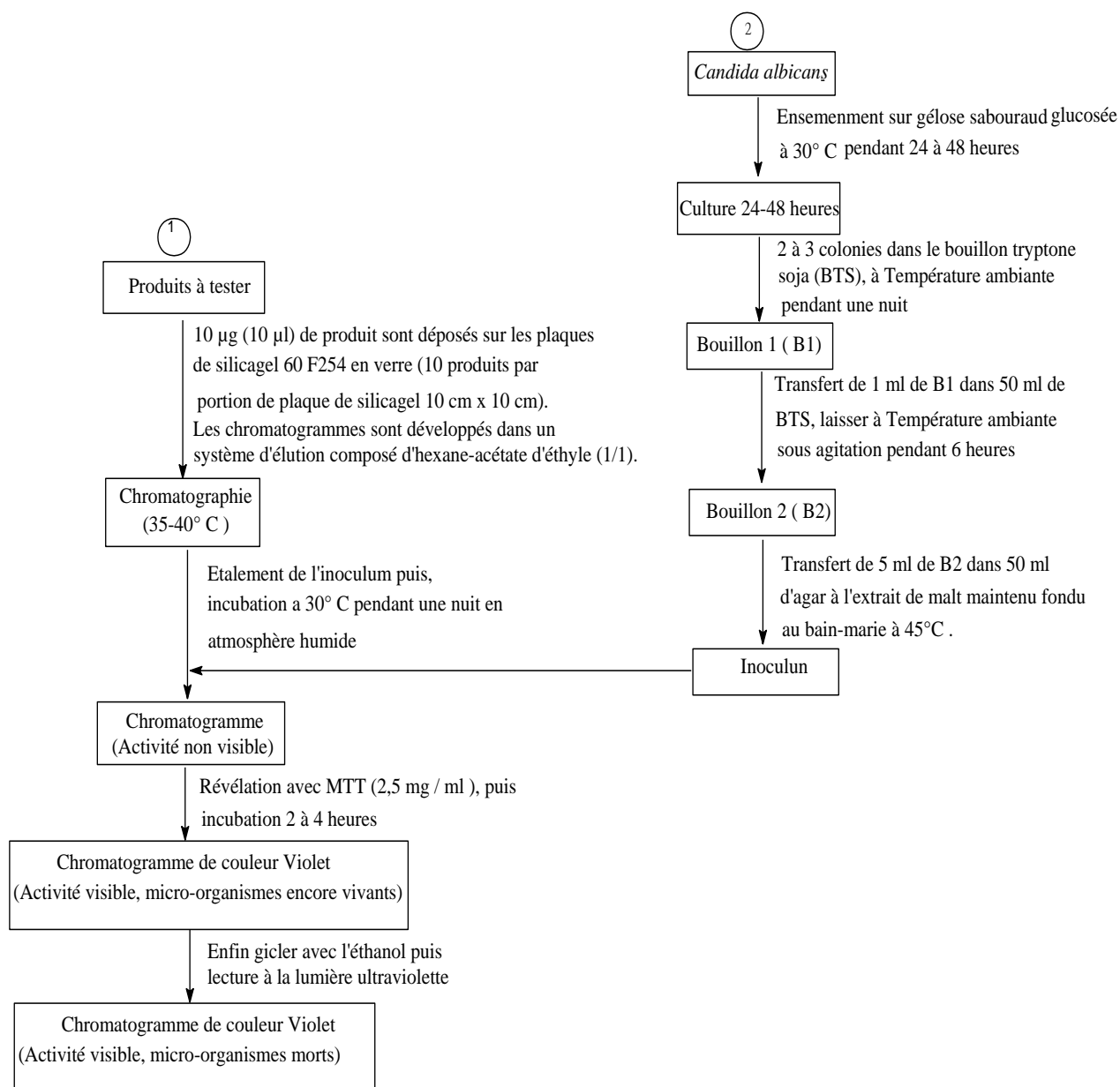


Schéma 3 : Etapes de réalisation de la technique de bioautographie

II.2.2.Détermination des CMI (en milieu liquide)

Pour tous les produits qui induisent une zone d'inhibition, donc actifs au moins sur une des espèces de *Candida*, les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de ces derniers ont été déterminées suivant d'une gamme de dilution donnant leurs CMI (**Tableau II**).

Tableau II: Gamme de dilution et de concentration

?

| Gamme de dilution | Concentration (µg/ml) |
|-------------------|-----------------------|
| 1 | 10 |
| 2 | 5 |
| 3 | 2,5 |
| 4 | 1,25 |
| 5 | 0,625 |
| 6 | 0,3125 |
| 7 | 0,15625 |
| 8 | 0,078125 |
| 9 | 0,0390625 |
| 10 | 0,01953125 |

II.2.2.1 Principe

La méthode de microdilution est utilisée pour évaluer la CMI des différents extraits. C'est une méthode qui consiste à mettre en contact un inoculum de *Candida* avec une dilution croissante d'antifongique dans des microplaques de 96 puits (12 rangés de 8 puits). L'inhibition de la croissance fongique sera évaluée par la détection colorée de l'activité déshydrogénasique des germes à

l'aide du Chlorure de Méthyl Thiazolyl Tétrazolium (MTT).). Cette coloration (violette) provient de l'activité des mitochondries des cellules vivantes actives.

La CMI est donnée par la plus faible concentration n'entraînant pas de transformation du MTT

II.2.2.2 Préparation de l'inoculum

La préparation de l'inoculum se fait selon le principe de la technique de bioautographie « agar overlay ». On prépare les cultures de *Candida* sur de la gélose de Sabouraud glucosée (Sabouraud 4% glucose agar, Fluka) en boîte de Pétri, incubée à 30°C pendant 48 heures. Une à trois colonies sont ensuite ensemencées dans 50 ml de bouillon de Tryptone Soja (OXOID), puis laissées sous agitation pendant une nuit à température ambiante. On prélève ensuite 10 ml du bouillon que l'on transfère dans un nouveau bouillon, laissé sous agitation pendant 6 heures (temps nécessaire pour atteindre une croissance exponentielle de *Candida*). Au moment du test, on ajoute 5 ml du bouillon d'environ 6 heures dans 50 ml de bouillon afin d'obtenir un inoculum contenant environ 10^5 cellules/ml.

II.2.2.3 Détection des activités

Le test est réalisé sur des microplaques de 96 puits. Les solutions mères des différents extraits ont été préparées avec du Diméthylsulfoxyde (DMSO) à la concentration de 1 mg/ml puis dilué avec le bouillon pour obtenir des solutions concentrées à 100 µg/ml. 100 µl de cette dilution est déposé dans les puits de la première colonne. L'on distribue ensuite 50 µl de bouillon dans les puits suivants et 50 µl de la solution du premier puits sont utilisés pour obtenir la gamme de dilution du tableau ci-dessus. 50 µl de l'inoculum sont distribués dans les puits à l'exception du dernier qui sert de témoin pour vérifier qu'il n'y a pas de contamination. Les plaques sont incubées à 30°C pendant 48h.

Pour la révélation des microplaques ainsi préparées, 40 μ l de solution aqueuse de Chlorure de Méthyl Thiazolyl Tétrazolium (MTT) à la concentration de 2,5 mg/ml sont distribués dans les puits et incubé encore pendant 30 min à température ambiante.

La solution aqueuse de MTT est de couleur jaune. Les puits contenant des cellules encore actives virent au violet sous l'effet de l'activité déshydrogénasique des mitochondries. La lecture se fait à l'œil nu.

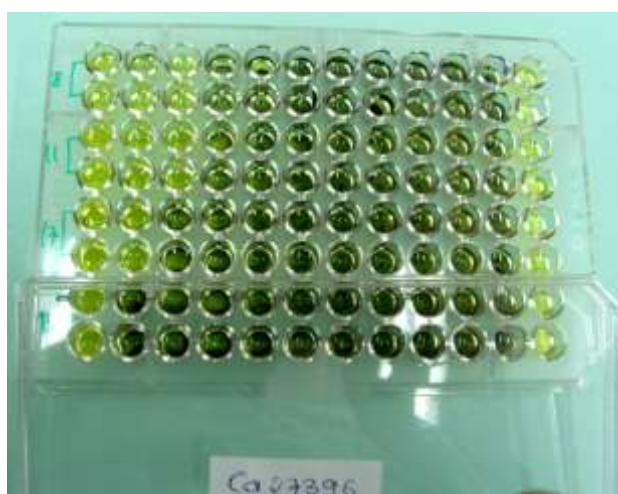


Figure 12 : CMI : dilution en milieu liquide en microplaque

La CMI a été définie comme la plus faible concentration pour laquelle aucune transformation du MTT n'a été observée. Tous les échantillons ont été testés en double et les tests ont été répétés et améliorés à deux reprises.

CHAPITRE 2 : RESULTATS ET DISCUSSION

I. RESULTATS

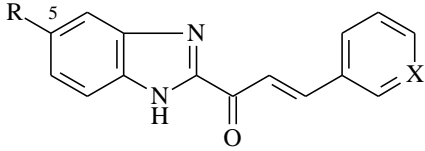

I.1. Résultats chimiques

Nous avons évalués 10 chalcones (**Tableau III**) possédant tous dans leurs molécules respectives l'enchainement phénylpropénone (**2a**, **2c**, **2e**, **2g**, **2i**) ou pyridinylpropénone (**2b**, **2d**, **2f**, **2h**, **2j**) porté par un hétérocycle benzimidazolique.

Par ailleurs ce benzimidazole est substitué ou non (**composés 2a** et **2b**) en position 5 par divers modulateurs :

- ✓ un groupement benzoyle : **composés 2c** et **2d**,
- ✓ un atome de chlore : **composés 2e** et **2f**,
- ✓ un atome de fluor : **composés 2g** et **2h**,
- ✓ un groupement nitro : **composés 2i** et **2j**.

Tableau III : Structure chimique des 10 chalcones benzimidazoliques

| Structure générale | Composés | R | X |
|---|-----------|---|----|
|  | 2a | H | CH |
| | 2b | | N |
| | 2c |  | CH |
| | 2d | | N |
| | 2e | Cl | CH |
| | 2f | | N |
| | 2g | F | CH |
| | 2h | | N |
| | 2i | NO ₂ | CH |
| | 2j | | N |

I.2. Résultats de l'évaluation des activités antifongiques

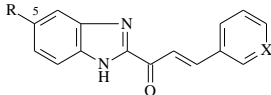

I.2.1 Détermination du statut actif ou non des produits

Les résultats obtenus lors du screening antifongique des chalcones à support benzimidazolique, du Fluconazole et du Kétoconazole vis-à-vis des souches de *Candida albicans*, de *Candida glabrata* et de *Candida tropicalis* sont rassemblés dans le **tableau IV**. Ces résultats montrent que :

- ✓ Les trois souches de *Candida* présentent des sensibilités relatives aux différents produits testés.
- ✓ Aucune des substances azolés de référence (Fluconazole et Kétoconazole) n'était active sur nos souches cliniques résistantes à cette même quantité seuil 10 µg.
- ✓ Sur les dix (10) chalcones soumis au test, sept (7) se sont avérés actives à la QMI seuil de 10 µg au moins sur une souche résistante de *Candida*. Il s'agit des **composés 2a, 2c - 2h**.
- ✓ Trois (3) produits chalconiques ont été inactifs quel que soit la souche résistante de *Candida* utilisée (**composés 2b, 2i et 2j**)

- ✓ Six (6) chalcones benzimidazoliques (**composés 2a, 2d-2h**) ont été actifs sur la seule souche clinique résistante de *C. albicans*.
- ✓ Sur *C. glabrata*, seuls deux (2) chalcones se sont révélées actives : **composés 2e et 2h**.
- ✓ Quatre autre (4) chalcones se sont avérées plutôt actives sur *C. tropicalis* : **composés 2c, 2d-2e, 2h**.
- ✓ Deux autres chalcones benzimidazoliques (**composés 2e et 2h**) se sont par contre révélées actives sur l'ensemble des souches de *Candida*.

Tableau IV : Statut antifongique des composés 2a-2j, du Kétoconazole et du Fluconazole vis-à-vis de *Candida*

| Structure générale | Composés | R | X | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
|---|----------|---|----|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
|  | 2a | H | CH | + | - | - |
| | 2b | | N | - | - | - |
| | 2c |  | CH | - | - | + |
| | 2d | | N | + | - | + |
| | 2e | Cl | CH | + | + | + |
| | 2f | | N | + | - | - |
| | 2g | F | CH | + | - | - |
| | 2h | | N | + | + | + |
| | 2i | NO ₂ | CH | - | - | - |
| | 2j | | N | - | - | - |
| Kétoconazole | | | | - | - | - |
| Fluconazole | | | | - | - | - |

+ : Actif (QMI = 10µg)
 - : Inactif (QMI >10µg)

I.2.2 Détermination des CMI

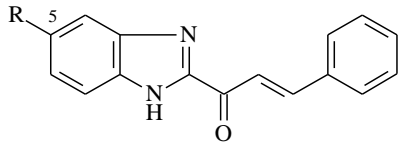

Les résultats des activités antifongiques des chalcones benzimidazoliques vis-à-vis des trois espèces de *Candida* ont été regroupés en deux séries dans deux tableaux :

- ✓ la série des phénylpropénone benzimidazoliques : **composé 2a, 2c, 2e, 2g et 2i (Tableau V),**
- ✓ la série des pyridinylpropénones benzimidazoliques (**composé 2b, 2d, 2f, 2h et 2j) (Tableau VI).**

L'activité de chaque chalcone est donnée par sa Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) exprimée en microgramme par millilitre ($\mu\text{g/ml}$). Certains composés n'ont pas vu leur CMI déterminée (-) car n'ayant aucune activité antifongique à $10\ \mu\text{g}$ (**Cf. tableau IV**). Les résultats obtenus font ressortir que:

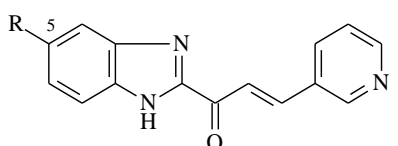

- ✓ **en série des phénylpropénones benzimidazoliques (Tableau V),** hormis le dérivés nitré en C5 sur l'homocycle benzénique des phénylpropénones (**composé 2i** : statut inactif), tous les 4 autres dérivés qu'ils soient substitués en C5 ou non ont été au moins actif sur une souche de *Candida*. Les CMI obtenues varient entre 5-1,25 $\mu\text{g/ml}$.
- ✓ **en série des pyridinylpropénones benzimidazoliques (Tableau VI),** trois chalcones sur cinq ont été au moins actifs sur une espèce de *Candida* à des CMI également variant entre 5 et 1,25 $\mu\text{g/ml}$. Les deux dérivés sans CMI (pour cause de statut inactif) sont respectivement la chalcone non substitué en C5 ou **composé 2b** et là encore un autre dérivé nitré en C5 (**composé 2j**).

Tableau V : Activités antifongiques *in vitro* des phénylpropénones benzimidazoliques vis-à-vis de *Candida*

| Phénylpropénones benzimidazoliques | | | CMI (µg/ml) | | |
|---|-----------|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Structure générale | composés | R | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
|  | 2a | H | 5 | - | - |
| | 2c |  | - | - | 2,5 |
| | 2e | Cl | 1,25 | 5 | 5 |
| | 2g | F | 5 | - | - |
| | 2i | NO ₂ | - | - | - |

(-) : non déterminé car n'ayant aucune activité antifongique à 10 µg (Cf. tableau V)

Tableau VI : Activités antifongiques *in vitro* des pyridinylpropénones benzimidazoliques vis-à-vis de *Candida*

| Pyridinylpropénones benzimidazoliques | | | CMI (µg/ml) | | |
|---|-----------|---|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| Structure générale | composés | R | <i>Candida albicans</i> | <i>Candida glabrata</i> | <i>Candida tropicalis</i> |
|  | 2b | H | - | - | - |
| | 2d |  | 5 | - | 2,5 |
| | 2f | Cl | 1,25 | - | - |
| | 2h | F | 2,5 | 5 | 2,5 |
| | 2j | NO ₂ | - | - | - |

(-) : non déterminé car n'ayant aucune activité antifongique à 10 µg (Cf. tableau V)

II. DISCUSSION

À la suite de l'évaluation des activités antifongiques des chalcones benzimidazoliques vis-à-vis de souches de *Candida* résistantes au Kétoconazole et au Fluconazole, nous nous sommes limités dans cette autre partie de notre travail, à la seule discussion des résultats expérimentaux obtenus. Une telle discussion de type relations structure-activité vise deux objectifs :

- ✓ la pertinence du concept pharmacochimique de juxtaposition d'entités bioactives comme méthode pratique d'élaboration de molécules d'intérêt thérapeutique,
- ✓ la détermination des éléments structuraux qui concourent à l'apparition voire à l'exaltation des activités antifongiques attendues.

II.1. Pertinence de notre stratégie pharmacochimique

La méthode pharmacochimique de conceptualisation de nouveaux candidat-médicaments par suite d'une réunification appropriée de plusieurs entités pharmacophores permet d'établir que :

- ✓ Le remplacement de l'homocycle benzénique en position 1' de la 1,3-diphénylpropénone ou chalcone par l'hétérocycle benzimidazole non substitué en C5 (**Figure 14**), conduit effectivement à une nouvelle molécule hybride ou Benzimidazolyl-phénylpropénone (**composé 2a**) possédant de fortes activités antifongiques à la CMI de 5 µg/ml. Cette efficacité ne l'est cependant que sur la souche chimiorésistante de *Candida albicans*. En effet aucune activité antimycosique n'a été décelée à la QMI seuil de 10 µg sur les souches chimiorésistantes de *C. glabrata* et *C. tropicalis*. Cette efficacité anti-*albicans* de la phénylpropénone à

support benzimidazole non C5 substitué est meilleure que celle du Kétoconazole ou du Fluconazole qui n'ont présenté aucune activité à la quantité seuil de l'expérimentation.

Le choix du diaza-hétéroaryle de nature benzimidazolique porteur en sa position 2 de la phénylpropénone des chalcones, s'avère donc judicieux pour l'induction d'activités antifongiques. Le concept pharmacochimique d'élaboration de nouvelles biomolécules potentielles par juxtaposition de pharmacophores, demeure par conséquent, une méthode pertinente pour l'élaboration de candidat-médicaments.

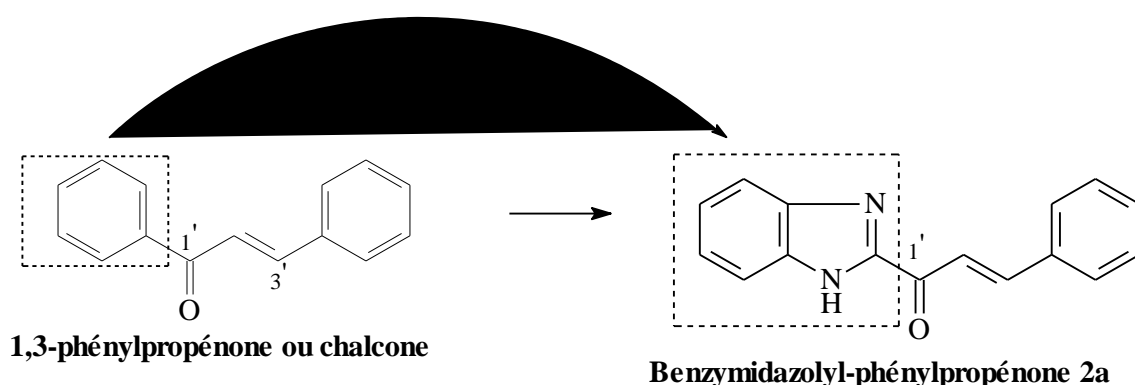


Figure 13 : Modulations entreprises autour de la 1,3 diphénylpropénone ou chalcone

Au vu de cette efficacité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* induite par notre chalcone (**composé 2a**), il nous paraît intéressant d'entreprendre d'autres modulations chimiques autour de cette dernière dans la perspective d'améliorer ses activités et ce, quelque que soit la souche chimiorésistante de *Candida*. A cette fin, nous avons entrepris autour du **composé 2a**, deux types de modulations chimiques à savoir (**Figure 15**) :

- ✓ la substitution du noyau benzimidazolique en sa position C5 par divers modulateurs de type benzoyle, chloré, fluoré ou nitré à l'instar des benzimidazolés anthelminthiques utilisés en thérapeutique
- ✓ le maintien du noyau benzimidazole C5 substitué ou non, doublé du remplacement de l'homocycle benzénique en position 3' de la propénone par un hétérocycle azoté de type pyridinique en référence aux azolés antifongiques,

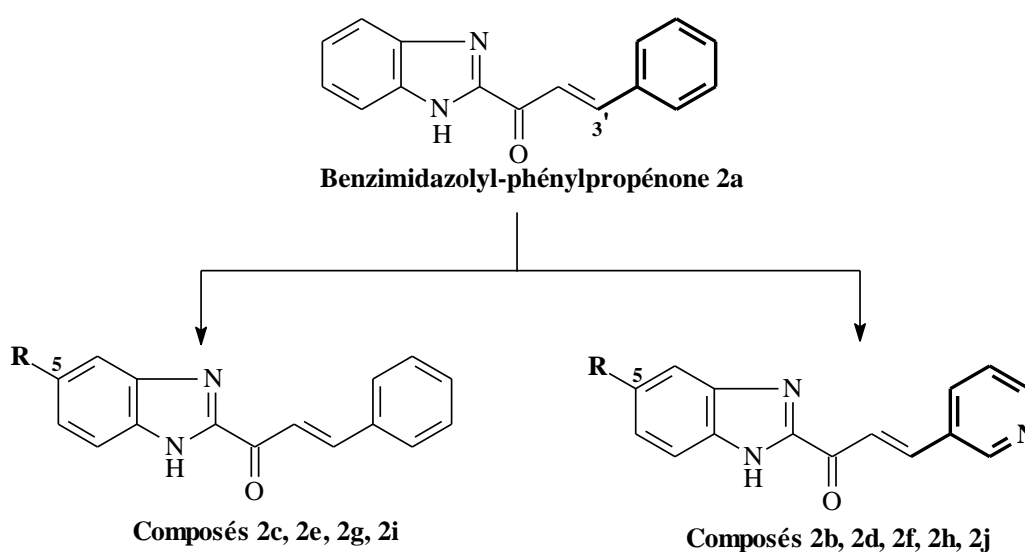


Figure 14 : Modulations chimiques entreprises autour de la phénylpropénone benzimidazolique **2a**

II.2. Éléments structuraux d'amélioration des activités antifongiques

Les principales variations entreprises pour déterminer les éléments structuraux indispensables à l'apparition, au maintien voire à l'exaltation des activités antifongiques attendues, permettent d'établir que :

II.2.1 Série des phénylpropénones benzimidazoliques (Tableau V)

- ✓ L'introduction d'un groupement benzoyle en position 5 du benzimidazole du **composé 2a**, provoque une perte d'activité sur *Candida albicans* au profit de *Candida tropicalis* (CMI = 2,5 µg/ml). En effet le dérivé C5-benzoylé ou **composé 2c**, n'a présenté aucune activité à 10 µg lors du screening antifongique par la méthode autobiographique sur *C. albicans* et *C. glabrata*. Pour la dernière souche chimiorésistante, à savoir *C. tropicalis*, le **composé 2c** s'est montré 2 fois plus efficace que son analogue non substitué **2a**, en terme d'activité antifongique.
- ✓ L'introduction d'un atome de chlore (**composé 2e**) conduit à une exaltation des activités antifongiques vis à vis de notre souche de *Candida albicans* chimiorésistante (CMI = 1,25 µg/ml), soit une performance anti-*Candida*, 4 fois supérieure à celle du composé **2a** sur la même souche (CMI = 5 µg/ml). Par ailleurs, cette performance s'étend également à *Candida glabrata* et *Candida tropicalis* à la CMI commune de 5 µg/ml. La phénylpropénone benzimidazolique chloré en C5 s'avère efficace pour l'induction d'activités antifongiques vis-à-vis des trois souches de *Candida* chimiorésistantes.
- ✓ Par contre, lorsque l'on remplace l'atome de chlore par un autre halogène de type fluoré, le **composé 2g** obtenue perd en efficacité vis-à-vis de *C. albicans* d'un facteur de 4 (CMI = 5 µg/ml). De plus ce dérivé fluoré s'illustre par sa totale inefficacité sur *C. glabrata* et sur *C. tropicalis* auparavant sensibles au dérivé chloré **2e**.
- ✓ L'introduction d'un groupement nitro (**composé 2i**) n'est pas favorable à l'apparition des activités anti-*Candida*. On a une perte total de l'activité

antifongique sur toutes les souches au seuil limite de notre expérimentation (QMI = 10 µg).

Au final, en série des phénylpropénones benzimidazoliques les modulations entreprises pour améliorer les activités antifongiques du **composé 2a** montre que :

- La meilleure performance sur *Candida albicans*, est obtenue avec le dérivé chloré ou **composé 2e**.
- Ce même composé demeure également le plus efficace sur *C. glabrata*.
- Par contre sur *C. tropicalis*, le **composé 2c** ou dérivé C5-benzoylé, s'avère le plus efficace.
- Sur les trois souches de *Candida* chimiorésistantes aux azolés antifongiques, le meilleur profil antimycosique est obtenu avec le **composé 2e** ou phénylpropénone benzimidazolique C5-chloré.

II.2.2 Série des pyridinylpropénones benzimidazoliques (Tableau VI)

- ✓ Le remplacement de l'homocycle benzénique du **composé 2a** par un hétéroaryle hexagonal de type pyridinique (**composé 2b**) en référence aux azolés antifongiques, a entraîné l'annihilation de la seule activité antifongique obtenue sur *Candida albicans*.
- ✓ Le maintien de la pyridinylpropénone doublé de la C5 benzylation du benzimidazole (**composé 2d**) montre le maintien de l'efficacité anti-*tropicalis* à 2,5 µg/ml, le maintien de l'inactivité sur *C. glabrata* et cette fois, l'induction d'une activité anti-*albicans* à 5 µg/ml, comparativement à l'analogue phénylpropénone benzoylé ou **composé 2c**.

- ✓ Contrairement au profil antifongique de la série des phénylpropénones halogénés en C5, la série des pyridinylpropénones halogénés montre une inversion du spectre d'action antimycosique. En effet le dérivé fluoré (**composé 2h**) est cette fois ci, le seul composé efficace sur les trois souches de *Candida*. Il est effectivement 2 fois plus efficace comparativement au **composé 2g** sur *C. albicans* (CMI = 2,5 µg/ml), en plus d'induire des activités anti-*glabrata* à 5 µg/ml et anti-*tropicalis* à 2,5 µg/ml.
- ✓ Pour ce qui est du composé chloré **2f**, ce dernier demeure le composé le plus actif sur *C. albicans* que ce soit en série des phénylpropénones qu'en série des pyridinylpropénones.
- ✓ Que ce soit en série des phénylpropénones qu'en série des pyridinylpropénones, la présence d'un groupement nitro sur le noyau benzimidazole n'entraîne aucune activité antifongique, contrairement à sa capacité d'induction de propriétés anti-infectieuses dans d'autres séries médicamenteuses.

Au final, en série des pyridinylpropénones, l'induction des activités antifongiques est assujettie à l'introduction d'un atome d'halogène ou d'un groupement benzoyl.

CONCLUSION - PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de la mise au point de nouveaux candidat-médicaments pour contribuer à la recherche pharmacochimique dans la lutte contre les maladies mycosiques.

L'évaluation des activités antifongiques des phénylpropénones et pyridinylpropénones benzimidazoliques vis-à-vis de trois souches de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*) résistantes au Kétoconazole et au Fluconazole a montré que :

- ✓ La meilleure performance sur *Candida albicans*, est obtenue avec les dérivés chlorés avec une CMI de 1,25 µg/ml.
- ✓ Le composé chloré et le composé fluoré demeurent les plus efficaces sur *C. glabrata* avec une CMI de 5µg/ml.
- ✓ Par contre sur *C. tropicalis*, avec des CMI de 2,5 µg/ml, les composés benzoylés et le dérivé fluoré, s'avèrent être les plus efficaces.
- ✓ Sur les trois souches de *Candida* chimiorésistantes aux azolés antifongiques, le meilleur profil antimycosique est obtenu avec les composés C5-halogénés avec des CMI variant entre 5 et 1,25 µg/ml.

Par ailleurs, les modulations chimiques entreprises montrent que :

- ✓ Que ce soit en série des phénylpropénones qu'en série des pyridinylpropénones, la présence d'un groupement nitro sur le noyau benzimidazole n'entraîne aucune activité antifongique.
- ✓ en série des pyridinylpropénones benzimidazoliques, l'induction des activités antifongiques est assujettie à l'introduction d'un atome d'halogène ou d'un groupement benzoyle en C5 du noyau benzimidazole.
- ✓ Le meilleur profil anti-*Candida* est obtenue avec les C5-halogénés quelque soit la série d'arylpropénone benzimidazolique.

Ces résultats nous permettent de valider le profil chimique arylpropénone benzimidazolique comme nouveau pharmacophore antimycosique potentiel. Il nous apparaît donc nécessaire de poursuivre ces travaux de pharmacochimie :

- ✓ par le blocage des sites de métabolisations potentiels du noyau benzimidazole (C5 et/ou C6) avec divers autres modulateurs
- ✓ par le remplacement de l'homocycle benzénique de l'enchaînement phénylpropénone par des hétérocycles pentagonaux à deux ou trois atomes d'azote à l'instar des imidazolés et triazolés antifongiques.

D'un point de vue fondamental, il serait aussi intéressant d'élucider le mode d'action de ses nouvelles chalcones à support benzimidazolique sur le genre *Candida*.

Les molécules obtenues dans ce travail de thèse constituent des fondations solides, sous réserve des études de toxicologie et de pharmacologie pour la mise au point d'une nouvelle classe chimique d'antifongique de synthèse totale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1- **Yaye YG, Kra AKM, Ackah JA, Djaman A.** Evaluation de l'activité antifongique et essai de purification des principes actifs des extraits de *Terminaliamantaly* (*h.perrier*), une Combretacée, sur la croissance in vitro de *Candida albicans*. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège 2011 ; Vol 80 : 953 - 964
- 2- **Konan KR.** Epidémiologie des mycoses profondes et génitales à l'unité de mycologie de l'institut Pasteur de Côte d'Ivoire de 1990 à 2009. 96p. Thèse pharma 2013.
- 3- **Patrick V.** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de doctorat Angers 2008 ; Vol 930 : 168p
- 4- **Silva S, Negri, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J.** *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews 2012; Vol 36 288–305
- 5- **Basu S, Chakraborty D, Dey SK, Das S.** Biological Characteristics of Nosocomial *Candida tropicalis* Isolated from Different Clinical Materials of Critically Ill Patients at ICU. International Journal of Microbiological Research 2011; Vol 2: 112-119.
- 6- **Develoux M, Bretagne S.** Candidoses et levures diverses.
EMC- Maladies Infectieuses 2005 ; Vol 2: 119–139
- 7- **André B.** Antibiotiques : Agents antibactériens et antifongiques.
Edition ellipses Paris 1999, 1216 p.

8- Morgan J, Meltzer MI, Plikaytis BD, Sofair AN, Huie WS, Wilcox S, et al. Excess mortality, hospital stay and cost due to candidemia: A case control study using data from population-based candidemia surveillance. Infect Control Hospital Epidemiology 2005; Vol 26: 540-547.

9- Lass FC. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. Mycoses 2009; Vol 52 (3) : 197-205

10- Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clinical microbiology reviews 2007; Vol 20 (1): 133-163.

11- Espinel IA. Mechanisms of resistance to antifungal agents: Yeasts and filamentous fungi. Revista Iberoamericana de Micología 2008; Vol 25(2): 101-106.

12- Smagill S, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Résistance croisée aux triazoles chez *Candida sp*: observation, fréquence dans les isolats sanguins et implications pour les traitements antifongiques. Journal de mycologie médicale 2007 ; Vol 17 (1) : 1-10.

13- Djohan V, Angora KE, Vanga BAH, Konaté A, Kassi FK, Yavo W et al. Sensibilité in vitro des souches de *Candida albicans* d'origine vaginale aux antifongiques à Abidjan (Cote d'Ivoire). Journal de Mycologie Médicale 2012 ; Vol 22 (2): 129-133.

14- Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infectious Diseases* 2002; Vol 2: 73-85

15- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Colombo A. Geographic and temporal trends in isolation and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*: A global assessment from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program 2001 to 2005. *Journal of Clinical Microbiology* 2008 ; Vol 46 : 842–849.

16- Talarmin JP, Bouteille D, Tattevin P, Dargère S, Weinbreck P, Ansart SJ. Epidemiology of candidemia: A one-year prospective observational study in the west of France. *Médecine et maladies infectieuses* 2009; Vol 39: 877-885.

17- Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Japanese Journal of Medical Mycology* 2007; Vol 48 (1): 1-12

18-Menan HE, Messou E, Adoubryn K, Yavo W, Kiki BP, Vanga H et al. Recherche de *Candida dubliniensis* chez des patients VIH+ à Abidjan (Côte d’Ivoire). *Journal de Mycologie Médicale* 2008; Vol 18 (4) : 228-233

19- Jindal N, Gill P, Aggarwal A. An epidemiological study of vulvovaginal candidiasis in women of childbearing age. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2007; Vol 25 (2) : 175-176

20- Kannel WB, Levine BS. *Candida* Infection as a Risk Factor for HIV Transmission. *Journal of Women’s Health* 2003; Vol 12 (5) : 487-494.

21-Cristina I. Caractérisation génétique, phénotypique et formation de biofilm des souches de *Candida albicans* répondant ou non au farnésol. 132p.

Thèse de doctorat Montréal 2010.

22-Allatin NF. Etude de la sensibilité in vitro aux antifongiques des souches de *Candida albicans* isolées des prélèvements vaginaux à Abidjan à l'institut Pasteur de Côte d'Ivoire. 118 p. Thèse Pharma, Abidjan 2013.

23-Céline L. Rôle de l'IL-13 et des ligands de PPAR- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*, implication de PPAR- γ . 151p. Thèse de doctorat Toulouse 2007.

24-Chabasse D, Guigen Cl, Contet AN. Mycologie médicale
Paris : MASSON (1999). 324 p.

25- Da Costa KR, Cristina J, Lavrador MA, Baruffi MD. Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. Mycoses 2012; Vol 55, e97–e105

26- Maertens JA. History of the development of azole derivatives.
Clinical Microbiology and Infection 2004; Vol 10 : 1-10.

27-Woolley DW. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. Journal of Biological Chemistry 1944; Vol 152 : 225-232.

28- Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents mechanisms and clinical impact. *Clinical Infectious Diseases* 2008 ; Vol 46 : 120-128.

29- Piens MA, Monbrison F, Picot S. Etude de la sensibilité des levures aux antifongiques en pratique médicale. *La lettre de l'infectiologie* 2003; Vol 18 (6): 222-226

30- James BA. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nature Reviews Microbiology* 2005; Vol 3: 547-556

31- Pfaller MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine.* 2012; Vol 125 (1) : S3-S13.

32- Andargachew M, Afework K, Belay A, Beyene M, Aschalew G, Martha A et al. Frequent detection of 'azole' resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. *BMC Infectious Diseases* 2013 ; Vol 13 : 82.

33- Magill S, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Résistance croisée aux dérivés triazolés chez *Candida sp*: Observation, fréquence dans les isolats sanguins et implications pour les traitements antifongiques. *Journal de Mycologie Médicale.* 2007; Vol 17: S1 -S10

34- Patrick V, Selene F, Alix TC. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International journal of microbiology* 2012; Vol 2012: 1-26

- 35- Lin MY, Carmeli Y, Zumsteg J.** Prior antimicrobial therapy and risk for hospital-acquired *Candida glabrata* and *Candida krusei* fungemia: a case-case-control study. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2005; Vol 49 : 4555-4560
- 36- Malani A, Hmoud J, Chiu L, Carver PL, Bielaczyc A, Kauffman C.** *Candida glabrata* fungemia: experience in a tertiary care center. Clinical Infectious Diseases 2005; Vol 41:975-981.
- 37- a) Ouattara M, Sissouma D, Koné MW, Menan HE, Touréand SA, Ouattara L.** Synthesis and anthelmintic activity of some hybrid Benzimidazolyl-chalcone derivatives. Tropical Journal of Pharmaceutical Research 2011; Vol 10 (6): 767-775.
- b). Sissouma D, Ouattara M, Koné MW, Menan HE, Adjoua A, Ouattara L.** Synthesis and *in vitro* nematocidal activity of new chalcones vectorised by imidazopyridine. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2011; Vol. 5 (18): 2086-2093.
- 38- Mahiuddin A, David SCB, Naresh K.** Synthesis, Reactivity and Biological Activity of Benzimidazoles. Topics in Heterocyclic chemistry 2007; Vol 9: 87-118
- 39- Khabnadideh S, Rezaei Z, Pakshir K, Zomorodian K, Ghafari N.** Synthesis and antifungal activity of benzimidazole, benzotriazole and aminothiazole derivatives. Research in pharmaceutical science 2012; Vol 7(2): 65–72

40- Singh N, Pandurangan A, Rana K, Anand P, Ahmad A, Kumar A. Benzimidazole: A short review of their antimicrobial activities. International Current Pharmaceutical Journal 2012; Vol 1 (5) : 119-127

41- Zniber R, Moussaif A, Achour R, El Ghouli M. Activité biologique de dérivés du benzimidazole. Revue Roumaine de Chimie. 2009; Vol 54 (8): 643–650

42- Dimmock JR, Elias DW, Beazely MA, Kandepu NM. Bioactivities of chalcones. Current Medicinal Chemistry 1999; Vol 6(12): 1125-1149.

43- Nowakowska Z. A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones. European Journal of medicinal Chemistry. 2007; Vol 42: 125-137.

44- Phillips MA. The formation of 2-substituted benzimidazoles. Journal of the Chemical Society. Vol 1928, 2393-2399.

45- Rahalison L, Hamburger MO, Monod M, Frenk E, Hostettmann K.
A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. Phytochemistry Analysis 1991; Vol 2:199-203.

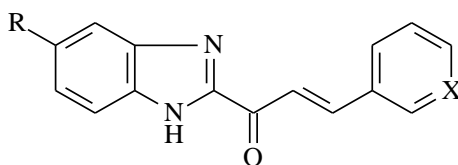
RÉSUMÉ

Les candidoses constituent des infections mycosiques les plus répandues dans le monde. L'efficacité de la chimiothérapie antifongique est devenue un enjeu de santé publique à cause de l'émergence et de la prolifération de *Candida* chimiorésistantes. C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposé d'évaluer les activités antifongiques d'une nouvelle série de chalcones benzimidazolique, sur trois souches de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*) chimiorésistantes au Kétoconazole et au Fluconazole. L'objectif de ce travail est d'identifier un chef de file antifongique potentiel afin d'entreprendre son développement pharmacochimique.

Les chalcones benzimidazoliques utilisées ont été conceptualisées selon les techniques de réunification pharmacochimique d'entités à propriétés biologiques potentielles. Quant aux activités antifongiques des produits, celles-ci ont été exprimées en Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) après leur détermination *in vitro* sur les trois souches clinique de *Candida* suivant la technique de dilution en microplaque.

Les 10 composés évalués possèdent tous dans leurs molécules respectives l'enchaînement phénylpropénone ou pyridinylpropénone porté par l'hétérocycle benzimidazolique. Les résultats montrent que sur les 10 composés évalués, 7 possèdent une activité antifongique contrairement à nos substances de référence le Fluconazole et le Kétoconazole qui n'ont montré aucune activité au seuil de la limite de notre expérimentation. Par ailleurs 2 composés se sont particulièrement illustrés par leur efficacité anti-*Candida* sur les trois souches avec des CMI comprises entre 5 et 1,25 µg/ml.

Notre approche pharmacochimique a permis de valider l'enchaînement fonctionnel arylpropénone des chalcones dès lors qu'il est porté par l'hétérocycle benzimidazolique, comme étant un nouveau pharmacophore antifongique. Ces résultats ouvrent des voies d'investigations non négligeables vers la mise au point d'une nouvelle classe chimique d'antifongiques de synthèse totale.



Chalcones Benzimidazoliques

Mots Clés : Chalcone. Benzimidazole. Arylpropénone. Antifongique. *Candida*