

ANNÉE 2017-2018

N° 70

**THÈSE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
**par**  
**Thomas Yvorra**

-----  
*Présentée et soutenue publiquement le 22 Décembre 2017*

**SYNTHÈSE ET EVALUATION BIOLOGIQUE D'IMIDAZO[1,2-  
a]PYRAZINES A PROPRIETES ANTIFONGIQUES**

**Président :** Mr Pascal Marchand, Professeur de Chimie Organique

**Membres du jury :** Mr Marc-Antoine Bazin, Maître de Conférences en Chimie  
Thérapeutique  
Mme Nidia Alvarez-Rueda, Maître de Conférences en  
Parasitologie-Mycologie Médicale  
Mr Jacques Renault, Maître de Conférences en Chimie  
Thérapeutique

# Remerciements

*A mon président de thèse Pascal Marchand,*

Merci d'avoir accepté de présider ma thèse. Je te remercie pour ton aide précieuse dans le cadre du projet de recherche mais également pour ta bonne humeur et ta gentillesse.

*A mon directeur de thèse Marc-Antoine Bazin,*

Je te remercie chaleureusement de m'avoir proposé le sujet de recherche faisant l'objet de cette thèse. Merci pour ton très bon encadrement durant le stage de master 2. Ça a été un plaisir de travailler avec toi sur ce projet, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

*Aux membres du jury, Nidia Alvarez-Rueda et Jacques Renault,*

Je vous vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse. Mes sincères remerciements.

*A Patrice, Cédric, Marie-Renée, Karen, Carine et Fabrice,*

Un grand merci pour votre participation au projet et pour votre gentillesse.

*Aux étudiants du laboratoire IICiMed Ousmane, Hung, Marlene, Kossi, Marie, Dartagnan, Arsenio, Angélique, Cathy, Emeline,*

Merci pour votre aide et votre bonne humeur de tous les jours.

*A Selma,*

Pour avoir été à mes côtés tout au long de mes études de pharmacie.

Pour m'avoir prodigué ton soutien essentiel durant ces études lorsque j'en avais besoin.

Pour tout ce que tu m'apportes en plus au quotidien, que je ne pourrais détailler en quelques lignes.

Je te remercie de tout mon cœur et te dédie cette thèse.

*A mes parents, Christophe, Nathalie et mes frères Adrien et Clément,*

Merci d'avoir cru en moi depuis le début de mes études et de m'avoir supporté tout au long de celles-ci bien que cela n'ait pas été toujours facile (cf PACES)

*A mes grands-parents (Bonnie, Jacques (Papi Pomme), Josette, Gérard), mon parrain et ma marraine (Christian et Béné), mes oncles et tantes (Phillipe, Pascale, Vincent, Soizic, Béa, Jean-François), mes cousins (Nico, Antoine G, Stéphane, Denis, Julien, Antoine M) et ma cousine (Marie), mes beaux-parents (Marie, François),*

Merci pour votre soutien et tout l'amour que vous me portez.

*A la famille de Selma, Rachid, Anne, Sophia, Riwan, Yanis et Louisa*

Merci pour toute l'aide et le soutien que vous nous avez apportés à Selma et moi pendant ces longues études.

*A tous mes amis,*

Merci pour votre soutien et surtout pour tous les bons moments passés ensemble.

## Liste des abréviations, sigles et acronymes

- 17-AAG** : 17-(allylamino)-17-deméthoxygeldanamycine
- 17-DMAG** : 17-diméthylaminoéthylamino-17- deméthoxygeldanamycine
- 5-FC** : 5-fluorocytosine
- ABC** : ATP-binding cassette
- ALS** : Agglutinin-like sequence
- AMB** : Amphotéricine B
- ASFU** : *Aspergillus fumigatus*
- Brk** : Breast tumor kinase
- CAAL** : *Candida albicans*
- CAAU** : *Candida auris*
- CAGL** : *Candida glabrata*
- CAKR** : *Candida krusei*
- CAPA** : *Candida parapsilosis*
- CATR** : *Candida tropicalis*
- CDC** : Center for diseases control and prevention
- CDR** : *Candida albicans* drug resistance
- CI<sub>50</sub>** : Concentration inhibitrice 50
- CLSI** : Clinical and laboratory standards institute
- CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- CXCL** : Chemokine ligand
- CXCR** : Chemokine receptor
- CYP 450** : Cytochromes P450
- ECMM** : European confederation of medical mycology
- FCZ** : Fluconazole
- GlcCer** : Glucosylceramide
- HSCT** : Hematological stem cell transplantation
- ICZ** : Itraconazole
- IFIs** : Infections fongiques invasives
- ISRS** : Inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine
- IVZ** : Isavuconazole
- MAPAPK5** : Mitogen activated protein kinase – activated protein kinase 5

**MDR** : Multi-drug resistance  
**MFS** : Major facilitator superfamily  
**NHDS**: National hospital discharge survey  
**NMR** : Nuclear magnetic resonance  
**PCZ** : Posaconazole  
**P-gp** : Glycoprotéine p  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinase  
**PDK1** : Phosphoinositide dependant kinase 1  
**Raf** : Rapidly accelerated fibrosarcoma  
**RPMI** : Roswell park memorial institute medium  
**SIDA** : Syndrome d'immunodéficience acquise  
**SOT**: Solid organ transplantation  
**Syk** : Spleen tyrosine kinase  
**UPLC-MS** : Ultra performance liquid chromatography - Mass spectrometry  
**VCZ** : Voriconazole  
**VIH** : Virus de l'immunodéficience humaine

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Les infections fongiques invasives (IFIs)</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Candidoses invasives</b> .....	<b>13</b>
1.1.1	Généralités .....	13
1.1.2	Epidémiologie .....	13
1.1.3	Pouvoir pathogène et physiopathologie .....	14
<b>1.2</b>	<b>Aspergilloses invasives</b> .....	<b>16</b>
1.2.1	Généralités .....	16
1.2.2	Epidémiologie .....	17
1.2.3	Pouvoir pathogène et physiopathologie .....	17
<b>1.3</b>	<b>Cryptococcoses invasives</b> .....	<b>19</b>
1.3.1	Généralités .....	19
1.3.2	Epidémiologie .....	20
1.3.3	Pouvoir pathogène et physiopathologie .....	20
<b>1.4</b>	<b>Autres infections fongiques invasives</b> .....	<b>20</b>
1.4.1	Pneumocystoses (IFIs atypiques).....	20
1.4.2	Fusarioses .....	22
1.4.3	Mucormycoses .....	23
1.4.4	Scedosporioses .....	24
<b>2</b>	<b>Les traitements des IFI(s) : état actuel de la thérapeutique, limites et nouvelles cibles d'intérêt</b> .....	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Traitement des IFI(s)</b> .....	<b>25</b>
2.1.1	Généralités .....	25
2.1.2	Antifongiques azolés .....	27
2.1.3	Amphotéricine B .....	32
2.1.4	Echinocandines .....	34
2.1.5	5-Fluorocytosine (flucytosine).....	36
<b>2.2</b>	<b>Inconvénients et limites des traitements antifongiques</b> .....	<b>38</b>
2.2.1	Effets indésirables .....	38
2.2.2	Interactions médicamenteuses.....	39
2.2.3	Phénomènes de résistance .....	40
<b>2.3</b>	<b>Résumé</b> .....	<b>44</b>
<b>2.4</b>	<b>Nouvelles stratégies de recherche et cibles d'intérêt dans le traitement des IFIs</b> .....	<b>44</b>
2.4.1	Etat global de la recherche d'agents antifongiques.....	44
2.4.2	Nouvelles molécules agissant sur des cibles déjà connues .....	46

2.4.3	Nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique et leurs inhibiteurs .....	49
2.4.4	Nouvelles indications pour d'anciennes molécules thérapeutiques .....	58
2.4.5	Résumé .....	58
<b>3</b>	<b>Conception de nouveaux agents antifongiques à structure chimique imidazo[1,2-<i>a</i>]pyrazines.....</b>	<b>59</b>
<b>3.1</b>	<b>Le noyau imidazo[1,2-<i>a</i>]pyrazine en chimie médicinale .....</b>	<b>59</b>
3.1.1	Généralités .....	59
3.1.2	Propriétés biologiques.....	59
3.1.3	Synthèse et réactivité chimique.....	63
<b>3.2</b>	<b>Explication du projet de recherche.....</b>	<b>66</b>
3.2.1	De la recherche de nouveaux agents anti- <i>Leishmania</i> à la découverte de molécules à activité antifongique.....	66
3.2.2	Objectifs du projet et synthèses envisagées .....	67
<b>3.3</b>	<b>Travaux de synthèse menés .....</b>	<b>67</b>
3.3.1	Conception des dérivés 2-phénylimidazo[1,2- <i>a</i> ]pyrazines .....	67
3.3.2	Conception des dérivés imidazo[1,2- <i>a</i> ]pyrazines non substituées en 2 .....	69
3.3.3	Synthèse d'autres analogues chimiques et bioisostères .....	71
<b>3.4</b>	<b>Evaluation biologique <i>in vitro</i>.....</b>	<b>75</b>
3.4.1	Tests de l'activité antifongique <i>in vitro</i> .....	75
3.4.2	Mesure de l'indice de sélectivité des molécules synthétisées .....	79
<b>4</b>	<b>Discussion et conclusion .....</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>84</b>
5.1	Chemistry .....	84
5.2	Biology .....	113
<b>Annexe 1 : Activité biologique des quatre molécules actives sur 28 souches de <i>Candida</i></b>		<b>122</b>
<b>Annexe 2 : Protocole d'évaluation de l'activité antifongique <i>in vitro</i> sur <i>Candida sp.</i> ...</b>		<b>124</b>
<b>Annexe 3 : Protocole d'évaluation de l'activité antifongique <i>in vitro</i> sur <i>Aspergillus sp.</i></b>		<b>127</b>

# Liste des figures et tableaux

Figure 1: <i>Candida albicans</i>	13
Figure 2: Mécanismes pathogéniques des infections aux levures genre <i>Candida</i>	15
Figure 3: Biofilm de <i>Candida</i>	15
Figure 4: Cycle de vie d' <i>A. fumigatus</i>	16
Figure 5: Physiopathologie des infections à <i>Aspergillus</i>	18
Figure 6: <i>Cryptococcus neoformans</i> (coloration à l'encre de chine)	19
Figure 7: <i>Pneumocystis jirovecii</i>	21
Figure 8: <i>Fusarium sp.</i>	22
Figure 9: Zygomycète : <i>Rhizopus arrhizus</i>	23
Figure 10: <i>Scedosporium prolificans</i>	24
Figure 11: Chronologie de découverte des molécules antifongiques dans la prise en charge des IFIs	25
Figure 12: Cibles des médicaments antifongiques	26
Figure 13: Structure chimique des antifongiques triazolés	28
Figure 14: Biosynthèse de l'ergostérol	29
Figure 15 : Mécanisme d'action des antifongiques triazolés	29
Figure 16: Structure chimique de l'amphotéricine B	32
Figure 17 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B	33
Figure 18 : Structures chimiques des échinocandines	34
Figure 19 : Mécanisme d'action des échinocandines	35
Figure 20: Mécanisme d'action de la 5-FC	37
Figure 21: Principaux effets indésirables des antifongiques	38
Figure 22: CYP450 et interactions médicamenteuses des antifongiques triazolés	40
Figure 23: Mécanismes de résistance aux antifongiques (ex de <i>Candida albicans</i> )	41
Figure 24: Nouveaux agents antifongiques étudiés en recherche <sup>6</sup>	46
Figure 25: Modèle pharmacophorique de nouveaux triazolés <sup>77</sup>	47
Figure 26 : Structures chimiques du VT-1129, VT-1161 et VT-1598	48
Figure 27 : Structures chimiques du CD101 (biafungine) et du SCY-078	49
Figure 28 : Structures moléculaires du BHBM et D0	50
Figure 29 : Structure chimique de l'Auréobasidine A	50
Figure 30 : Structure chimique de la Nikkomycine Z	51
Figure 31 : Structures chimiques des molécules APX001, E1210 et Gépinaïne	52
Figure 32 : Structure chimique de l'AR12 - OSU 03012	53
Figure 33 : Mécanisme d'action de la dihydroorotate deshydrogénase	53
Figure 34 : Structure chimique du F901318	54
Figure 35 : Structure moléculaire du T2307	54



Figure 36 : Structures chimiques de la sordarine et du FR290581	55
Figure 37 : Voie de signalisation de la calcineurine-Hsp90	56
Figure 38 : Structures chimiques de la geldanamycine et des analogues structuraux (17-AAG et 17-DMAG)	56
Figure 39 : Voie de signalisation probable des tréhaloses	57
Figure 40: La structure imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine	59
Figure 41 : Structures chimiques d'inhibiteurs de la MAPKAPK5 et activités biologiques associées	60
Figure 42 : Structure d'un inhibiteur potentiel de CXCR3	61
Figure 43: Structures chimiques de molécules actives sur la Syk	61
Figure 44: Structure d'une molécule inhibitrice d'Aurora kinase A et B	62
Figure 45 : Structure moléculaire du KDU 691	62
Figure 46 : Structure chimique d'une molécule activité anti- <i>Plasmodium falciparum</i>	63
Figure 47: Principales voies d'accès aux dérivés imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine	63
Figure 48: Régiosélectivité de l'halogénéation des imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazines	64
Figure 49 : Illustration de la réactivité des imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazines	65
Figure 50 : Activités anti-leshmaniennes et antifongiques du NP 30	66
Figure 51 : Modulations chimiques du NP 30 envisagées	67
Figure 52: Pharmacomodulations du NP 30 avec R <sub>2</sub> = phényle	68
Figure 53 : Première voie de synthèse étudiée (R <sub>2</sub> = phényle)	68
Figure 54 : Seconde voie de synthèse étudiée (R <sub>2</sub> = phényle)	69
Figure 55: Pharmacomodulations du NP 30 avec R <sub>2</sub> = H	70
Figure 56 : Synthèse des analogues du NP 30 avec R <sub>2</sub> = H	70
Figure 57 : Analogues, bioisostères de la fonction hydrazone et synthèses réalisées (encadrées en bleu)	71
Figure 58 : Essais de réduction de la 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phénylimidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine	72
Figure 59 : Synthèse de la 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phénylimidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine	72
Figure 60 : Formation de l'analogue hydrazide	73
Figure 61: Tentative de formation de l'urée par l'utilisation du DPPA	74
Figure 62: Tentative de formation de l'urée par l'utilisation de triphosgène	74
Figure 63: Autre voie de synthèse de l'urée à explorer	75
Figure 64 : Evaluation biologique des molécules synthétisées sur les souches CAAL93 et ASFU7	76
Figure 65 : Evaluation biologique des quatre molécules actives sur 27 souches différentes de <i>Candida spp.</i>	77
Figure 66 : Evaluation biologique de quatre molécules à structure imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazines non substituées en 2.	79
Figure 67 : Résultats des tests sur MRC-5	80
Figure 68 : Docking (logiciel gold) du (E)-TY35 dans le site ATP d'un modèle $\alpha$ -Pkc1 (élaboré à partir de la PKC $\beta$ II humaine, 2I0E.pdb)	82
Figure 69: Perspectives de pharmacomodulations	82
Figure 70: Début de synthèse de la 3-fluoro-2-phényl-8-(2-(pyridin-2-ylméthylène)hydrazinyl)imidazo[1,2- $\alpha$ ]pyrazine	83

**Figure 71 : Biological tests process**

**113**

**Tableau 1 : Spectre d'activité des triazolés : - : aucune activité antifongique ; + : activité antifongique modérée ; ++ : forte activité antifongique**

**31**

## Introduction

Les infections fongiques nécessitant une prise en charge médicale peuvent être classées dans deux catégories cliniques distinctes. Les mycoses superficielles constituent un premier groupe englobant les dermatophytoses, les candidoses des muqueuses (digestive, génitale...) ainsi que les candidoses cutanées. Le second groupe comprend les infections fongiques invasives (IFIs), définies par la contamination de sites normalement stériles de l'organisme tels que la circulation sanguine, le système nerveux central, les reins, le foie et autres organes<sup>1</sup>. La preuve de ces infections passe par la mise en évidence de champignons pathogènes dans les tissus profonds, soit par biopsie, soit par culture du champignon au laboratoire en conditions stériles<sup>2</sup>.

Les IFI(s) représentent depuis plusieurs décennies un réel problème de santé publique car elles sont une cause majeure et croissante de morbidité et de mortalité chez des patients présentant certains facteurs de risque. Ces affections restent en effet très rares chez des individus immunocompétents chez qui le système immunitaire fonctionnel prévient la survenue de telles pathologies. A l'inverse, les populations à risque présentant une immunodépression sont très susceptibles de développer une IFI, ceci souvent associé à un mauvais pronostic vital une fois la pathologie installée. Parmi ces patients sont représentés majoritairement ceux atteints de pathologies hématologiques malignes et cancéreuses (en particulier les leucémies) mais aussi les patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSCT) ou une transplantation d'organes (SOT)<sup>3</sup>. Enfin, il ne faut pas oublier les individus atteints du VIH/SIDA qui constituent une autre population très à risque de développer des IFIs du fait de l'immunodéficience acquise par l'infection.

Le fait marquant épidémiologique de ces dernières années est que le nombre d'individus présentant ces facteurs de risque tend globalement à croître, ceci allant de pair avec une augmentation de l'incidence des IFIs (augmentation de l'incidence de 207 % entre 1979 et 2000)<sup>4</sup>. Aujourd'hui, il est estimé que plus de 300 millions de personnes dans le monde souffrent de ces pathologies et que plus d'un million d'entre elles en décèdent chaque année<sup>5</sup>. De nombreux agents infectieux sont à ce jour connus pour leur implication dans de telles pathologies. Plusieurs levures sont recensées comme celles appartenant au genre *Candida* ou encore au genre *Cryptococcus*. Les champignons filamenteux sont également largement représentés dans ces pathologies, en particulier les moisissures du genre *Aspergillus* et les espèces émergentes *Fusarium*, *Scedosporium* et celles de la classe des *Zygomycètes*.

Si les IFIs posent toujours de sérieux problèmes de prise en charge médicale, c'est en grande partie parce que l'arsenal thérapeutique (polyènes, triazolés, échinocandines et 5-FC) à notre disposition est trop limité et entaché d'un grand nombre d'inconvénients d'utilisation. S'ajoute à cela l'émergence de plus en plus marquante de phénomènes de résistances chez les champignons pathogènes qui diminuent l'efficacité de ces molécules. Face à ces problèmes, les chercheurs ont intensifié leurs investigations dans le but de découvrir de nouvelles molécules vouées à répondre au besoin urgent existant. Cependant, ils se sont heurtés à plusieurs problèmes dont principalement la difficulté de cibler spécifiquement la cellule fongique du fait d'une forte homologie qu'elle détient avec la cellule mammifère. Ainsi, malgré tous les efforts mis en place, trop peu de molécules sont en cours d'évaluation clinique et très peu de nouvelles molécules arrivent de même sur le marché<sup>6</sup>. C'est pourquoi il est essentiel de continuer les efforts en adoptant des stratégies de *drug discovery* originales permettant la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques dans le but final d'agréments notre arsenal thérapeutique.

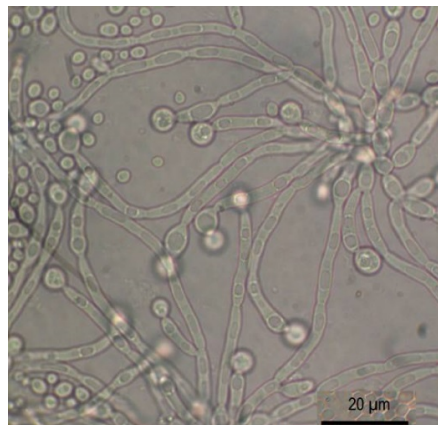
C'est dans ce contexte, au cours d'un stage réalisé au laboratoire IICiMed (EA 1155 de l'Université de Nantes) que nous avons mis en évidence l'activité antifongique *in vitro* de plusieurs molécules à structure chimique imidazo[1,2-*a*]pyrazine. Ces structures sont bien connues pour leur nombreuses activités biologiques mais aucune activité antifongique n'était reportée à ce jour<sup>7</sup>. Tous les travaux de chimie médicinale suivant cette découverte sont présentés dans cette thèse s'articulant en trois parties. D'abord, sont présentés les différentes infections fongiques invasives et les agents pathogènes en cause. Ensuite, sont détaillés les traitements actuels des IFIs et leurs différentes limites d'utilisation suivis d'une revue des nouvelles pistes de recherche étudiées pour répondre à tous ces problèmes. Pour finir, le projet de recherche de nouvelles molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine à propriétés antifongiques est relaté dans son ensemble.

# 1 Les infections fongiques invasives (IFIs)

## 1.1 Candidoses invasives

### 1.1.1 Généralités

Les candidoses invasives sont causées par des levures non pigmentées et non capsulées du genre *Candida*. Ces dernières sont ubiquitaires, commensales et saprophytes. Leur taille, variable, se situe entre 3 et 8  $\mu\text{m}$  tandis que la reproduction asexuée se fait par bourgeonnement multipolaire. Il existe un nombre important d'espèces au sein de ce genre (près de 200 connues à ce jour) dont la plus rencontrée en pathologie humaine est *Candida albicans* (Figure 1). Ce champignon réside habituellement au sein du tube digestif et des cavités naturelles de l'homme (muqueuse buccale, vaginale). Il possède la particularité d'être polymorphique, de par sa capacité à produire du mycélium vrai contrairement aux autres principales espèces pathogènes : *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. En ce qui concerne ces quatre espèces, elles sont retrouvées majoritairement au niveau des muqueuses et des peaux saines.



**Figure 1: *Candida albicans***

### 1.1.2 Epidémiologie

Les champignons du genre *Candida* sont la première cause d'IFIs chez les patients hospitalisés. Ces pathologies affectent plus de 250 000 individus dans le monde et sont la cause de plus de 50 000 décès chaque année<sup>8</sup>. Elles sont également classées au 4<sup>ème</sup> rang des infections

invasives nosocomiales les plus fréquentes aux Etats-Unis avec un nombre de cas annuel estimé à 46 000 par le CDC<sup>9,10</sup>.

Plus de 90% des IFIs sont dues à 5 espèces de *Candida* : *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, et *C. krusei*. L'espèce *C. albicans* est encore aujourd'hui la cause prédominante des IFIs dues à des champignons du genre *Candida* mais la tendance actuelle est à une augmentation des infections par les espèces dites « non-*albicans* ». Ainsi, Tortorano *et al.* rapportent dans leur étude menée en Europe (étude de l'ECMM) que plus de la moitié des candidémies sont dues à *C. albicans*. Suivent ensuite *C. glabrata* avec 14% des cas infectieux puis *C. parapsilosis* et *C. tropicalis* avec 7 % d'incidence chacun et enfin 3% pour *C. krusei*<sup>11</sup>.

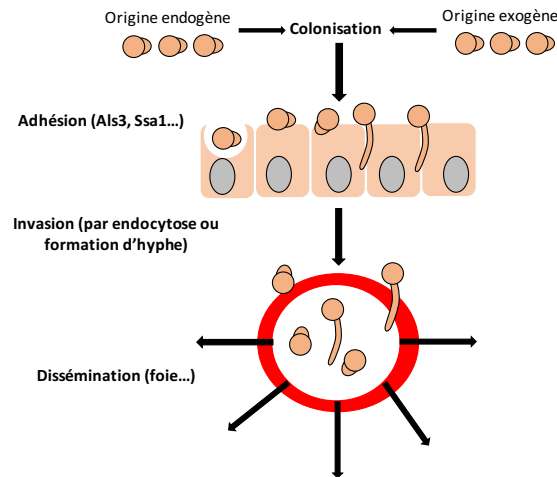
### 1.1.3 Pouvoir pathogène et physiopathologie

Les levures du genre *Candida* sont des pathogènes opportunistes. Lors d'un déséquilibre d'interaction hôte-champignon dû à plusieurs facteurs de risques tel qu'une immunodépression dans le cas des IFIs, il y a colonisation par le champignon. Celle-ci se fait majoritairement par voie endogène (le plus souvent à partir d'un foyer digestif) mais elle peut également survenir par voie exogène, souvent par contamination au préalable d'un cathéter installé par la suite chez le patient. La colonisation mène ensuite à une invasion de la circulation systémique aboutissant à une candidémie. La dernière étape de l'infection est la dissémination du pathogène vers les organes profonds (ex : candidose hépatosplénique) conduisant à une infection généralisée.

Tous ces phénomènes physiopathologiques sont causés par un certain nombre de facteurs de virulence produits par la levure (Figure 2). Des protéines appelées adhésines, comme celles de la famille ALS (notamment les protéines Als3 et Ssa1), permettent une forte adhésion aux cellules hôtes après colonisation de l'organisme par le pathogène<sup>12</sup>. Ces mêmes protéines jouent ensuite un rôle clé dans l'invasion de la cellule en se liant spécifiquement à des protéines situées à la surface membranaire des cellules épithéliales telles que les cadhérines ou l'EGFR<sup>13</sup>. Ceci induit un recrutement de diverses protéines des cellules hôtes impliquées dans la formation de vésicules d'endocytose (clathrine, actine...) assurant l'internalisation du pathogène dans la cellule.

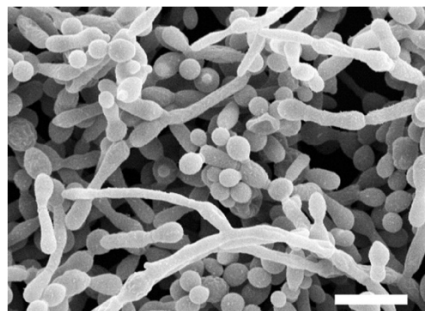
Une pénétration de manière active est également possible chez *C. albicans* du fait de la capacité que ce champignon possède à former des hyphes. Pour cela il sécrète plusieurs

enzymes hydrolytiques (Sap 3, phospholipases et lipases) qui affectent les jonctions intercellulaires et dégradent certains composants de la membrane cellulaire hôte. La pénétration des hyphes se fait alors par simple force physique, soit directement à travers la membrane épithéliale, soit par le biais des jonctions intercellulaires rendues perméables.



**Figure 2: Mécanismes pathogéniques des infections aux levures genre *Candida***

Enfin, ces levures ont la capacité de former des biofilms, facteurs clés de virulence (Figure 3). Il s'agit de regroupements spécifiques et organisés d'agents infectieux qui assurent leur protection vis à vis du système immunitaire de l'hôte ainsi que des diverses molécules thérapeutiques utilisées pour éradiquer l'agent pathogène en cause. Ces biofilms peuvent se former sur les cellules hôtes ou encore sur du matériel médical. Les cathéters sont particulièrement sujets à la formation de biofilm à leur surface et sont ainsi largement impliqués dans la transmission de ces agents infectieux aux patients à l'hôpital<sup>14</sup>.

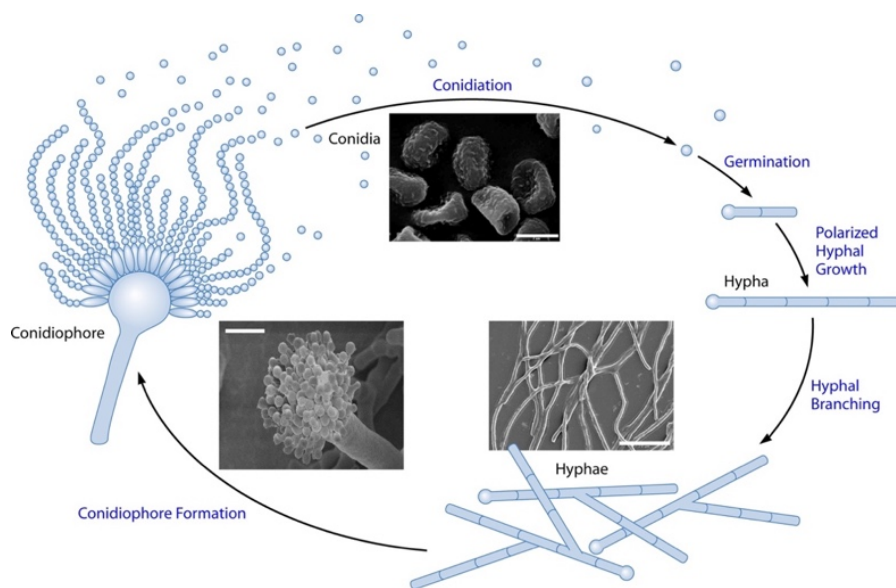


**Figure 3: Biofilm de *Candida***

## 1.2 Aspergilloses invasives

### 1.2.1 Généralités

Les pathologies regroupées sous le terme d'aspergilloses invasives sont causées par des organismes fongiques appartenant au genre *Aspergillus* (près de 300 espèces sont répertoriées à ce jour). Il s'agit de champignons filamenteux ubiquitaires, saprophytes et opportunistes. Le thalle végétatif du champignon se développe en formant des hyphes cloisonnés pour constituer un mycélium. Les hyphes peuvent générer par endroit des filaments conidiophores responsables de la formation de têtes aspergillaires où se forment les spores, encore appelées conidies (Figure 4) Ces dernières sont à la base de la reproduction asexuée des champignons du genre *Aspergillus* (à noter qu'il existe également une reproduction sexuée chez ces champignons). Après dissémination dans l'atmosphère, elles peuvent se fixer sur un substrat donné (plantes, patient...) à partir duquel elles parviennent, après germination, à produire de nouveaux filaments fongiques et *in fine* un nouveau mycélium<sup>15</sup>.



**Figure 4: Cycle de vie d'*A. fumigatus***

Plusieurs espèces de ce genre sont impliquées dans les aspergilloses invasives. Parmi celles-ci, *Aspergillus fumigatus* est responsable de la majorité des cas, suivie de plusieurs espèces plus rarement rencontrées : *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* ou encore *A. versicolor*.



### 1.2.2 Epidémiologie

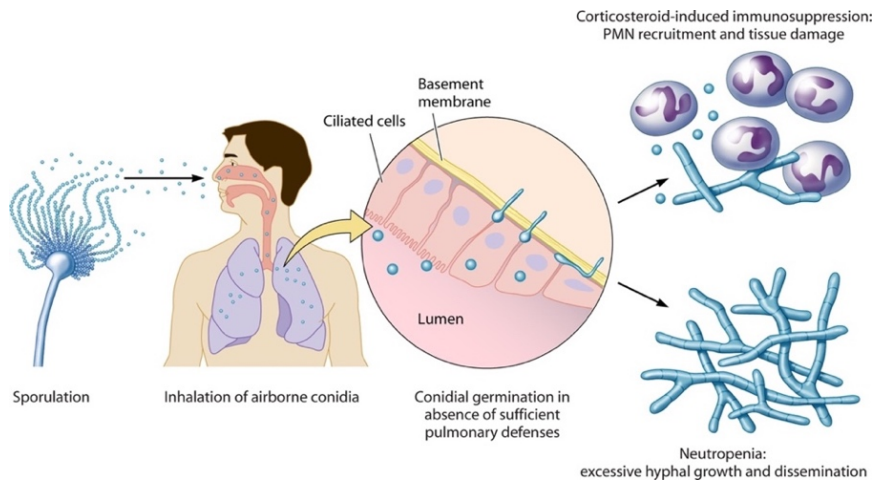
L'incidence des aspergilloses invasives en Europe varie de 0,4 % à 23 % selon la population étudiée<sup>16</sup>. Il est maintenant connu que les patients les plus touchés par ces pathologies sont ceux atteints d'hémopathies malignes (leucémie aiguë en particulier) ainsi que les patients HSCT et SOT<sup>17</sup>. Une étude menée en Italie sur une cohorte de 11802 patients atteints de pathologies cancéreuses hématologiques a rapporté une incidence de 2,6% en ce qui concerne les aspergilloses invasives tandis qu'une autre menée en Espagne sur 395 patients ayant subi un greffe de cellules souches hématopoïétiques a recensé une incidence de 9,4%<sup>18,19</sup>.

Bien que les aspergilloses soient classées loin derrière les candidoses en terme d'incidence, elles sont cependant responsables d'un taux de mortalité nettement plus élevé compris entre 40 et 90%<sup>20</sup>. *Aspergillus fumigatus* reste l'agent pathogène le plus représenté dans ces pathologies bien que son implication ait largement diminué depuis les années 1980 en passant de près de 90% des cas d'aspergilloses à 50-60% dans les années 2000. Ce changement épidémiologique marquant s'est fait au profit des espèces « non *Aspergillus* » qui ont vu leur incidence augmenter au cours de ces mêmes années. C'est le cas en particulier pour *A. flavus* et *A. terreus*<sup>21</sup>.

### 1.2.3 Pouvoir pathogène et physiopathologie

La contamination par des champignons du genre *Aspergillus* passe essentiellement, en premier lieu, par une colonisation des voies respiratoires du patient. En effet, les conidies disséminées dans l'atmosphère sont inhalées par l'individu puis se déposent dans les bronchioles et l'arbre alvéolaire. Chez l'homme sain, les spores qui n'ont pas été expulsées via le système muco-ciliaire sont phagocytées par les macrophages alvéolaires présents naturellement dans les poumons. Ces mêmes cellules permettent également de déclencher une réponse inflammatoire avec le recrutement de polynucléaires neutrophiles capables de détruire les hyphes formés par germination des conidies. Chez les patients immunodéprimés présentant une sévère neutropénie (nombre de polynucléaires neutrophiles inférieur à 1,5 G/L chez l'adulte) tels que ceux sous traitement cytotoxique, il y a croissance excessive des hyphes et dissémination de ces derniers par voie systémique. En ce qui concerne les patients ayant une immunosuppression induite par des corticostéroïdes, il a été démontré qu'il y avait tout de

même un recrutement efficace de polynucléaires neutrophiles au niveau pulmonaire permettant de limiter la croissance des hyphes et de fait l'invasion fongique. Cependant, ceci induit la mise en place d'un environnement inflammatoire exacerbé aboutissant à des dommages tissulaires importants au niveau pulmonaire (Figure 5)<sup>22</sup>.



**Figure 5: Physiopathologie des infections à *Aspergillus***

Tous ces mécanismes physiopathologiques sont rendus possibles par un certain nombre de facteurs impliqués dans le pouvoir pathogène du champignon<sup>23</sup> :

- Petite taille des spores (2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre pour *A. fumigatus*) leur donnant la possibilité d'atteindre les alvéoles pulmonaires,
- Thermotolérance (jusqu'à 55°C pour *A. fumigatus*) permettant leur développement chez leur hôte à 37°C,
- Capacité d'adhérence à la membrane basale (via le fibrinogène, la laminine, la fibronectine, etc...) et la capacité d'induire des microlésions et des ulcérations vasculaires par le biais de toxines nécrosantes,
- Tropicité vasculaire.

## 1.3 Cryptococcoses invasives

### 1.3.1 Généralités

Les cryptococcoses invasives sont dues à des levures cosmopolites et saprophytes du genre *Cryptococcus* dont la principale espèce en cause est *Cryptococcus neoformans* (Figure 6). Elle est de taille comprise entre 3 et 8  $\mu\text{m}$  et présente une reproduction asexuée se faisant par bourgeonnement multipolaire, comme les levures du genre *Candida* (il existe également une reproduction sexuée chez le genre *Cryptococcus*). A la différence de ces dernières, les levures du genre *Cryptococcus* présentent en plus de la membrane cellulaire, une capsule mucopolysaccharidique jouant un rôle clé, entre autres, dans la protection de la cellule. Les différences structurales existant au niveau de cette capsule ont permis une classification des levures selon plusieurs variétés :

- *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (sérotypage A),
- *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (sérotypes B et C),
- *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (sérotypage D).

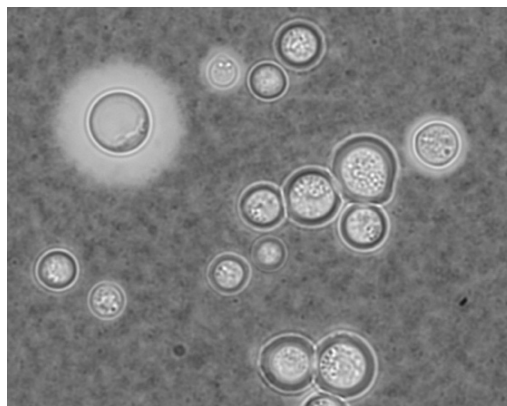


Figure 6: *Cryptococcus neoformans* (coloration à l'encre de chine)

### **1.3.2 Epidémiologie**

Les cryptococcoses surviennent, comme pour toutes les IFI(s) chez les patients à risque mais elles sont le plus souvent rencontrées chez les patients atteints du VIH au stade SIDA. Ainsi, plus de 80% des cas de cryptococcoses invasives sont associées à cette pathologie infectieuse<sup>24</sup>. Près de 220 000 cas de cryptococcoses neuroméningées ont été ainsi rapportés chez ces patients en 2014 pour environ 181 000 décès dus à cette maladie. Les valeurs d'incidence tendent à baisser depuis le traitement des patients VIH par thérapies antirétrovirales. Néanmoins, l'incidence reste encore élevée dans les pays en voie de développement n'ayant pas ou peu accès à ces traitements.<sup>25</sup>

### **1.3.3 Pouvoir pathogène et physiopathologie**

La contamination se fait le plus souvent par inhalation des spores présentes dans l'environnement, induisant une colonisation, souvent asymptomatique des voies pulmonaires<sup>26</sup>. Les levures peuvent ensuite proliférer en l'absence d'une réaction immunitaire efficace puis disséminer vers d'autres sites de l'organisme par voie hématogène. Cela se fait essentiellement vers le système nerveux central, résultant en une cryptococcose neuroméningée. Plusieurs facteurs de virulences sont connus chez *Cryptococcus* pour participer à l'infection. La capsule polysaccharidique constitue certainement le plus important d'entre eux en assurant une protection majeure de la cellule fongique. Elle permet un échappement à l'immunité de l'hôte en empêchant la reconnaissance de la cellule par les phagocytes et en induisant une diminution de la production de cytokines par les cellules de l'immunité. La production de mélanine fait partie également des facteurs de virulence de ces champignons. Cette molécule assure une protection importante de la levure contre le stress oxydatif<sup>27</sup>.

## **1.4 Autres infections fongiques invasives**

### **1.4.1 Pneumocystoses (IFIs atypiques)**

La pneumocystose est une pathologie invasive développée suite à une infection par le champignon ubiquitaire *Pneumocystis jirovecii*. Ce champignon était considéré historiquement

comme un protozoaire puis a été assigné plus tardivement au règne des *Fungi*, du fait de la découverte d'une forte homologie génétique avec les organismes appartenant à ce règne<sup>28</sup>.



**Figure 7: *Pneumocystis jirovecii***

Cet agent infectieux possède malgré tout un cycle de vie semblable à de nombreux parasites. Il existe sous trois formes majoritaires : trophozoïte, sporocyte et kyste. Ces différentes formes fongiques sont à la base de la pathogénie de ce champignon. Il est accepté que l'infection passe par l'inhalation de spores haploïdes qui, après conjugaison (reproduction sexuée), forment des sporocytes. Ces entités produisent, après méiose et mitose, 8 noyaux en leur sein pour aboutir à la formation d'un kyste mature. Enfin, la rupture du kyste induit la libération des huit spores précédemment formées qui disséminent dans l'organisme et participent à un nouveau cycle infectieux<sup>29,30</sup>.

La pneumocystose survient majoritairement chez des patients profondément immunodéprimés, en particulier ceux infectés par le VIH. Après une importante épidémie dans les années 1970-1980 (incidence de près de 20 cas pour 100 patients VIH/SIDA chaque année), son incidence a diminué depuis les années 1990s avec 3,4% de baisse d'incidence chaque année depuis 1992<sup>31</sup>. Ceci s'explique majoritairement par la mise sur le marché des thérapies antirétrovirales qui ont limité l'évolution de l'infection chez les patients atteints du VIH. Cependant, l'incidence reste encore relativement élevée chez les populations n'ayant pas accès à ces traitements ou celles ne pouvant pas les tolérer. Le taux de mortalité est actuellement évalué aux alentours de 10% dans les pays industrialisés<sup>30</sup>.

## 1.4.2 Fusarioses

Les fusarioses sont causées par des micromycètes du genre *Fusarium* (Figure 8). Ce sont de champignons filamenteux à hyphes septées ubiquitaires, fréquemment retrouvés dans les réserves d'eau et dans le sol. Le genre *Fusarium* comprend près de 200 espèces différentes dont *Fusarium solani*, la plus pathogène chez l'homme (près de 60% des cas de fusarioses) suivie de *Fusarium oxysporum* (20% des cas)<sup>32</sup>.



**Figure 8: *Fusarium* sp.**

Les fusarioses invasives disséminées surviennent particulièrement chez les patients des services d'oncohématologie et chez les patients transplantés. Dans une étude multicentrique menée au Brésil et aux Etats-Unis, l'incidence déterminée était proche de 6 cas pour 1000 patients HSCTs. Chez ces mêmes individus, le taux de mortalité est aujourd'hui très élevé avec un indice de survie à 90 jours après diagnostic de fusariose invasive égal à 13%<sup>33</sup>.

Les infections aux champignons du genre *Fusarium* se font le plus souvent par voie cutanée au niveau de diverses lésions. Ceci mène ensuite à un possible passage dans la circulation sanguine et dissémination vers différents organes<sup>34</sup>. La contamination par voie pulmonaire est également possible tout comme la contamination par ingestion d'eau contaminée. Un certain nombre de facteurs de virulence sont impliqués dans l'infection comme la production de mycotoxines capables d'empêcher la réponse immunitaire cellulaire et humorale tout en étant responsables de dommages tissulaires importants.

### 1.4.3 Mucormycoses

Les mucormycoses (précédemment appelées zygomycoses) sont développées suite à une infection par des champignons de la classe des *Zygomycètes*. Ce sont des champignons filamenteux opportunistes, ubiquitaires et saprophytes rencontrés en particulier dans les matières organiques en décomposition, dans le sol et dans les excréments animaux. Les filaments qu'ils produisent ont comme particularité d'être aseptés, hyalins, irréguliers et en forme de rubans. La reproduction est à la fois sexuée (par la formation de zygospores) et asexuée (production de sporangiospores) (Figure 9)<sup>34</sup>.



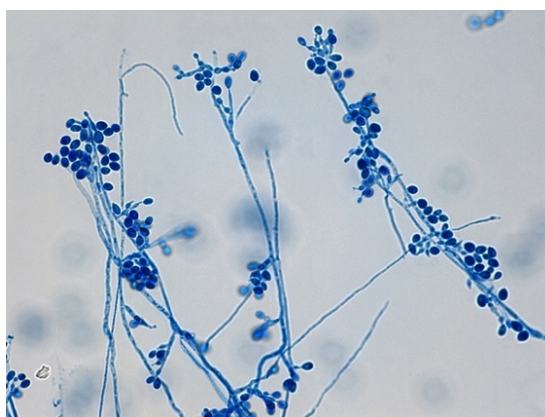
**Figure 9: Zygomycète : *Rhizopus arrhizus***

Les principaux agents de ces pathologies font partie de l'ordre des *Mucorales*. Les genres les plus pathogènes sont *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Absidia* et *Cunninghamella*<sup>36,37</sup>.

La porte d'entrée de l'agent pathogène est le plus souvent pulmonaire (inhalation des spores présentes dans l'environnement). La dissémination vers différents organes profonds peut ensuite se faire par voie hématogène. Les mucormycoses restent aujourd'hui des infections rares mais en nette augmentation ces dernières années. Une étude menée en France montre une avancée de l'incidence de 0,7 à 1,2 cas par million d'individus en 10 ans<sup>37,39</sup>. Elles sont maintenant classées au 3<sup>ème</sup> rang des IFIs les plus importantes après les candidoses et aspergilloses chez les patients SOT et HSCT<sup>40</sup>. Ceci est en grande partie dû à la mortalité très élevée et même quasi-constante retrouvée en cas de mucormycoses invasives (taux de 96% pour les mucormycoses disséminées) associée à des difficultés importantes de prise en charge médicamenteuses pour ces pathologies (inefficacité des traitements couramment utilisés)<sup>37,41</sup>.

#### 1.4.4 Scedosporioses

Les agents infectieux responsables des scedosporioses font parties du genre *Scedosporium*. Il comprend deux espèces principalement impliquées en pathogénie : *Scedosporium apiospermum* (et la forme téléomorphe *Pseudallescheria boydii*) et *Scedosporium prolificans*. Ce sont des champignons filamenteux ubiquitaires présents en grande partie au niveau du sol et dans les eaux usées et polluées<sup>42</sup>.



**Figure 10:** *Scedosporium prolificans*

L'infection peut se faire par inhalation, inoculation traumatique (plaie cutanée) ou par ingestion de spores. La formation des hyphes permet ensuite une dissémination dans l'organisme par voie hématogène.

Les patients neutropéniques en oncologie ou transplantés sont très touchés par ce type d'infections invasives. L'augmentation du nombre d'individus au sein de cette population à risque est corrélée à une augmentation significative de l'incidence des scedosporioses invasives. Elles représentent maintenant près d'un quart des infections fongiques par des champignons filamenteux hors *Aspergillus* chez les patients SOT (cœur, foie, poumon) et 29% chez les patients HSCT<sup>43</sup>. A cette incidence forte est associé un taux de mortalité élevé se situant autour de 55%<sup>44</sup>.



## 2 Les traitements des IFI(s) : état actuel de la thérapeutique, limites et nouvelles cibles d'intérêt

### 2.1 Traitement des IFI(s)

#### 2.1.1 Généralités

Le développement des agents antifongiques a commencé historiquement avec la mise sur le marché de l'amphotéricine B en 1957 puis celle de la flucytosine (5-FC) en 1964. C'est plusieurs années après que le fluconazole, premier antifongique triazolé, a pu être commercialisé en 1990, suivi de l'itraconazole, du voriconazole, du posaconazole et de l'isavuconazole approuvé en mars 2015 par la FDA. Les représentants des échinocandines ont été globalement découverts plus tardivement avec la caspofungine en 2001, la micafungine en 2005 et l'anidulafungine l'année suivante (Figure 11: Chronologie de découverte des molécules antifongiques)<sup>45</sup>.

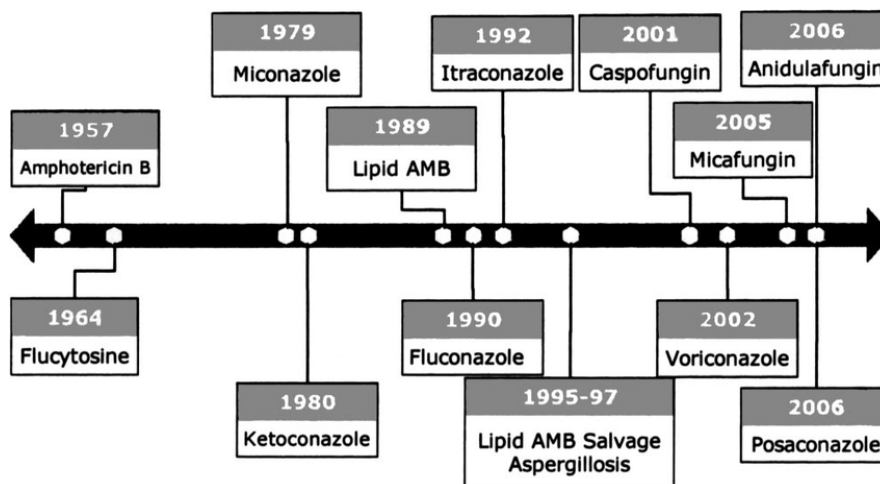
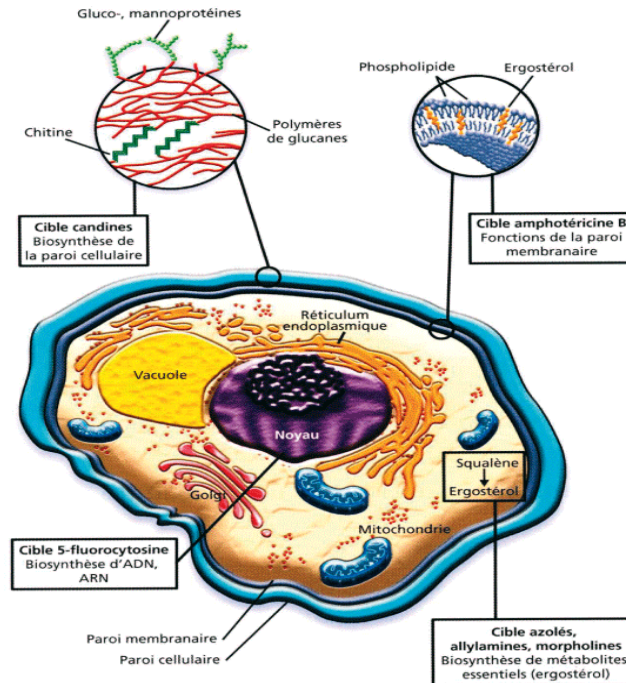


Figure 11: Chronologie de découverte des molécules antifongiques dans la prise en charge des IFIs

Ces différentes molécules constituent encore l'arsenal thérapeutique de choix dans le traitement des IFIs. Les mécanismes d'action de ces molécules sont aujourd'hui bien connus pour la plupart d'entre elles. Ainsi, l'amphotéricine B et les triazolés ont pour cible la membrane fongique. Le premier perturbe l'intégrité membranaire par une liaison à l'ergostérol, élément constitutif essentiel au maintien de son intégrité, tandis que le second limite la production de ce

même composé. Les échinocandines, elles, ciblent la paroi fongique en empêchant sa biosynthèse. La 5-flucytosine, quant à elle, interfère dans la biosynthèse de l'ADN, de l'ARN et dans la synthèse protéique (Figure 12).



**Figure 12: Cibles des médicaments antifongiques**

Malgré l'apport crucial que représentent ces différentes classes médicamenteuses, tant dans le traitement que dans la prévention des IFIs, elles ne parviennent pas systématiquement à répondre aux besoins thérapeutiques des populations concernées par ces maladies. Ceci s'explique par plusieurs éléments, certains propres aux molécules antifongiques, comme une toxicité marquée pour certaines ou encore des interactions médicamenteuses gênantes lors de l'association avec d'autres médicaments. D'autres sont inhérents aux agents infectieux comme les phénomènes de résistances développées vis-à-vis des traitements, posant aujourd'hui de sérieux problèmes dans la prise en charge des patients concernés.

Afin de détailler les différents faits exposés auparavant, trois points seront abordés dans cette seconde partie. Tout d'abord, les différents traitements actuellement utilisés chez les patients atteints d'IFIs (ou en prévention) seront présentés. Ensuite, une revue et une explication des limites d'utilisation de ces traitements sera faite afin d'illustrer l'essoufflement des

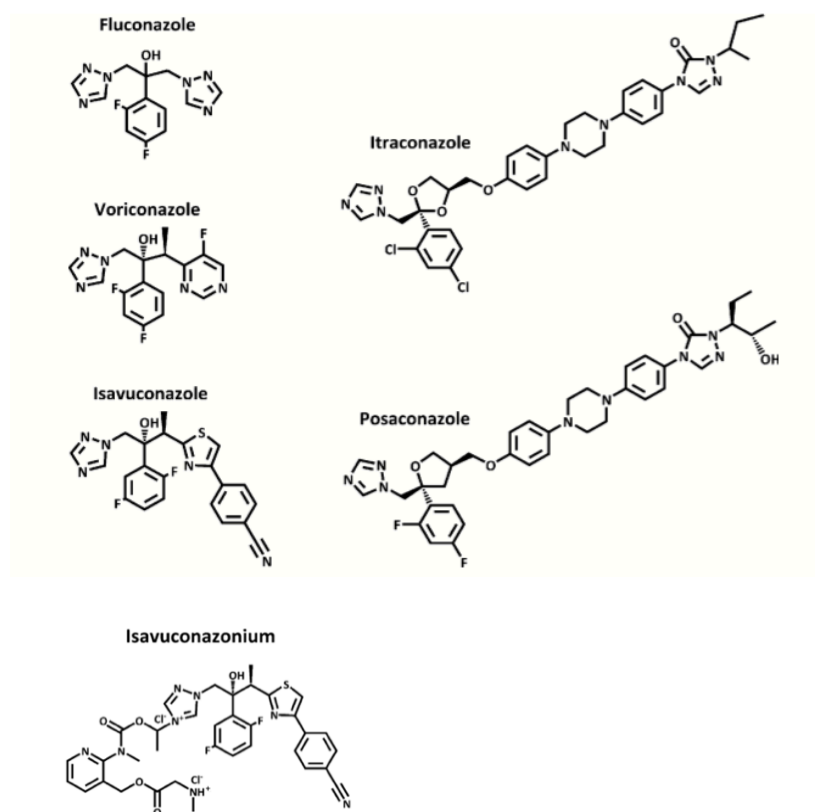
thérapeutiques actuelles. Enfin, la partie se terminera avec les recherches de nouvelles cibles d'intérêt et de nouveaux agents antifongiques pour répondre aux différents problèmes exposés.

## 2.1.2 Antifongiques azolés

### 2.1.2.1 Généralités

Les antifongiques azolés peuvent être divisés en deux classes en fonction de leur structure moléculaire. La première initialement découverte est celle des antifongiques imidazolés (clotrimazole, miconazole et kétoconazole). En dépit de leur efficacité, ces molécules présentent de nombreux effets indésirables. C'est pourquoi leur utilisation est aujourd'hui très restreinte et limitée à l'usage topique<sup>46</sup>. Malgré tout, la découverte de cette classe thérapeutique a permis le lancement de nombreuses recherches de nouveaux composés possédant une structure chimique analogue à la structure imidazolée. Ces multiples investissements ont abouti à la découverte de la seconde classe d'antifongiques dont il est question dans ce paragraphe : les antifongiques triazolés. Cette classe médicamenteuse est aujourd'hui la plus utilisée dans le traitement des infections fongiques systémiques. Elle comprend aujourd'hui cinq représentants : le fluconazole (FCZ), le voriconazole (VCZ), l'itraconazole (ICZ), le posaconazole (PCZ) et enfin l'isavuconazole (IVZ) (ce dernier est utilisé sous forme de prodrogue appelée isavuconazium) (Figure 13)<sup>47</sup>. D'autres molécules prometteuses sont également en cours d'évaluation clinique (ravuconazole et albaconazole).

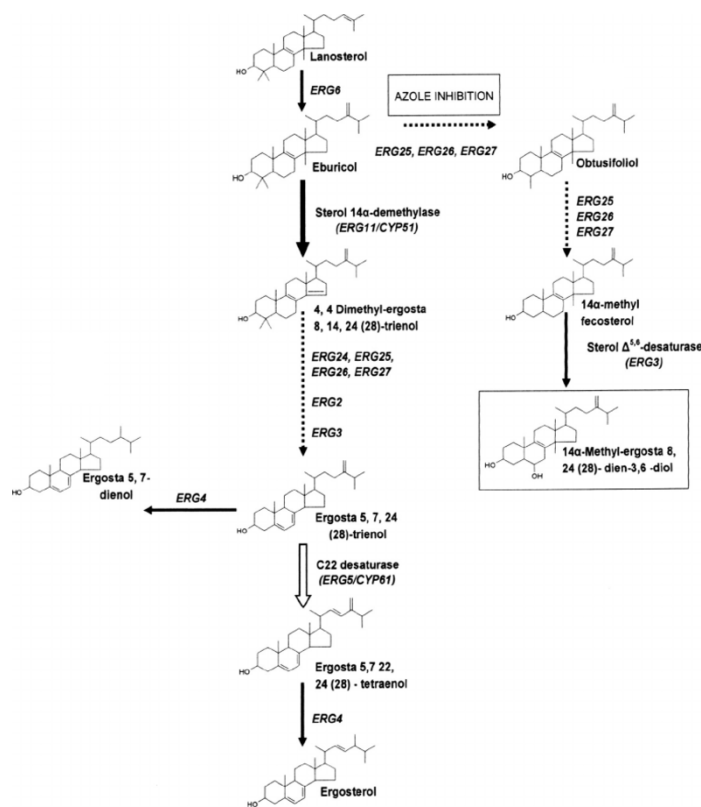
Toutes ces molécules thérapeutiques possèdent un même noyau pharmacophore 1,2,4-triazole ainsi que divers substituants plus ou moins semblables chimiquement d'une molécule à une autre. A titre d'exemple, FCZ, VCZ et IVZ possèdent tous une fonction difluorobenzène ainsi qu'une fonction hydroxyle clé sur la même position des trois molécules. En revanche, le FCZ possède un second motif 1,2,4-triazole alors que le VCZ et l'IVZ présentent respectivement un noyau fluoropyrimidine et un groupement thiazolebenzonnitrile. La différence majeure en termes de structure chimique est celle existant entre ces trois molécules d'un côté et l'ICZ et le PCZ de l'autre. En effet, ces derniers ont une taille moléculaire beaucoup plus importante. Cet aspect a un impact non négligeable sur la pharmacocinétique de ces molécules, élément qui sera détaillé plus loin dans le texte.



**Figure 13: Structure chimique des antifongiques triazolés**

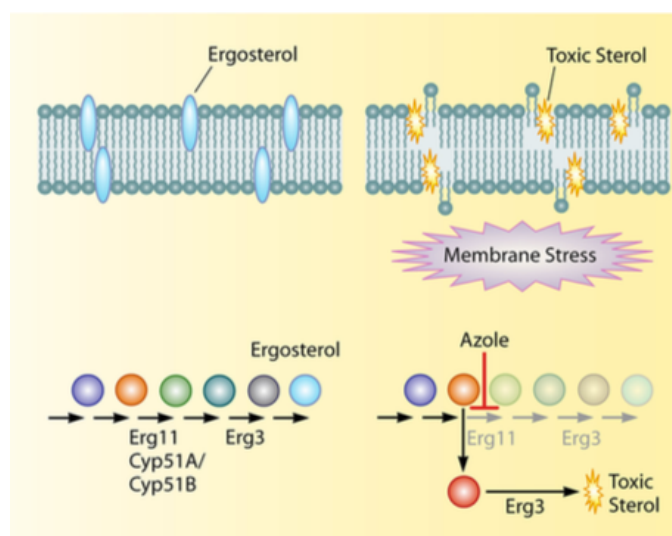
### 2.1.2.2 Mécanisme d'action

Les antifongiques triazolés ont généralement une activité fongistatique sur les levures du genre *Candida* et fongicide sur les moisissures du genre *Aspergillus*<sup>48</sup>. L'ensemble de ces molécules empêchent la biosynthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane fongique assurant son intégrité. L'ergostérol est un analogue du cholestérol qui possède l'avantage majeur de n'être produit que chez le champignon et pas chez l'homme. La biosynthèse de ce composé implique de nombreux enzymes dont celui codé par le gène *erg11* qui représente la cible des antifongiques triazolés : le lanosterol 14 $\alpha$ -déméthylase ou CYP 51. Cet enzyme catalyse en temps normal la formation de ce stérol en permettant la déméthylation de son précurseur, le lanostérol (Figure 14).



**Figure 14: Biosynthèse de l'ergostérol**

L'inhibition de l'activité de l'enzyme par les triazolés aboutit à une déplétion en ergostérol ainsi qu'à l'accumulation dans la membrane de précurseurs méthylés toxiques produits par la  $\Delta 5,6$ -desaturase (codée par le gène *erg3*). Ces stérols toxiques sont responsables d'un stress membranaire majeur, cause de la mort cellulaire fongique (Figure 15).



**Figure 15 : Mécanisme d'action des antifongiques triazolés**

### 2.1.2.3 Spectre d'activité antifongique

Le spectre d'activité des antifongiques triazolés varie d'une molécule à l'autre et en fonction de l'agent infectieux fongique concerné. Le spectre d'activité de chaque molécule est représenté dans le Tableau 1<sup>49</sup>. Le FCZ et l'ICZ, historiquement les premiers antifongiques triazolés développés, sont dits de 1<sup>ère</sup> génération. Ils présentent globalement une bonne activité sur les levures (à l'exception de certaines espèces résistantes comme *C. glabrata*, *C. krusei* pour lesquelles la CMI est plus élevée). En revanche, ils sont beaucoup moins actifs contre les champignons filamenteux voire inactifs en ce qui concerne le fluconazole.

Les trois autres triazolés, le VCZ, le PCZ et l'IVZ font partie d'une seconde génération d'antifongiques conçue en particulier pour étendre le spectre d'activité des triazolés aux champignons filamenteux, en particulier aux *Aspergillus spp.* Le VCZ constitue d'ailleurs l'antifongique triazolé de choix pour le traitement des aspergilloses invasives. Comme il est visible dans le tableau, le PCZ possède le spectre antifongique le plus large. Cette molécule est active sur la majorité des champignons filamenteux et notamment sur ceux présentant des susceptibilités moins marquées aux autres antifongiques triazolés (*Mucorales*, *Fusarium spp.* et *Scedosporium spp.*). Les données de la littérature montrent également une activité antifongique très intéressante de l'IVZ sur ces champignons, en particulier sur les *Mucorales* qui sont pourtant peu susceptibles à la plupart des antifongiques (la molécule possède d'ailleurs l'AMM pour le traitement des mucormycoses invasives en plus des aspergilloses invasives)<sup>50,51</sup>.

	<b>FCZ</b>	<b>ICZ</b>	<b>VCZ</b>	<b>PCZ</b>	<b>IVZ</b>
<b><i>C. albicans</i></b>	++	++	++	++	++
<b><i>C. glabrata</i></b>	+	+	++	++	++
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	++	++	++	++	++
<b><i>C. tropicalis</i></b>	++	++	++	++	++
<b><i>C. krusei</i></b>	-	+	++	++	++
<b><i>C. lusitaniae</i></b>	++	++	++	++	++
<b><i>Cryptococcus neoformans</i></b>	++	++	++	++	++
<b><i>Aspergillus fumigatus</i></b>	-	+	++	++	++
<b><i>Aspergillus flavus</i></b>	++	++	++	++	++

	FCZ	ICZ	VCZ	PCZ	IVZ
<i>Aspergillus terreus</i>	-	++	++	++	++
<i>Mucorales</i>	-	-	-	++	++
<i>Fusarium spp.</i>	-	+	++	++	++
<i>Scedosporium spp.</i>	-	+	+	+	+

**Tableau 1 : Spectre d'activité des triazolés : - : aucune activité antifongique ; + : activité antifongique modérée ; ++ : forte activité antifongique**

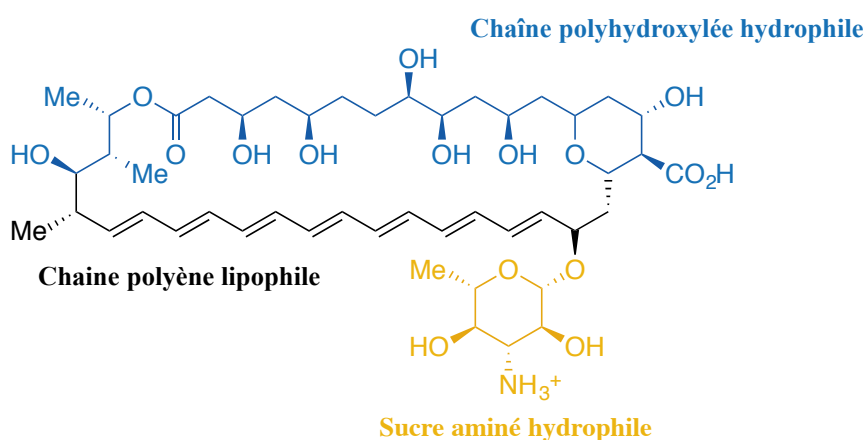
#### 2.1.2.4 Pharmacologie

Les antifongiques triazolés présentent l'avantage certain de pouvoir être administrés *per os* contrairement aux autres antifongiques. De plus, ils sont relativement bien tolérés chez la plupart des patients. En termes de paramètres pharmacocinétiques, il existe plusieurs différences au sein même de cette classe médicamenteuse. Ceci s'explique par la différence de structure chimique des molécules triazolés. Le FCZ, le VCZ et l'IVZ présentent une structure relativement polaire contrairement au PCZ et à l'ICZ qui présentent un profil beaucoup plus hydrophobe de par la présence de la longue chaîne latérale. Ceci a un impact non négligeable sur les différents paramètres classiquement mesurés en pharmacocinétiques. Ainsi, le FCZ et le VCZ présentent de fortes biodisponibilités orales (plus de 90%) quand le PCZ et l'ICZ présentent des taux beaucoup plus faibles (par exemple 50% pour l'ICZ). De même, les antifongiques hydrophobes se lient fortement aux protéines plasmatiques et ont une élimination biliaire ou fécale tandis que les antifongiques hydrophiles se lient nettement moins aux protéines plasmatiques et présentent une élimination urinaire majoritaire. Concernant la métabolisation, elle se fait au niveau hépatique pour toutes ces molécules par les enzymes de la superfamille des cytochromes P450 (CYP 450)<sup>52</sup>.

## 2.1.3 Amphotéricine B

### 2.1.3.1 Généralités

L'amphotéricine B (AMB) est un macrolide polyénique produit lors de la fermentation de *Streptomyces nodosus*, un actinomycète retrouvé dans le sol<sup>53</sup>. La molécule comprend deux motifs moléculaires distincts : un motif polyène hydrophobe et une chaîne polyhydroxylée hydrophile. Elle présente également un amino-sucre greffé sur une des extrémités de la chaîne polyénique qui augmente le caractère hydrophile de la molécule.



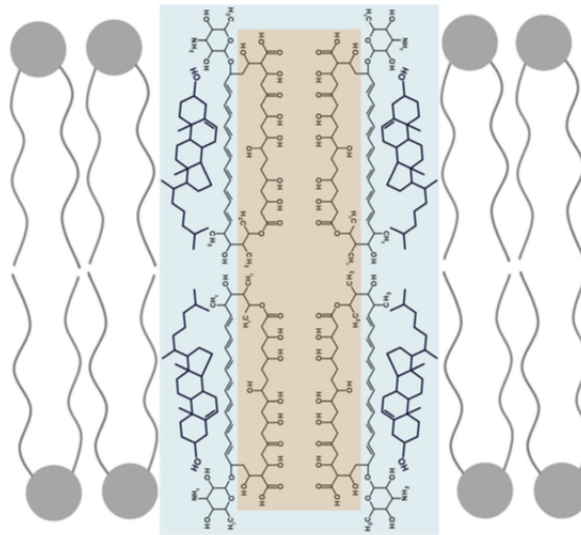
**Figure 16: Structure chimique de l'amphotéricine B**

Plusieurs formulations de l'AMB sont utilisées en thérapeutique. Cette molécule est formulée soit sous forme de sel de désoxycholate, soit sous des formes lipidiques pour diminuer les toxicités associées à la molécule (détaillées après). On compte aujourd'hui trois formulations lipidiques : AMB liposomale, AMB en complexe lipidique et AMB en dispersion colloïdale.

### 2.1.3.2 Mécanisme d'action

L'AMB est une molécule fongicide qui interfère dans la fonction de la membrane fongique en se liant à l'ergostérol grâce à sa structure polyénique. Ceci induit ensuite la formation de pores au sein de la membrane responsables de fuites ioniques (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>) et de fait d'une perte de l'homéostasie menant à une lyse cellulaire (Figure 17).





**Figure 17 : Mécanisme d'action de l'amphotéricine B**

### 2.1.3.3 Spectre d'activité antifongique

L'AMB est le composé présentant le spectre d'activité le plus large de tous les antifongiques commercialisés. La molécule est active sur la plupart des levures et champignons filamenteux du genre *Aspergillus*. Elle présente aussi la particularité très intéressante d'être active contre de nombreux champignons appartenant à l'ordre des *Mucorales*. En revanche, les valeurs de CMI pour les champignons des genres *Scedosporium* et *Fusarium* sont souvent plus élevées montrant une moindre efficacité de l'AMB dans le traitement des pathologies associées à ces pathogènes<sup>54</sup>.

### 2.1.3.4 Pharmacologie

L'AMB possède une biodisponibilité par voie orale quasi-nulle. C'est pourquoi, dans le cadre du traitement des IFIs, elle ne peut être utilisée que par voie parentérale (à noter qu'il existe une formulation par voie orale, la fungizone® en suspension buvable à 10%, utilisée dans le traitement des candidoses buccales et digestives). La molécule est très fortement liée aux protéines plasmatiques et diffuse très bien vers de nombreux tissus de l'organisme. La demi-vie d'élimination est très longue (près de 15 jours) et cela résulte en une accumulation dans les tissus hépatiques, spléniques et un peu moins marquée dans les poumons et les reins. La molécule ne subit pas de métabolisation et l'élimination sous forme inchangée est à la fois rénale et fécale.

## 2.1.4 Echinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides cycliques semi-synthétiques. Ils sont obtenus par modifications structurales de précurseurs produits lors de la fermentation de divers champignons. Trois molécules sont aujourd'hui répertoriées au sein de cette classe (Figure 18)<sup>55</sup>:

- La caspofungine produite à partir de la pneumocandine B de *Glarea lozoyensis*,
- L'anidulafungine qui dérive de l'échinocandine B<sub>0</sub> d'*Aspergillus nidulans*,
- La micafungine ayant comme molécule d'origine l'hexapeptide FR901370 de *Coleophoma empedri*.

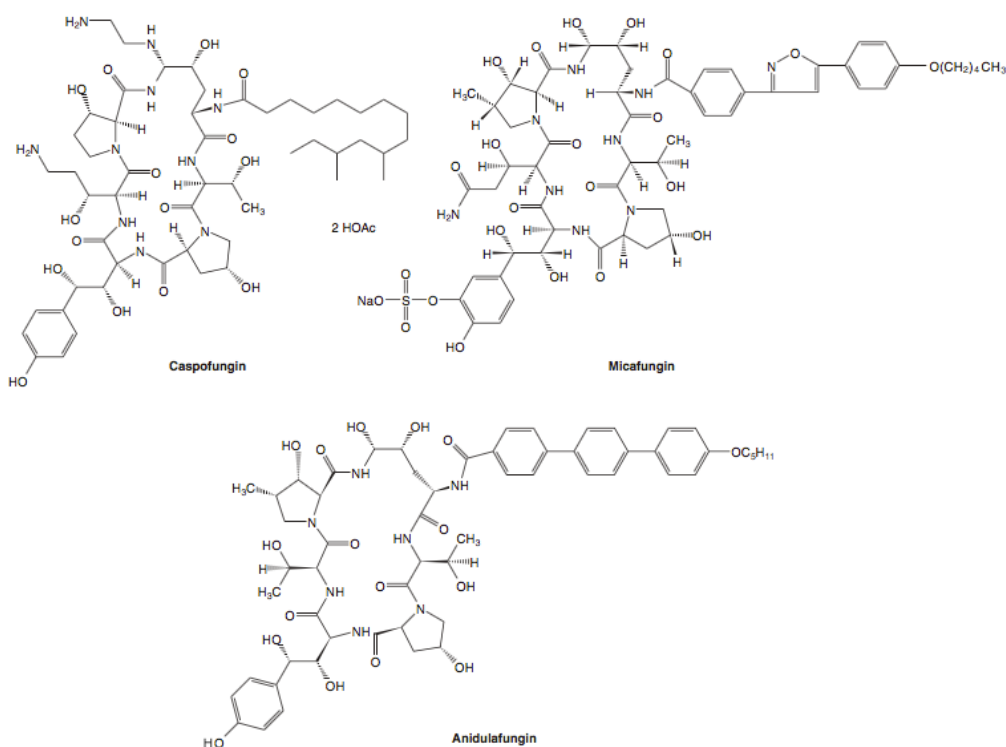
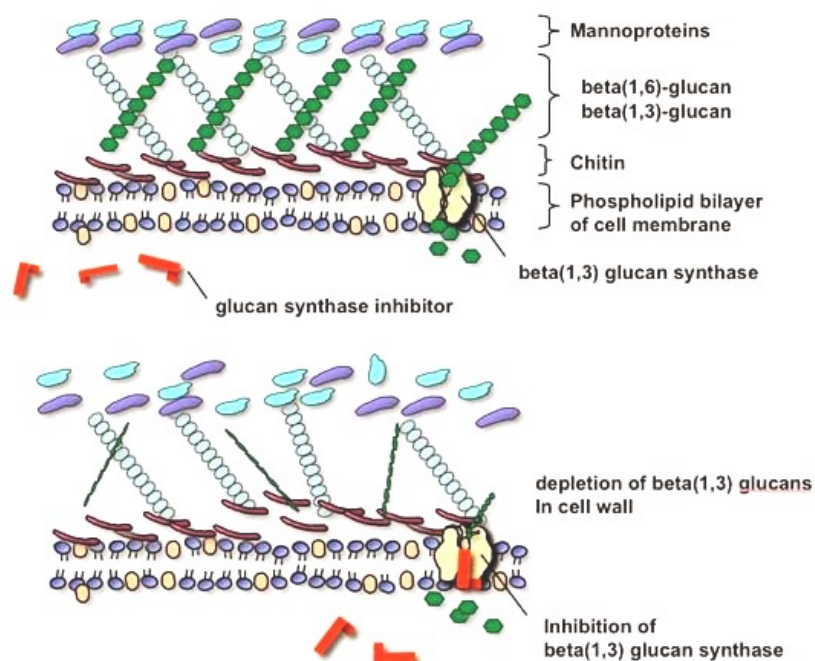


Figure 18 : Structures chimiques des échinocandines

#### 2.1.4.1 Mécanisme d'action

Les échinocandines possèdent une activité antifongique que l'on pourrait qualifier d'opposée à celle des triazolés. En effet, elles ont une activité fongistatique contre les levures du genre *Candida* et fongicide contre les champignons du genre *Aspergillus*<sup>56</sup>.

La cible des échinocandines est la  $\beta$ -(1,3)-D-glucane synthase (inhibition non compétitive). Cet enzyme participe à la formation de la paroi fongique. En effet, celle-ci catalyse la formation des chaînes polysaccharidiques de glucane, indispensables à la structure de la paroi fongique. La déplétion induite par les échinocandines entraîne une perte d'intégrité de la paroi cellulaire, un déséquilibre osmotique et *in fine* une lyse cellulaire. Il est primordial de noter que cet enzyme n'est pas présent chez l'homme, ce qui rend les échinocandines spécifique dans leur mécanisme d'action (Figure 19).



**Figure 19 : Mécanisme d'action des échinocandines**

#### 2.1.4.2 Spectre d'activité antifongique

Les données de la littérature montrent que les trois échinocandines possèdent des profils d'activité très semblables avec des valeurs de CMI très proches. Ces molécules sont très actives

sur les levures du genre *Candida* (à l'exception de *C. parapsilosis* pour laquelle l'activité est modérée) et les espèces du genre *Aspergillus*<sup>57,58</sup>. Ces molécules possèdent la particularité d'être actives sur *Pneumocystis jirovecii* bien qu'elles n'aient pas été étudiées plus en détail pour cette indication<sup>59</sup>. En revanche, elles sont très peu actives voire inactives sur les *Mucorales* et les espèces du genre *Fusarium*, *Scedosporium*. De même, elles n'ont pas d'effet sur *Cryptococcus* étant donné que cette levure est dépourvue de glucane synthase<sup>56</sup>.

#### 2.1.4.3 Pharmacologie

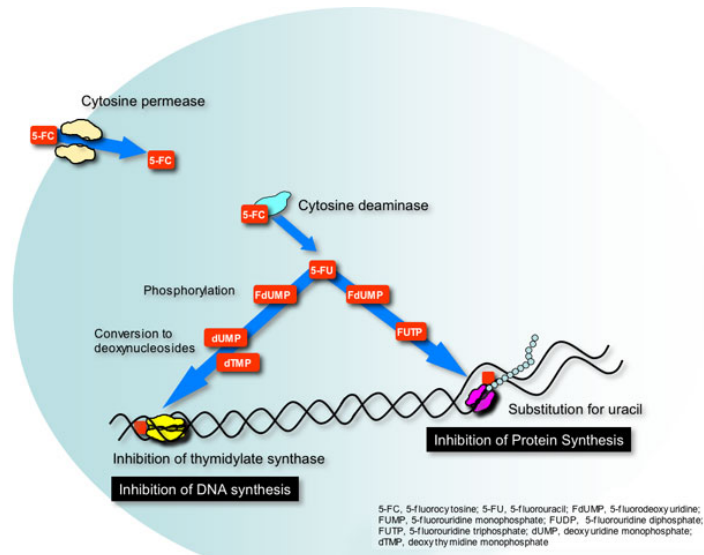
Les échinocandines présentent une très faible biodisponibilité orale justifiant l'administration exclusivement par voie parentérale. La diffusion de ces molécules est bonne dans de nombreux organes (foie, rate, reins, poumons) mais pas au niveau du système nerveux central à cause de la forte liaison aux protéines plasmatiques se faisant immédiatement après administration, ainsi qu'aux poids moléculaires élevés. L'élimination se fait principalement par voie fécale après métabolisation le plus souvent hépatique<sup>59</sup>.

### 2.1.5 5-Fluorocytosine (flucytosine)

#### 2.1.5.1 Généralités et Mécanisme d'action

La 5-fluorocytosine (5-FC) ou flucytosine est une molécule synthétique, analogue fluoré de la cytosine, agissant comme un bioprécurseur. Après l'entrée dans la cellule fongique grâce aux cytosine perméases, la molécule subit une transformation enzymatique par la cytosine désaminase menant à la formation de 5-fluorouracile (5-FU). Ce composé agit de deux manières (Figure 20) :

- inhibition de la synthèse d'ADN par antagonisme de l'activité de la thymidylate synthase,
- inhibition de la synthèse protéique par incorporation dans l'ADN (au lieu des molécules uraciles produites naturellement par le champignon)<sup>60</sup>.



**Figure 20: Mécanisme d'action de la 5-FC**

### 2.1.5.2 Spectre d'activité antifongique

La 5-FC est active contre les levures du genre *Candida* et *Cryptococcus*. Elle est en revanche beaucoup moins active voire inactive sur *Aspergillus spp.* Cette molécule s'utilise aujourd'hui principalement en association, en particulier avec l'amphotéricine B et le fluconazole dans le traitement des cryptococcoses méningées<sup>61</sup>.

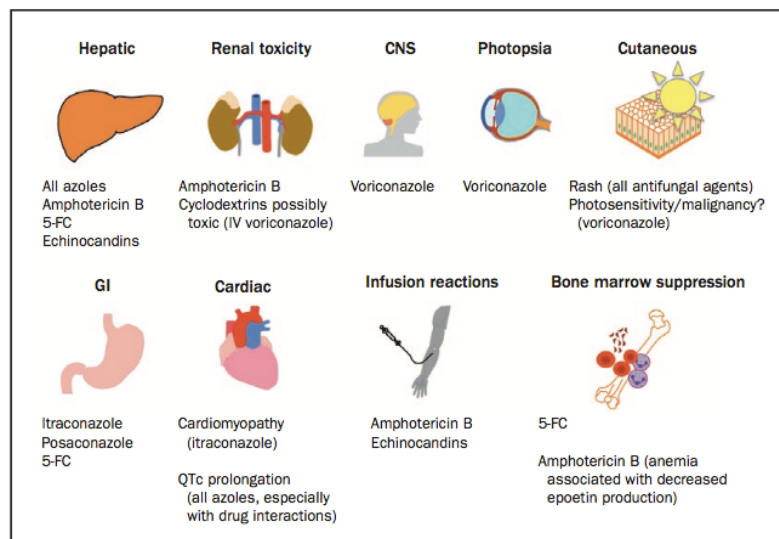
### 2.1.5.3 Pharmacologie

La 5-FC présente une bonne biodisponibilité orale ainsi qu'une bonne diffusion tissulaire du fait de sa forte hydrosolubilité, de son petit poids moléculaire et d'une faible liaison aux protéines plasmatiques. Ces points justifient son utilisation dans les atteintes du système nerveux central causées par les champignons du genre *Cryptococcus*. La métabolisation est exclusivement hépatique et l'élimination est majoritairement urinaire.

## 2.2 Inconvénients et limites des traitements antifongiques

### 2.2.1 Effets indésirables

Les différentes classes d'antifongiques décrites précédemment présentent un certain nombre d'effets indésirables posant quelques fois de sérieux problèmes d'utilisation chez les patients atteints d'IFIs. Les principaux effets indésirables sont schématisés dans la Figure 21<sup>52</sup> :



**Figure 21: Principaux effets indésirables des antifongiques**

La molécule la plus fréquemment responsable d'effets indésirables (survenue quasi-systématique) est l'AMB. Des atteintes rénales de type insuffisances rénales aiguës sont souvent recensées avec des taux d'incidence décrits dans la littérature compris entre 49 et 65% chez les patients ayant recours à ce traitement<sup>62</sup>. L'explication de la survenue de ces effets indésirables repose sur une altération de la fonction de filtration glomérulaire ainsi que sur des dysfonctions tubulaires rénales induites par l'AMB. Cette même molécule est aussi responsable très souvent de réactions locales douloureuses au niveau du point d'injection et plus rarement d'une hépatotoxicité. L'ensemble de ces effets indésirables a motivé le développement de formulations lipidiques pour obtenir une alternative à la forme AMB désoxycholate. Ces formulations lipidiques limitent particulièrement les atteintes de la fonction rénale.

Les antifongiques triazolés et les échinocandines sont beaucoup mieux tolérés que l'amphotéricine B. Les effets indésirables fréquents des antifongiques triazolés sont des rashes

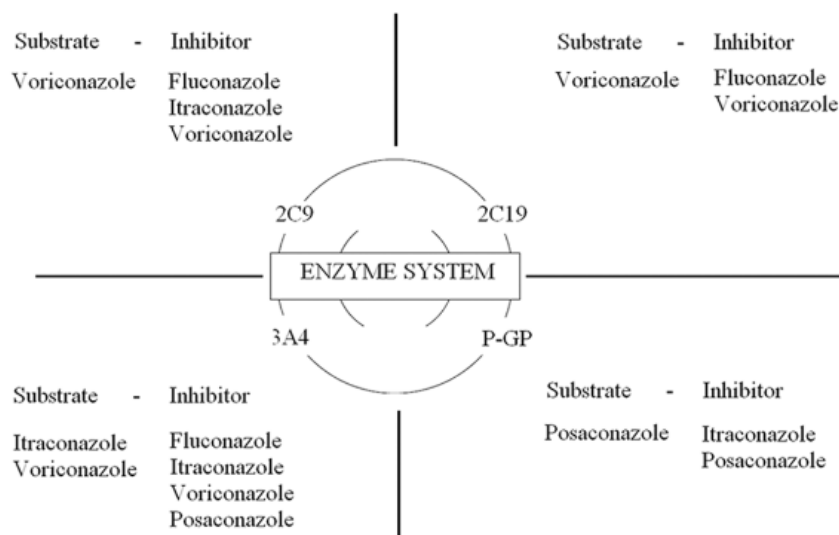
cutanés, maux de tête et des troubles gastro-intestinaux. Les atteintes hépatiques sont les effets indésirables graves les plus souvent décrits pour cette famille médicamenteuse. Elles sont marquées par une élévation des enzymes hépatiques et très rarement par une défaillance de la fonction hépatique. Le VCZ se démarque des autres molécules par des effets indésirables uniques : des rashes cutanés induits par photosensibilité et des altérations réversibles de la vue (photopsie). Les échinocandines, quant à elles, possèdent très peu de toxicité si ce n'est quelques réactions locales au site d'injection.

Enfin, la 5-FC est responsable de deux types de toxicités principales : des atteintes hépatiques et des troubles hématologiques (leucopénie, thrombopénie voire aplasie médullaire et agranulocytose dans les cas plus graves)<sup>63</sup>. Les affections de la moelle osseuse sont plus fréquentes et plus graves chez les patients présentant une fonction rénale altérée puisqu'il y a alors une accumulation importante de la 5-FC dans l'organisme.

### **2.2.2 Interactions médicamenteuses**

Les antifongiques triazolés ont la particularité d'être à la fois des substrats et des inhibiteurs des nombreux isoenzymes des CYP450 (contrairement aux autres antifongiques systémiques qui ne sont pas métabolisés par ces enzymes). Leur utilisation constitue de fait un risque important d'interactions médicamenteuses d'ordre cinétique lors de polymédication avec des médicaments métabolisés par ces enzymes. Il est à noter que les interactions ne sont pas tout à fait les mêmes d'une molécule à l'autre de cette famille car elles possèdent des affinités différentes pour les quelques isoenzymes concernés. L'isoforme enzymatique la plus marquante est le CYP3A4 puisqu'elle est inhibée par l'ensemble des antifongiques triazolés (Figure 22)<sup>64,65</sup>.

En plus de l'inhibition des CYP450, le PCZ et l'ICZ sont des inhibiteurs de la glycoprotéine P (P-gp) codée par le gène *MDR1*. Il s'agit d'un transporteur d'efflux qui contrôle la concentration cellulaire de différents substrats en assurant leur expulsion de certaines cellules. Ainsi, l'inhibition par ces deux triazolés est susceptible de modifier la cinétique des molécules prises en charge par ce système de transport.



**Figure 22: CYP450 et interactions médicamenteuses des antifongiques triazolés**

## 2.2.3 Phénomènes de résistance

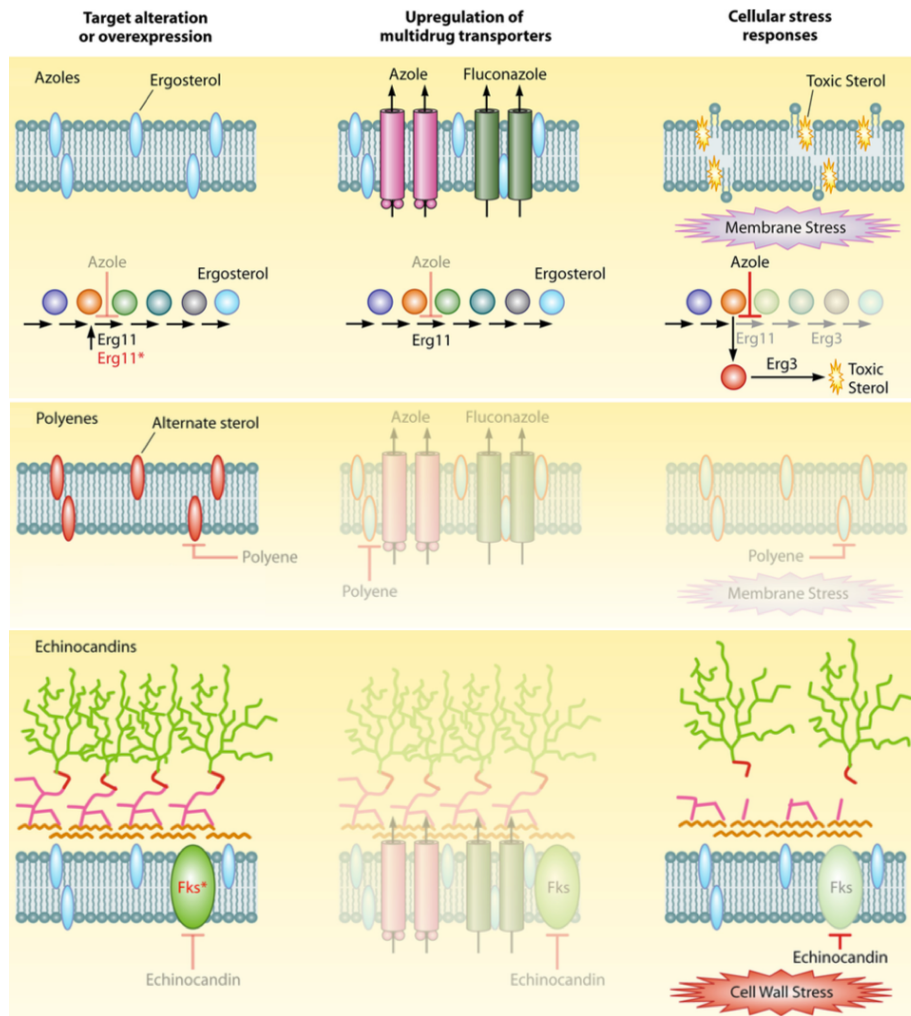
### 2.2.3.1 Généralités

Le terme de résistance d'un point de vue clinique, est défini par la persistance ou la progression d'une infection malgré le recours à une thérapie appropriée. Du point de vue microbiologique, elle est définie par la non-susceptibilité d'un champignon à un agent antifongique donné. Elle est déterminée par des tests de susceptibilité *in vitro* et par comparaison des valeurs de concentration minimale inhibitrice obtenues (CMI ou MIC en anglais) avec les autres isolats de la même espèce<sup>66</sup>.

Les résistances fongiques sont classées dans deux catégories distinctes : les résistances innées (ou intrinsèques) et les résistances acquises. Les résistances intrinsèques surviennent naturellement chez des souches fongiques n'ayant pas été exposées auparavant à un traitement donné tandis que les résistances acquises sont développées suite à l'exposition à un antifongique d'un pathogène initialement sensible à ce composé.



### 2.2.3.2 Mécanismes de résistance



**Figure 23: Mécanismes de résistance aux antifongiques (ex de *Candida albicans*)**

Quatre mécanismes principaux sont exploités par les champignons pour développer des résistances aux antifongiques (Figure 23)<sup>67</sup>. L'altération de la cible fongique par mutation ou surexpression des gènes codant pour cette dernière est le mécanisme le plus commun aux trois classes d'antifongiques principales (triazolés, polyènes et échinocandines). Ces mutations peuvent donc porter sur le gène *erg11* conférant de possibles résistances vis à vis des triazolés ou encore les gènes *fks* pour des résistances aux échinocandines.

Un second mécanisme concernant les triazolés consiste en l'augmentation d'expression de transporteurs d'efflux. Ces entités sont responsables de l'externalisation des molécules antifongiques de la cellule. Les transporteurs les plus impliqués dans ces phénomènes sont les

CDR (*Candida albicans* drug resistance) de *C. albicans* qui sont des transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) et MDR1 qui fait partie de la famille des MFS (Major facilitator superfamily)<sup>68</sup>. L'augmentation de l'expression membranaire de ces deux types de transporteurs entraîne une diminution de la concentration intracellulaire de l'agent thérapeutique et donc une baisse consécutive de l'activité antifongique.

L'induction de réponses au stress cellulaire occasionné suite à l'activité antifongique constitue un troisième mécanisme clé de résistance. Ce point concerne surtout les triazolés et les échinocandines. Dans le cas des antifongiques triazolés, la réponse peut être une mutation du gène *erg3* qui code pour l'enzyme  $\Delta 5,6$ -desaturase. Ce mécanisme bloque ainsi la production éventuelle de stérols toxiques par cet enzyme et limite de ce fait le stress membranaire. La protéine de choc thermique Hsp90 est également fortement impliquée dans cette réponse, à la fois pour les triazolés et les échinocandines. Cette protéine chaperonne joue en effet un rôle essentiel dans le maintien d'un bon repliement dans l'espace de très nombreuses protéines clientes, que ce soit chez *Candida spp* ou *Aspergillus spp*. Elle assure de ce fait leur fonctionnalité dans les diverses voies de signalisation de réponse au stress cellulaire au sein desquelles elles sont impliquées<sup>69</sup>. La Hsp90, lors de mutation, permet ainsi de préserver la fonctionnalité d'un certain nombre de facteurs de transcription qui permettent une adaptation de la cellule fongique au stress cellulaire auquel elle est soumise.

Enfin, il est crucial d'aborder la formation de biofilms dans les mécanismes de résistance. En effet, en plus de leur implication dans la virulence, ils possèdent un rôle prépondérant dans la résistance fongique. Plusieurs explications existent pour justifier cette résistance comme une modification de la composition membranaire en ergostérol. En effet, des données expérimentales ont montré que le niveau en ergostérol des biofilms de *Candida albicans* était diminué de 41% à un stade intermédiaire de formation et de 50% à un stade mature. Ce point concourt à une baisse de l'activité antifongique des azolés du fait de l'expression moindre de la cible. Il faut noter enfin l'existence, au sein des biofilms, d'une up-régulation de *cdr1* et *mdr1* diminuant la susceptibilité aux antifongiques triazolés par un mécanisme d'efflux<sup>67,70</sup>.

### 2.2.3.3 Description des principales résistances aux antifongiques

L'augmentation de l'incidence des IFIs ces dernières décennies est accompagnée d'une augmentation de la survenue de résistances aux différents traitements disponibles. Comme il a été décrit dans le paragraphe précédent, les antifongiques triazolés sont les molécules les plus touchées par ces phénomènes. Ces résistances concernent en particulier les levures du genre *Candida* devenues de plus en plus résistantes au FCZ essentiellement (peu de résistances sont reportées chez *Cryptococcus spp.*<sup>71</sup>). Ainsi, en plus des résistances innées existantes chez *C. krusei*, *A. terreus* et autres champignons filamenteux (*Fusarium spp.*, *Scedosporium spp.*), un grand nombre de résistances acquises ont été développées chez certaines espèces en raison de divers mécanismes cités auparavant. C'est le cas en particulier de *C. glabrata* dont l'implication dans les IFIs est passée de 18 % à 25 % entre 1992 et 2001 avec une concomitante augmentation du taux d'incidence de résistances au FCZ de 9 % à 14 %<sup>72</sup>. Cette même espèce pose en plus des problèmes de résistances croisées au sein d'une même famille de médicaments. Ceci a pour conséquence l'existence de souches de *C. glabrata* résistantes à plusieurs triazolés en plus du fluconazole (VCZ et PCZ principalement). De plus, les résistances acquises par cette espèce s'étendent maintenant aux échinocandines, matérialisant un phénomène de plus en plus inquiétant qui est celui des souches fongiques MDR, particulièrement compliquées à prendre en charge par les thérapeutiques actuelles<sup>73</sup>. Les souches de cette nature sont de plus en plus émergentes actuellement comme l'espèce *C. auris*, reconnue MDR depuis 2016 et inquiétant de plus en plus les autorités sanitaires partout dans le monde<sup>74</sup>.

La flucytosine (5-FC) est également très sujette aux résistances avec notamment une prévalence générale chez *C. albicans* proche de 10%<sup>75</sup>. C'est pourquoi, afin de limiter le développement de résistances et les échecs thérapeutiques, cette molécule est utilisée le plus souvent en association avec un autre antifongique, souvent l'amphotéricine B. Cette dernière présente, au contraire de la 5-FC, peu de résistances. Néanmoins, quelques espèces de *Candida* rares telles que *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii* ou encore quelques espèces des genres *Fusarium* et *Scedosporium* possèdent des résistances intrinsèques à cette molécule.

## **2.3 Résumé**

Pour résumer cette partie, il est important de rappeler que quatre classes d'antifongiques sont utilisées dans le traitement des IFIs (polyène, triazolés, échinocandines et 5-FC). Si ces classes thérapeutiques montrent des activités intéressantes chez de nombreuses espèces fongiques, elles sont entachées d'un certain nombre d'inconvénients lors de leur utilisation : des effets indésirables non négligeables causés par l'amphotéricine B ; des interactions médicamenteuses majeures d'ordres pharmacocinétiques dues aux triazolés ; des résistances fongiques de plus en plus marquées chez les triazolés, la 5-FC mais aussi des résistances émergentes aux échinocandines. Au vu de toutes ces limites posées par l'utilisation de ces traitements, il est primordial d'accentuer les recherches de nouveaux agents antifongiques pour enrichir l'arsenal thérapeutique à notre disposition. Pour ce faire, il est nécessaire de mettre en vigueur de nouvelles stratégies de recherche originales en recherchant de nouvelles cibles thérapeutiques.

## **2.4 Nouvelles stratégies de recherche et cibles d'intérêt dans le traitement des IFIs**

### **2.4.1 Etat global de la recherche d'agents antifongiques**

La recherche dans le domaine des antifongiques s'est particulièrement intensifiée depuis plusieurs années afin de répondre aux besoins cliniques grandissants des populations atteintes d'IFIs. Malheureusement, malgré tous les efforts investis depuis de nombreuses années, très peu de molécules sont en cours d'évaluation clinique. La raison majeure de cet échec est la nature eucaryote des cellules fongiques<sup>76</sup>. En effet, contrairement aux bactéries, organismes procaryotes dont les représentants présentent peu d'homologie avec l'homme, les cellules fongiques eucaryotes sont de la même nature que les cellules humaines. Ainsi, il est extrêmement difficile de concevoir des molécules ciblant spécifiquement les cellules fongiques sans affecter les cellules humaines. Ce n'est d'ailleurs pas surprenant si les trois principales classes d'agents antifongiques (triazolés, polyène, échinocandines) agissent sur des cibles exclusivement exprimées par les cellules fongiques et non par les cellules mammifères.

Un second élément limitant en recherche est le peu d'informations disponibles sur les différentes cibles fongiques. Il existe aujourd'hui trop peu de modèles 3D expérimentaux de cibles protéiques, ce qui en limite l'étude approfondie. La conséquence de ce phénomène est qu'il est difficile de mettre en œuvre des stratégies rationnelles de *drug discovery* de type *structure-based drug design* basées sur la connaissance de la cible<sup>77</sup>.

Afin de répondre à ces problèmes, plusieurs options existent et sont exploitées dans les recherches actuelles. Le premier aspect qu'il faut mettre en avant est la recherche de nouvelles molécules agissant sur des cibles déjà connues. Cette approche évite le problème de la méconnaissance de la cible mais n'est cependant pas une stratégie originale et peut poser les mêmes types de problèmes que ceux posés par les antifongiques commercialisés agissant sur ces mêmes cibles (effets indésirables, résistances...). La seconde option, plus originale mais plus compliquée à mettre en œuvre pour les raisons décrites ci-dessus, est la recherche de cibles nouvelles. Enfin, une dernière piste étudiée en recherche est la réutilisation d'« anciennes » molécules déjà approuvées par les autorités de santé pour d'autres indications thérapeutiques. Cette stratégie peut être intéressante car on possède une connaissance globale de ces molécules du fait de leur utilisation préalable en thérapeutique. Leur mécanisme d'action ou leurs profils toxicologique et pharmacocinétique sont notamment connus pour la majorité d'entre elles.

Dans cette partie, il est question de faire une revue de l'état actuel de la recherche de nouveaux antifongiques en présentant certains des nouveaux agents potentiellement actifs en cours de développement. Pour clarifier et schématiser tout cela, la Figure 24 fait un bilan exhaustif de ces molécules avec leur(s) cible(s) associée(s) quand celle-ci est connue.

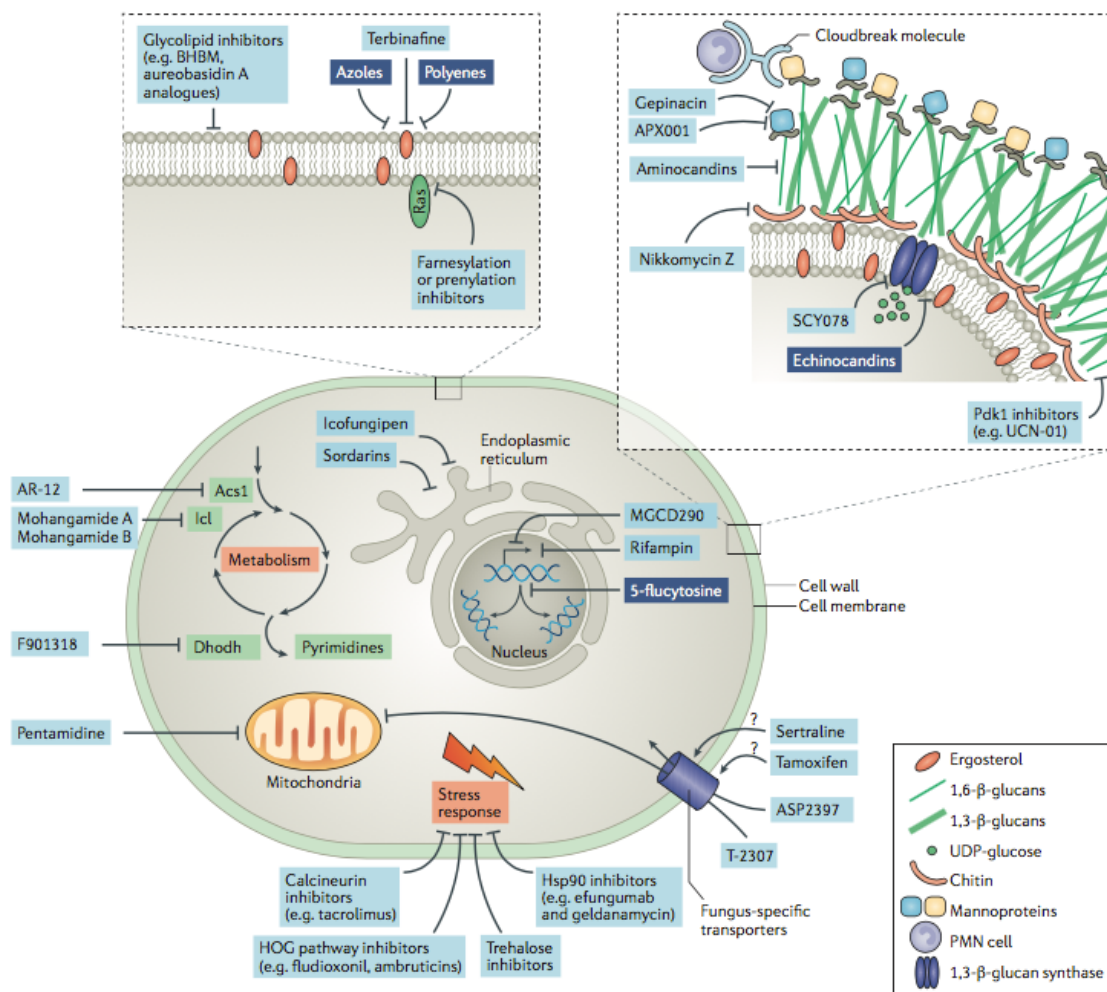


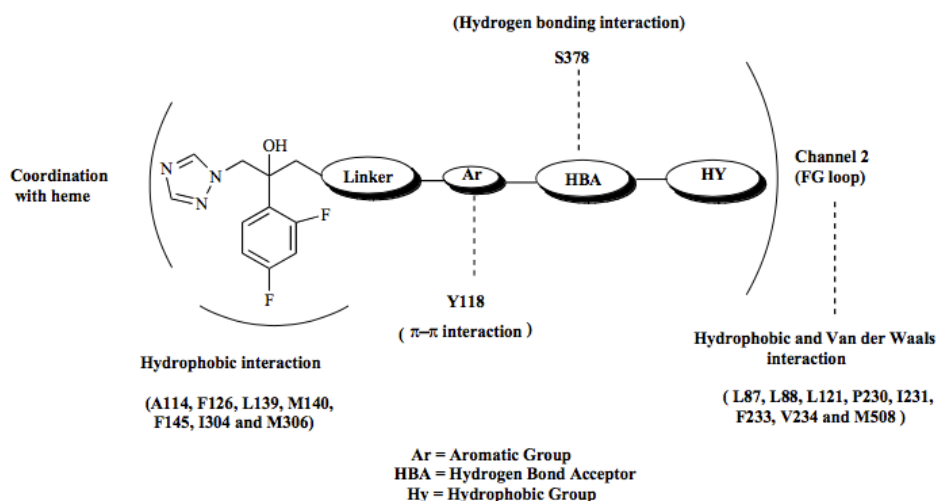
Figure 24: Nouveaux agents antifongiques étudiés en recherche<sup>6</sup>

## 2.4.2 Nouvelles molécules agissant sur des cibles déjà connues

### 2.4.2.1 Lanosterol 14- $\alpha$ -déméthylase

La lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase est une cible maintenant bien connue notamment grâce à l'existence de modèles expérimentaux 3D (par exemple chez *Aspergillus fumigatus*) qui permettent une étude en détail des interactions entre les ligands et la cible. Beaucoup de recherches sont en cours pour découvrir de nouvelles molécules actives sur cet enzyme. La structure triazole est toujours une structure privilégiée dans la recherche d'inhibiteurs de cet enzyme et ce point est bien illustré par les quelques molécules à structure triazolée actuellement en essais cliniques (ravuconazole, albaconazole). Dans le but d'optimiser la recherche de nouveaux composés efficaces, Sheng et Zhang ont développé un modèle pharmacophorique

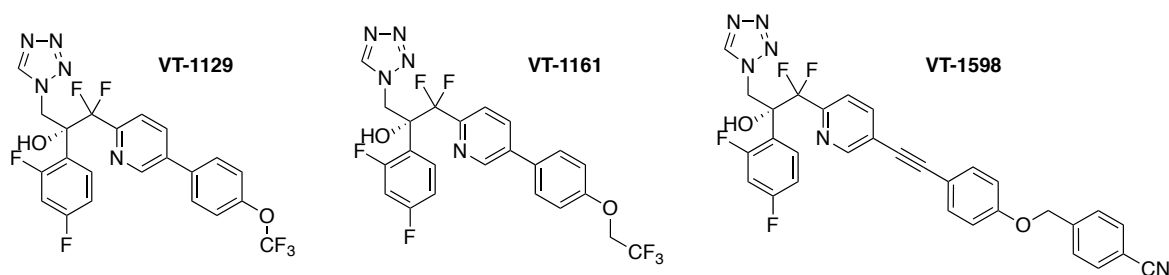
sur la base du site actif du CYP51 (Figure 25). Ce modèle met en évidence les différentes interactions favorables avec la cible comme une interaction  $\pi$ - $\pi$  avec un groupement aryle ou encore la nécessité d'avoir un groupement accepteur de liaison hydrogène et également un motif hydrophobe en bout de chaîne pour effectuer des interactions type Van der Waals.



**Figure 25: Modèle pharmacophorique de nouveaux triazolés<sup>77</sup>**

Ce modèle a été largement exploité dans la synthèse de multiples nouvelles molécules possédant une forte activité *in vitro* sur la cible, que ce soit chez les levures du genre *Candida*, *Cryptococcus* ou chez *Aspergillus* pour certaines d'entre elles.

D'autres analogues, cette fois avec un noyau tétrazole, ont été développés par Viamet Pharmaceuticals (Figure 26). L'idée majeure était de remplacer le triazole par un tétrazole, moins affiné pour l'hème du CYP51, tout en augmentant les interactions avec les acides aminés du site actif par modifications structurales de la chaîne latérale. Cette stratégie a mené à l'obtention de molécules hautement sélectives de l'enzyme fongique, limitant le risque d'interactions médicamenteuses lors de polymédications (VT-1129, VT-1161, VT-1598). Ces trois molécules présentent toutes de bonnes activités contre un large panel d'agents fongiques pathogènes. Le VT-1129 est d'ailleurs en essai clinique de phase 1 pour le traitement des méningites à cryptocoques<sup>78</sup>.



**Figure 26 : Structures chimiques du VT-1129, VT-1161 et VT-1598**

En plus des inhibiteurs azolés, un certain nombre d'inhibiteurs non azolés actifs sur la lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase ont été étudiés afin de pallier les inconvénients de ces derniers tels que les résistances croisées ou les effets indésirables. Plusieurs structures ont ainsi été découvertes comme les structures benzopyrane, tetrahydroisoquinoléine, 2-aminotétraline ou encore pyrazino[2,1-*a*]isoquinoléine. Cependant, ces structures sont dans la majorité des cas moins actives que les antifongiques azolés<sup>77</sup>.

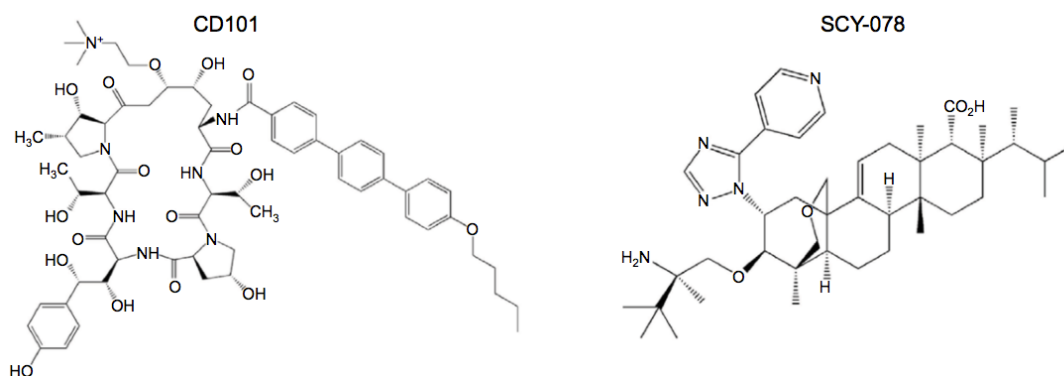
#### 2.4.2.2 $\beta$ -(1,3)-D-glucane synthase

Les échinocandines sont à l'heure actuelle les seuls représentants sur le marché ciblant la  $\beta$ -(1,3)-D-glucane synthase. Ces molécules ont montré leur efficacité en thérapeutique mais possèdent l'inconvénient d'une administration exclusivement par voie parentérale du fait d'une trop faible biodisponibilité par voie orale. Plusieurs composés ont été développés pour répondre à ce problème majeur. Le CD101 ou biafungine est un lipopeptide de la famille des échinocandines qui présente une demi-vie longue (plus de 80 heures) (Figure 27). C'est le cas également pour l'aminocandine, une autre molécule d'origine hémisynthétique de la famille des échinocandines. L'avantage de présenter une demi-vie longue est de limiter la fréquence des administrations à une par semaine faute de ne pouvoir administrer ces molécules que par voie parentérale<sup>78</sup>.

Le SCY-078 est un autre composé actif sur le même enzyme mais avec une structure chimique totalement différente des échinocandines. Ce dérivé triterpénique est obtenu par hémisynthèse à partir de l'enfumafungine, une molécule d'origine naturelle inhibitrice de la  $\beta$ -(1,3)-D-glucane synthase<sup>79</sup>. L'avantage majeur de cette molécule est qu'elle est administrable à la fois par voie orale et voie parentérale contrairement aux échinocandines. Le SCY-078 a



prouvé son efficacité *in vitro* sur plusieurs espèces du genre *Candida* y compris sur des souches MDR de *Candida auris*<sup>80,81</sup>.



**Figure 27 : Structures chimiques du CD101 (biafungine) et du SCY-078**

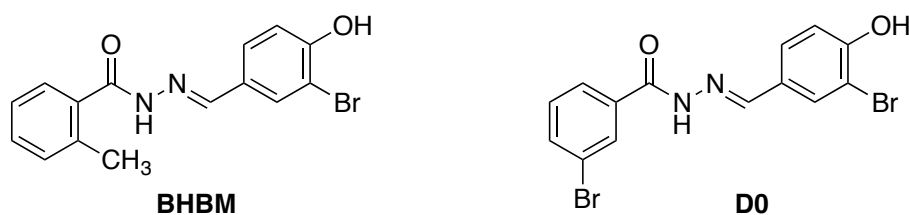
## 2.4.3 Nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique et leurs inhibiteurs

### 2.4.3.1 Cibles de la membrane fongique

La membrane fongique est une cible pertinente en recherche de nouveaux antifongiques. En effet, les molécules thérapeutiques agissant sur cette dernière (azolés, polyènes) prouvent bien que l'induction d'un déséquilibre membranaire est suivi très fréquemment d'une mort cellulaire fongique et donc d'une bonne activité antifongique. C'est pourquoi il est pertinent de rechercher de nouvelles cibles associées à la membrane fongique.

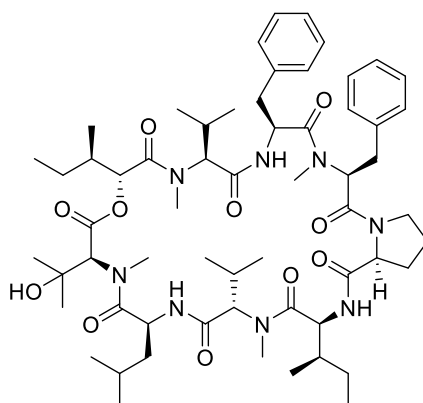
Les sphingolipides et leur voie de synthèse ont émergé comme de bonnes cibles thérapeutiques. Ces lipides jouent un rôle essentiel aussi bien chez les champignons que chez les mammifères mais leur voie de biosynthèse et leurs structures chimiques sont différentes. En ce qui concerne les champignons pathogènes en question, ils sont impliqués dans la réponse au stress cellulaire, la transduction du signal cellulaire, l'endocytose ou encore l'apoptose. Certains sphingolipides participent en plus à la virulence du champignon. C'est le cas du glucosylceramide (GlcCer) qui intervient dans la régulation de la réplication cellulaire dans des milieux à pH neutres ou alcalins. Plus précisément, lors d'une alcalinisation du pH, ces lipides tendent à s'accumuler au niveau membranaire, ce qui favoriserait l'activité d'un certain nombre de transporteurs membranaires impliqués dans la progression du cycle cellulaire<sup>82</sup>.

Le *N*'-(3-bromo-4-hydroxybenzylidène)-2-méthylbenzohydrazide (BHBM) et le 3-bromo-*N*'-(3-bromo-4-hydroxybenzylidène)benzohydrazide (D0) sont des inhibiteurs de la biosynthèse du GlcCer (inhibition de l'enzyme GlcCer synthase). Ces molécules sont regroupées dans une nouvelle classe chimique appelée « hydrazycine »<sup>83</sup>. Elles présentent une activité antifongique en particulier sur des champignons du genre *Cryptococcus* mais également contre *Pneumocystis jirovecii*.



**Figure 28 : Structures moléculaires du BHBM et D0**

L'auréobasidine A est une autre molécule interférant dans la voie des sphingolipides. Cette molécule d'origine naturelle est un depsipeptide cyclique qui a pour cible l'inositol phosphorylceramide synthase (IPCS)<sup>84</sup>. Cet enzyme catalyse une des dernières étapes de synthèse des sphingolipides en greffant une fonction phosphoinositol sur les céramides. Les phosphoinositolcéramides sont produits uniquement chez le champignon et pas chez les cellules mammifères, ce qui fait de l'auréobasidine A un antifongique spécifique. Ce composé possède des valeurs de CMI relativement basses pour *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans*. Elle est, en revanche, beaucoup moins active sur *Aspergillus fumigatus*.



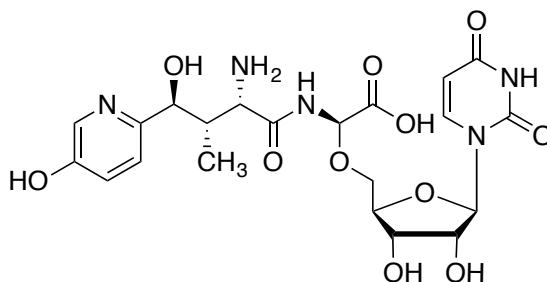
**Figure 29 : Structure chimique de l'Auréobasidine A**

La protéine Ras joue également un rôle clé dans la protection de la cellule vis-à-vis du stress cellulaire et est associée à la virulence fongique. Quelques composés sont en cours de développement pour inhiber les modifications post-traductionnelles de la protéine Ras (farnésylation, palmitoylation...) dans l'idée de bloquer les différentes voies de signalisation dans lesquelles elle est impliquée<sup>85</sup>.

#### 2.4.3.2 Cibles de la paroi fongique

Tout comme la membrane fongique, la paroi est une cible incontournable des agents antifongiques. Sa composition est aujourd'hui bien connue, ce qui permet aux chercheurs de développer diverses molécules capables d'empêcher la synthèse ou l'activité de plusieurs de ses constituants. Parmi les pistes de recherche les plus sérieuses, on compte principalement les inhibiteurs de la chitine synthase et les inhibiteurs de la fonction du glucosylphosphatidylinositol (GPI).

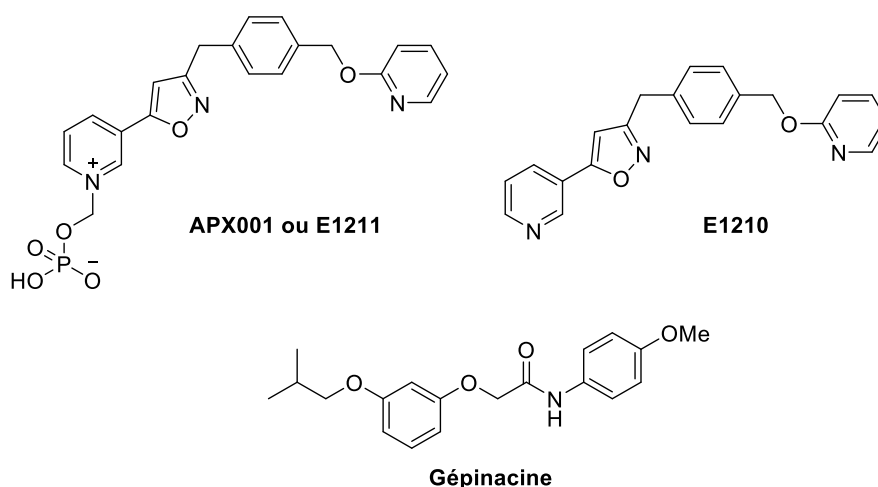
La chitine est un polymère de  $\beta$ -(1,4)-*N*-acétylglucosamine. Ce polysaccharide est un constituant indispensable des parois fongiques qui n'est en revanche pas produit par les cellules animales. La biosynthèse de ce composé est assurée par de nombreux enzymes dont la chitine synthase. Il constitue la cible de plusieurs molécules d'origine naturelle, les nikkomycines (produits de fermentation de *Streptomyces tendae*)<sup>86</sup>. D'un point de vue structural, ces molécules sont constituées d'un motif nucléoside et d'une partie peptidique. Le représentant le plus prometteur de cette famille est la nikkomycine Z (Figure 30). Elle possède une activité *in vitro* contre plusieurs espèces de *Candida* en particulier. De plus, elle a une activité synergique ou additive lors d'association avec divers antifongiques triazolés et surtout avec les échinocandines, que ce soit chez *Candida albicans* ou chez *Aspergillus fumigatus*<sup>87,88,89</sup>.



**Figure 30 : Structure chimique de la Nikkomycine Z**

Plus récemment, une autre cible très pertinente a été investiguée en recherche, le glucosylphosphatidylinositol (GPI). Ce glycolipide possède un rôle prépondérant dans la virulence du champignon en se liant à différentes protéines cytosoliques qu'il adresse ensuite à la paroi fongique où elles exercent leurs diverses fonctions. Parmi les protéines prises en charge, on compte plusieurs facteurs de virulence dont les adhésines (famille des Als notamment) qui permettent l'adhésion à la cellule hôte<sup>90</sup>. La gépinacine et l'E1210 sont deux molécules capables d'antagoniser l'action du GPI fongique. Ceci passe par l'inhibition de la protéine Gwt1 (GPI-anchor wall transfer protein 1) qui catalyse en temps normal l'ancrage des protéines sur le GPI. Le point intéressant à cela est que l'enzyme humaine qui possède une fonction analogue n'est pas inhibée par ce composé<sup>91</sup>.

L'E1210 est formulé sous forme de prodrogue de type ester phosphonate appelée APX001 ou E1211. Cette molécule a passé les essais cliniques de phase 1 et va être évaluée prochainement (début 2018) en essais cliniques de phase 2 dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives.

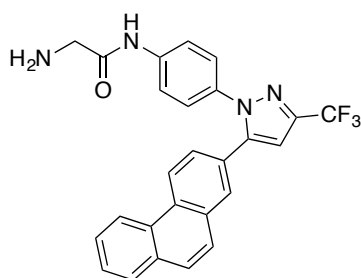


**Figure 31 : Structures chimiques des molécules APX001, E1210 et Gépinacine**

#### 2.4.3.3 Perturbation du métabolisme fongique

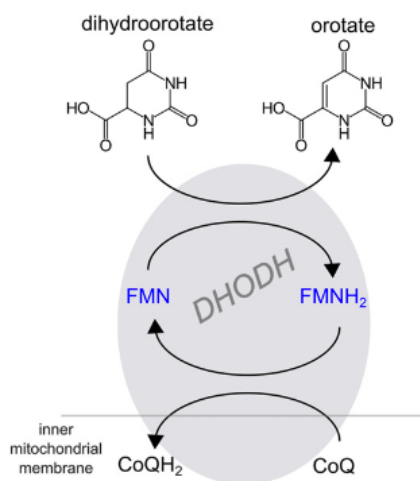
La molécule AR12 est une molécule initialement étudiée pour ses propriétés anti-prolifératives. Ce composé est un dérivé du célécoxib initialement considéré comme un inhibiteur de PDK1 (Phosphoinositide dependant kinase 1) (Figure 32). Des criblages ultérieurs sur des organismes fongiques pathogènes ont permis de mettre en évidence un spectre d'activité

antifongique très intéressant. En effet, cette molécule est active sur *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (dont une activité synergique avec le fluconazole), *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus oryzae* (mucormycoses) ainsi que sur plusieurs espèces des genres *Fusarium* et *Scedosporium*<sup>92</sup>. Plus tardivement, le mécanisme d'action a été remis en question et maintenant il semblerait que l'AR 12 cible plutôt l'acétyl coenzyme A synthétase (Acs)<sup>93</sup>.



**Figure 32 : Structure chimique de l'AR12 - OSU 03012**

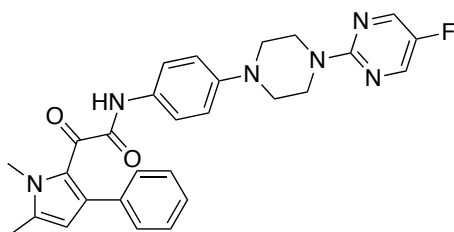
Une seconde cible d'intérêt impliquée dans le métabolisme est la dihydroorotate deshydrogénase (DDODH). Cette oxydoréductase est située au niveau mitochondrial et catalyse la quatrième étape de la biosynthèse des pyrimidines, à savoir la conversion du dihydroorotate en orotate (avec comme accepteurs d'électrons la flavine mononucléotide (FMN) et le coenzyme Q10 (Figure 33)<sup>94</sup>.



**Figure 33 : Mécanisme d'action de la dihydroorotate deshydrogénase**

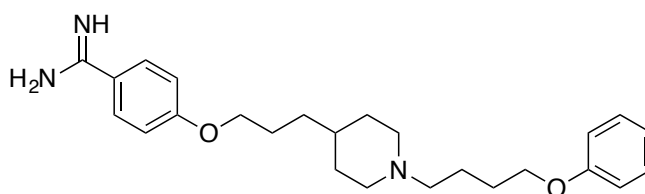
La molécule F901318 (Figure 34) est un inhibiteur réversible de la DDODH du fait d'une inhibition compétitive du coenzyme Q10 et de son site de fixation sur l'enzyme au sein

de la membrane mitochondriale. Cette inhibition empêche la réoxydation indispensable du FMNH<sub>2</sub>, cofacteur de la réaction enzymatique décrite ci-dessus. Le F901318 ne possède pas d'activité sur les levures du genre *Candida* ou *Cryptococcus* mais présente de très bonnes activités contre les champignons filamenteux dont *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* et *Scedosporium spp.*<sup>94</sup>.



**Figure 34 : Structure chimique du F901318**

Pour terminer sur les activités anti-métaboliques, il convient de citer une dernière molécule, la T2307. Cette molécule à structure arylamidine présente un mécanisme d'action singulier (Figure 35)<sup>95</sup>. Elle pénètre dans la cellule à l'aide d'un transporteur spécifique des polyamines pour aller inhiber la propagation du potentiel membranaire mitochondrial, ce qui entraîne par la suite la mort de la cellule fongique. La majorité des champignons pathogènes sont sensibles à ce composé y compris des souches de *Candida spp.* résistantes au fluconazole<sup>96</sup>.

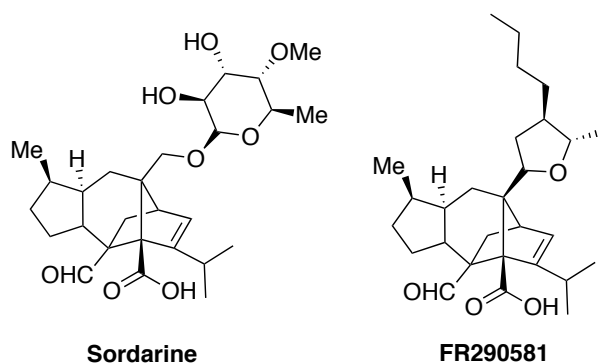


**Figure 35 : Structure moléculaire du T2307**

#### 2.4.3.4 Inhibition de la biosynthèse de l'ADN et des protéines fongiques

L'ADN et sa biosynthèse ainsi que celle des protéines fongiques peuvent constituer des cibles pertinentes dans la découverte de nouveaux agents antifongiques. La sordarine cible justement la synthèse protéique par l'inhibition du facteur d'élongation EF-2. Ce facteur assure en temps normal la dernière étape du cycle d'élongation, la translocation. De nombreux

analogues de la sordarine ont été développés afin d'améliorer les valeurs de CMI obtenues pour celle-ci. Il faut citer le FR290581 qui possède une activité antifongique beaucoup plus prononcée que la sordarine contre *Candida spp.* et *Cryptococcus spp.* En revanche, ces deux molécules ne possèdent pas d'activité contre *Aspergillus fumigatus*.



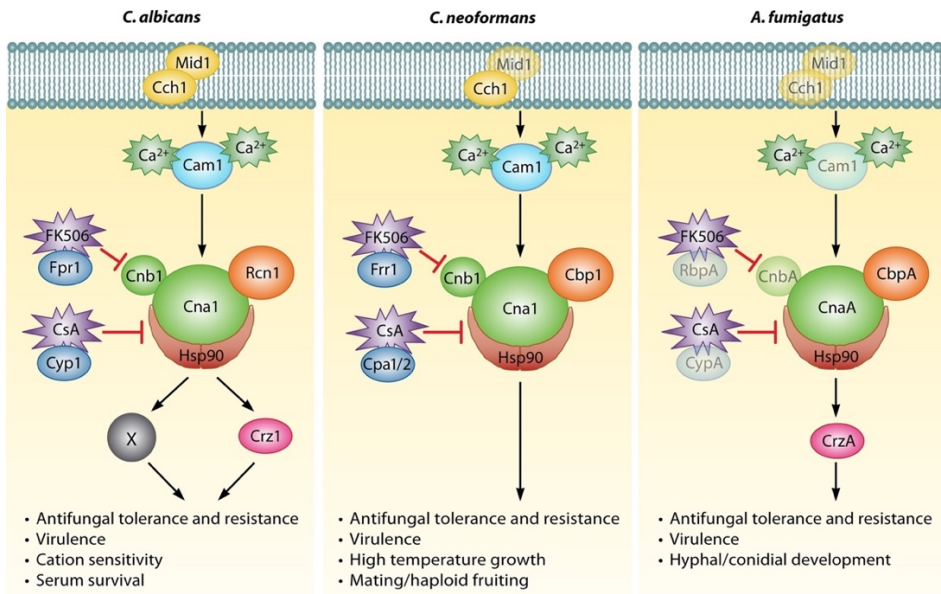
**Figure 36 : Structures chimiques de la sordarine et du FR290581**

Le MGCD 290 est un inhibiteur de l'histone désacétylase 2 (Hos2). Comme son nom l'indique, cet enzyme a pour rôle de désacétyler les lysines des histones dites de « cœur » mais aussi celles de la Hsp 90 et autres protéines diverses. Ainsi, le Hos2 possède une importante activité régulatrice de la transcription des gènes fongiques tout comme dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose. Le MGCD 290 semble être une molécule très prometteuse. Elle a montré une activité antifongique intéressante *in vitro* y compris sur de souches MDR de *Candida spp*<sup>97</sup>. De plus elle a une activité synergique lors de l'association avec d'autres molécules comme le fluconazole et les échinocandines.

#### 2.4.3.5 Inhibition de la réponse au stress cellulaire

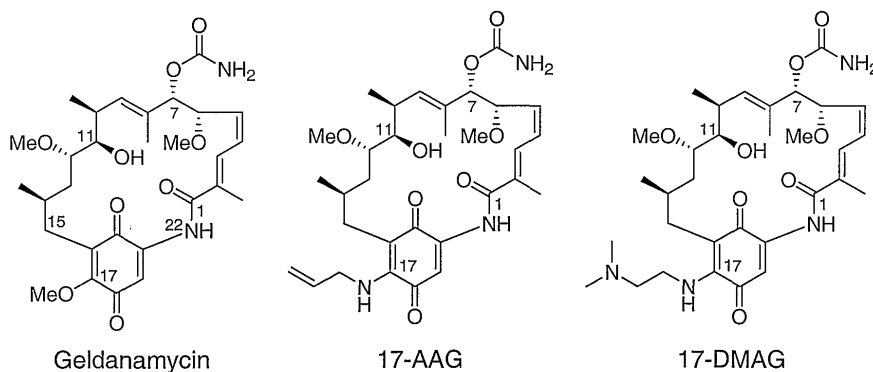
La réponse au stress cellulaire est un élément primordial à la survie de la cellule fongique. Plusieurs voies de signalisation participent à ce phénomène dont la voie de la calcineurine-Hsp90 (Figure 37). Chez *Candida albicans* par exemple, lors de l'activation de canaux ioniques membranaires (Mid1, Cch1), une entrée d'ions calcium dans la cellule aboutit à l'activation de la calmoduline 1 (Cam1). Celle-ci est responsable ensuite de l'activation de la calcineurine. Cela est rendu possible uniquement grâce à l'interaction entre la partie catalytique de cet enzyme (Cna1) et la Hsp90. La calcineurine peut ensuite exercer sa fonction de phosphatase en déphosphorylant plusieurs facteurs de transcription comme Crz1, facteur

régulant de très nombreuses réponses cellulaires (défense de l'organisme fongique, tolérance et résistance aux antifongiques...). Des voies de signalisation analogues sont reportées pour *A. fumigatus* et *C. neoformans*<sup>67</sup>.



**Figure 37 : Voie de signalisation de la calcineurine-Hsp90**

Afin de jouer sur cette voie de signalisation, de nombreux chercheurs se sont penchés sur l'inhibition de la Hsp90. Il est en effet largement prouvé que l'inhibition de l'activité de cette protéine entraîne un effet délétère chez le champignon et permet de limiter la survenue de phénomènes de résistances. La geldanamycine est une molécule d'origine naturelle ciblant justement la Hsp 90. Elle présente une structure unique benzoquinone ansamycine tout comme ses analogues le 17-AAG (17-(allylamino)-17-déméthoxygeldanamycine) et le 17-DMAG (17-diméthylamino-éthylamino-17-déméthoxygeldanamycine)<sup>98</sup> (Figure 38).



**Figure 38 : Structures chimiques de la geldanamycine et des analogues structuraux (17-AAG et 17-DMAG)**



Ces molécules, initialement étudiées pour leurs propriétés anticancéreuses, ont prouvé leur efficacité *in vitro* en particulier lors de l'association avec d'autres molécules antifongiques (caspofungine, fluconazole)<sup>99,100</sup>. De plus elles sont responsables d'une restauration de la susceptibilité aux antifongiques chez plusieurs souches résistantes de *Candida spp.* et d'*Aspergillus spp.* Ces mêmes molécules présentent des activités *in vivo*. Cowen *et al.* ont par exemple montré qu'elles permettaient la survie de larves de *Galleria melonella* à des infections fongiques systémiques dues à *C. albicans* ou *A. fumigatus*<sup>101</sup>.

D'autres voies de signalisation sont l'objet de recherche approfondies comme la voie des tréhaloses. Celle-ci est retrouvée chez les bactéries, champignons, plantes et invertébrés mais pas chez les mammifères<sup>102</sup>. Les tréhaloses ont diverses fonctions indispensables à l'organisme fongique dont une implication dans la réponse au stress cellulaire ou encore dans la virulence fongique. Cette voie comprend deux enzymes clés pouvant constituer de bonnes cibles thérapeutiques, le Tsp 1 (Tréhalose-6-phosphate synthase) et le Tsp2 (Tréhalose-6-phosphate phosphatase) (Figure 39). Actuellement, peu de composés ciblant cette voie de signalisation ont été découverts et ils sont pour l'instant à un stade très précoce de développement.

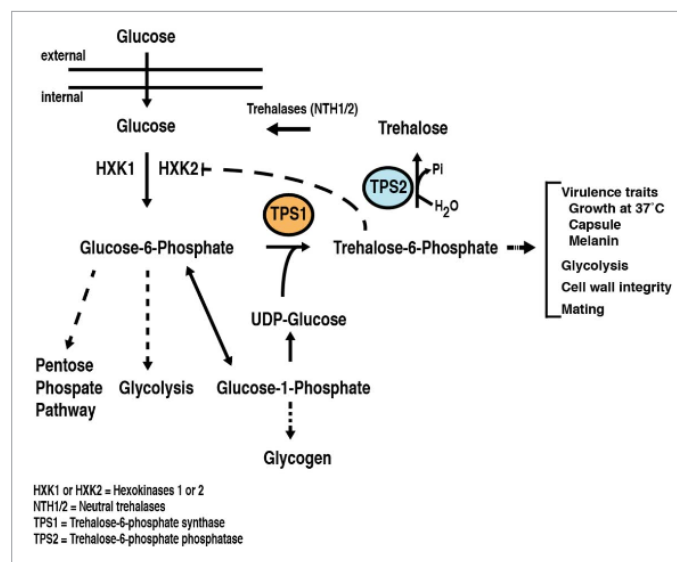


Figure 39 : Voie de signalisation probable des tréhaloses

#### 2.4.4 Nouvelles indications pour d'anciennes molécules thérapeutiques

Pour terminer avec les stratégies actuelles de découverte de nouveaux agents antifongiques, il est important de dire un mot à propos du recours à d'« anciennes » molécules thérapeutiques ayant été utilisées dans d'autres indications thérapeutiques que l'indication antifongique. Parmi ces molécules, on retrouve des immunosuppresseurs tels que la rapamycine, la cyclosporine et le tacrolimus. Ces molécules ne peuvent bien sûr pas être utilisées telles qu'elles puisqu'elles induisent des immunosuppressions et donc un risque de développement d'IFIs mais des modifications structurales de ces composés pourraient amener à diminuer cette activité au profit d'une augmentation de l'activité antifongique.

La sertraline est une autre molécule qui a montré son intérêt en tant qu'antifongique. Cette molécule, faisant partie de la classe des ISRS (inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine), a en effet une activité non négligeable sur *Cryptococcus spp*<sup>103</sup>. De même, le tamoxifène utilisé initialement dans le traitement des cancers du sein présente des activités antifongiques à la fois *in vitro* et *in vivo* sur des levures de pathogènes (*Candida spp.* et *Cryptococcus spp.*)<sup>104</sup>.

#### 2.4.5 Résumé

L'ensemble des nouvelles molécules décrites précédemment donnent un certain nombre d'espoirs quant à l'arrivée sur le marché de nouveaux médicaments indiqués dans le traitement des IFIs. L'avènement majeur de la biologie moléculaire ainsi que l'existence de modèles *in vivo* d'infections fongiques ont joué un rôle très important dans la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Il est important maintenant de continuer les efforts menés depuis plusieurs années pour trouver de nouvelles molécules actives et ainsi augmenter les chances de mettre sur le marché de nouveaux médicaments originaux pour agrémenter l'arsenal thérapeutique à notre disposition. C'est dans cette optique que le projet de recherche autour duquel s'articule cette thèse a été mené. Celui-ci est présenté dans la troisième et dernière partie de ce document.

### 3 Conception de nouveaux agents antifongiques à structure chimique imidazo[1,2-*a*]pyrazines

#### 3.1 Le noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazine en chimie médicinale

##### 3.1.1 Généralités

La structure chimique imidazo[1,2-*a*]pyrazine est un système bicyclique provenant de la fusion d'un premier cycle pyrazine et d'un second imidazole comme représenté sur la Figure 40.

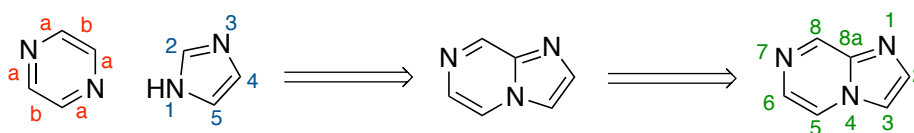


Figure 40: La structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine

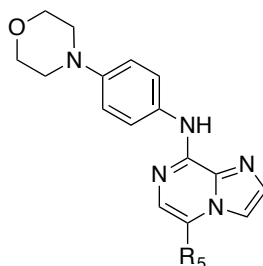
Cette structure a été décrite tardivement (en 1957) mais a été l'objet par la suite de multiples études dans le domaine de la chimie médicinale. Etant un analogue structural des purines, le noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazine possède de multiples propriétés biologiques<sup>105</sup>. De plus, cette série chimique est une source importante de diversité chimique. En effet, les très nombreuses modulations chimiques réalisables aux différentes positions de ces molécules permettent la synthèse d'analogues structuraux très divers et possédant des activités biologiques qui leur sont propres. Il est alors question dans ce paragraphe d'illustrer ce propos en donnant des exemples de molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine présentant des propriétés biologiques d'intérêt.

##### 3.1.2 Propriétés biologiques

###### 3.1.2.1 Propriétés anti-inflammatoires

Plusieurs molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine sont reportées dans la littérature comme possédant de potentielles activités anti-inflammatoires. C'est le cas de certains dérivés

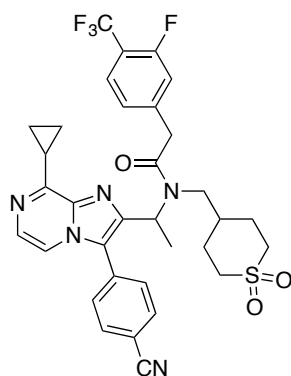
5,8-disubstitués représentés dans la Figure 41 qui possèdent une forte activité sur la protéine MAPKAPK5<sup>106</sup>. Il s'agit d'un enzyme qui joue un rôle important dans la réponse pro-inflammatoire aux cytokines. Il constitue une cible intéressante dans la recherche de nouveaux agents thérapeutiques pour le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.



R <sub>5</sub>	MAPKAPK5
	IC <sub>50</sub> (nM)
4-pyrazolyl	829
4-(2-pyridone)	390
4-benzene carboxamido	1370
5-isoindolin-1-one	239

**Figure 41 : Structures chimiques d'inhibiteurs de la MAPKAPK5 et activités biologiques associées**

Dans le même domaine thérapeutique, certaines molécules présentent des activités intéressantes sur une autre protéine de l'inflammation : CXCR3<sup>107</sup>. Ce récepteur aux chémokines, exprimé préférentiellement à la surface des lymphocytes T cytotoxiques, joue un rôle clé dans le déclenchement de l'inflammation en interagissant avec plusieurs facteurs de l'inflammation tels que CXCL9 (MIG), CXCL10, (IP-10), et CXCL11 (ITAC). Son implication dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques comme le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde ou encore les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin est démontrée. Parmi les molécules reportées, l'une d'entre elles marque fortement par son activité biologique très intéressante (Figure 42). Celle-ci a en effet montré des résultats satisfaisants *in vivo* chez un modèle animal en induisant une inhibition de l'infiltration leucocytaire dans les poumons suite à une inflammation induite par la bléomycine.

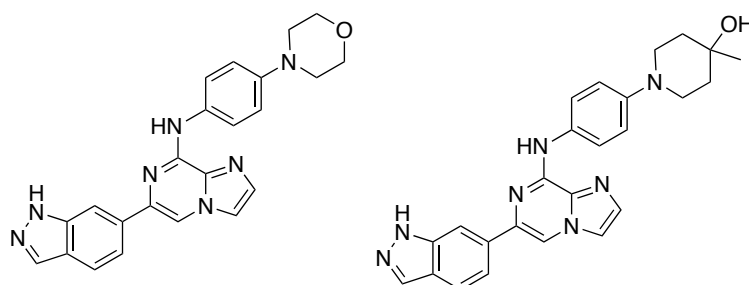


**Figure 42 : Structure d'un inhibiteur potentiel de CXCR3**

### 3.1.2.2 Propriétés anti-prolifératives

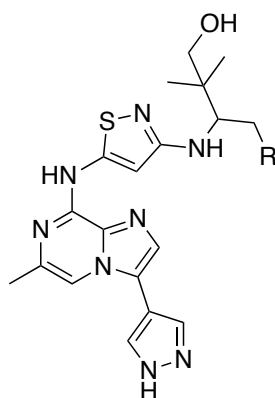
Les activités anti-prolifératives des imidazo[1,2-*a*]pyrazines sont véritablement les propriétés biologiques prédominantes. Elles passent très souvent par une inhibition de protéines kinases impliquées dans le développement tumoral.

Currie *et al.* ont décrit la synthèse de molécules à activité anti-proliférative par l'inhibition de la *Spleen tyrosine kinase* (Syk), avec des IC<sub>50</sub> inférieures à 10 nM pour les deux molécules (Figure 43).



**Figure 43: Structures chimiques de molécules actives sur la Syk**

Une autre équipe de recherche a montré une activité de ses composés trisubstitués sur les Aurora kinase A et B avec encore de très bonnes valeurs de CMI (quelques nM) (Figure 44)<sup>108</sup>.

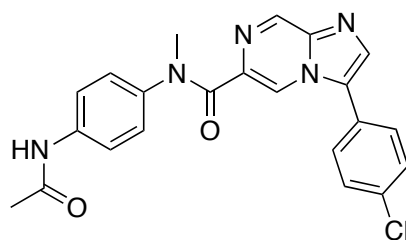


**Figure 44: Structure d'une molécule inhibitrice d'Aurora kinase A et B**

De nombreux autres exemples existent dans la littérature comme des inhibiteurs de PI3K, de la protéine kinase Brk ou encore de B-Raf<sup>109, 110, 111</sup>.

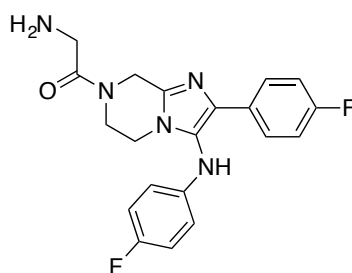
### 3.1.2.3 Propriétés anti-parasitaires

Certaines molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine possèdent des activités anti-parasitaires qui sont à notifier. C'est le cas notamment du KDU 691 décrit par Zeeman *et al.* Cette molécule expose de très fortes activités contre *Plasmodium cynomolgy* (parasite du primate utilisé comme modèle d'étude des infections à *Plasmodium vivax*) et ce sur de multiples stades parasitaires du cycle de vie de *Plasmodium* (schizozoïte, hypnozoïte...)<sup>112</sup>.



**Figure 45 : Structure moléculaire du KDU 691**

D'autres chercheurs ont découvert des molécules actives sur des souches de *Plasmodium falciparum*. Ces composés sont des d'analogues réduits d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines comme celui représenté sur la figure ci-dessous.



3D7 IC<sub>50</sub> = 20 nM; W2 (souche MDR) IC<sub>50</sub> = 23 nM

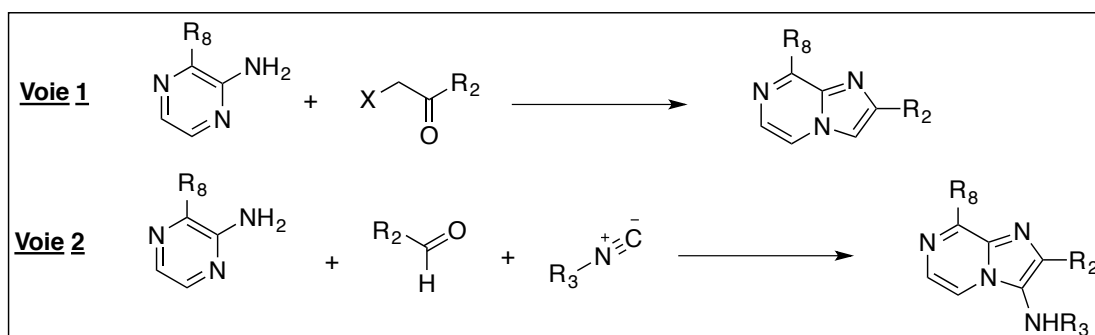
**Figure 46 : Structure chimique d'une molécule activité anti-*Plasmodium falciparum***

### 3.1.3 Synthèse et réactivité chimique

#### 3.1.3.1 Synthèse du noyau imidazo[1,2-*a*]pyrazine

Différentes méthodes de synthèse sont décrites dans la littérature afin d'obtenir des dérivés de cette famille chimique hétérocyclique. Parmi celles-ci, il existe deux voies majoritaires (Figure 47) :

- Condensation à deux composantes entre un composé  $\alpha$ -halogénocarbonyle et un dérivé de la 2-aminopyrazine (**voie 1**),
- Réaction multicomposante de Groebke-Blackburn-Bienaymé (semblable à la réaction d'Ugi) avec un dérivé de la 2-aminopyrazine, un composé carbonylé et un isonitrile (**voie 2**).



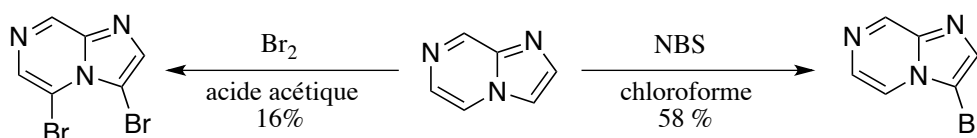
**Figure 47: Principales voies d'accès aux dérivés imidazo[1,2-*a*]pyrazine**

La voie de synthèse 1 est la plus classiquement utilisée, du fait de l'accès aisé aux matières premières ainsi qu'à l'utilisation de conditions de réaction relativement douces<sup>113</sup>. La seconde voie nécessite des conditions plus dures de réaction avec souvent un recours aux micro-ondes et/ou à un catalyseur organométallique. Guchait *et al* ont, par exemple, reporté l'utilisation du tétrachlorure de zirconium pour la synthèse de leurs dérivés imidazopyrazines.<sup>114</sup> Cependant, comme les auteurs l'illustrent dans la publication, cette voie de synthèse est particulièrement intéressante pour l'obtention de composés aminosubstitués en position 3, étant donné qu'ils peuvent être obtenus directement en une seule étape après greffage initial du groupement désiré sur l'azote de l'isonitrile.

### 3.1.3.2 Réactivité chimique

Afin de comprendre la réactivité des molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine, il est important de s'intéresser à la composition élémentaire de ces structures. Celles-ci sont constituées d'un cycle  $\pi$ -excédentaire, l'imidazole (du fait de l'implication du doublet non liant d'un des azotes dans l'aromaticité du cycle), et d'un second cycle  $\pi$ -déficientaire, la pyrazine. Sachant cela, il est pertinent d'un point de vue théorique d'effectuer plutôt des réactions de substitutions électrophiles aromatiques (SEar) sur la partie imidazole et des réactions de substitutions nucléophiles aromatiques (SNar) sur le cycle pyrazine.

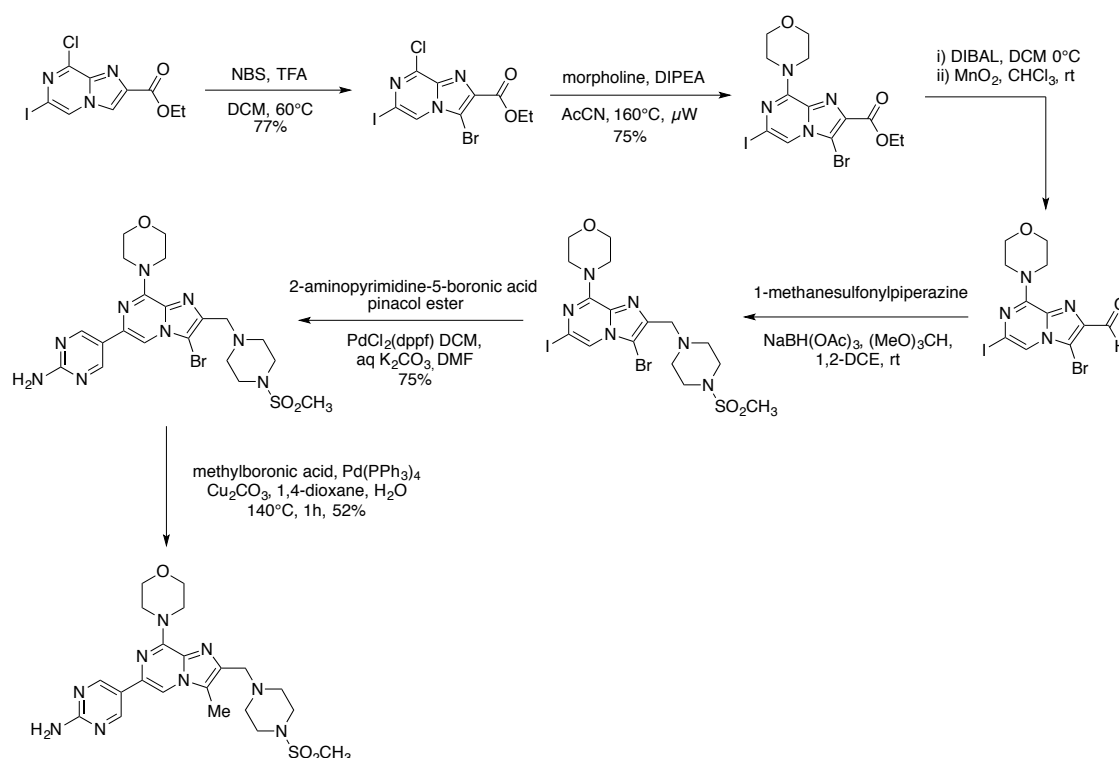
Plusieurs chercheurs ont d'ailleurs étudié la réactivité de ces structures. Concernant la réaction avec des composés électrophiles, les réactions de SEar ont tendance à se faire majoritairement en position 3 (et parfois aussi en 5). C'est notamment le cas des réactions d'halogénéation souvent exploitées en synthèse. Bradac *et al.* ont montré que l'utilisation du *N*-bromosuccinimide dans l'acétonitrile permettait l'obtention de la 3-bromoimidazo[1,2-*a*]pyrazine tandis que la réaction avec le dibrome dans l'acide acétique glacial donnait l'analogue dibromé en positions 3 et 5 (Figure 48)<sup>115</sup>.



**Figure 48: Régiosélectivité de l'halogénéation des imidazo[1,2-*a*]pyrazines**



A l'inverse, les substitutions nucléophiles aromatiques ont tendance à se faire préférentiellement en position 8 (et quelquefois en 5 et 6) du fait du caractère électrophile des carbones présent en cette position. L'exemple de synthèse de Gonzalez *et al.* illustre bien les différentes réactivités aux divers sites de la molécule<sup>102</sup>. Au cours de celle-ci, une substitution nucléophile par la morpholine s'effectue de manière régiosélective en position 8 malgré la présence d'un substituant iodo- en 6, d'un atome de brome en 3 ainsi que des conditions de réactions assez dures (chauffage au micro-onde à 160°C). Ensuite, c'est sur la position 6 que s'effectue le couplage pallado-catalysé de la 2-aminopyrimidine puis la position 3 est fonctionnalisée en dernière par une réaction de Suzuki.



**Figure 49 : Illustration de la réactivité des imidazo[1,2-*a*]pyrazines**

Tous ces aspects de réactivité sont primordiaux pour orienter la stratégie de synthèse organique (choix des produits de départ, types de réactions en fonction de la position de fonctionnalisation voulue...). Ils ont été constamment exploités lors des stratégies de synthèse qui vont être présentées par la suite, après une explication rationnelle du projet de recherche dont il est question.

## 3.2 Explication du projet de recherche

### 3.2.1 De la recherche de nouveaux agents anti-*Leishmania* à la découverte de molécules à activité antifongique

Le projet scientifique s'inscrit dans la suite des travaux réalisés antérieurement au laboratoire IICiMed. L'objectif était la découverte de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique dans le traitement des leishmanioses. C'est dans ce but que diverses molécules avec des noyaux chimiques hétérocycliques ont été investiguées. Il s'agissait d'abord de la structure imidazo[1,2-*a*]pyridine<sup>116</sup> puis des imidazo[1,2-*a*]pyrazines<sup>117</sup>, leurs analogues chimiques très proches. Après la synthèse de nombreuses molécules possédant ces structures chimiques, des tests biologiques ont été réalisés sur le parasite ciblé du genre *Leishmania sp.* Ces tests ont également été menés sur des souches d'espèces fongiques couramment impliquées dans des IFIs : *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*. Ces résultats biologiques ont permis de mettre en évidence une activité antifongique intéressante pour une des molécules sur ces deux espèces de micromycètes. Cette dernière, le NP 30, est représentée ci-dessous dans la Figure 50 avec les valeurs de concentrations inhibitrices 50 (CI<sub>50</sub>) obtenues après l'expérimentation (l'activité sur *Leishmania major* est également reportée à titre informatif).

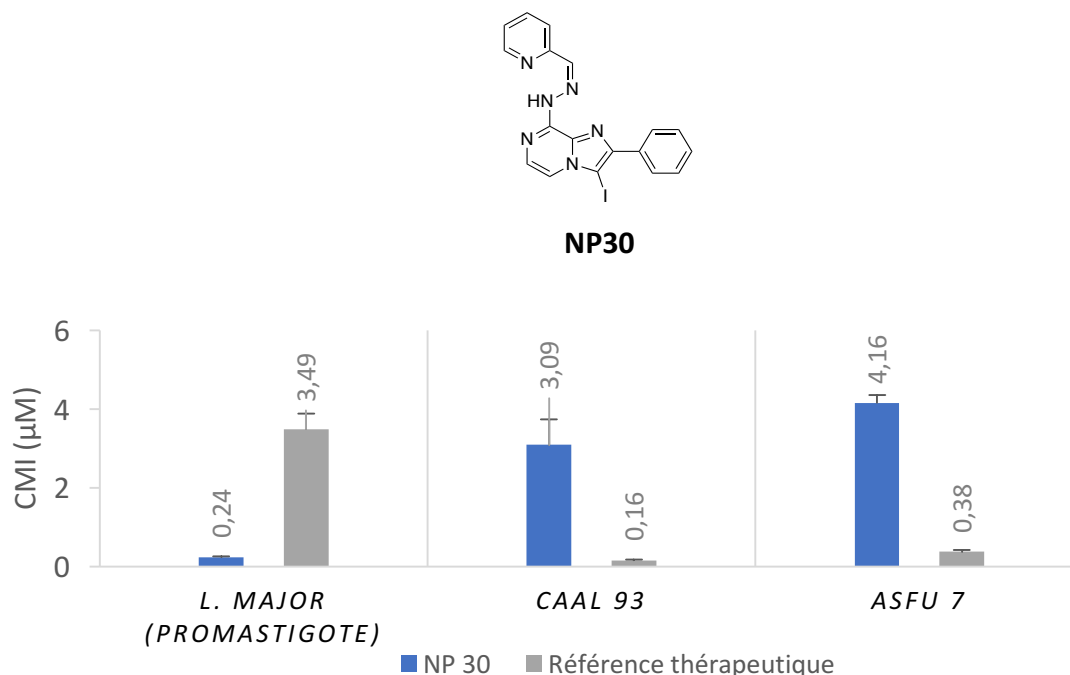


Figure 50 : Activités anti-leishmaniennes et antifongiques du NP 30

Devant ces résultats biologiques intéressants, il a été décidé d'investiguer plus en détail ce type de structures chimiques et leur activité antifongique associée.

### 3.2.2 Objectifs du projet et synthèses envisagées

Après la mise en évidence antérieure de l'activité biologique du NP30, l'objectif était de synthétiser des analogues de cette molécule. Les buts d'une telle manœuvre étaient de rechercher naturellement d'autres hits pouvant potentiellement mener à des chefs de file mais aussi d'obtenir des informations précieuses quant aux fonctions chimiques indispensables à l'activité biologique (relations structures-activités). Ainsi, il a été décidé d'accentuer les recherches sur la substitution de l'hétérocycle en 2, 3 et 8 afin d'étudier l'importance du groupement phényle en position 2, le rôle de l'halogène en position 3 avec la synthèse de dérivés iodés, chlorés, bromés ou non halogénés. L'ensemble des modulations chimiques envisagées sont représentées sur la Figure 51.

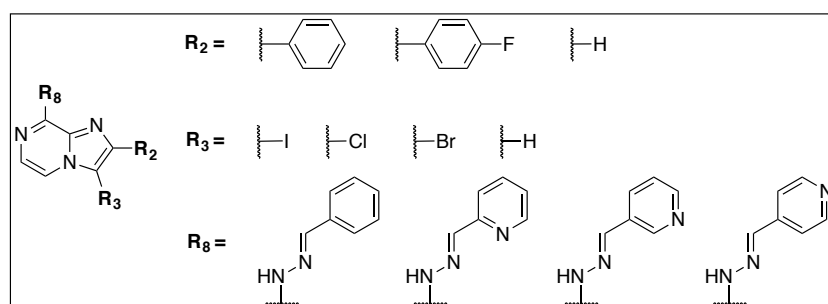


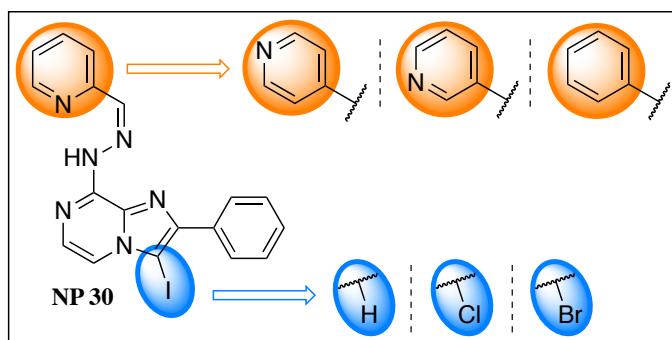
Figure 51 : Modulations chimiques du NP 30 envisagées

### 3.3 Travaux de synthèse menés

#### 3.3.1 Conception des dérivés 2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazines

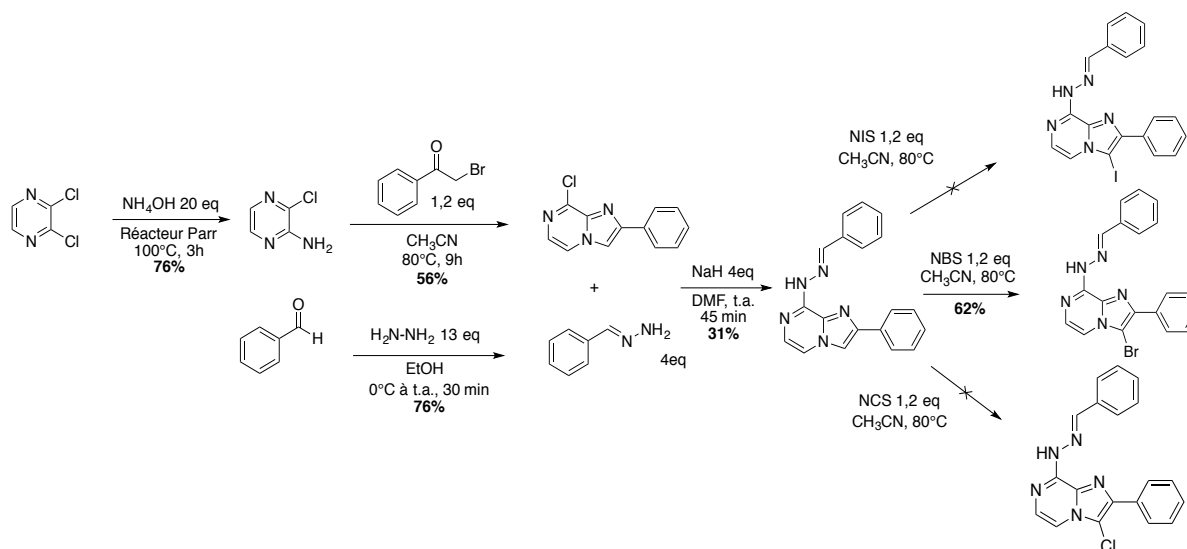
Dans un premier temps, il a été décidé de réaliser la synthèse d'analogues du NP 30 avec comme substituants (Figure 52) :

- R<sub>2</sub> : phényle
- R<sub>3</sub> : I, Cl, Br ou H
- R<sub>8</sub> : phénylhydrazone



**Figure 52: Pharmacomodulations du NP 30 avec  $R_2$ = phényle**

L'option choisie au départ était de réaliser une synthèse convergente des analogues chimiques souhaités en synthétisant d'une part l'hétérocycle azoté et d'autre part le substituant phénylhydrazone. Ensuite, des réactions de substitution nucléophile en position 8 et d'halogénéation en position 3 permettaient d'obtenir les molécules finales. Les schémas réactionnels sont représentés dans la Figure 53.

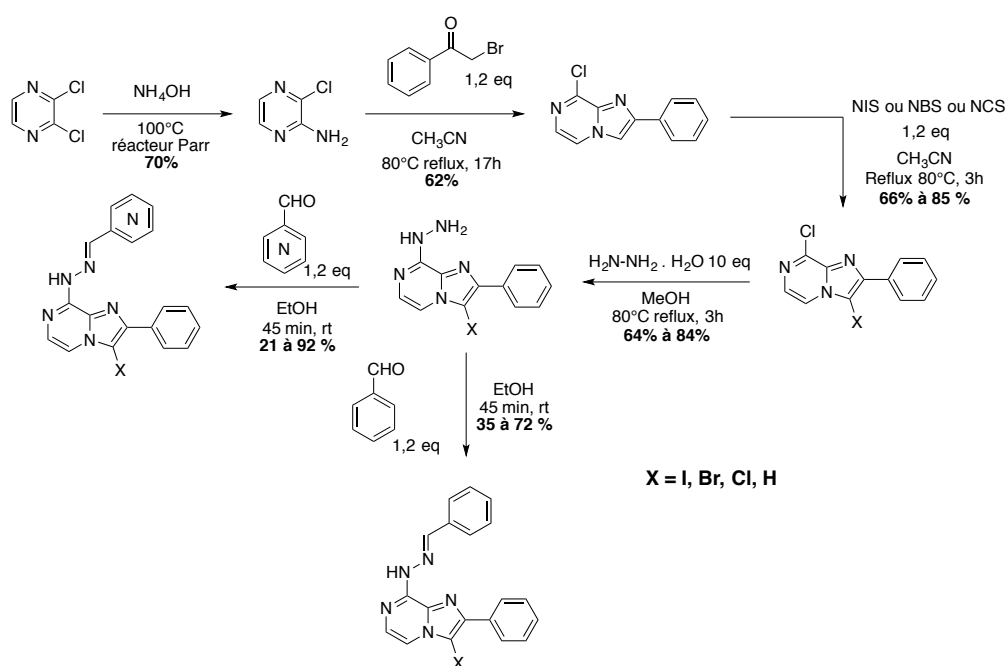


**Figure 53 : Première voie de synthèse étudiée ( $R_2$  = phényle)**

Le produit de départ choisi était la 2,3-dichloropyrazine. Après amination par réaction avec l'ammoniaque dans un réacteur Parr (sous pression et à chaud), la 2-amino-3-chloropyrazine a pu être obtenue. Ensuite, la réaction de ce produit avec la 2-bromoacétophénone dans l'acétonitrile a permis la conversion vers la 8-chloro-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine. De l'autre côté, la formation de la phénylhydrazone a été réalisée aisément dans l'éthanol en partant du benzaldéhyde et de l'hydrazine monohydratée. Ensuite, en présence d'une base forte

(l'hydrure de sodium), la réaction entre les deux synthons a été réalisée mais avec un rendement globalement faible (difficulté dans la purification du produit). Une halogénéation a été réalisée mais étonnamment, seul le dérivé bromé a été formé parmi les trois différentes réactions d'halogénéation.

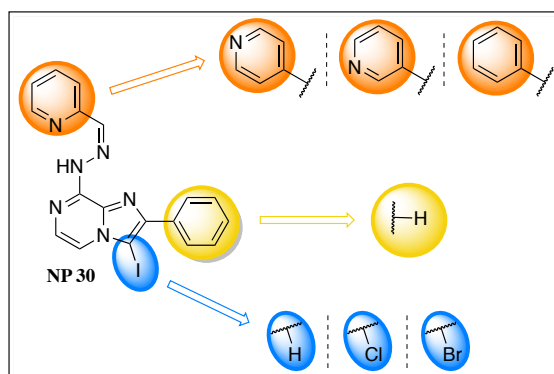
Au vu des difficultés rencontrées au cours de cette synthèse, il a été choisi de se diriger vers une seconde voie (Figure 54). Cette fois, la formation de la fonction hydrazone se faisait au cours de la dernière étape de synthèse puisque celle-ci semblait gêner l'halogénéation en position 3 et posait de nombreux problèmes de purification (les produits avaient tendance à traîner sur colonne chromatographique). En utilisant cette méthodologie, l'halogénéation a pu être réalisée avec succès en amont, pour ensuite greffer l'hydrazine et former l'hydrazone *in fine*.



**Figure 54 : Seconde voie de synthèse étudiée ( $R_2$  = phényle)**

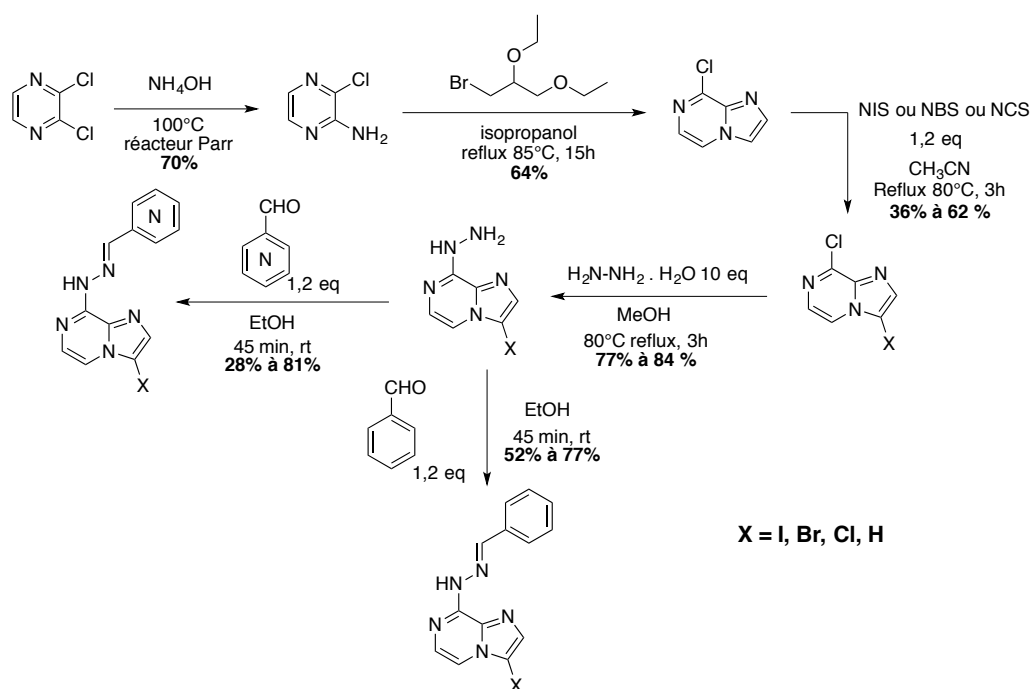
### 3.3.2 Conception des dérivés imidazo[1,2-*a*]pyrazines non substitués en 2

Dans un second temps de la synthèse, les efforts se sont portés sur la série avec un substituant hydrogène en position 2. Comme précédemment, divers analogues ont été formés avec les mêmes types de substituants en position 3 et 8 de l'hétérocycle (Figure 55).



**Figure 55: Pharmacomodulations du NP 30 avec  $R_2 = H$**

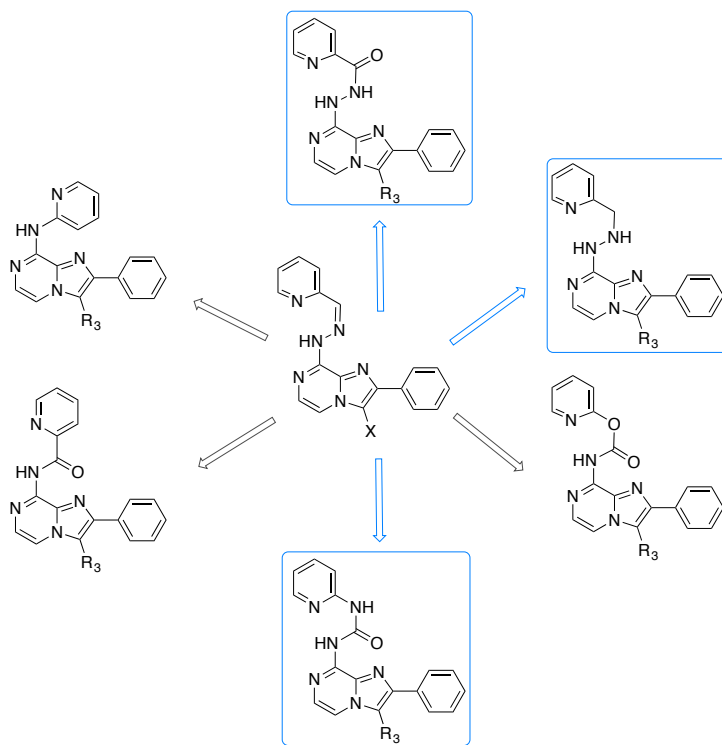
La seconde méthode de synthèse présentée auparavant a été retenue puisqu'elle était plus aisée à mettre en place et donnait d'assez bons rendements. De la même manière, la 2,3-dichloropyrazine a servi de point de départ pour la formation de la 2-amino-3-chloropyrazine. Celle-ci a été mise en réaction avec du 2-bromoacétaldéhyde (avec déprotection du diacétal au préalable par l'acide bromhydrique) pour permettre la cyclisation. Les réactions suivantes sont, comme décrit pour la série phényle, des réactions d'halogénéation en position 3 puis de formations des dérivés hydrazines en 8 pour aboutir aux produits souhaités après réactions avec le benzaldéhyde ou les pyridinecarboxaldéhydes (Figure 56).



**Figure 56 : Synthèse des analogues du NP 30 avec  $R_2 = H$**

### 3.3.3 Synthèse d'autres analogues chimiques et bioisostères

La synthèse de différents bioisostères de la fonction hydrazone a été réalisée dans un troisième temps. Il était important de trouver des alternatives chimiques à ce groupement pouvant potentiellement être responsable d'une certaine toxicité *in vivo* comme reporté dans la littérature<sup>118</sup>. Après quelques recherches, certains bioisostères de la fonction hydrazone ont pu être mis en évidence et retenus pour la suite des travaux de synthèse organique<sup>119</sup>. Parmi ces structures, il est possible de citer les analogues amine, amide et les bioisostères hydrazide, hydrazine, urée, carbamate (Figure 57). Il a été décidé de focaliser la recherche sur les fonctions hydrazide, hydrazine et urée.

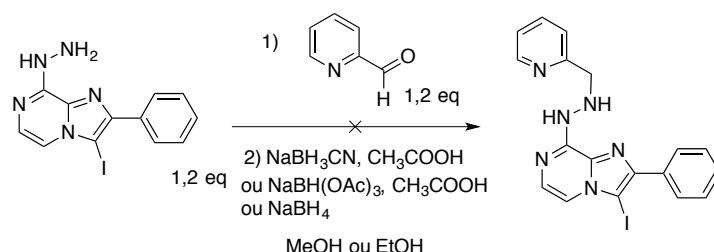


**Figure 57 : Analogues, bioisostères de la fonction hydrazone et synthèses réalisées (encadrées en bleu)**

#### 3.3.3.1 Synthèse de dérivés 8-(2-pyridine)hydrazineimidazo[1,2-*a*]pyrazine

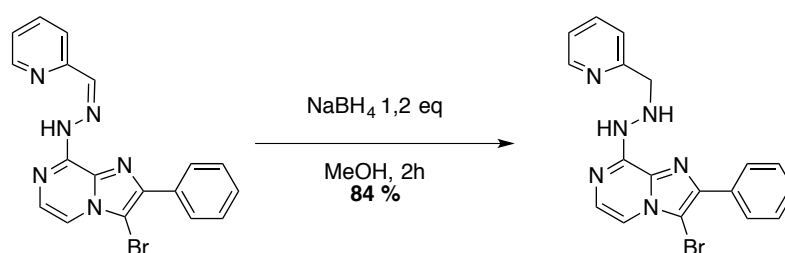
La stratégie choisie pour synthétiser le dérivé hydrazine était la réalisation d'une amination réductrice à partir de la 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine. Afin d'effectuer cette opération, divers réactifs ont été utilisés. Le cyanoborohydrure de sodium

( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) est un réactif de choix pour cette réaction tout comme le triacétoxyborohydrure de sodium ( $\text{NaBH}(\text{OAc}_3)$ ) qui propose une alternative intéressante au premier réactif cité. Malheureusement, aucune conversion vers le produit désiré n'a pu être obtenue lors de leur utilisation (Figure 58).



**Figure 58 : Essais de réduction de la 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine**

Il a de fait été décidé de recourir à un agent réducteur plus fort, le borohydrure de sodium ( $\text{NaBH}_4$ ). Comme auparavant, la réaction n'a pas abouti et l'on a pu voir apparaître en UPLC-MS, un pic correspondant au produit déiodé. Ce problème du départ de l'atome d'iode a été par ailleurs mis en évidence à plusieurs reprises au cours de la synthèse initiale. Cela n'a au contraire pas été le cas pour le dérivé bromé qui s'est montré plus stable tout en étant plus réactif que le composé iodé. Pour prouver cela, la réaction de réduction a été testée avec, cette fois, le dérivé bromé de départ et du borohydrure de sodium. La réaction s'est faite relativement rapidement aboutissant à l'unique dérivé hydrazine souhaité (Figure 59).

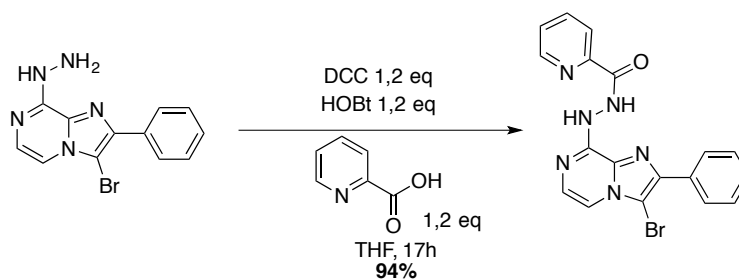


**Figure 59 : Synthèse de la 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine**



### 3.3.3.2 Synthèse de dérivés *N'*-(3-bromo-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-yl)picolinohydrazide

Différentes options ont été envisagées pour la synthèse du dérivé hydrazide. La première d'entre elles était de former un chlorure d'acyle à partir de l'acide picolinique et d'un réactif de chloration tel POCl<sub>3</sub> ou SOCl<sub>2</sub>, pour ensuite effectuer la substitution nucléophile de l'hydrazine sur ce composé. Les conditions utilisées pour ce type de réaction sont relativement dures et le traitement de réaction est délicat (principalement la neutralisation du milieu). C'est pourquoi il a été préféré d'orienter la stratégie de synthèse vers un couplage peptidique (Figure 60). Ceci permet l'utilisation de conditions beaucoup plus douces que dans le premier cas.



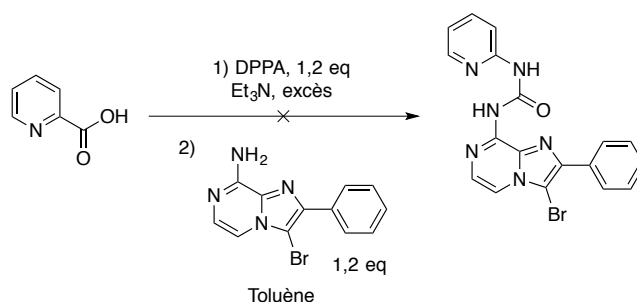
**Figure 60 : Formation de l'analogue hydrazide**

L'agent de couplage utilisé est le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). L'ajout d'hydroxybenzotriazole a empêché le réarrangement de la *O*-acylisourée en *N*-acylurée et a permis de fait, l'obtention de la fonction hydrazide comme voulue.

### 3.3.3.3 Synthèse de dérivés 2-phényl-8-(pyridin-2-yl)uréeimidazo[1,2-*a*]pyrazine

La synthèse des urées peut se faire de diverses manières en passant par exemple par la synthèse d'un intermédiaire isocyanate ou carbamate qui peuvent ensuite subir une attaque nucléophile d'une amine aboutissant à l'obtention de l'urée. Dans ce paragraphe sont regroupés les différents essais de synthèse de la 3-bromo-2-phényl-8-(pyridin-2-yl)uréeimidazo[1,2-*a*]pyrazine.

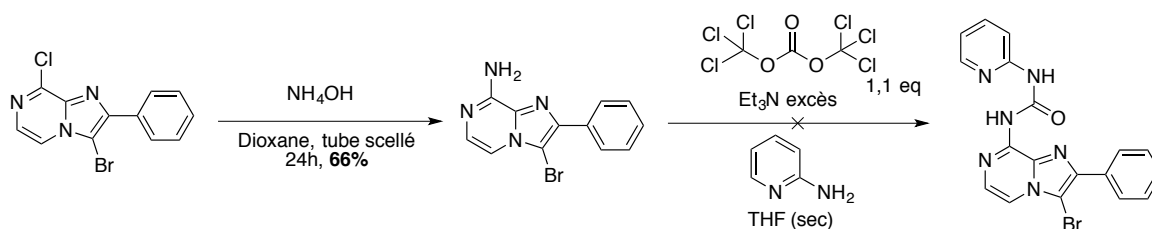
La première méthode testée passait par l'utilisation de l'azoture de diphenylphosphoryle comme agent électrophile (Figure 61).



**Figure 61: Tentative de formation de l'urée par l'utilisation du DPPA**

Pour effectuer cette réaction, l'acide picolinique a été mis en réaction avec le DPPA en présence de triéthylamine. Cela permet de former l'azoture d'acyle qui, après chauffage, donne le dérivé isocyanate par réarrangement de Curtius. La synthèse de l'isocyanate de 2-pyridyle a été réalisée sans problème. A l'inverse, l'ajout de la 8-amino-3-bromo-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine ensuite n'a pas permis d'obtenir le produit voulu (aucune réaction ne s'est produite). Cela prouve probablement que l'azote en position 8 de l'hétérocycle est peu nucléophile. Pour résoudre ce problème, des conditions plus dures de réaction ont été choisies avec un agent encore plus électrophile que le DPPA. Le triphosgène a semblé être un réactif intéressant pour ce faire. L'amination de la 3-bromo-8-chloro-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine par l'ammoniaque en tube scellé a permis d'obtenir la 3-chloro-8-hydrazinyl-2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine. De l'autre côté la 2-aminopyridine a été mise en réaction avec le triphosgène dans le THF (Figure 62).

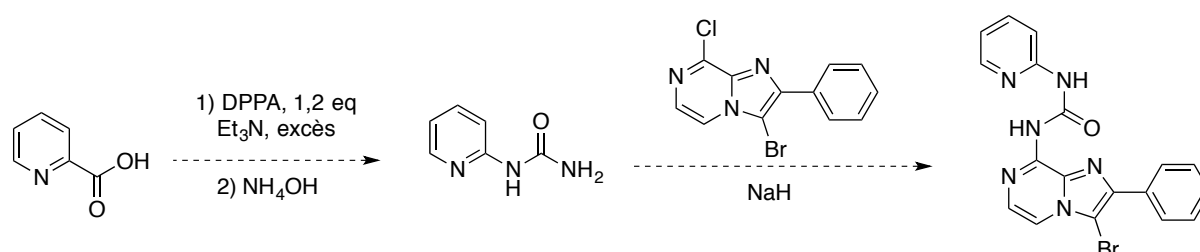
Après plusieurs minutes de réaction, l'hétérocycle imidazo[1,2-*a*]pyrazine a été ajouté. Malheureusement, les analyses ont montré que la molécule attendue n'avait pas été synthétisée (il reste du produit de départ ainsi que des produits de dégradation).



**Figure 62: Tentative de formation de l'urée par l'utilisation de triphosgène**

En dépit de plusieurs tentatives décrites auparavant, la synthèse de l'urée n'a pas pu se faire de cette manière. Ceci est probablement dû à un manque de réactivité de l'amine en position 8 de l'hétérocycle, du fait de sa conjugaison avec le cycle et de la présence des trois atomes d'azote électroattracteurs.

Il est nécessaire de trouver d'autres voies de synthèse permettant d'arriver à la formation de l'urée. Il pourrait notamment être intéressant de synthétiser l'urée en formant préalablement l'isocyanate à partir de l'acide picolinique et de l'ammoniaque (Figure 63). Ensuite la réaction de substitution nucléophile pourrait être effectuée sur le C<sub>8</sub> en présence d'une base.



**Figure 63: Autre voie de synthèse de l'urée à explorer**

En résumé, la synthèse de deux bioisostères de la fonction hydrazone a été réalisée et une dernière est en cours de synthèse. Il reste à présent à tester ces molécules sur plusieurs isolats cliniques fongiques pour rechercher une activité biologique pour ces molécules. Ceci serait particulièrement intéressant pour proposer des alternatives à la fonction hydrazone, dans le cas où celle-ci serait responsable d'une toxicité *in vivo*.

### 3.4 Evaluation biologique *in vitro*

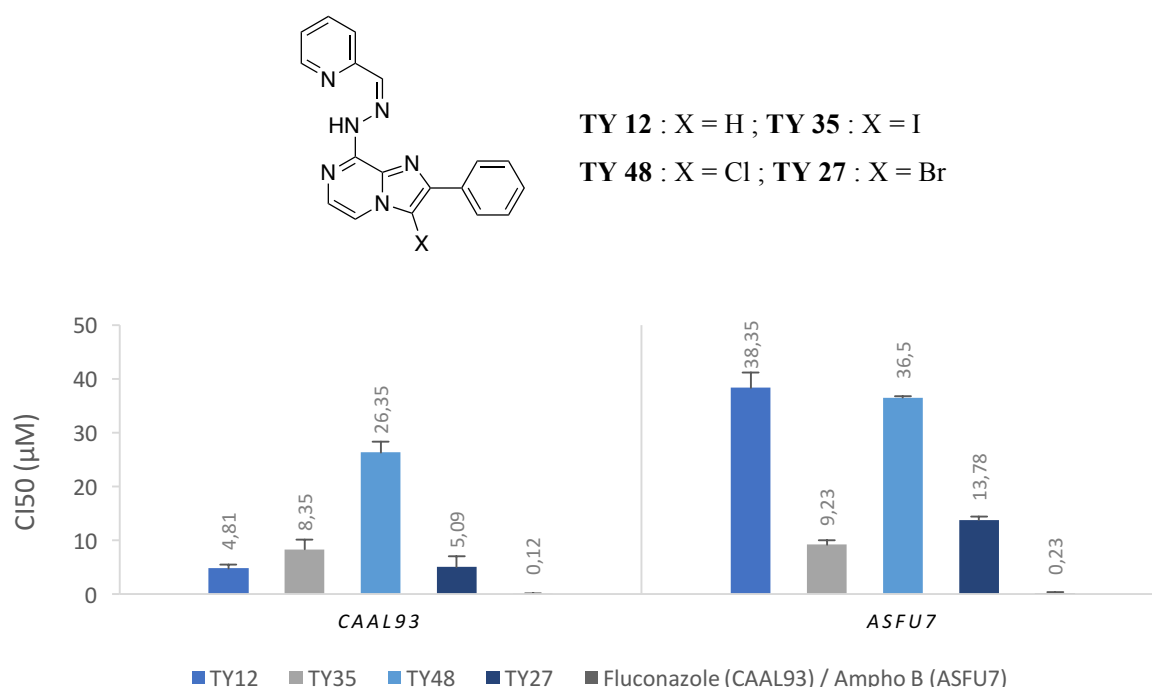
#### 3.4.1 Tests de l'activité antifongique *in vitro*

Plusieurs molécules synthétisées ont pu être testées dans le but d'abord de confirmer l'activité antifongique de la série chimique dont il est question (NP30) et ensuite de mettre en avant de nouvelles activités parmi les molécules synthétisées. Les activités biologiques ont été investiguées par le biais de tests d'inhibition de prolifération fongique *in vitro*. Ceux-ci ont été effectués à trois reprises pour les analogues présentant un substituant phényle en 2 afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures. Des tests sur cellules humaines (cellules MRC-5)

ont été également effectués pour déterminer l'indice de sélectivité de cette série chimique. En ce qui concerne la seconde série de composés ( $R_2 = H$ ), seul un test d'inhibition de prolifération fongique a pu être fait mais les résultats seront tout de même présentés, en gardant à l'esprit ce point important.

### 3.4.1.1 Screening des molécules 2-phénylimidazo[1,2-a]pyrazines

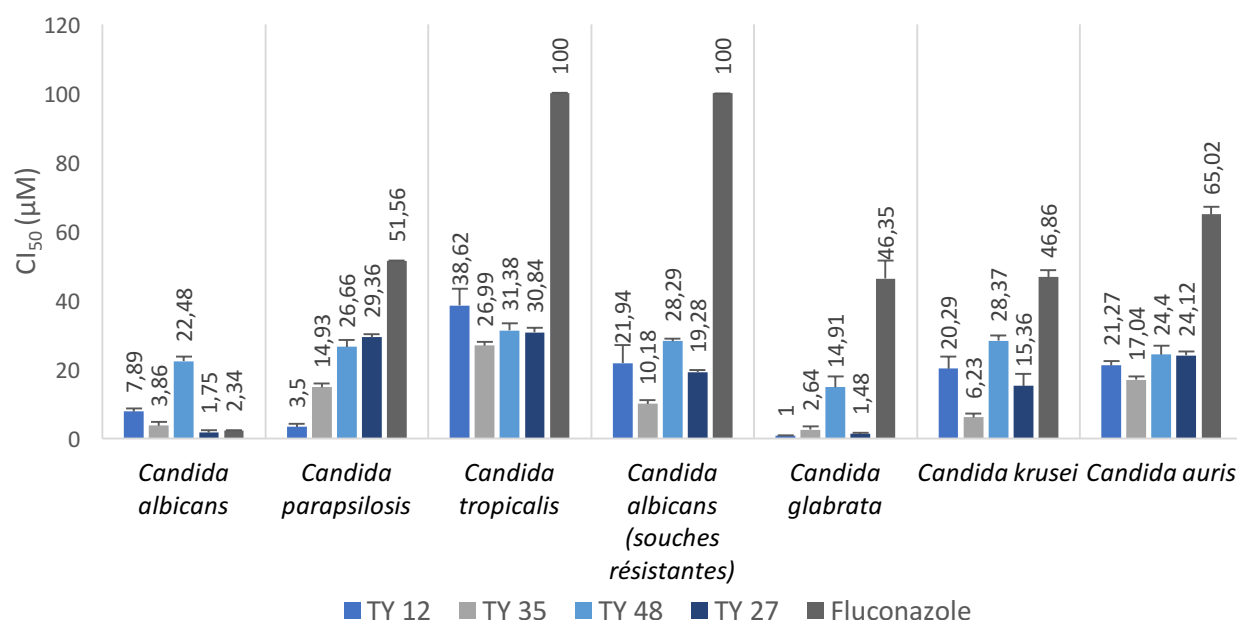
Il a été décidé de se focaliser dans un premier temps sur des isolats cliniques classiques sensibles aux traitements antifongiques de référence, pour obtenir un premier profil d'activité biologique. Ce screening a été fait sur les souches *CAAL93* (*Candida albicans*) et *ASFU7* (*Aspergillus fumigatus*), souches issues de la biothèque de Parasitologie et Mycologie médicale de l'EA 1155. Le test d'inhibition de prolifération a été réalisé par la méthode des microdilutions en plaques 96 puits et la révélation s'est faite par un test à la résazurine en fluorimétrie. Cette méthode de révélation remplace celles classiquement utilisées au MTT ou XTT pour déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de molécules. Les valeurs de  $CI_{50}$  des molécules ayant présenté une activité ( $CMI < 100 \mu M$ ) sont représentées dans la Figure 64.



**Figure 64 : Evaluation biologique des molécules synthétisées sur les souches CAAL93 et ASFU7**

Comme le montrent les résultats représentés ci-dessus, seules les molécules possédant le motif 2-pyridinylhydrazone ont montré une activité antifongique inférieure à 100  $\mu\text{M}$ . Les quatre molécules possédant une telle structure chimique ont toutes montré des activités relativement proches en terme de valeurs (bien qu'un peu moins élevée pour le dérivé chloré). On peut remarquer également que les dérivés iodé TY-35 et bromé TY-27 possèdent toutes deux un bon profil d'activité à la fois sur *Candida albicans* et sur *Aspergillus fumigatus*. Les 4 molécules étudiées ont montré cependant une activité moins marquée que celles des molécules thérapeutiques de référence (fluconazole pour *Candida albicans* et amphotéricine B pour *Aspergillus fumigatus*).

Dans un second temps, des tests biologiques plus larges ont été réalisés sur ces 4 molécules afin d'estimer leur spectre d'activité biologique. L'investigation a porté sur 27 souches différentes appartenant au genre *Candida* dont trois souches résistantes de *C. albicans* résistantes aux antifongiques triazolés. Les espèces concernées sont : *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. auris* et *C. tropicalis*. Les résultats obtenus sont reportés sur l'histogramme de la Figure 65 (moyenne des activités calculées sur les différentes souches avec l'erreur-type correspondante). Pour plus de détails à propos de l'activité précise des molécules sur chaque souche, se référer à l'Annexe 1.



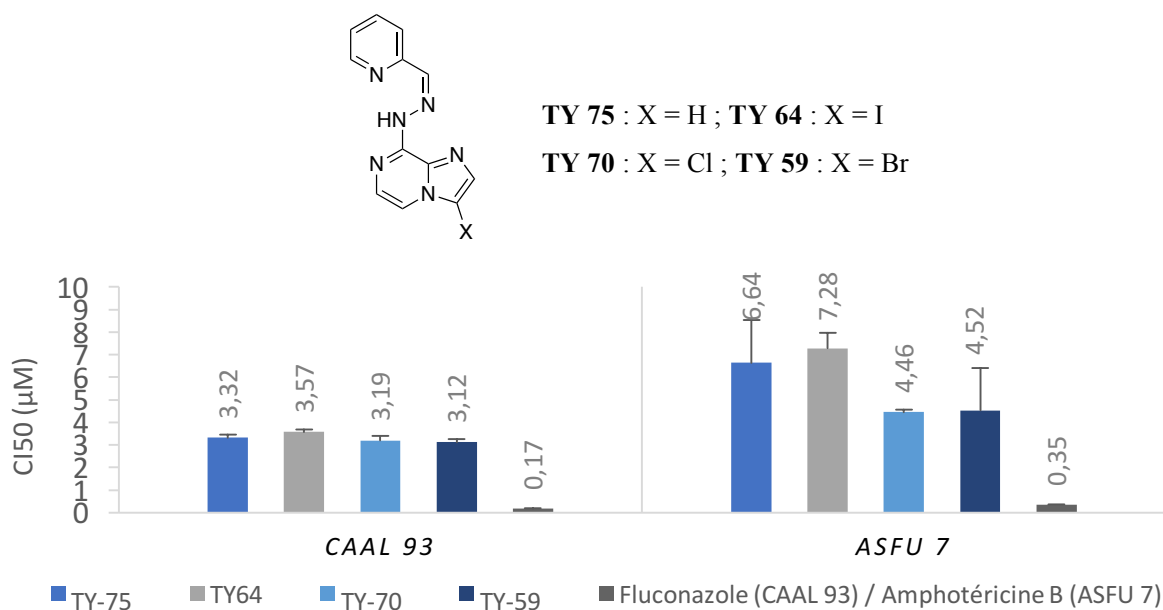
**Figure 65 : Evaluation biologique des quatre molécules actives sur 27 souches différentes de *Candida spp.***

Les tests biologiques effectués sur les nombreuses souches précédentes corroborent les premiers résultats obtenus puisque les molécules testées ont montré une activité biologique avec une  $CI_{50}$  de l'ordre du  $\mu M$  sur toutes les souches de *Candida*. Pour certaines molécules, des valeurs inférieures à  $1 \mu M$  ont parfois été obtenues. C'est le cas par exemple de TY-12 qui a montré des valeurs très intéressantes sur *Candida glabrata*, espèce qui pose de plus en plus de problèmes de MDR de nos jours comme il a été expliqué dans la partie précédente. En revanche, le dérivé chloré a montré l'activité globale la plus faible des quatre molécules. L'autre point à mettre en avant est que pour la plupart des souches, les molécules testées semblent être plus actives que la référence. Ceci est très intéressant, en particulier en ce qui concerne les souches de *Candida albicans* résistantes au fluconazole pour lesquelles les  $CI_{50}$  sont toujours supérieures à  $100 \mu M$ .

En résumé, l'ensemble de résultats biologiques obtenus ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel à l'activité biologique de la fonction 2-pyridinehydrazone en position 8 de l'hétérocycle. Il semble ensuite intéressant de fonctionnaliser la position 3 comme il a été fait. Les dérivés iodés et bromés ont en effet montré de bonnes activités biologiques. Il serait donc intéressant de substituer ces halogènes par d'autres fonctions chimiques pour connaître l'impact de ces modifications chimiques sur l'activité biologique. Enfin, pour avoir une vision globale de l'importance des divers substituants de ces molécules, il est primordial d'étudier la fonctionnalisation de la position 2, ce qui a été réalisé avec les molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine possédant un hydrogène en position 2.

#### 3.4.1.2 Début de screening des molécules imidazo[1,2-*a*]pyrazines non substituées en 2

Les 4 molécules présentant la fonction 2-pyridinehydrazone ont été testé *in vitro* à la fois sur la souche CAAL 93 et la souche ASFU7. Les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues sont représentées dans la Figure 66.

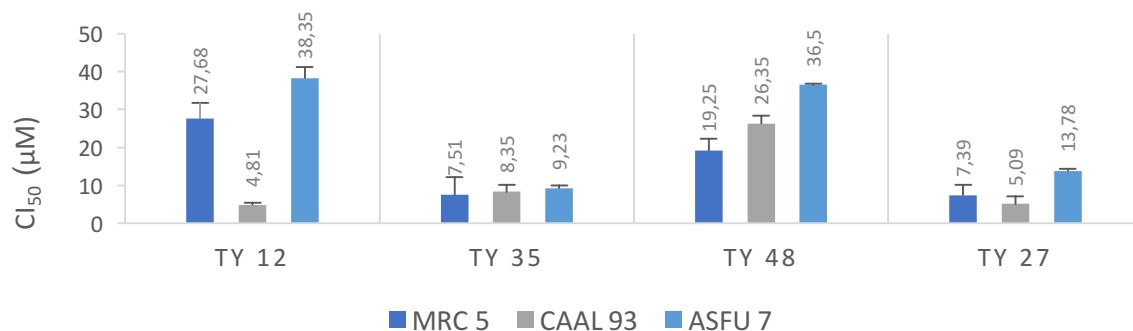


**Figure 66 : Evaluation biologique de quatre molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazines non substituées en 2.**

Les résultats du screening sont relativement intéressants. L'activité est certes moins bonne que les références mais sont relativement basses avec des valeurs à chaque fois inférieures à 10 µM. De plus, les valeurs obtenues sont meilleures que celle obtenues pour la série 2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine. En revanche, il faut, pour confirmer ces résultats, réitérer l'expérience plusieurs fois pour avoir une fiabilité statistique.

### 3.4.2 Mesure de l'indice de sélectivité des molécules synthétisées

La mesure de l'indice de sélectivité de molécules actives est un élément très important. En effet, ces données sont indispensables pour déterminer s'il est possible de continuer les évaluations biologiques, notamment vers le stade *in vivo*, ou bien les arrêter en raison d'une trop forte toxicité. Dans le cadre de ce projet, deux évaluations de la toxicité des 4 molécules actives à structure 2-phénylimidazo[1,2-*a*]pyrazine ont été réalisées (Figure 67). Celles-ci ont été faites en ayant recours aux cellules MRC-5 (lignée de cellules fibroblastiques embryonnaires).



**Figure 67 : Résultats des tests sur MRC-5**

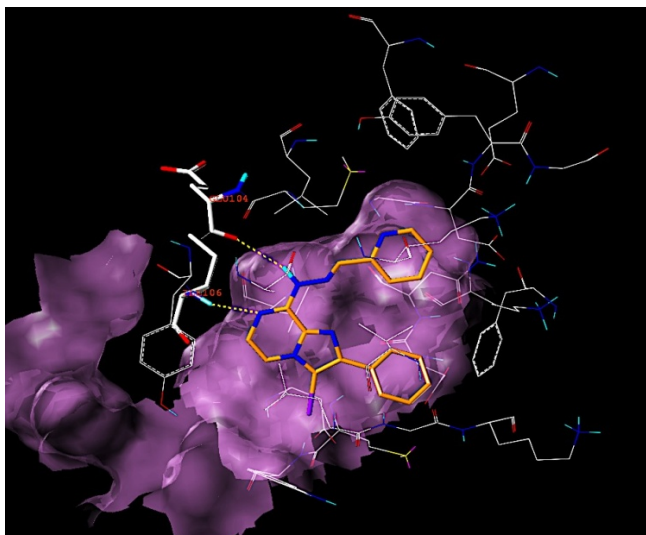
Les résultats représentés dans l'histogramme sont comparés avec les valeurs de CMI obtenues lors du premier screening effectué sur les souches CAAL 93 et ASFU 7. On peut s'apercevoir que la sélectivité d'action sur les cellules fongiques n'est pas très bonne. En ce qui concerne par exemple TY 35 et TY 27, les valeurs de CMI sont quasiment les mêmes si on compare l'activité fongique et l'activité sur les cellules humaines. La sélectivité est un peu meilleure cependant pour TY 12 et CAAL 93 mais tout de même trop faible.



## 4 Discussion et conclusion

L'ensemble des travaux menés dans le cadre de ce projet de recherche au sein du Laboratoire IICiMed a abouti à la synthèse de plusieurs molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazine bi- ou trisubstituées en positions 2, 3 et 8. Pour ce faire, une voie de synthèse efficiente a été développée, menant à l'obtention de nombreux analogues de la molécule initiale ayant montré une activité antifongique (le NP 30). Après un screening biologique de plusieurs de ces molécules, des activités ont été mises en évidence et ce, exclusivement pour celles possédant un motif 2-pyridinylhydrazone en position 8 de l'hétérocycle. Les valeurs de CMI obtenues pour ces molécules actives étaient relativement bonnes, de l'ordre du  $\mu\text{M}$  voire moins parfois pour certaines d'entre elles sur quelques espèces fongiques. La série imidazo[1,2-*a*]pyrazines non substituées en 2 a montré les meilleurs valeurs comparativement à la série substituée par un phényle en 2 mais les résultats méritent encore d'être confirmés par d'autres évaluations d'activité biologique. En revanche, les indices de sélectivité obtenus restent encore trop faibles montrant une certaine toxicité des molécules étudiées sur les cellules humaines. Cela signifie probablement que ces molécules possèdent une ou plusieurs cibles présente(s) à la fois dans les cellules fongiques et humaines. Ces éléments mettent en avant l'importance, après avoir obtenu ces résultats biologiques, de rechercher la ou les cible(s) de ces composés.

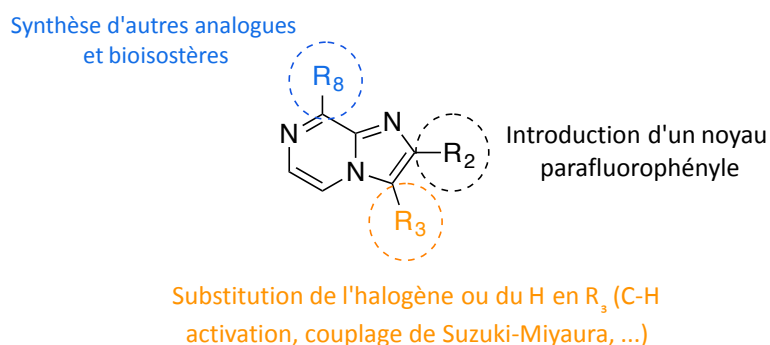
Après avoir étudié largement la littérature relatant les propriétés des molécules à structure imidazo[1,2-*a*]pyrazines, l'hypothèse émise était qu'elles possédaient une activité inhibitrice de kinase. Pour avoir plus d'information à ce sujet, une étude *in silico* a été réalisée, consistant en un simple docking de la molécule TY 35 sur une protéine kinase, la Pkc1 de *Candida albicans*. Le résultat obtenu est assez intéressant puisque le docking a montré un bon ancrage de la molécule dans la poche de l'enzyme qui serait susceptible d'induire des interactions entre la molécule et la région charnière de la kinase (notamment avec le glutamate 104 et l'isoleucine 106) (Figure 68).



**Figure 68 : Docking (logiciel gold) du (*E*)-TY35 dans le site ATP d'un modèle *Ca*-Pkc1 (élaboré à partir de la PKC $\beta$ II humaine, 2I0E.pdb)**

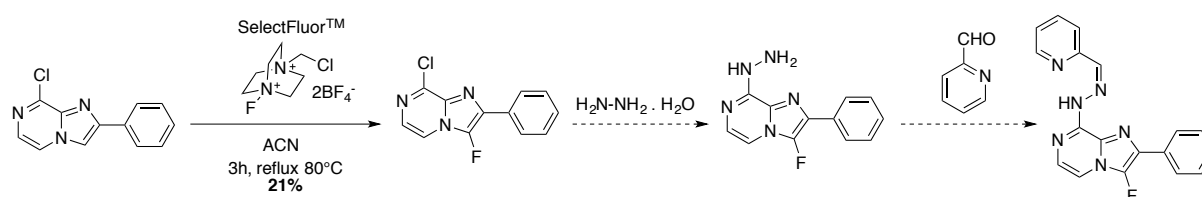
Cette donnée confirme que l'hypothèse d'une activité sur une ou plusieurs protéines kinases est à étudier plus en détail. Cependant, il ne s'agit aujourd'hui que d'une hypothèse qui doit être confirmée par des tests biologiques expérimentaux.

Malgré tout, il est certain que les résultats obtenus apportent des informations précieuses quant à l'importance des différents substituants de l'hétérocycle et offrent de nombreuses perspectives de recherche. Il s'agirait maintenant de rechercher des substituants qui pourraient améliorer l'efficacité et surtout diminuer la toxicité. Après réflexion, certaines d'entre elles ont retenu notre attention. Elles sont présentées dans la Figure 69.



**Figure 69: Perspectives de pharmacomodulations**

La suite de la synthèse s'orientera vers des molécules possédant un motif chimique *para*-fluorophényle en position 2. Elles sont d'ailleurs actuellement en cours de synthèse. Le choix de la fluoration est motivé par le rôle bien connu de l'atome de fluor dans la stabilisation métabolique, dans le franchissement plus efficace des membranes biologiques (distribution) ainsi que dans l'augmentation de l'affinité des molécules pour leur cible biologique, comme c'est le cas par exemple, pour l'ézétimibe (médicament hypocholestérolémiant)<sup>120</sup>. Ce choix est de plus justifié par les résultats obtenus pour les molécules dérivés du 2-*para*-nitrophénylimidazo[1,2-*a*]pyrazines testés sur *Leishmania major* qui ont montré un réel impact positif du fluor sur l'activité biologique<sup>117</sup>. L'intérêt de la présence de cet atome sur l'hétérocycle sera également considéré en position 3 avec la prochaine synthèse des dérivés 3-fluoro-8-pyridinylhydrazone-imidazo[1,2-*a*]pyrazines. La synthèse de la molécule dihalogénée avec chlore en position 8 et fluor en position 3 a d'ores et déjà été réalisée par réaction de fluoration électrophile avec le réactif SelectFluor<sup>TM</sup> (Figure 70).



**Figure 70: Début de synthèse de la 3-fluoro-2-phényl-8-(2-(pyridin-2-ylméthylène)hydrazinyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazine**

Les résultats obtenus proposent ensuite des perspectives de synthèse d'analogues avec d'autres substituants en position 3. Du point de vue chimique, il existe de nombreuses options. Plusieurs couplages pallado-catalysés type Suzuki-Miyaura ont été décrits sur l'hétérocycle imidazo[1,2-*a*]pyrazine, permettant de greffer divers substituants en cette position. Il serait possible également de s'orienter vers des réactions de C-H activation.

De l'autre côté, il est important de continuer les tests d'évaluation d'activité biologique et surtout de pousser les recherches sur la ou les cibles pour la(les) identifier et accéder alors si possible à de précieuses informations qui guideraient les stratégies de *drug discovery* mises en place au laboratoire.

## 5 Partie expérimentale

Pour des facilités de rédaction et d'uniformité avec les articles de recherche, cette partie sera rédigée en anglais.

### 5.1 Chemistry

All reactions were monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) using Merck Silicagel 60F-254 thin layer plates and by Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (UPLC-MS). Column chromatography was carried out on silicagel Merck 60 (70-230 mesh ASTM) and mass spectra were recorded using electrospray ionization method with Waters ZQ 2000 spectrometer.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis were performed in DMSO- $d_6$  or  $\text{CDCl}_3$  with Bruker AVANCE 400 MHz spectrometer. Chemical shifts are reported as  $\delta$  values in parts per million (ppm) relative to tetramethylsilane as internal standard and coupling constants (J) are given in hertz (Hz). The following abbreviations are used to describe peak patterns when appropriate: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet). Melting points were determined on an Electrothermal IA 9000 melting point apparatus and are uncorrected.

NMR analyses of some molecules with 2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazines structures need to be performed again because of a lack of peak resolution and proton relaxation issues. For the same reasons, new NMR analyses of imidazo[1,2-*a*]pyrazines without any substituent at position 2 are required for all the chemical series. However, purity of compounds was confirmed with the initial NMR and Mass Spectrometry.

## 2-Amino-3-chloropyrazine

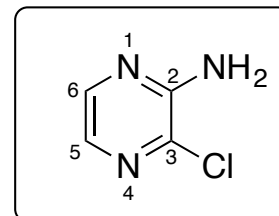
White powder

$C_4H_4ClN_2$

MM = 129.01 g/mol

MP = 170 °C

Yield = 76%



To 2,3-dichloropyrazine (10g, 67 mmol) was added a 28% aqueous ammonium hydroxide solution (50 mL, 1.30 mol) in a Parr reactor. After stirring at 100°C for 17 hours, the reaction was stopped and cooled overnight. The precipitate was filtered through a sintered funnel and rinsed with methanol.

**$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$ :** 7.98 (s, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, H<sub>6</sub>), 7.60 (s, 1H,  $J$  = 2.4 Hz, H<sub>5</sub>), 6.83 (s, 2H, NH<sub>2</sub>)

**$^{13}C$  NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>),  $\delta$ :** 152.7 (C), 141.4 (CH), 132.6 (C), 130.6 (CH)

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 129.9 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 131.9 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>

## 8-Chloro-2-phenyl-imidazo[1,2-a]pyrazine

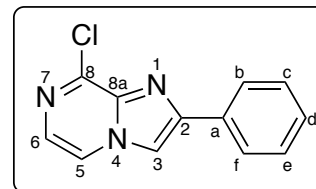
Brown powder

$C_{12}H_8ClN_3$

MM = 229.67 g/mol

MP = 206 °C

Yield = 56 %



To 2-amino-3-chloropyrazine (5 g, 39 mmol) was added 2-bromoacetophenone (1.2 eq, 9.35 g, 47 mmol) in 70 mL of acetonitrile. The reaction was refluxed at 80°C for 20 h. A saturated solution of sodium hydrogenocarbonate was added to the mixture and the compound was extracted using 3x250 mL of ethyl acetate. The organic layer was dried over sodium sulfate and the solvent was evaporated in vacuo. Chromatography column was performed to purify the product using mixtures of cyclohexane/ethyl acetate as eluents (cyclohexane/ethyl acetate 50/50%; cyclohexane/ethyl acetate 40/60%; ethyl acetate 100%).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 8.77 (s, 1H,  $\text{H}_3$ ), 8.66 (d, 1H,  $J = 4.4$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 8.08 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $\text{H}_{ar}$ ), 7.77 (d, 1H,  $J = 4.4$  Hz,  $\text{H}_6$ ), 7.54 (t, 2H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{H}_{ar}$ ), 7.45 (t, 1H,  $J = 7.6$  Hz,  $\text{H}_{ar}$ )

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ : 146.5 (C), 141.3 (C), 137.3 (C), 132.5 (C), 129.03 (2CH), 128.9 (CH), 127.7 (CH), 126.1 (2CH), 120.6 (CH), 113.2 (CH)

MS (ESI),  $m/z$  (%): 230.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 232.0 (35)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$

### 3-Iodo-8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

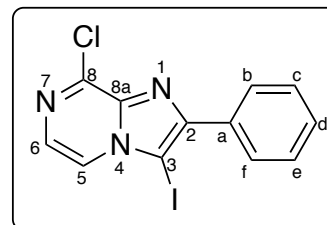
Yellow Powder

$C_{12}H_7ClIN_3$

MM = 356.57 g/mol

MP = 144.0°C

Yield = 71 %



*N*-Iodosuccinimide (1.2 eq, 472 mg, 2.1 mmol) was added to 8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (400 mg, 1.75 mmol) in 30 mL of acetonitrile. The mixture was heated at 80°C for 3 hours. After cooling, the solution was poured into water and the organic layer was extracted with dichloromethane (3x50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate, filtrated and concentrated in vacuo. The extracted product was then purified by column chromatography using cyclohexane/ethyl acetate 50/50 and then ethyl acetate 100% as eluents.

**$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :** 8.55 (d, 1H,  $J = 4.6$  Hz,  $H_5$ ), 8.11 (d, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $H_{ar}$ ), 7.89 (d, 1H,  $J = 4.6$  Hz,  $H_6$ ), 7.59 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz,  $H_{ar}$ ), 7.52 (t, 1H,  $J = 7.2$  Hz,  $H_{ar}$ )

**$^{13}C$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :** 148.6 (C), 141.5 (C), 140.1 (C), 132.70 (C), 129.1 (CH), 128.8 (2CH), 128.7 (CH), 128.4 (2CH), 121.0 (CH), 70.2 (C)

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 355.9 (100)  $[M+H]^+$ , 357.9 (35)  $[M+H+2]^+$

## 8-Hydrazinyl-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

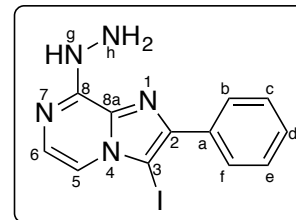
Yellow powder

C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>IN<sub>5</sub>

MM = 351.15 g/mol

MP = 168.0°C

Yield = 84 %



To 8-chloro-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (660 mg, 1.86 mmol) was added hydrazine monohydrate (10 eq, 928 mg, 18.6 mmol, 0.9 mL) in 20 mL of methanol. The mixture was refluxed for 3 hours. After cooling, the formed precipitate was filtered and washed with methanol.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.81 (s, 1H), 8.03 (s, 2H), 7.84 – 7.31 (m, 5H), 4.51 (s, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 352.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>



### 3-Bromo-8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

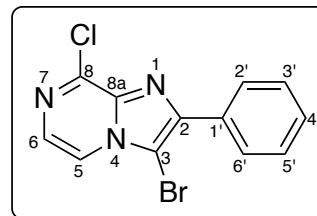
Brown powder

$C_{12}H_7BrClN_3$

MM = 306.95 g/mol

MP = 148.6°C

Yield = 85 %



*N*-Bromosuccinimide (1.2 eq, 466 mg, 2.62 mmol) was added to 3-bromo-8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (500 mg, 2.18 mmol) in 30 mL of acetonitrile. The mixture was heated at 80°C for 3 hours. After cooling, the solution was poured into water and the organic layer was extracted with dichloromethane (3x50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate, filtrated and concentrated in vacuo.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ:** 8.52 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 8.13 – 8.07 (m, 2H, H<sub>ar</sub>), 7.89 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.62 – 7.45 (m, 3H, H<sub>ar</sub>)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 143.54, 142.71, 135.94, 131.08, 129.31, 128.72, 128.65, 128.57, 128.27, 127.91, 116.72, 115.52

**MS (ESI), *m/z* (%):** 307.9 (75) [M+H]<sup>+</sup>, 310.0 (100) [M+H+2]<sup>+</sup>, 312 (25) [M+H+4]<sup>+</sup>

### 3-Bromo-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine

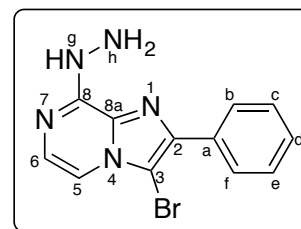
White powder

$C_{12}H_{10}BrN_5$

MM = 303.01 g/mol

MP = 212.7 °C

Yield = 64 %



To 8-chloro-3-bromo-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (300 mg, 0.97 mmol) was added hydrazine monohydrate (10 eq, 487 mg, 9.74 mmol, 0.5 mL) in 15 mL of methanol. The mixture was refluxed for 3 hours. After cooling, the formed precipitate was filtered and washed with methanol.

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 8.12 – 8.05 (m, 2H,  $H_{ar}$ ), 7.96 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 7.74 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H,  $H_6$ ), 7.49 – 7.32 (m, 4H,  $H_{ar}$ )

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 143.54, 142.71, 135.94, 131.08, 129.31, 128.72, 128.57, 128.27, 127.91, 116.72, 115.52, 109.65

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 304.0 (100)  $[M+H]^+$ , 306.1 (35)  $[M+H+2]^+$

## 8-Hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine

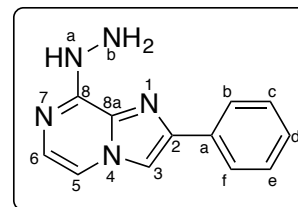
Orange powder

$C_{12}H_{11}N_5$

MM = 225.10 g/mol

MP = 126.8 °C

Yield = 84 %



To 8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (235 mg, 1,03 mmol) was added hydrazine monohydrate (10 eq, 510 mg, 10,3 mmol, 0,50 mL) in 15 mL of methanol. The mixture was refluxed for 3 hours. After cooling, the formed precipitate was filtered and washed with methanol.

**$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :** 8.32 (s, 1H), 7.99 – 7.92 (m, 2H), 7.74 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 7.38 (m, 5H), 4.49 (s, 2H)

**$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ :** 152.62, 143.01, 141.32, 133.40, 132.51, 131.89, 130.66, 128.65, 127.67, 125.47, 111.25, 110.23

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 226.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$

### 3,8-Dichloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

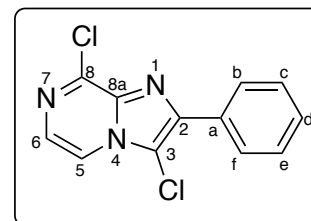
Yellow powder

$C_{12}H_7Cl_2N_3$

MM = 263,00 g/mol

MP = 142.9°C

Yield = 62 %



*N*-Chlorosuccinimide (1.2 eq, 498 mg, 3.72 mmol) was added to 8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (700 mg, 3.10 mmol) in 30 mL of acetonitrile. The mixture was heated at 80°C for 3 hours. After cooling, the solution was poured into water and the organic layer was extracted with dichloromethane (3x50 mL). The combined organic extracts were dried over sodium sulfate, filtrated and concentrated in vacuo.

**$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 8.21 – 8.10 (m, 2H), 8.03 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 7.81 (d,  $J$  = 4.6 Hz, 1H), 7.59 – 7.36 (m, 3H).

**$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ :** 143.69, 142.85, 136.09, 131.22, 129.46, 128.87, 128.71, 128.42, 128.06, 116.86, 115.66, 109.79

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 264.0 (100)  $[M+H]^+$ , 266.0 (35)  $[M+H+2]^+$

### 3-Chloro-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

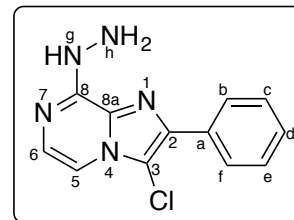
White powder

$C_{12}H_{10}Cl_2N_5$

MM = 259.06 g/mol

MP = 219.7 °C

Yield = 78 %



To 3,8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (140 mg, 0.53 mmol) was added hydrazine monohydrate (10 eq, 266 mg, 5.32 mmol, 0.26 mL) in 15 mL of methanol. The mixture was refluxed for 3 hours. After cooling, the formed precipitate was filtered with methanol.

**$^1H$  NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ :** 10.18 (s, 1H, NH), 8.00 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 7.57 – 7.35 (m, 5H), 6.94 (s, 2H, NH<sub>2</sub>)

**$^{13}C$  NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ :** in progress

**MS (ESI),  $m/z$  (%):** 260.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 262.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>

### 3-Bromo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-2-ylmethyl)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

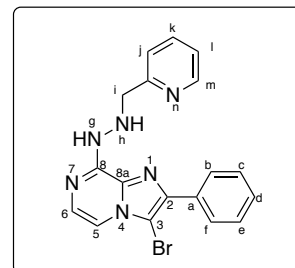
Brown powder

C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>Br

MM = 394.05 g/mol

MP = 205.5 °C

Yield = 84 %



To 3-bromo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine (20 mg, 0.05 mmol) was added NaBH<sub>4</sub> (1.4 eq, 0.07 mmol, 3 mg) in 10 mL of methanol. The mixture was stirred at room temperature for 2 hours. The crude product was then poured into water and extracted with dichloromethane. The organic layer was dried over sodium sulfate and concentrated in vacuo to give the pure product.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.57 (s, 2H), 8.21 – 8.13 (m, 2H), 8.03 (m, 2H), 7.57 – 7.26 (m, 9H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 395.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 397.0 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 1620, 1555 (νC=N and νC=C), 1153 (νC-N).

## *N'*-(3-Bromo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazin-8-yl)picolinohydrazide

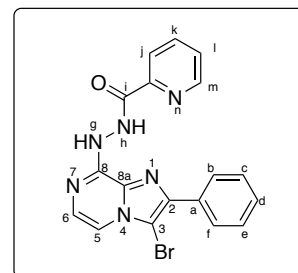
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>6</sub>O

MM = 408.03 g/mol

MP = 213.9 °C

Yield = 94 %



To 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (50 mg, 0.16 mmol) were added DCC (1.2 eq, 0.20 mmol, 24 mg), HOBT (1.2 eq, 0.20 mmol, 41 mg) and picolinic acid (1.2 eq, 0.20 mmol, 27 mg) at 0°C in 10 mL of THF. The mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was then poured into water leading to the formation of a precipitate that was filtered to obtain the pure product.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 409.0 (85) [M+H]<sup>+</sup>, 411.0 (100) [M+H+2]<sup>+</sup>, 412.1 (15) [M+H+3]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3321, 2926 (νC-N<sub>ar</sub>), 1678 (νC=O), 1620, 1568 (νC=N, νC=C), 1153 (νC-N).

## 8-Amino-3-bromo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

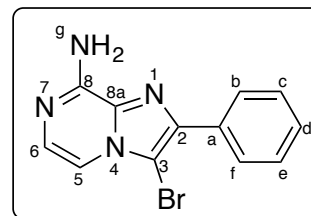
Yellow powder

$C_{12}H_9BrN_4O$

MM = 288.00 g/mol

MP = 187.9 °C

Yield = 66 %



To 3-bromo-8-chloro-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (250 mg, 0.81 mmol) was added a solution of a 28% aqueous ammonium hydroxide solution (5 mL, 4.4 mol) and 5 mL of 1,4-dioxane in a sealed tube. The mixture was heated at 100°C for 24 hours. After cooling, the solution was poured into water and the organic layer was extracted with dichloromethane. The combined organic extracts were dried over sodium sulfate, filtrated and concentrated in vacuo leading to the pure product

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : in progress

$^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : in progress

MS (ESI),  $m/z$  (%): 289.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$  291.1 (100)  $[\text{M}+\text{H}+2]^+$

IR ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3192 ( $\nu\text{N-H}$ ), 1614, 1533 ( $\nu\text{C=N}$  and  $\nu\text{C=C}$ ), 1138 ( $\nu\text{C-N}$ ).



## 8-(2-Benzylidenehydrazinyl)-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine

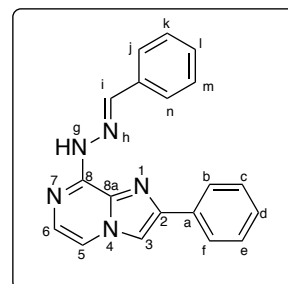
Yellow powder

C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>

MM = 313.13 g/mol

MP = 103.8 °C

Yield: 39 %



To 8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (80 mg, 0.35 mmol) was added benzaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.31 (s, 1H), 7.99 – 7.92 (m, 2H), 7.86 – 7.79 (m, 2H), 7.78 (s, 1H), 7.50 – 7.31 (m, 9H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 148.02, 145.27, 145.08, 134.31, 133.02, 130.08, 129.85, 129.11, 128.94, 128.89, 128.71, 128.63, 128.41, 127.70, 126.12, 111.13, 110.48

**MS (ESI), m/z (%):** 314.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 315.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 3051 (νC-H<sub>ar</sub>) 1612, 1549 (νC=N and νC=C); 1144 (νC-N)

## 2-Phenyl-8-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazine

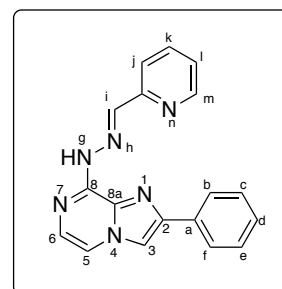
Brown powder

C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>

MM = 314.13 g/mol

MP = 239.6 °C

Yield: 78 %



To 8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (80 mg, 0.35 mmol) was added a solution of 2-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 9.70 (s, 1H), 8.66 – 8.59 (m, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.25 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.95 (dd, *J* = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.87 (d, *J* = 3.3 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 7.54 – 7.34 (m, 5H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 149.39, 145.48, 144.76, 136.30, 128.92, 128.49, 126.10, 123.85, 121.10, 112.35, 110.62.

**MS (ESI), *m/z* (%):** 314.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 315.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 1624, 1550 (νC=N and νC=C), 1130 (νC-N)

## 2-Phenyl-8-(2-(pyridin-3-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

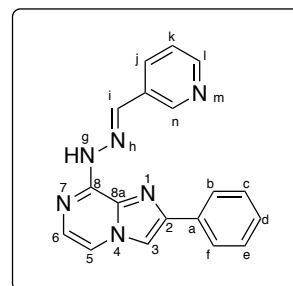
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>6</sub>

MM = 314.13 g/mol

MP = 218.1 °C

Yield: 42 %



To 8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (80 mg, 0.35 mmol) was added a solution of 3-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.89 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.59 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.25 (dt, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 7.96 – 7.90 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 7.52 – 7.29 (m, 7H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 150.57, 149.18, 145.31, 133.89, 132.64, 130.32, 128.84, 128.45, 126.04, 123.62, 111.11

**MS (ESI), *m/z* (%):** 315.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 316.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 3125 (νN-H), 1615, 1545 (νC=N and νC=C), 1142 (νC-N)

## 2-Phenyl-8-(2-(pyridin-4-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

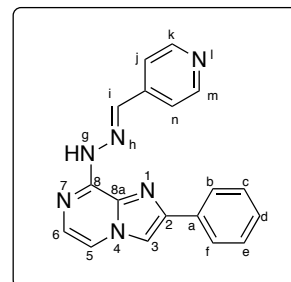
Brown powder

$C_{18}H_{14}N_6$

MM = 314.13 g/mol

MP = 184.0 °C

Yield: 83 %



To 8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (80 mg, 0.35 mmol) was added a solution of 4-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : in progress

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 150.57, 149.18, 145.31, 133.89, 132.64, 130.32, 128.84, 128.45, 126.04, 123.62, 111.11

MS (ESI),  $m/z$  (%): 315.1 (100)  $[M+H]^+$ , 316.1 (35)  $[M+H+2]^+$

IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3125 ( $\nu_{N-H}$ ), 1615, 1545 ( $\nu_{C=N}$  and  $\nu_{C=C}$ ), 1142 ( $\nu_{C-N}$ )

## 8-(2-Benzylidenehydrazinyl)-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine

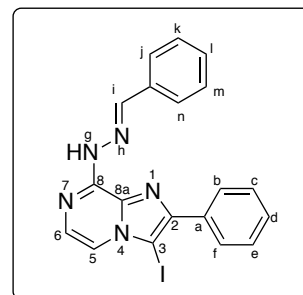
Yellow powder

C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>5</sub>

MM = 439.03 g/mol

MP = 184.0 °C

Yield: 35 %



To 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (80 mg, 0.23 mmol) was added a solution of benzaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred for 45 minutes at room temperature. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.26 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60 – 7.34 (m, 9H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 150.57, 149.18, 145.31, 133.89, 132.64, 130.32, 128.84, 128.45, 126.04, 123.62, 111.11

MS (ESI), *m/z* (%): 440.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3125 (νN-H), 1615, 1545 (νC=N and νC=C), 1142 (νC-N)

### 3-Iodo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazine

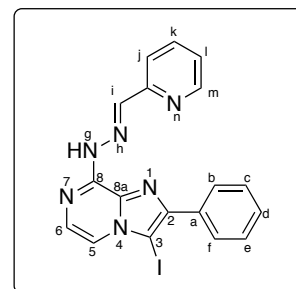
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>6</sub>

MM = 440.24 g/mol

MP = 180.8 °C

Yield: 92 %



To 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (200 mg, 0.56 mmol) was added a solution of 2-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 20 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ:** 15.31 (s, 1H), 8.73 (d, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.23 – 8.05 (m, 2H), 7.98-7.94 (m, 2H), 7.71 – 7.42 (m, 6H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ:** 161.07, 152.09, 149.92, 137.07, 128.56, 127.65, 125.66, 121.72

**MS (ESI), *m/z* (%):** 441.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 2581 (νN-H<sub>ar</sub>), 1618, 1554 (νC=N and νC=C), 1150 (νC-N)

### 3-Iodo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-3-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazine

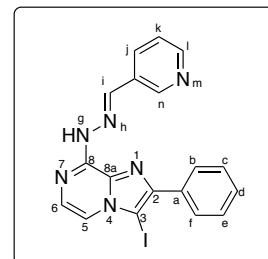
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>6</sub>

MM = 440.24 g/mol

MP = 113.0 °C

Yield: 84 %



To 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (80 mg, 0.23 mmol) was added a solution of 3-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 9.06 (s, 1H), 8.67 – 8.61 (m, 2H), 8.37 – 8.30 (m, 2H), 8.09 – 8.02 (m, 2H), 7.72 – 7.29 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 441.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 2916 (νN-H<sub>ar</sub>), 1620, 1554 (νC=N and νC=C), 1151 (νC-N)

### 3-Iodo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-4-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-*a*]pyrazine

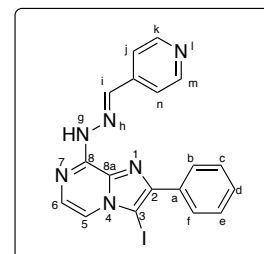
Brown powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>6</sub>

MM = 440.24 g/mol

MP = 145.0 °C

Yield: 40 %



To 8-hydrazinyl-3-iodo-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (80 mg, 0.23 mmol) was added a solution of 4-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.76 – 8.45 (m, 2H), 8.22 (s, 1H), 8.07 – 7.96 (m, 2H), 7.70 – 7.62 (m, 2H), 7.57 – 7.32 (m, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 151.40, 150.33, 147.71, 141.58, 132.75, 128.92, 128.66, 128.51, 127.89, 122.24, 121.34.

MS (ESI), *m/z* (%): 441.0 (100) [M+H]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3459, 3246 (νN-H), 1562, 1475 (νC=C and νC=N), 1157 (νC-N).



## 8-(2-Benzylidenehydrazinyl)-3-bromo-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine

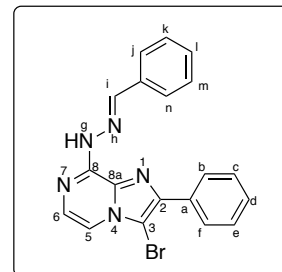
Yellow powder

$C_{19}H_{14}BrN_5$

MM = 391.04 g/mol

MP = 112.5 °C

Yield: 62 %



To 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (80 mg, 0.26 mmol) was added a solution of benzaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : in progress

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : in progress

MS (ESI),  $m/z$  (%): 392.0 (100)  $[M+H]^+$

IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3070 ( $\nu C-H_{ar}$ ); 1614, 1592 ( $\nu C=N$  and  $\nu C=C$ ); 1188 ( $\nu C-N$ )

### 3-Bromo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

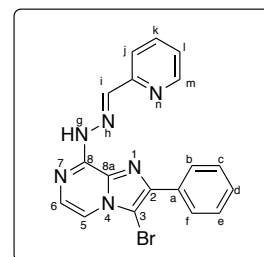
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>6</sub>

MM = 392.04 g/mol

MP = 242.8 °C

Yield: 57 %



To 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (80 mg, 0.26 mmol) was added a solution of 2-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred for 45 minutes at room temperature. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 15.40 (s, 1H), 8.84 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 8.20 – 8.14 (m, 2H), 7.84 – 7.78 (m, 2H), 7.64 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.51 – 7.28 (m, 5H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 153.12, 148.42, 145.76, 137.51, 137.21, 136.17, 132.68, 129.76, 128.68, 128.65, 128.00, 127.80, 127.02, 125.19, 123.57, 110.43

**MS (ESI), *m/z* (%):** 395.0 (100) [M+H+2]<sup>+</sup>

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 1564 (νC=C), 1153 (νC-N)

### 3-Bromo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-3-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

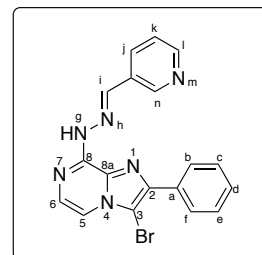
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>6</sub>

MM = 392.04 g/mol

MP = 106.8 °C

Yield: 75 %



To 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (80 mg, 0.26 mmol) was added a solution of 3-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 8.93 – 8.87 (m, 1H), 8.59 (dd, *J* = 4.9, 1.7 Hz, 2H), 8.35 (s, 1H), 8.30 – 8.22 (m, 2H), 8.12 – 8.05 (m, 2H), 7.60 – 7.29 (m, 5H).

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 150.44, 149.02, 144.65, 142.44, 134.09, 131.92, 130.29, 128.67, 128.56, 127.70, 123.70, 108.89

**MS (ESI), *m/z* (%):** 395.0 (100) [M+H+2]<sup>+</sup>

**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 1564 (νC=C), 1153 (νC-N)

### 3-Bromo-2-phenyl-8-(2-(pyridin-4-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

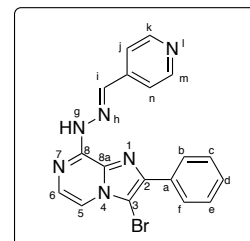
Yellow powder

$C_{18}H_{13}BrN_6$

MM = 392.04 g/mol

MP = 240.7 °C

Yield: 21 %



To 3-bromo-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine (80 mg, 0.26 mmol) was added a solution of 4-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured with water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over  $Na_2SO_4$  and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : in progress

$^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : in progress

MS (ESI),  $m/z$  (%): 395.0 (100)  $[M+H+2]^+$

IR ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3026 ( $\nu C-H_{ar}$ ), 1616, 1555 ( $\nu C=N$  and  $\nu C=C$ ), 1151 ( $\nu C-N$ )

## 8-(2-Benzylidenehydrazinyl)-3-chloro-2-phenylimidazo[1,2-a]pyrazine

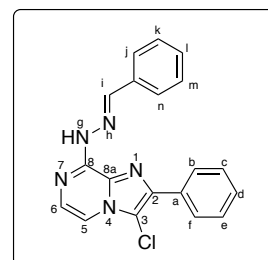
Yellow powder

C<sub>19</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>

MM = 347.09 g/mol

MP = 176.8 °C

Yield: 72 %



To 3-chloro-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (30 mg, 0.17 mmol) was added a solution of benzaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 348.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 350.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>, 351.2 (15) [M+H+3]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3026 (νC-H<sub>ar</sub>), 1616, 1555 (νC=N and νC=C), 1151 (νC-N)

### 3-Chloro-2-phenyl-8-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

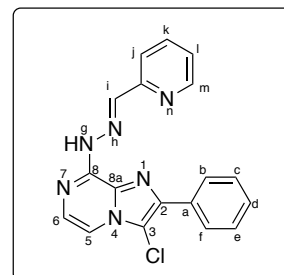
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>6</sub>

MM = 348.09 g/mol

MP = 187.2 °C

Yield: 75 %



To 3-chloro-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (30 mg, 0.17 mmol) was added a solution of 2-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 8.83 – 8.75 (m, 2H), 8.59 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.24 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.71 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.65 – 7.46 (m, 5H)

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 349.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 351.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>, 352.1 (15) [M+H+3]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 3391 (νN-H), 1616, 1585 (νC=N and νC=C), 1138 (νC-N)

### 3-Chloro-2-phenyl-8-(2-(pyridin-3-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

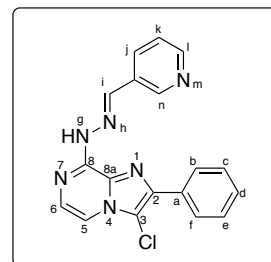
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>6</sub>

MM = 348.09 g/mol

MP = 184.4 °C

Yield: 81 %



To 3-chloro-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (30 mg, 0.17 mmol) was added a solution of 3-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: in progress

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: in progress

MS (ESI), *m/z* (%): 349.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 351.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>, 352.1 (15) [M+H+3]<sup>+</sup>

IR (ν, cm<sup>-1</sup>): 2959 (νN-H<sub>ar</sub>), 1614, 1551 (νC=N and νC=C), 1151 (νC-N)

### 3-Chloro-2-phenyl-8-(2-(pyridin-4-ylmethylene)hydrazinyl)imidazo[1,2-a]pyrazine

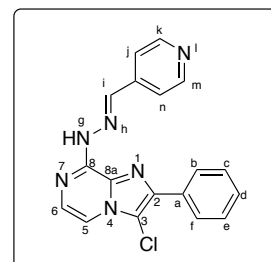
Yellow powder

C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>ClN<sub>6</sub>

MM = 348.09 g/mol

MP = 187.2 °C

Yield: 75 %



To 3-chloro-8-hydrazinyl-2-phenylimidazo[1,2-*a*]pyrazine (30 mg, 0.17 mmol) was added a solution of 4-pyridinecarboxaldehyde (1.2 eq) in 10 mL of ethanol. The solution was stirred at room temperature for 45 minutes. Then, the mixture was poured into water and extracted with 3x50 mL of dichloromethane. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to afford the pure hydrazone.

**<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ:** 9.83 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.65 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.26 – 7.97 (m, 3H), 7.64 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.54 – 7.30 (m, 7H)

**<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ:** 150.27, 141.31, 139.84, 131.58, 128.68 (2C), 127.73, 127.35, 121.20

**MS (ESI), *m/z* (%):** 349.1 (100) [M+H]<sup>+</sup>, 351.1 (35) [M+H+2]<sup>+</sup>, 352 (15) [M+H+3]<sup>+</sup>

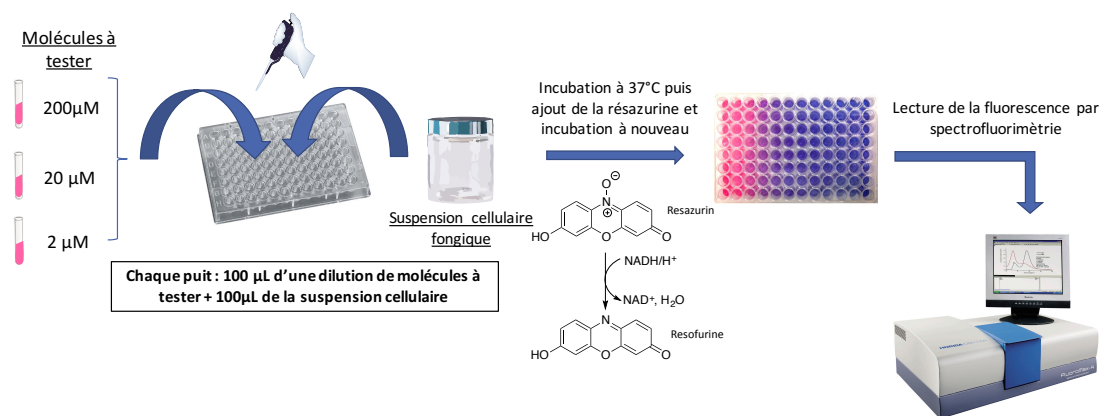
**IR (ν, cm<sup>-1</sup>):** 3366 (νN-H), 1618, 1566 (νC=N and νC=C), 1153 (νC-N)



## 5.2 Biology

Antifungal susceptibility assays were performed following CLSI guidelines. Inhibition of proliferation assays were thus performed using microdilution method with 96-well plates. Compounds were first dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) to obtain stock solution (10 mM). Dilutions of each compound were carried out in RPMI 1640 MOPS Glucose culture medium at a maximum final concentration of 1% DMSO.

While fungal strains were suspended in RPMI, each compound with its different dilutions as well as a positive control was put into the wells with a constant volume of cellular suspension. A blank was also realized for each plate with only the culture media therein. The plates were after incubated at 37°C for a predefined time (depending on the nature of the microbial agent). After incubation, a solution of resazurin (700  $\mu$ M) was added in each well and the plates were then incubated during defined lap of time according to the targeted cells. Finally, the results were obtained by measuring the corresponding fluorescence in each plate by spectrofluorimetry.



**Figure 71 : Biological tests process**

For more information about biology protocols that were used for the experiments, please refer to Annexes.

# Bibliographie

- (1) Seneviratne, C. J.; Rosa, E. A. R. Editorial: Antifungal Drug Discovery: New Theories and New Therapies. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*.
- (2) Ascioğlu, S.; Rex, J. H.; de Pauw, B.; Bennett, J. E.; Bille, J.; Crokaert, F.; Denning, D. W.; Donnelly, J. P.; Edwards, J. E.; Erjavec, Z.; Fiere, D.; Lortholary, O.; Maertens, J.; Meis, J. F.; Patterson, T. F.; Ritter, J.; Selleslag, D.; Shah, P. M.; Stevens, D. A.; Walsh, T. J. Defining Opportunistic Invasive Fungal Infections in Immunocompromised Patients with Cancer and Hematopoietic Stem Cell Transplants: An International Consensus. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34* (1), 7–14.
- (3) Low, C.-Y.; Rotstein, C. Emerging Fungal Infections in Immunocompromised Patients. *FI000 Med. Rep.* **2011**, *3*.
- (4) Warnock, D. W. Trends in the Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **2007**, *48* (1), 1–12.
- (5) Wu, S.; Wang, Y.; Liu, N.; Dong, G.; Sheng, C. Tackling Fungal Resistance by Biofilm Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60* (6), 2193–2211.
- (6) Perfect, J. R. The Antifungal Pipeline: A Reality Check. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16* (9), 603–616.
- (7) Goel, R.; Luxami, V.; Paul, K. Recent Advances in Development of imidazo[1,2-A]pyrazines: Synthesis, Reactivity and Their Biological Applications. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (12), 3525–3555.
- (8) Kullberg, B. J.; Arendrup, M. C. Invasive Candidiasis. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373* (15), 1445–1456.
- (9) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: A Persistent Public Health Problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (1), 133–163.
- (10) CDC. CDC – Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013: Fluconazole-Resistant *Candida*  
<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/invasive/statistics.html> (accessed Sep 11, 2017).
- (11) Tortorano, A. M.; Kibbler, C.; Peman, J.; Bernhardt, H.; Klingspor, L.; Grillot, R. Candidaemia in Europe: Epidemiology and Resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2006**, *27* (5), 359–366.
- (12) Mayer, F. L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence* **2013**, *4* (2), 119–128.
- (13) Yang, W.; Yan, L.; Wu, C.; Zhao, X.; Tang, J. Fungal Invasion of Epithelial Cells. *Microbiol. Res.* **2014**, *169* (11), 803–810.
- (14) Sardi, J. C. O.; Scorzoni, L.; Bernardi, T.; Fusco-Almeida, A. M.; Mendes Giannini, M. J. S. *Candida* Species: Current Epidemiology, Pathogenicity, Biofilm Formation, Natural Antifungal Products and New Therapeutic Options. *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62* (Pt 1), 10–24.
- (15) Shapiro, R. S.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75* (2), 213–267.
- (16) Lass-Flörl, C. The Changing Face of Epidemiology of Invasive Fungal Disease in Europe. *Mycoses* **2009**, *52* (3), 197–205.
- (17) Gregg, K. S.; Kauffman, C. A. Invasive Aspergillosis: Epidemiology, Clinical Aspects, and Treatment. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *36* (5), 662–672.

- (18) Pagano, L.; Caira, M.; Candoni, A.; Offidani, M.; Fianchi, L.; Martino, B.; Pastore, D.; Picardi, M.; Bonini, A.; Chierichini, A.; Fanci, R.; Caramatti, C.; Invernizzi, R.; Mattei, D.; Mitra, M. E.; Melillo, L.; Aversa, F.; Lint, M. V.; Falcucci, P.; Valentini, C. G.; Girmenia, C.; Nosari, A. The Epidemiology of Fungal Infections in Patients with Hematologic Malignancies: The SEIFEM-2004 Study. *Haematologica* **2006**, *91* (8), 1068–1075.
- (19) Martino, R.; Subirá, M.; Rovira, M.; Solano, C.; Vázquez, L.; Sanz, G. F.; Urbano-Ispizua, A.; Brunet, S.; De la Cámara, R.; alloPBSCT Infectious/Non-infectious Complications Subcommittees of the Grupo Español de Trasplante Hematopoyético (GETH). Invasive Fungal Infections after Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Incidence and Risk Factors in 395 Patients. *Br. J. Haematol.* **2002**, *116* (2), 475–482.
- (20) Lin, S. J.; Schranz, J.; Teutsch, S. M. Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2001**, *32* (3), 358–366.
- (21) Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Crit. Rev. Microbiol.* **2010**, *36* (1), 1–53.
- (22) Dagenais, T. R. T.; Keller, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus Fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2009**, *22* (3), 447–465.
- (23) ANOFEL. Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes - cours.pdf <http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/aspergillose/site/html/cours.pdf> (accessed Aug 31, 2017).
- (24) Chayakulkeeree, M.; Perfect, J. R. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2006**, *20* (3), 507–544, v – vi.
- (25) Rajasingham, R.; Smith, R. M.; Park, B. J.; Jarvis, J. N.; Govender, N. P.; Chiller, T. M.; Denning, D. W.; Loyse, A.; Boulware, D. R. Global Burden of Disease of HIV-Associated Cryptococcal Meningitis: An Updated Analysis. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17* (8), 873–881.
- (26) Maziarz, E. K.; Perfect, J. R. Cryptococcosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30* (1), 179–206.
- (27) Brunke, S.; Mogavero, S.; Kasper, L.; Hube, B. Virulence Factors in Fungal Pathogens of Man. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *32*, 89–95.
- (28) Sokulska, M.; Kicia, M.; Wesolowska, M.; Hendrich, A. B. *Pneumocystis Jirovecii*--from a Commensal to Pathogen: Clinical and Diagnostic Review. *Parasitol. Res.* **2015**, *114* (10), 3577–3585.
- (29) Aliouat-Denis, C.-M.; Martinez, A.; Aliouat, E. M.; Pottier, M.; Gantois, N.; Dei-Cas, E. The *Pneumocystis* Life Cycle. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104* (3), 419–426.
- (30) R. Harris, J.; Arunmozhi Balajee, S.; J. Park, B. *Pneumocystis Jirovecii* Pneumonia: Current Knowledge and Outstanding Public Health Issues. *Curr Fungal Infect Rep* **2010**, *4*, 229–237.
- (31) Morris, A.; Lundgren, J. D.; Masur, H.; Walzer, P. D.; Hanson, D. L.; Frederick, T.; Huang, L.; Beard, C. B.; Kaplan, J. E. Current Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.* **2004**, *10* (10), 1713–1720.
- (32) Guarro, J. Fusariosis, a Complex Infection Caused by a High Diversity of Fungal Species Refractory to Treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *32* (12), 1491–1500.
- (33) Muhammed, M.; Coleman, J. J.; Carneiro, H. A.; Mylonakis, E. The Challenge of Managing Fusariosis. *Virulence* **2011**, *2* (2), 91–96.
- (34) Nucci, M.; Anaissie, E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20* (4), 695–704.

- (35) Ribes, J. A.; Vanover-Sams, C. L.; Baker, D. J. Zygomycetes in Human Disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, *13* (2), 236–301.
- (36) Chayakulkeeree, M.; Ghannoum, M. A.; Perfect, J. R. Zygomycosis: The Re-Emerging Fungal Infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**, *25* (4), 215–229.
- (37) Lanternier, F.; Sun, H.-Y.; Ribaud, P.; Singh, N.; Kontoyiannis, D. P.; Lortholary, O. Mucormycosis in Organ and Stem Cell Transplant Recipients. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54* (11), 1–8.
- (38) Petrikkos, G.; Skiada, A.; Drogari-Apiranthitou, M. Epidemiology of Mucormycosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20* Suppl 6, 67–73.
- (39) Bitar, D.; Van Cauteren, D.; Lanternier, F.; Dannaoui, E.; Che, D.; Dromer, F.; Desenclos, J.-C.; Lortholary, O. Increasing Incidence of Zygomycosis (Mucormycosis), France, 1997–2006. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15* (9), 1395–1401.
- (40) Petrikkos, G.; Skiada, A.; Lortholary, O.; Roilides, E.; Walsh, T. J.; Kontoyiannis, D. P. Epidemiology and Clinical Manifestations of Mucormycosis. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *54* (suppl\_1), S23–S34.
- (41) Roden, M. M.; Zaoutis, T. E.; Buchanan, W. L.; Knudsen, T. A.; Sarkisova, T. A.; Schaufele, R. L.; Sein, M.; Sein, T.; Chiou, C. C.; Chu, J. H.; Kontoyiannis, D. P.; Walsh, T. J. Epidemiology and Outcome of Zygomycosis: A Review of 929 Reported Cases. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2005**, *41* (5), 634–653.
- (42) Cortez, K. J.; Roilides, E.; Quiroz-Telles, F.; Meletiadis, J.; Antachopoulos, C.; Knudsen, T.; Buchanan, W.; Milanovich, J.; Sutton, D. A.; Fothergill, A.; Rinaldi, M. G.; Shea, Y. R.; Zaoutis, T.; Kottlil, S.; Walsh, T. J. Infections Caused by *Scedosporium* Spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21* (1), 157–197.
- (43) Bastides, F. Zygomycoses, Fusarioses, Scédosporioses, Trichosporonoses : Les Nouvelles Mycoses émergentes. *Réanimation* **2010**, *19* (4), 319–326.
- (44) Subedi, S.; Chen, S. C.-A. Epidemiology of Scedosporiosis. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2015**, *9* (4), 275–284.
- (45) Chapman, S. W.; Sullivan, D. C.; Cleary, J. D. In Search of the Holy Grail of Antifungal Therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* **2008**, *119*, 197–216.
- (46) Campoy, S.; Adrio, J. L. Antifungals. *Biochem. Pharmacol.* **2017**, *133* (Supplement C), 86–96.
- (47) Rybak, J. M.; Marx, K. R.; Nishimoto, A. T.; Rogers, P. D. Isavuconazole: Pharmacology, Pharmacodynamics, and Current Clinical Experience with a New Triazole Antifungal Agent. *Pharmacotherapy* **2015**, *35* (11), 1037–1051.
- (48) Cowen, L. E.; Steinbach, W. J. Stress, Drugs, and Evolution: The Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. *Eukaryot. Cell* **2008**, *7* (5), 747–764.
- (49) Nett, J. E.; Andes, D. R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30* (1), 51–83.
- (50) Miceli, M. H.; Kauffman, C. A. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2015**, *61* (10), 1558–1565.
- (51) Nucci, M. Use of Antifungal Drugs in Hematology. *Rev. Bras. Hematol. E Hemoter.* **2012**, *34* (5), 383–391.
- (52) Lewis, R. E. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. *Mayo Clin. Proc.* **2011**, *86* (8), 805–817.
- (53) Chattopadhyay, A.; Jafurulla, M. A Novel Mechanism for an Old Drug: Amphotericin B in the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *416* (1-2), 7–12.

- (54) Hamill, R. J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs* **2013**, *73* (9), 919–934.
- (55) Chen, S. C.-A.; Slavin, M. A.; Sorrell, T. C. Echinocandin Antifungal Drugs in Fungal Infections: A Comparison. *Drugs* **2011**, *71* (1), 11–41.
- (56) Denning, D. W. Echinocandin Antifungal Drugs. *Lancet Lond. Engl.* **2003**, *362* (9390), 1142–1151.
- (57) Pfaller, M. A.; Boyken, L.; Hollis, R. J.; Messer, S. A.; Tendolkar, S.; Diekema, D. J. In Vitro Susceptibilities of *Candida* Spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44* (3), 760–763.
- (58) Pfaller, M. A.; Boyken, L.; Hollis, R. J.; Kroeger, J.; Messer, S. A.; Tendolkar, S.; Diekema, D. J. In Vitro Susceptibility of Clinical Isolates of *Aspergillus* Spp. to Anidulafungin, Caspofungin, and Micafungin: A Head-to-Head Comparison Using the CLSI M38-A2 Broth Microdilution Method. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47* (10), 3323–3325.
- (59) Kauffman, C. A.; Carver, P. L. Update on Echinocandin Antifungals. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2008**, *29* (2), 211–219.
- (60) Loyse, A.; Dromer, F.; Day, J.; Lortholary, O.; Harrison, T. S. Flucytosine and Cryptococcosis: Time to Urgently Address the Worldwide Accessibility of a 50-Year-Old Antifungal. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68* (11), 2435–2444.
- (61) Vermes, A.; Guchelaar, H.-J.; Dankert, J. Flucytosine: A Review of Its Pharmacology, Clinical Indications, Pharmacokinetics, Toxicity and Drug Interactions. *J. Antimicrob. Chemother.* **2000**, *46* (2), 171–179.
- (62) Deray, G. Amphotericin B Nephrotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *49* Suppl 1, 37–41.
- (63) Kauffman, C. A.; Frame, P. T. Bone Marrow Toxicity Associated with 5-Fluorocytosine Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *11* (2), 244–247.
- (64) Brüggemann, R. J. M.; Alffenaar, J.-W. C.; Blijlevens, N. M. A.; Billaud, E. M.; Kosterink, J. G. W.; Verweij, P. E.; Burger, D. M.; Saravolatz, L. D. Clinical Relevance of the Pharmacokinetic Interactions of Azole Antifungal Drugs with Other Coadministered Agents. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48* (10), 1441–1458.
- (65) Brüggemann, R. J. M.; Alffenaar, J.-W. C.; Blijlevens, N. M. A.; Billaud, E. M.; Kosterink, J. G. W.; Verweij, P. E.; Burger, D. M. Pharmacokinetic Drug Interactions of Azoles. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2008**, *2* (1), 20.
- (66) Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Lass-Flörl, C. Antifungal Drug Resistance among *Candida* Species: Mechanisms and Clinical Impact. *Mycoses* **2015**, *58* Suppl 2, 2–13.
- (67) Shapiro, R. S.; Robbins, N.; Cowen, L. E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2011**, *75* (2), 213–267.
- (68) Prasad, R.; Shah, A. H.; Rawal, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *892*, 327–349.
- (69) Cowen, L. E. Hsp90 Orchestrates Stress Response Signaling Governing Fungal Drug Resistance. *PLoS Pathog.* **2009**, *5* (8), e1000471.
- (70) Mukherjee, P. K.; Chandra, J.; Kuhn, D. M.; Ghannoum, M. A. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida Albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. *Infect. Immun.* **2003**, *71* (8), 4333–4340.
- (71) Pfaller, M. A.; Messer, S. A.; Boyken, L.; Rice, C.; Tendolkar, S.; Hollis, R. J.; Doern, G. V.; Diekema, D. J. Global Trends in the Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus Neoformans* (1990 to 2004). *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43* (5), 2163–2167.
- (72) Pfaller, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am. J. Med.* **2012**, *125* (1 Suppl), S3–S13.

- (73) Pfaller, M. A.; Castanheira, M.; Messer, S. A.; Moet, G. J.; Jones, R. N. Variation in *Candida* Spp. Distribution and Antifungal Resistance Rates among Bloodstream Infection Isolates by Patient Age: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2010**, *68* (3), 278–283.
- (74) Sarma, S.; Upadhyay, S. Current Perspective on Emergence, Diagnosis and Drug Resistance in *Candida Auris*. *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, 155–165.
- (75) Sanglard, D.; Odds, F. C. Resistance of *Candida* Species to Antifungal Agents: Molecular Mechanisms and Clinical Consequences. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2* (2), 73–85.
- (76) Roemer, T.; Krysan, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2014**, *4* (5).
- (77) Sheng, C.; Zhang, W. New Lead Structures in Antifungal Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18* (5), 733–766.
- (78) Wiederhold, N. P. Antifungal Resistance: Current Trends and Future Strategies to Combat. *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, 249–259.
- (79) Onishi, J.; Meinz, M.; Thompson, J.; Curotto, J.; Dreikorn, S.; Rosenbach, M.; Douglas, C.; Abruzzo, G.; Flattery, A.; Kong, L.; Cabello, A.; Vicente, F.; Pelaez, F.; Diez, M. T.; Martin, I.; Bills, G.; Giacobbe, R.; Dombrowski, A.; Schwartz, R.; Morris, S.; Harris, G.; Tsipouras, A.; Wilson, K.; Kurtz, M. B. Discovery of Novel Antifungal (1,3)-Beta-D-Glucan Synthase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (2), 368–377.
- (80) Larkin, E.; Hager, C.; Chandra, J.; Mukherjee, P. K.; Retuerto, M.; Salem, I.; Long, L.; Isham, N.; Kovanda, L.; Borroto-Esoda, K.; Wring, S.; Angulo, D.; Ghannoum, M. The Emerging Pathogen *Candida Auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61* (5), e02396–16.
- (81) Pfaller, M. A.; Messer, S. A.; Moutyl, M. R.; Jones, R. N.; Castanheira, M. Activity of MK-3118, a New Oral Glucan Synthase Inhibitor, Tested against *Candida* Spp. by Two International Methods (CLSI and EUCAST). *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68* (4), 858–863.
- (82) Rollin-Pinheiro, R.; Singh, A.; Barreto-Bergter, E.; Del Poeta, M. Sphingolipids as Targets for Treatment of Fungal Infections. *Future Med. Chem.* **2016**, *8* (12), 1469–1484.
- (83) Mor, V.; Rella, A.; Farnoud, A. M.; Singh, A.; Munshi, M.; Bryan, A.; Naseem, S.; Konopka, J. B.; Ojima, I.; Bullesbach, E.; Ashbaugh, A.; Linke, M. J.; Cushion, M.; Collins, M.; Ananthula, H. K.; Sallans, L.; Desai, P. B.; Wiederhold, N. P.; Fothergill, A. W.; Kirkpatrick, W. R.; Patterson, T.; Wong, L. H.; Sinha, S.; Giaever, G.; Nislow, C.; Flaherty, P.; Pan, X.; Cesar, G. V.; de Melo Tavares, P.; Frases, S.; Miranda, K.; Rodrigues, M. L.; Luberto, C.; Nimrichter, L.; Del Poeta, M. Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. *mBio* **2015**, *6* (3).
- (84) Aeed, P. A.; Young, C. L.; Nagiec, M. M.; Elhammer, Å. P. Inhibition of Inositol Phosphorylceramide Synthase by the Cyclic Peptide Aureobasidin A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (2), 496–504.
- (85) Abdallah, Q. A.; Fortwendel, J. R. Exploration of *Aspergillus Fumigatus* Ras Pathways for Novel Antifungal Drug Targets. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*.
- (86) Chaudhary, P. M.; Tupe, S. G.; Deshpande, M. V. Chitin Synthase Inhibitors as Antifungal Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **2013**, *13* (2), 222–236.

- (87) Li, R. K.; Rinaldi, M. G. In Vitro Antifungal Activity of Nikkomycin Z in Combination with Fluconazole or Itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43* (6), 1401–1405.
- (88) Ganesan, L. T.; Manavathu, E. K.; Cutright, J. L.; Alangaden, G. J.; Chandrasekar, P. H. In-Vitro Activity of Nikkomycin Z Alone and in Combination with Polyenes, Triazoles or Echinocandins against *Aspergillus Fumigatus*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *10* (11), 961–966.
- (89) Sandovsky-Losica, H.; Shwartzman, R.; Lahat, Y.; Segal, E. Antifungal Activity against *Candida Albicans* of Nikkomycin Z in Combination with Caspofungin, Voriconazole or Amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62* (3), 635–637.
- (90) Watanabe, N.-A.; Miyazaki, M.; Horii, T.; Sagane, K.; Tsukahara, K.; Hata, K. E1210, a New Broad-Spectrum Antifungal, Suppresses *Candida Albicans* Hyphal Growth through Inhibition of Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (2), 960–971.
- (91) McLellan, C. A.; Whitesell, L.; King, O. D.; Lancaster, A. K.; Mazitschek, R.; Lindquist, S. Inhibiting GPI Anchor Biosynthesis in Fungi Stresses the Endoplasmic Reticulum and Enhances Immunogenicity. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (9), 1520–1528.
- (92) Baxter, B. K.; DiDone, L.; Ogu, D.; Schor, S.; Krysan, D. J. Identification, in Vitro Activity and Mode of Action of Phosphoinositide-Dependent-1 Kinase Inhibitors as Antifungal Molecules. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (5), 502–510.
- (93) Koselny, K.; Green, J.; Favazzo, L.; Glazier, V. E.; DiDone, L.; Ransford, S.; Krysan, D. J. Antitumor/Antifungal Celecoxib Derivative AR-12 Is a Non-Nucleoside Inhibitor of the ANL-Family Adenylating Enzyme Acetyl CoA Synthetase. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2* (4), 268–280.
- (94) Oliver, J. D.; Sibley, G. E. M.; Beckmann, N.; Dobb, K. S.; Slater, M. J.; McEntee, L.; du Pré, S.; Livermore, J.; Bromley, M. J.; Wiederhold, N. P.; Hope, W. W.; Kennedy, A. J.; Law, D.; Birch, M. F901318 Represents a Novel Class of Antifungal Drug That Inhibits Dihydroorotate Dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**.
- (95) Nishikawa, H.; Sakagami, T.; Yamada, E.; Fukuda, Y.; Hayakawa, H.; Nomura, N.; Mitsuyama, J.; Miyazaki, T.; Mukae, H.; Kohno, S. T-2307, a Novel Arylamidine, Is Transported into *Candida Albicans* by a High-Affinity Spermine and Spermidine Carrier Regulated by Agp2. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71* (7), 1845–1855.
- (96) Shibata, T.; Takahashi, T.; Yamada, E.; Kimura, A.; Nishikawa, H.; Hayakawa, H.; Nomura, N.; Mitsuyama, J. T-2307 Causes Collapse of Mitochondrial Membrane Potential in Yeast. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (11), 5892–5897.
- (97) Pfaller, M. A.; Rhomberg, P. R.; Messer, S. A.; Castanheira, M. In Vitro Activity of a Hos2 Deacetylase Inhibitor, MGCD290, in Combination with Echinocandins against Echinocandin-Resistant *Candida* Species. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *81* (4), 259–263.
- (98) Gorska, M.; Popowska, U.; Sielicka-Dudzin, A.; Kuban-Jankowska, A.; Sawczuk, W.; Knap, N.; Cicero, G.; Wozniak, F. Geldanamycin and Its Derivatives as Hsp90 Inhibitors. *Front. Biosci. Landmark Ed.* **2012**, *17*, 2269–2277.
- (99) Zhang, J.; Liu, W.; Tan, J.; Sun, Y.; Wan, Z.; Li, R. Antifungal Activity of Geldanamycin Alone or in Combination with Fluconazole against *Candida* Species. *Mycopathologia* **2013**, *175* (3-4), 273–279.
- (100) Lamoth, F.; Juvvadi, P. R.; Gehrke, C.; Steinbach, W. J. In Vitro Activity of Calcineurin and Heat Shock Protein 90 Inhibitors against *Aspergillus Fumigatus* Azole- and Echinocandin-Resistant Strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57* (2), 1035–1039.

- (101) Cowen, L. E.; Singh, S. D.; Köhler, J. R.; Collins, C.; Zaas, A. K.; Schell, W. A.; Aziz, H.; Mylonakis, E.; Perfect, J. R.; Whitesell, L.; Lindquist, S. Harnessing Hsp90 Function as a Powerful, Broadly Effective Therapeutic Strategy for Fungal Infectious Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (8), 2818–2823.
- (102) Perfect, J. R.; Tenor, J. L.; Miao, Y.; Brennan, R. G. Trehalose Pathway as an Antifungal Target. *Virulence* **2017**, *8* (2), 143–149.
- (103) Zhai, B.; Wu, C.; Wang, L.; Sachs, M. S.; Lin, X. The Antidepressant Sertraline Provides a Promising Therapeutic Option for Neurotropic Cryptococcal Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56* (7), 3758–3766.
- (104) Dolan, K.; Montgomery, S.; Buchheit, B.; DiDone, L.; Wellington, M.; Krysan, D. J. Antifungal Activity of Tamoxifen: In Vitro and In Vivo Activities and Mechanistic Characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53* (8), 3337–3346.
- (105) Basiuk, V. A. Imidazo[1,2-A]pyrazines. *Russ. Chem. Rev.* **1997**, *66* (3), 187.
- (106) Andrews, M. J. I.; Andrew Clase, J.; Bar, G.; Tricarico, G.; Edwards, P. J.; Brys, R.; Chambers, M.; Schmidt, W.; MacLeod, A.; Hirst, K.; Allen, V.; Birault, V.; Le, J.; Harris, J.; Self, A.; Nash, K.; Dixon, G. Discovery of a Series of Imidazopyrazine Small Molecule Inhibitors of the Kinase MAPKAPK5, That Show Activity Using in Vitro and in Vivo Models of Rheumatoid Arthritis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (6), 2266–2270.
- (107) Du, X.; Gustin, D. J.; Chen, X.; Duquette, J.; McGee, L. R.; Wang, Z.; Ebsworth, K.; Henne, K.; Lemon, B.; Ma, J.; Miao, S.; Sabalan, E.; Sullivan, T. J.; Tonn, G.; Collins, T. L.; Medina, J. C. Imidazo-Pyrazine Derivatives as Potent CXCR3 Antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (17), 5200–5204.
- (108) Kerekes, A. D.; Esposito, S. J.; Doll, R. J.; Tagat, J. R.; Yu, T.; Xiao, Y.; Zhang, Y.; Prelusky, D. B.; Tevar, S.; Gray, K.; Terracina, G. A.; Lee, S.; Jones, J.; Liu, M.; Basso, A. D.; Smith, E. B. Aurora Kinase Inhibitors Based on the imidazo[1,2-A]pyrazine Core: Fluorine and Deuterium Incorporation Improve Oral Absorption and Exposure. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (1), 201–210.
- (109) Martínez González, S.; Hernández, A. I.; Varela, C.; Rodríguez-Arístegui, S.; Lorenzo, M.; Rodríguez, A.; Rivero, V.; Martín, J. I.; Saluste, C. G.; Ramos-Lima, F.; Cendón, E.; Cebrián, D.; Aguirre, E.; Gomez-Casero, E.; Albarrán, M.; Alfonso, P.; García-Serelde, B.; Oyarzabal, J.; Rabal, O.; Mulero, F.; Gonzalez-Granda, T.; Link, W.; Fominaya, J.; Barbacid, M.; Bischoff, J. R.; Pizcueta, P.; Pastor, J. Identification of ETP-46321, a Potent and Orally Bioavailable PI3K  $\alpha$ ,  $\delta$  Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (10), 3460–3466.
- (110) Zeng, H.; Belanger, D. B.; Curran, P. J.; Shipps, G. W.; Miao, H.; Bracken, J. B.; Arshad Siddiqui, M.; Malkowski, M.; Wang, Y. Discovery of Novel imidazo[1,2-A]pyrazin-8-Amines as Brk/PTK6 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (19), 5870–5875.
- (111) Buckmelter, A. J.; Ren, L.; Laird, E. R.; Rast, B.; Miknis, G.; Wenglowsky, S.; Schlachter, S.; Welch, M.; Tarlton, E.; Grina, J.; Lyssikatos, J.; Brandhuber, B. J.; Morales, T.; Randolph, N.; Vigers, G.; Martinson, M.; Callejo, M. The Discovery of furo[2,3-C]pyridine-Based Indanone Oximes as Potent and Selective B-Raf Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21* (4), 1248–1252.
- (112) Zeeman, A.-M.; van Amsterdam, S. M.; McNamara, C. W.; Voorberg-van der Wel, A.; Klooster, E. J.; van den Berg, A.; Remarque, E. J.; Plouffe, D. M.; van Gemert, G.-J.; Luty, A.; Sauerwein, R.; Gagaring, K.; Borboa, R.; Chen, Z.; Kuhen, K.; Glynne, R. J.; Chatterjee, A. K.; Nagle, A.; Roland, J.; Winzeler, E. A.; Leroy, D.; Campo, B.; Diagana, T. T.; Yeung, B. K. S.; Thomas, A. W.; Kocken, C. H. M. KAI407, a Potent Non-8-Aminoquinoline Compound That Kills Plasmodium Cynomolgi Early Dormant



- Liver Stage Parasites In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58* (3), 1586–1595.
- (113) Katritzky, A. R.; Xu, Y.-J.; Tu, H. Regiospecific Synthesis of 3-Substituted Imidazo[1,2-A]pyridines, Imidazo[1,2-A]pyrimidines, and Imidazo[1,2-C]pyrimidine. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (12), 4935–4937.
- (114) Guchhait, S. K.; Madaan, C. Towards Molecular Diversity: Dealkylation of Tert-Butyl Amine in Ugi-Type Multicomponent Reaction Product Establishes Tert-Butyl Isocyanide as a Useful Convertible Isonitrile. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (16), 3631–3634.
- (115) Bradac, J.; Furek, Z.; Janezic, D.; Molan, S.; Smerkolj, I.; Stanovnik, B.; Tisler, M.; Vercek, B. Heterocycles. 167. Telesubstitution and Other Transformations of imidazo[1,2-A]- and S-triazolo[4,3-A]pyrazines. *J. Org. Chem.* **1977**, *42* (26), 4197–4201.
- (116) Marhadour, S.; Marchand, P.; Pagniez, F.; Bazin, M.-A.; Picot, C.; Lozach, O.; Ruchaud, S.; Antoine, M.; Meijer, L.; Rachidi, N.; Le Pape, P. Synthesis and Biological Evaluation of 2,3-diarylimidazo[1,2-*a*]pyridines as Antileishmanial Agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 543–556.
- (117) Marchand, P.; Bazin, M.-A.; Pagniez, F.; Rivière, G.; Boderio, L.; Marhadour, S.; Nourrisson, M.-R.; Picot, C.; Ruchaud, S.; Bach, S.; Baratte, B.; Sauvain, M.; Pareja, D. C.; Vaisberg, A. J.; Le Pape, P. Synthesis, Antileishmanial Activity and Cytotoxicity of 2,3-Diaryl- and 2,3,8-Trisubstituted imidazo[1,2-A]pyrazines. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *103*, 381–395.
- (118) Bir, Sinha, ra K.; Mason, R. P. Biotransformation of Hydrazine Dervatives in the Mechanism of Toxicity. *J. Drug Metab. Toxicol.* **2014**, *5* (3).
- (119) Mayer, N.; Schweiger, M.; Melcher, M.-C.; Fledelius, C.; Zechner, R.; Zimmermann, R.; Breinbauer, R. Structure–activity Studies in the Development of a Hydrazone Based Inhibitor of Adipose-Triglyceride Lipase (ATGL). *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (12), 2904–2916.
- (120) Shah, P.; Westwell, A. D. The Role of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22* (5), 527–540.

## Liste des Annexes

### Annexe 1 : Activité biologique des quatre molécules actives sur 28 souches de

#### Candida

Les valeurs de  $CI_{50}$  obtenues lors des tests réalisés au laboratoire IICiMed sont reportées dans le tableau ci-dessous. Les valeurs de  $CI_{50}$  sont exprimées en  $\mu M$  et les molécules présentant des valeurs inférieures à  $10 \mu M$  représentées en vert ainsi qu'en jaune par la référence (fluconazole).

	CAAL 2*	CAAL 111*	CAAL 117*	CAAL 118	CAAL 97	CAAL 93
TY-12	6,64±1,48	23,48±0,51	24,04 ± 1,37	15,30±0,35	2,21 ± 0,74	11,45±1,76
TY-35	3,24±0,18	10,64±1,48	7,46 ± 1,03	3,21±0,19	3,05 ± 0,16	7,79±2,13
TY-27	3,37±0,07	26,01±2,27	29,36 ± 0,50	2,35±0,82	< 1 $\mu M$	< 1 $\mu M$
TY-48	32,22±1,74	24,58±0,77	33,03 ± 1,10	26,41±0,60	24,51 ± 0,31	24,58±3,97
Fluco	>100	>100	>100	3,28±0,06	2,46±0,26	2,44±0,14
	CAAL 16	CAAL 28*	CAKR 1	CAKR 2	CAKR 3	CAKR 4
TY-12	2,61±0,68		20,41±2,60	23,50±3,35	12,50±5,05	24,75±4,23
TY-35	1,40±0,13		6,23±0,13	11,66±3,18	2,94±0,28	4,09±0,40
TY-27	4,65±2,70		12,71±2,43	25,18±2,72	5,33±0,54	18,21±9,0
TY-48	14,42±0,51		29,77 ± 0,87	32,93±0,38	20,53±4,64	30,21±1,05
Fluco	1,57±0,03	> 100	31,54±2,68	>100	25,02±1,23	30,90±2,64
	CAAU 880	CAAU 881	CAAU B0981	CAAU 882	CAGL1	CAGL 2
TY-12	20,38 ± 4,99	3,44±1,31	3,44 ± 1,31	20,05±0,64	< 1 $\mu M$	< 1 $\mu M$
TY-35	17,56 ± 2,07	< 1 $\mu M$	< 1 $\mu M$	17,56±2,07	3,10±9,37	4,14±0,00
TY-27	27,69 ± 1,32	5,33±0,77	5,33 ± 0,77	27,69±1,32	1,94±0,40	1,88±0,57
TY-48	20,38 ± 4,99	18,16±0,61	18,16 ± 0,61	20,38±4,99	34,09±9,37	8,81±0,62
Fluco	32,00±1,16	>100	28,08±3,29	>100	>100	25,11±10,49
	CAGL 3	CAGL 4	CATR 1	CATR 2	CATR 3	CATR 4
TY-12	< 1 $\mu M$	< 1 $\mu M$	25,75±3,66	29,35±0,63	29,03±0,55	63,00±11,16
TY-35	1,64±0,21	1,67±0,36	20,14±0,64	27,72±0,98	31,00±1,10	29,10±1,41

<b>TY-27</b>	2,12±4,34	< 1 µM	27,55±0,68	31,14±0,20	31,72±1,85	32,94±0,27
<b>TY-48</b>	7,33±0,46	9,40±3,27	33,58±0,51	29,03±0,55	32,97±0,38	29,94±1,58
<b>Fluco</b>	37,82±4,43	22,46±2,51	>100	>100	>100	>100
	<b>CAPA 1</b>	<b>CAPA 2</b>	<b>CAPA 3</b>	<b>CAPA 17</b>		
<b>TY-12</b>	17,94 ± 7,93	23,49±2,83	> 100	42,25±4,52		
<b>TY-35</b>	11,40 ± 1,60	5,17±1,01	24,51 ± 2,33	18,64±3,71		
<b>TY-27</b>	24,20 ± 4,03	26,03±0,80	33,29 ± 0,40	33,03±0,45		
<b>TY-48</b>	23,38 ± 4,51	20,74±2,96	31,02 ± 1,28	31,51±0,15		
<b>Fluco</b>	>100	>100	3,19±0,005	3,05±0,40		

\* : Souches de *Candida albicans* résistantes au fluconazole

(CAAL 28 : souche à retester)

## Annexe 2 : Protocole d'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* sur

### *Candida sp.*

#### 1) OBJET

Déterminer l'activité antifongique de molécules chimiques, ou d'extraits d'origine naturelle, sur *Candida sp. in vitro*, révélée grâce à la réduction de la résazurine en un dérivé fluorescent. Cette réaction est directement proportionnelle à l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire, soit au nombre de cellules vivantes. Cette détection est réalisée au spectrofluorimètre.

#### 2) MATERIEL

- Microplaque de 96 puits
- Cellule de Malassez (ou hématimètre)
- Microscope objectif x40
- Spectrofluorimètre (Dynetech, Flurolite 1000)

#### 3) REACTIFS ET MILIEUX

- Milieu RPMI 1640 avec L-Glutamine (Bio Whittaker France, ref 12702 F) = M<sub>1</sub> . en 145 armoire grise réfrigérée- Porte liquide
- Milieu M<sub>2</sub> :
  - ✓ RPMI 1640 avec L-Glutamine (Bio Whittaker France, ref 12702 F)
  - ✓ MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonique acide) (Sigma, ref M3183) à 0.33M ou 69.06g/L – en 140-armoire 4-porte gauche-bac G-N
  - ✓ Glucose (Merck, ref 8337) à 4% (m/v) - en 140 –armoire 1- étagère G
  - ✓ Ajuster au pH 7
  - ✓ Filtrer à 0.22µm sur filtre Stéricup
- Sérum physiologique stérile (NaCl 9‰)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma D4540), réserve en 140-armoire 3-porte de gauche, aliquot sous chaque PSM
- Sérum physiologique stérile additionné de Tween 80 à 0,01% (v/v)
- Résazurine (Sigma R7017), réserve en 140-frigo F5-Bac Q-S, aliquots de 1ml à 7mM dans H<sub>2</sub>O stérile dans le congélateur C5 en 145. Prévoir une dilution à 700µM avec H<sub>2</sub>O stérile à mettre à +4°C dans les différents laboratoires L2 respectifs)

#### 4) MODE OPERATOIRE

##### Préparation des molécules

- Préparer une solution mère de la solution à tester dans du DMSO ou autre solvant (éthanol, H<sub>2</sub>O stérile...) :
    - pour un extrait, préparer une solution à 10 mg/mL
    - pour une substance de masse moléculaire connue, préparer une solution à 10 mM.
- Faire une gamme en DMSO 100 fois plus concentrée que la gamme finale désirée :

Etape	Concentration en mM ou mg/mL DMSO	source	Volume échantillon $\mu\text{L}$	Volume DMSO $\mu\text{L}$	Conc. Intermédiaire DMSO mM ou mg/mL	Conc. $\mu\text{M}$ ou $\mu\text{g/mL}$ après dilution au 1/50 <sup>ème</sup> avec le milieu <b>MSC</b>	Conc. Final dans les puits en $\mu\text{M}$ ou mg/mL
Sm	10	Sm	200	0	10	200	100
S1	10	Sm	10	90	1	20	10
S2	1	S1	10	90	0,1	2	1

### Dilution au 1/50<sup>ème</sup> pour 1 plaque

Volume nécessaire :

On a besoin de  $100 \mu\text{L/puits} \times 3\text{puits/conc} \times 1\text{ plaque} = 300\mu\text{L}$

Volume de la dilution préparée est de  $500\mu\text{L}$

Soit  $10\mu\text{L}$  de la solution intermédiaire +  $490\mu\text{L}$  de milieu **M<sub>2</sub>**

**Prévoir une ou plusieurs molécules référence : le Fluconazole** : pour les souches sensibles la conc finales est à 1-0.1-0.01 $\mu\text{M}$ , pour les résistantes à 100-10-1 $\mu\text{M}$ , **le Voriconazole** à 10-1-0.1 $\mu\text{M}$ .

### Dans une plaque de 96 puits :

- Déposer dans les puits,  $100 \mu\text{L}$  de chaque concentration des composés à évaluer en triplicate.
- Conserver 3 puits pour le blanc de lecture (T<sup>-</sup>) et les remplir avec  $100 \mu\text{L}$  de milieu **M<sub>1</sub>**
- Conserver 3 puits pour le témoin de croissance normale (T+ Témoins positifs) et les remplir avec  $100 \mu\text{L}$  de milieu **M<sub>1</sub>**
- Ajouter  $200 \mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O osmosée stérile dans les puits périphériques

Plan de plaque classique conseillé :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	x	1	10	100	1	10	100	1	10	100		x
C	x		Molécule1			Molécule3			Molécule5		T+	x
D	x											x
E	x											x
F	x		Molécule2			Molécule4			Molécule6		T-	x
G	x	1	10	100	1	10	100	1	10	100		x
H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

**Congeler à -80°C les plaques, maximum 6 mois.**

### - Préparation de la suspension

- Prévoir un repiquage n°2 à partir de la souche n°1, la mettre 24h à 37°C
- Mettre une suspension cellulaire de la souche n°2 dans 1 mL de solution de sérum physiologique et de Tween 80 à 0,01%. Prévoir une dilution au 1/100<sup>ème</sup> dans le sérum + Tween 80 ( $>10^4$  cellules/mL)

En faire un dénombrement précis en cellule de Malassez

- Préparer une suspension de *Candida sp.* à environ  $10^3$  cellules/mL, ou  $5 \cdot 10^3$  pour certaines espèces avec le milieu **M<sub>1</sub>**
- Déposer 100  $\mu$ L de la suspension cellulaire dans les puits d'une microplaque 96 puits (conserver 3 puits pour le blanc de lecture).
- Ajouter 100  $\mu$ L de milieu **M<sub>1</sub>** dans les puits pour le blanc de lecture ( T<sup>-</sup> )
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Ajouter 10  $\mu$ L de résazurine (700  $\mu$ M) dans chaque puits et incuber à 37°C pendant 3-4 heures.
- Lecture de la plaque au spectrofluorimètre (filtre d'excitation 530 nm, filtre d'émission 590 nm).
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en calculant la CI<sub>50</sub> pour chaque composé

## **Annexe 3 : Protocole d'évaluation de l'activité antifongique *in vitro* sur *Aspergillus sp.***

### **1) OBJET**

Déterminer l'activité antifongique de molécules chimiques, ou d'extraits d'origine naturelle, sur *Candida sp. in vitro*, révélée grâce à la réduction de la résazurine en un dérivé fluorescent. Cette réaction est directement proportionnelle à l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire, soit au nombre de cellules vivantes. Cette détection est réalisée au spectrofluorimètre.

### **2) MATERIEL**

- Microplaque de 96 puits
- Cellule de Malassez (ou hématimètre)
- Microscope objectif x40
- Spectrofluorimètre (Dynetech, Flurolite 1000)

### **3) REACTIFS ET MILIEUX**

- Milieu RPMI 1640 avec L-Glutamine (Bio Whittaker France, ref 12702 F) = M<sub>1</sub> . *en 145 armoire grise réfrigérée- Porte liquide*
- Milieu M<sub>2</sub> :
  - ✓ RPMI 1640 avec L-Glutamine (Bio Whittaker France, ref 12702 F)
  - ✓ MOPS (3-[N-Morpholino]propanesulfonique acide) (Sigma, ref M3183) à 0.33M ou 69.06g/L – *en 140-armoire 4-porte gauche-bac G-N*
  - ✓ Glucose (Merck, ref 8337) à 4% (m/v) - *en 140 –armoire 1- étagère G*
  - ✓ Ajuster au pH 7
  - ✓ Filtrer à 0.22µm sur filtre Stéricup
- Sérum physiologique stérile (NaCl 9‰)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma D4540), *réserve en 140-armoire 3-porte de gauche*, aliquot sous chaque PSM
- Sérum physiologique stérile additionné de Tween 20 à 0,1% (v/v)
- Résazurine (Sigma R7017), *réserve en 140-frigo F5-Bac Q-S*, aliquots de 1ml à 7mM dans H<sub>2</sub>O stérile dans le *congélateur C5 en 145*. Prévoir une dilution à 700µM avec H<sub>2</sub>O stérile à mettre à +4°C dans les différents laboratoires L2 respectifs)

### **4) MODE OPERATOIRE**

#### **Préparation des Molécules**

- Préparer une solution mère de la solution à tester dans du DMSO ou autre solvant (éthanol, H<sub>2</sub>O stérile...) :
    - pour un extrait, préparer une solution à 10 mg/mL
    - pour une substance de masse moléculaire connue, préparer une solution à 10 mM.
- Faire une gamme en DMSO 100 fois plus concentrée que la gamme finale désirée :

Etape	Concentration source en mM ou mg/mL DMSO	source	Volume échantillon $\mu\text{L}$	Volume DMSO $\mu\text{L}$	Conc. Intermédiaire DMSO mM ou mg/mL	Conc. $\mu\text{M}$ ou $\mu\text{g/mL}$ après dilution au $1/50^{\text{ème}}$ avec le milieu <b>MSC</b>	Conc. Final dans les puits en $\mu\text{M}$ ou $\mu\text{g/mL}$
Sm	10	Sm	200	0	10	200	100
S1	10	Sm	10	90	1	20	10
S2	1	S1	10	90	0,1	2	1

### Dilution au $1/50^{\text{ème}}$ pour 1 plaque

Volume nécessaire :

On a besoin de  $100\mu\text{L}/\text{puits} \times 3\text{puits}/\text{conc} \times 1\text{ plaque} = 300\mu\text{L}$

Volume de la dilution préparée est de  $500\mu\text{L}$

Soit  $10\mu\text{L}$  de la solution intermédiaire +  $490\mu\text{L}$  de milieu **M<sub>2</sub>**

**Prévoir une ou plusieurs molécules référence : Amphotéricine B** : pour les souches sensibles la conc finales est à  $1-0.1-0.01\mu\text{M}$ , pour les résistantes à  $100-10-1\mu\text{M}$ , le **Voriconazole** à  $10-1-0.1\mu\text{M}$ .

### Dans une plaque de 96 puits :

- Déposer dans les puits,  $100\mu\text{L}$  de chaque concentration des composés à évaluer en triplicate.
- Conserver 3 puits pour le blanc de lecture ( $T^-$ ) et les remplir avec  $100\mu\text{L}$  de milieu **M<sub>1</sub>**
- Conserver 3 puits pour le témoin de croissance normale ( $T+$  Témoins positifs) et les remplir avec  $100\mu\text{L}$  de milieu **M<sub>1</sub>**
- Ajouter  $200\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  osmosée stérile dans les puits périphériques

Plan de plaque classique conseillé :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
B	x	1	10	100	1	10	100	1	10	100		x
C	x		Molécule1			Molécule3			Molécule5		T+	x
D	x											x
E	x											x
F	x		Molécule2			Molécule4			Molécule6		T-	x
G	x	1	10	100	1	10	100	1	10	100		x
H	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

**Congeler à  $-80^\circ\text{C}$  les plaques, maximum 6 mois.**

### Préparation de la suspension

- Prévoir un repiquage n°2 à partir de la souche n°1, la mettre 48h à 96 h à  $37^\circ\text{C}$

- Mettre une suspension cellulaire de la souche n°2 dans 1 mL de solution de sérum physiologique et de Tween 20 à 0,1%. Prévoir une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  dans le sérum + Tween 20 ( $>10^5$  spores/ml)

En faire un dénombrement précis en cellule de Malassez

- Préparer une suspension de spores à environ  $2.10^4$  spores/mL avec le milieu **M<sub>1</sub>**

- Déposer  $100\mu\text{L}$  de la suspension cellulaire dans les puits d'une microplaque 96 puits (conserver 3 puits pour le blanc de lecture).



- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de milieu  $\mathbf{M}_1$  dans les puits pour le blanc de lecture (  $T^-$  )
- Incuber à 37 °C pendant 24 heures.
- Ajouter 10  $\mu\text{L}$  de résazurine (700  $\mu\text{M}$ ) dans chaque puits et incuber à 37°C pendant 15 à 20 heures.
- Lecture de la plaque au spectrofluorimètre (filtre d'excitation 530 nm, filtre d'émission 590 nm).
- Déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) en calculant la  $CI_{50}$  pour chaque composé

**Vu, le Président du jury,**

Pr Pascal MARCHAND

**Vu, le Directeur de thèse,**

Dr Marc-Antoine BAZIN

**Vu, le Directeur de l'UFR,**

Pr Gaël Grimandi

UNIVERSITÉ DE NANTES

Année de la soutenance : 2017

---

Nom - Prénoms : YVORRA Thomas

Titre de la thèse : Synthèse et évaluation biologique d'imidazo[1,2-*a*]pyrazines à propriétés antifongiques

---

Résumé de la thèse : Dans le cadre d'un travail de recherche mené au laboratoire IICiMed, une activité antifongique originale a été identifiée chez des molécules à structure chimique imidazo[1,2-*a*]pyrazine. Pour ce faire, près de 40 analogues chimiques ont été synthétisés puis testés, pour la plupart d'entre eux, au cours d'un screening biologique *in vitro* sur *Candida spp.* et *Aspergillus fumigatus*. Un large spectre d'activité a été mis en évidence chez huit molécules, y compris chez des souches de *Candida spp.* résistantes au fluconazole. Ces résultats offrent de nombreuses opportunités de recherche tant sur le plan chimique (modulations chimiques) que biologique (recherche de la cible fongique). Ce projet donne ainsi un exemple concret de stratégie de drug discovery dans le domaine des antifongiques visant à répondre au besoin urgent de mise sur le marché de nouvelles molécules indiquées dans le traitement des infections fongiques invasives.

---

**MOTS CLÉS : INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES, MEDICAMENTS ANTIFONGIQUES, IMIDAZO[1,2-*a*]PYRAZINES, CHIMIE MEDICINALE**

---

JURY

PRÉSIDENT : Mr Pascal MARCHAND, Professeur de Chimie Organique  
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : Mr Marc-Antoine BAZIN, Maître de Conférences en Chimie Thérapeutique,  
Faculté de Pharmacie de Nantes

Mme Nidia ALVAREZ-RUEDA, Maître de Conférences en Parasitologie-  
Mycologie Médicale, Faculté de Pharmacie de Nantes

Mr Jacques RENAULT, Maître de Conférences en Chimie Thérapeutique,  
Faculté de Pharmacie de Rennes

---

Adresse de l'auteur : 2 rue de la Saône, 75014 Paris