

Évaluation de l'activité antimicrobienne de nouveaux composés aminostéroïdiens dans le contexte de la mucoviscidose

Soutenance de thèse d'université

ALHANOUT Kamel

22/06/2010

URMITE UMR 6236, CNRS-IRD , Facultés de Médecine et
de Pharmacie, Marseille

Sous la direction du:

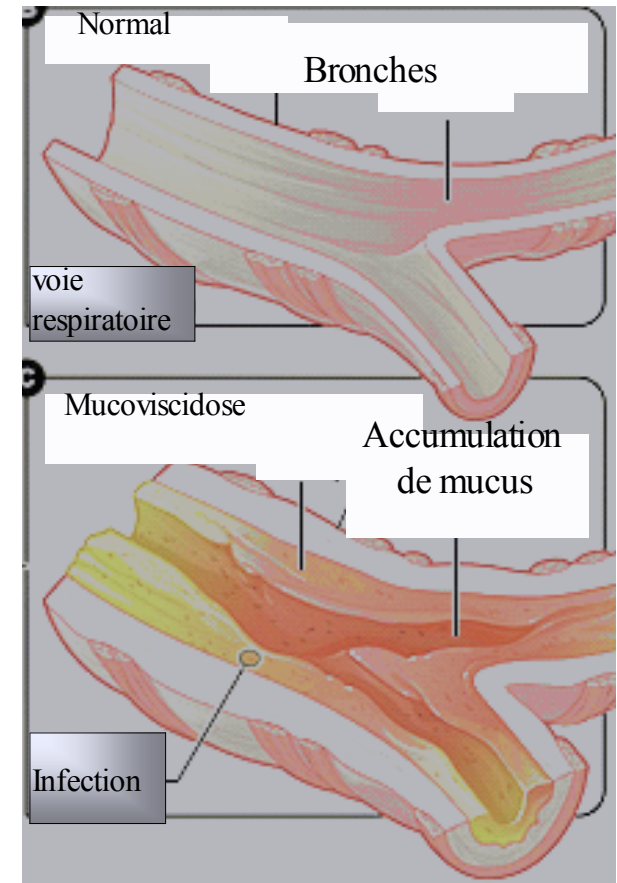
Pr. JM. Rolain

Dr. JM. Brunel

Introduction

La mucoviscidose (MV)

- MV est une maladie génétique altérant la fonction pulmonaire: **micro- environnement pulmonaire favorisant les infections fongiques et bactériennes.**
- La morbidité et la mortalité sont liées principalement à ces infections.
- Bactéries de type *S. aureus* et *P. aeruginosa* - Champignons de type *A. fumigatus*, *A. terreus*, *S. prolificans* et *C. albicans*. (Pihet *et al*, Med Mycol. 2009)
- **Administration locale des antibiotiques.** (Geller DE, Respir Care. 2009)
- Problème de multi-résistance => Besoin de nouveaux agents antimicrobiens



Introduction

La squalamine

Découverte de la squalamine: M. Zasloff, 1993

- Recherche de nouveaux produits antimicrobiens
- Système immunitaire du requin
- Dogfish shark *Squalus acanthias* (Brunel et al, Curr Cancer Drug Targets. 2005)
- Structure:

Noyau stéroïdien

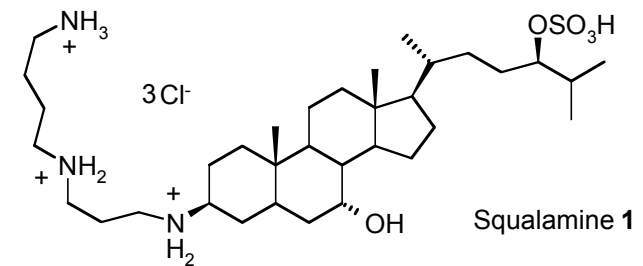
Chaîne polyamine

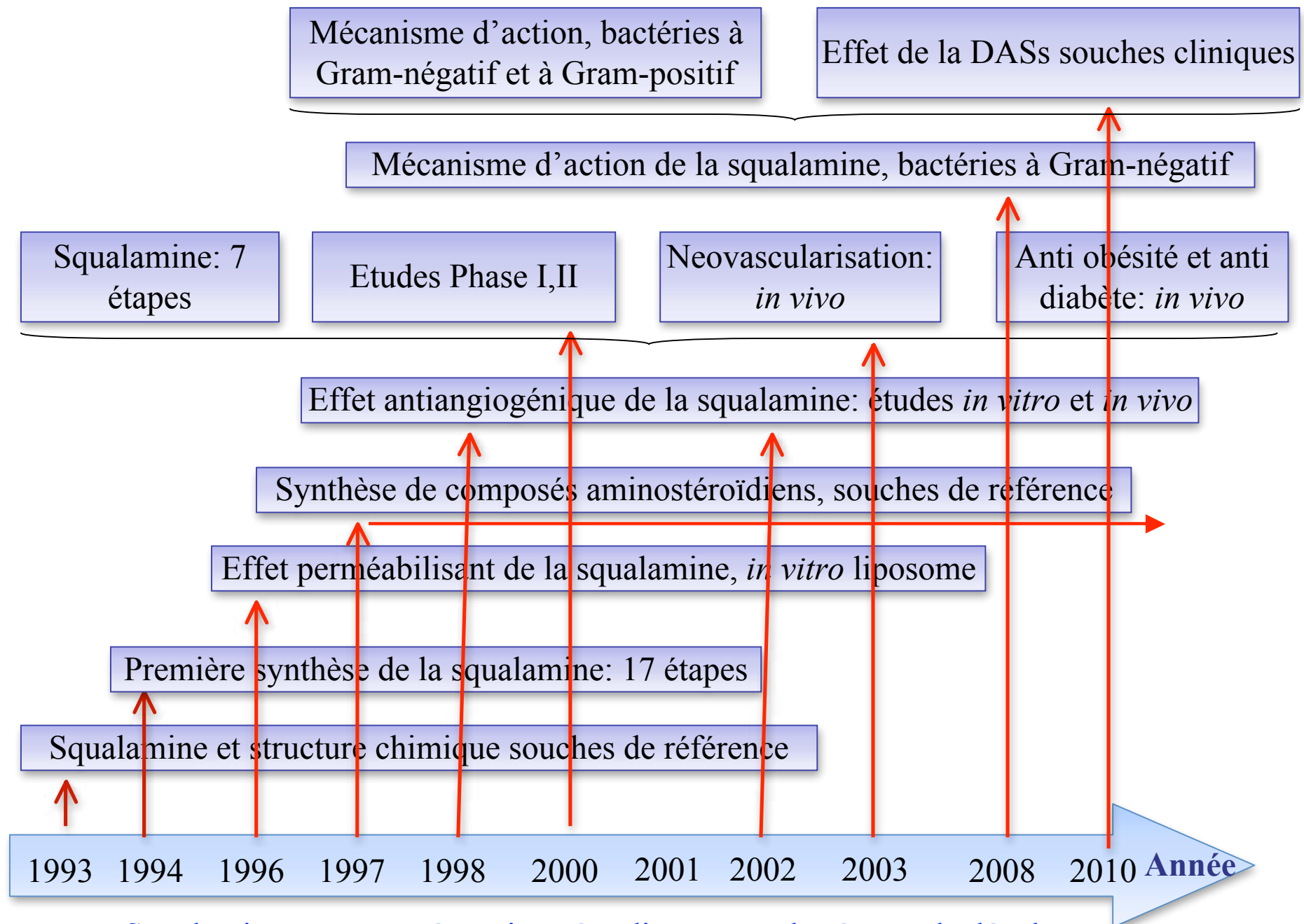
Groupelements sulfate et hydroxyle

- Propriétés: (Brunel et al, Curr Cancer Drug Targets. 2005)
 - ✓ **Antimicrobiennes- *in vitro***
 - ✓ **Inhibition de l'angiogénèse - Phase II**



Squalus acanthias





Squalamine et composés aminostéroïdiens: grandes étapes de développement

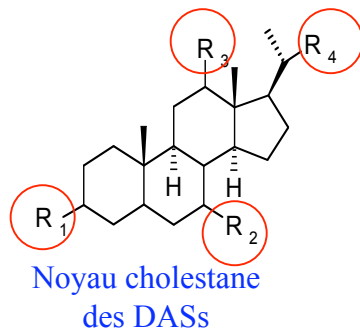
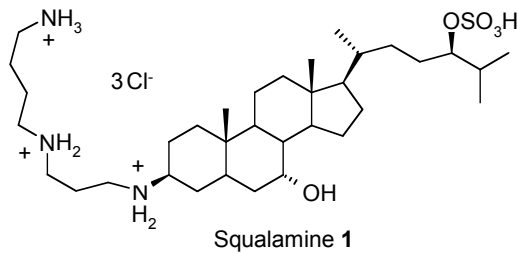
4

Introduction

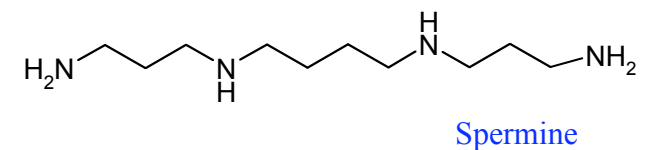
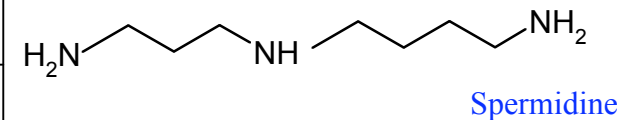
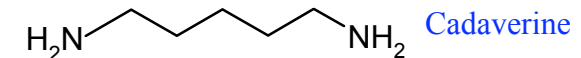
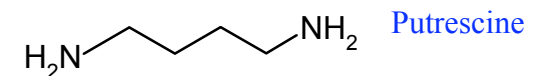
Effet antimicrobien

Dérivés aminostéroïdiens (DASs)

- Alternative: aminostéroïls synthétiques: (Salmi et al Expert Opin Investig Drugs. 2007)
- Nombreux composés



$R_1=R_2=H, R_3=OH, R_4:CO\text{-spermine}$
$R_1=R_2=H, R_3=OH, R_4=CO\text{-putrescine}$
$R_1=R_2=R_3=H, R_4=CO\text{-spermidine}$
$R_1=OH, R_2=R_3=H, R_4=CO\text{-spermine}$
$R_1=R_2=OH, R_3=H, R_4=CO\text{-spermine}$
$R_1=R_2=R_3=OH, R_4=CO\text{-spermine}$
$R_1=OH, R_2=NH_2, R_3=R_4=H$
$R_1=OH, R_3=R_4=H, R_2= \text{putrescine}$
$R_1=OH, R_3=R_4=H, R_2= \text{cadaverine},$
$R_1=OH, R_3=R_4=H, R_2= 1,12 \text{ diamine}$



Introduction

Activité antimicrobienne de DASs

- Souches de référence de champignons et de bactéries.
- Large spectre d'activité antimicrobien
- Concentration minimale inhibitrice (CMI) relativement élevée: Exemple

CMIs mg/L							
Dérivés	Bactéries à Gram-positif			Bactéries à Gram-négatif			Champignons
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6305	<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	<i>E. coli</i> ATCC25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 27853	<i>A. fumigatus</i> H1120
Squalamine	2	-	-	1-2	4-8	-	-
1	1.56	3.13	0.78	3.13	3.13	3.13	12.5
2	25	25	6.25	50	100	50	50
3	3.13	0.78	3.13	3.13	12.5	6.25	3.13
4	0.78	3.13	0.78	1.56	0.78	> 100	12.5
5	1.56	3.13	0.78	3.13	3.13	3.13	12.5
6	6.25	25	3.13	25	25	>100	25

Introduction

Mécanisme d'action antibactérien de DASs

- *Salmi et al*, PLoS One. 2008 Jul 23;3(7):e2765.
- Mécanisme d'action de la squalamine contre les bactéries à Gram-négatif
- Questions:
 - Relation squalamine-autres antibiotiques
 - Effet de la squalamine sur les membranes bactériennes
 - Interaction avec le LPS.
- Résultats:
 - ✓ Relation squalamine-polymyxin B.
 - ✓ La squalamine induit un efflux d'ATP intracellulaire et une perméabilité aux colorants « membrano-imperméables »
 - ✓ Ces effets sont inhibés par les cations divalents seulement.

Conclusion:

La squalamine agit en perturbant l'intégrité de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif après interaction avec les LPSs .

Introduction

- Effets de DASs contre des souches cliniques?
- Mécanisme d'action antibactérien de la squalamine
Bactéries à Gram-positif?
- Mécanisme d'action antifongique?
- Toxicité de DASs?
- Activité *In vivo* ...

Article 1: Revue

Aminosterols as a new class of antimicrobial agents: a critical review

Kamel Alhanout, Jean Marc Rolain and Jean Michel Brunel*

Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes
(URMITE) UMR 6236 CNRS, Faculté de Pharmacie et de Médecine, Université
de la Méditerranée, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille 05, France.

* Corresponding author, e-mail: bruneljm@yahoo.fr.

Soumis à Current Medicinal Chemistry

Objectif

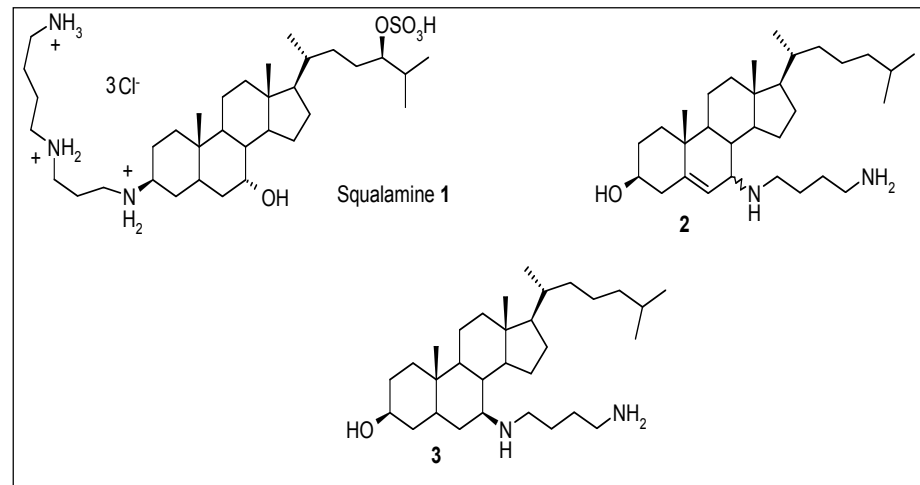
Partie I

Activité antimicrobienne de la squalamine et de deux DASs synthétisés dans notre laboratoire (**2-3**) vis-à-vis de:

- 135 souches bactériennes **cliniques**
 - 47 souches **cliniques** de champignons filamenteux
- } **Isolées de patients atteints de MV**
- 25 souches **cliniques** de levures impliquées dans des fongémies

Partie II

Mécanisme d'action antibactérien

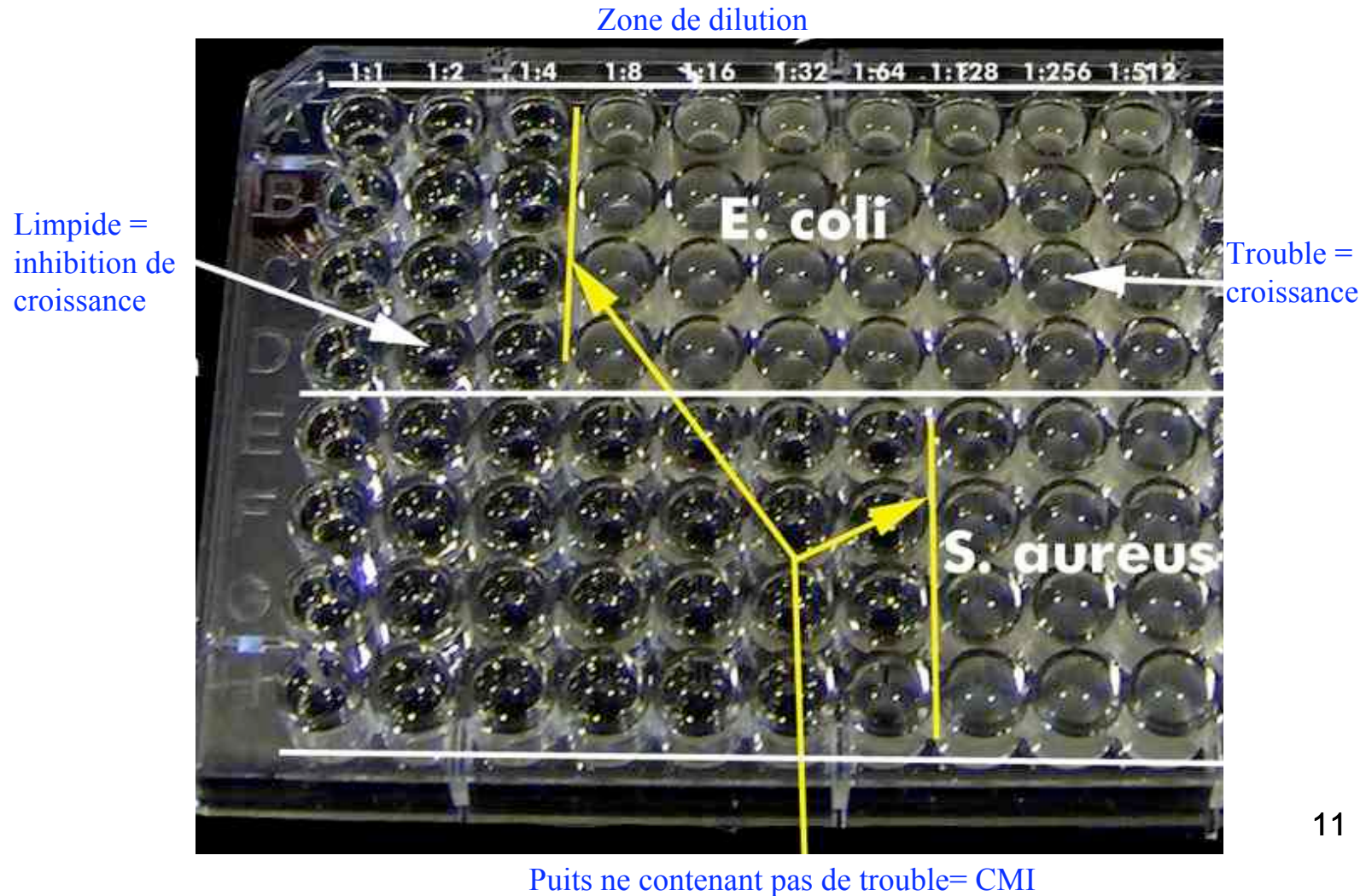


Structure de la squalamine et de DASs 2-3

❖ Matériel et Méthodes

1- Évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro*

- ❖ Détermination des CMI par la méthode de référence de microdilution : BSAC: Bactéries, NCCLS: Champignons => CMI: La plus faible concentration inhibant la croissance bactérienne ou fongique en comparaison avec le contrôle de croissance.



2- Identification des bactéries et des champignons:

Méthodes phénotypiques et moléculaires : 16S rRNA et/ou *rpoB* pour les bactéries et ITS (internal transcribed spacer) pour les champignons

3- Mécanisme d'action antibactérien

❖ Effet de la squalamine et de la colistine sur les membranes bactériennes:

Souches testées : *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*

➤ Microscopie Electronique en Transmission (MET)

➤ Mesure de cinétiques d'efflux d'ATP intracellulaire : Méthode de bioluminescence

➤ Dépolarisation membranaire: Spectrophotométrie à fluorescence

4- Études de survie (Time-kill assays) :

Squalamine, DAS, colistine, amphotericine B: Bactéries et champignons

5- *In vitro* Toxicité:

Activité hémolytique de DASs.

Partie I

- Activité antimicrobienne des aminostérols

Article 2

Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2009) **64**, 810–814
doi:10.1093/jac/dkp281
Advance Access publication 7 August 2009

JAC

***In vitro* antibacterial activity of aminosterols against multidrug-resistant bacteria from patients with cystic fibrosis**

Kamel Alhanout, Jean-Michel Brunel, Didier Raoult and Jean-Marc Rolain*

*URMITE UMR 6236, CNRS-IRD, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin,
13385 Marseille cedex 05, France*

DASs et bactéries à Gram-négatif

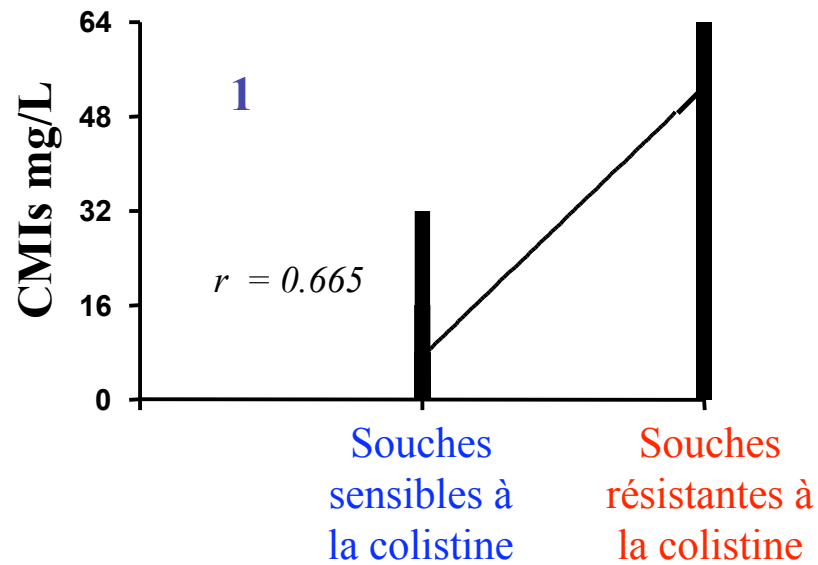
Effet du caractère mucoïde sur l'activité des DASs

	Souches	N°	CMI's (mg/L)			
			Sq	DAS1	DAS2	Colistine
 <u>Bactéries non mucoïdes à Gram-négatif</u>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	2-8	2-8	2-8	0.5-1
	<i>Haemophilus influenzae</i>	6	4-8	4-8	4	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	8	16	4	0.5-1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	8	16	4	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	16	16	16	2
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	16	16	16	2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	16	16	8-16	4
<u>Bactéries mucoïdes à Gram-négatif</u> 	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	16-32	16-32	16-32	4
	<i>Burkholderia cepacia</i>	2	16-64	16-64	128	64
	<i>Inquilinus limosus</i>	5	16-64	16-64	128	32
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	32	32	64	64
	<i>Serratia marcescens</i>	2	32	32	32	16
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	15	64	64	128	16

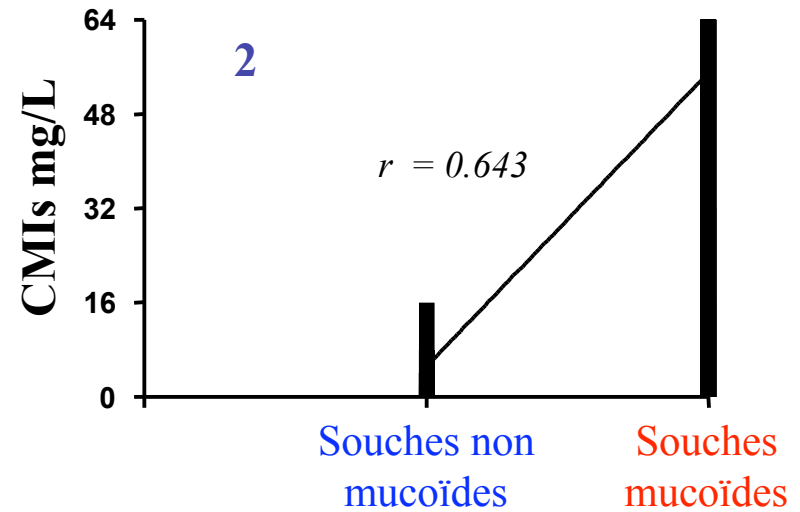
Effet de la résistance à la colistine sur l'activité des DASs

	Souches	N°	CMI (mg/L)			
			Sq	DAS1	DAS2	Colistine
<u>Bactéries à Gram-négatif sensibles à la colistine</u> CMI ≤ 4 mg/L	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	2-16	2-16	2-16	0.5-4
	<i>Haemophilus influenzae</i>	6	4-8	4-8	4	2
	<i>Escherichia coli</i>	3	8	16	4	0.5-1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	8	16	4	4
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	16	16	16	2
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	16	16	16	2
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5	16	16	8-16	4
<u>Bactéries à Gram-négatif résistantes à la colistine</u> CMI > 4 mg/L	<i>Burkholderia cepacia</i>	2	16-64	16-64	128	64
	<i>Inquilinus limosus</i>	5	16-64	16-64	128	32
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	32	32	64	64
	<i>Serratia marcescens</i>	2	32	32	32	16
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	15	64	64	128	16

Analyse statistique



Effet de la résistance à la colistine



Effet du phénotype mucoïde

Même mécanisme d'action?

DASs et bactéries à Gram-positif

Activités antibactériennes de DASs vis-à-vis des bactéries à Gram-positif

	Souches	N°	CMI _s (mg/L)		
			SQ	DAS1	DAS2
Bactéries à Gram-positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	33	2-8	0.5-4	2-8
	<i>Corynebacterium spp</i>	8	2-4	2-4	2-4
	<i>Nocardia spp</i>	2	4	4	8
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	32	32	32

- Les souches de *S. aureus* contenaient des isolats résistants à l'oxacilline
- Deux souches de *S. pneumoniae* avec des CMI_s élevées (capsulées).

Conclusions:

- ✓ Première étude évaluant l'activité antibactérienne de DASs contre des souches cliniques isolées de patients atteints de MV
- ✓ Le phénotype mucoïde, la résistance à la colistine et la présence de capsule réduisent l'activité des DASs: **originalité par rapport aux travaux précédents utilisant des souches de références**
- ✓ Corrélation significative: colistine + DASs: **même mécanisme d'action?**
- ✓ DASs actifs contre bactéries à Gram-positif : **nouveau mécanisme d'action?**
- ✓ CMI relativement élevées: utilisation **par voie locale** comme par exemple, **sous forme d'aérosol**.

Article 3: Correspondance

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkq089

***In vitro* antifungal activity of aminosterols against moulds isolated from cystic fibrosis patients**

**Kamel Alhanout, Jean Michel Brunel, Stéphane Ranque
and Jean Marc Rolain***

*URMITE UMR 6236, CNRS-IRD, Faculté de Médecine et de
Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05,
France*

DASs et champignons filamenteux

Souches	N°	CMI's mg/L					
		Sq	DAS 1	AMB	ITC	VRC	CAS
<i>Aspergillus fumigatus</i> complex	10	8-16	4	1-2	2	1-2	<0.5-1
<i>Aspergillus niger</i> complex	2	16	4	1	1	2	<0.5
<i>Aspergillus flavus</i> complex	8	8-16	2-4	<0.5-1	1-2	<0.5-1	1
<i>Aspergillus terreus</i> complex	5	8	4	8->32	16->32	<0.5	<0.5
<i>Aspergillus ustus</i> complex	1	16	2	2	>32	16	16
<i>Penicillium griseofulvum</i>	2	8	2	8	>32	16	16
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	2	16	4	2	>32	8	16
<i>Alternaria triticina</i>	1	8	4	<0.5	2	2	2
<i>Fusarium proliferatum</i>	2	16	2-4	>32	>32	16	16
<i>Scedosporium prolificans</i>	1	16	2	>32	>32	>32	16
<i>Pseudallescheria boydii</i>	2	16	4	8	16	16	8
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1	8	2	>32	16	16	16

AMB: Amphotéricine B, ITC: itraconazole, VRC: voriconazole, CAS: caspofungine

Conclusions

- ✓ Première étude évaluant l'activité antifongique de DASs contre des souches cliniques de champignons filamenteux isolées de patients atteints de MV
- ✓ Les DASs ont montré une activité homogène contre l'ensemble de souches testées alors que les antifongiques classiques ont présenté des activités hétérogènes.
- ✓ Nouveau mécanisme d'action ?
- ✓ Développement sous forme d'aérosol

Article 4

***In vitro* antifungal activity of aminosterols derivatives against yeast isolates from blood cultures.**

Kamel Alhanout^a, Jean Michel Brunel, Lamia Djouhri, Stéphane Ranque^{a,b*}

a. URMITE UMR 6236, CNRS-IRD, Faculté de Médecine et de Pharmacie, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France.

b. Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, AP-HM Timone, 264 Boulevard Saint Pierre, 13385 Marseille cedex 05, France.

Medical Mycology: sous presse

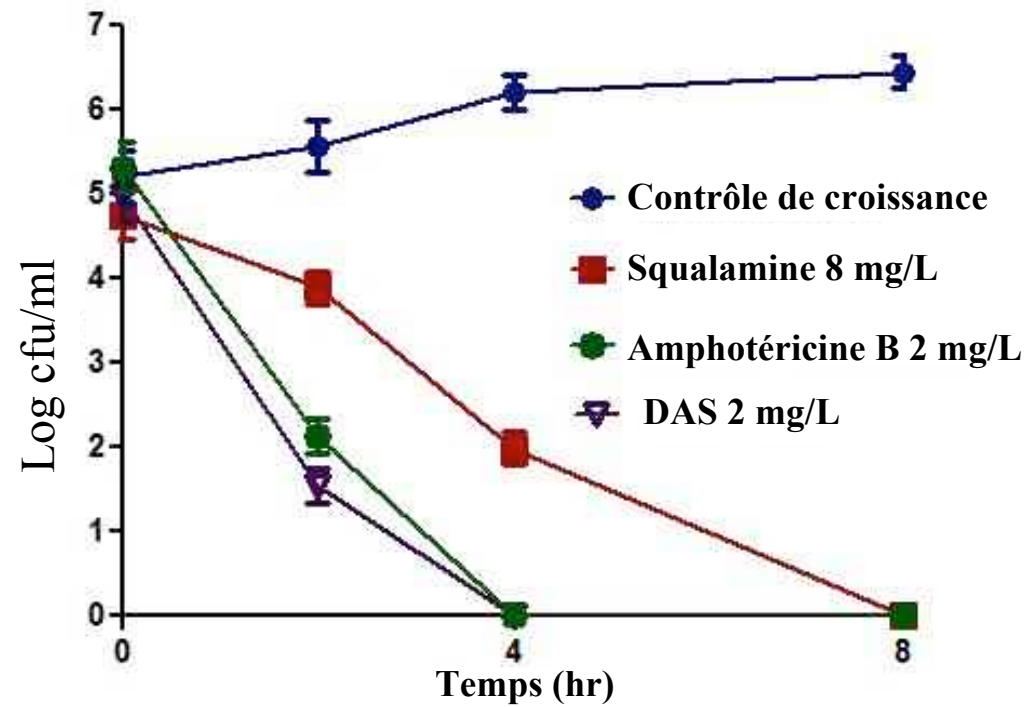
DASs et souches cliniques de levures

Souches	CMI (mg/L)						
	Squalamine	DAS	AMB	FLC	ITC	VRC	CSN
<i>Candida tropicalis</i>	16	1	1	2	1	1	<0.5
<i>Candida tropicalis</i> AB437087	---	---	---	---	---	---	---
<i>Candida tropicalis</i>	16	1	2	2	1	1	<0.5
<i>Candida tropicalis</i>	16	1	2	2	1	1	<0.5
<i>Candida albicans</i>	16	2	<0.5	1	1	<0.5	<0.5
<i>Candida albicans</i>	16	2	1	1	1	<0.5	<0.5
<i>Candida albicans</i> 90028	16	2	1	<0.5	1	<0.5	<0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	16	1	2	<0.5	4	1	2
<i>Candida parapsilosis</i>	16	1	4	1	>32	1	2
<i>Candida parapsilosis</i> 22019	16	1	1	<0.5	1	1	<0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	16	1	4	1	1	1	<0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	16	1	2	<0.5	>32	1	<0.5
<i>Candida parapsilosis</i>	16	1	2	1	>32	1	<0.5
<i>Candida guilliermondii</i>	8	2	<0.5	2	2	<0.5	16
<i>Candida guilliermondii</i> FJ515181	---	---	---	---	---	---	---
<i>Candida lusitanae</i>	8	1	1	1	<0.5	1	1
<i>Candida lusitanae</i> EF136370	---	---	---	---	---	---	---
<i>Candida lusitanae</i>	16	1	<0.5	1	<0.5	1	1
<i>Candida lusitanae</i>	16	1	<0.5	1	<0.5	1	1
<i>Candida krusei</i>	8	2	4	>32	>32	1	<0.5
<i>Candida krusei</i>	8	2	4	>32	>32	1	<0.5
<i>Candida krusei</i>	8	2	4	>32	>32	1	<0.5
<i>Candida krusei</i> 6258	8	2	2	4	16	2	<0.5
<i>Cryptococcus neoformans</i> FJ011544	---	---	---	---	---	---	---
<i>Cryptococcus neoformans</i>	16	1	1	>32	16	2	>32
<i>Cryptococcus neoformans</i>	16	1	1	>32	16	2	>32
<i>Candida glabrata</i> 90028	8	2	2	1	2	<0.5	1
<i>Candida glabrata</i>	8	2	2	16	4	4	1
<i>Candida glabrata</i>	8	2	2	16	4	4	1
<i>Ornithonyssus bacoti</i> AM903318	---	---	---	---	---	---	---
Concentration hémolytique (mg/L)		90	40	---	---	---	---

AMB: Amphotéricine B, ITC: itraconazole, VRC: voriconazole, CAS: caspofungine

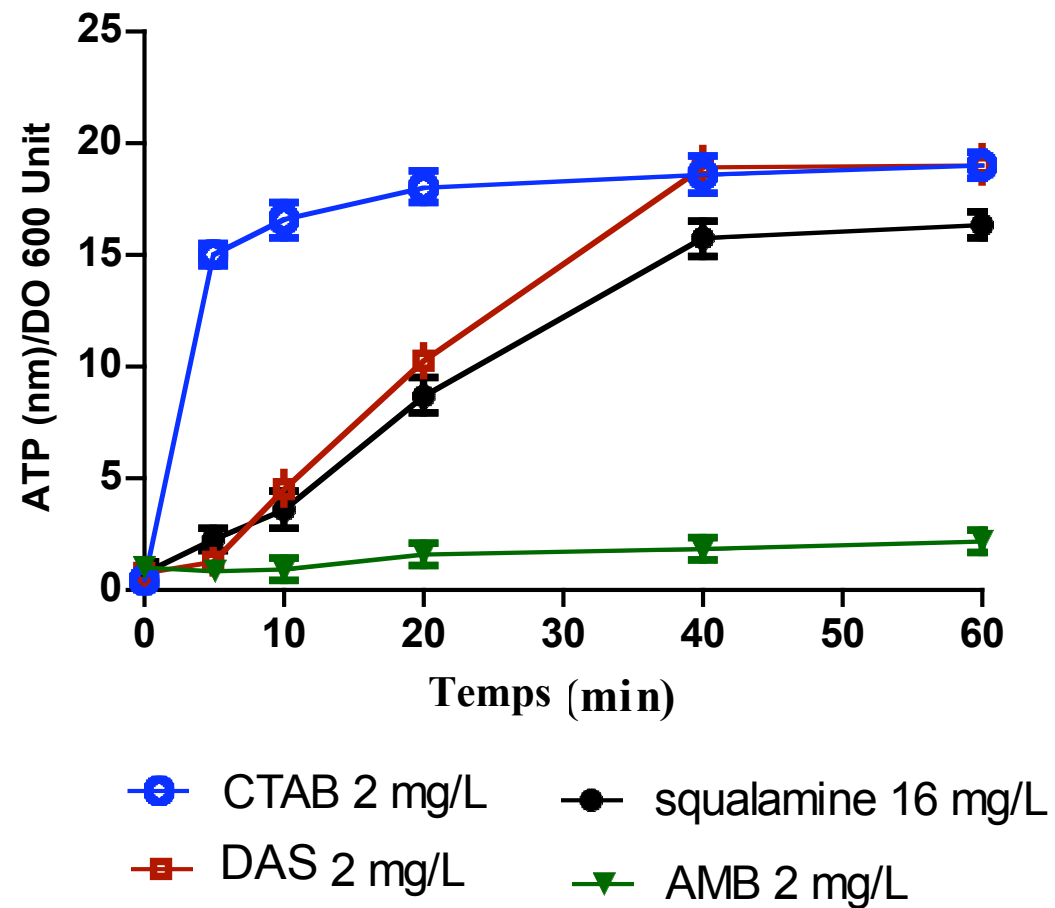
Éléments mécanistiques

✓ Effet fongicide de DASs? étude de survie (Time-kill study): *C. albicans* ATCC 90028



Éléments mécanistiques

Effet de DASs sur la membrane fongique: efflux d'ATP de *C. albicans* ATCC 90028



Conclusions:

- ✓ Activité homogène de DASs à l'opposé des antifongiques classiques.
- ✓ Le mécanisme d'action antifongique des DAS: **original**
- ✓ Perturbation de l'intégrité de la membrane cellulaire des levures
- ✓ Toxicité: **vérifier *in vivo***

Partie II

Analyse du mécanisme d'action antibactérien de la squalamine

Article 5

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkq213

New insights into the antibacterial mechanism of action of squalamine

Kamel Alhanout¹, Soazig Malesinki², Nicolas Vidal³, Vincent Peyrot², Jean Marc Rolain¹ and Jean Michel Brunel^{1*}

¹Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Émergentes URMITE UMR 6236 CNRS, Faculté de Pharmacie et de Médecine, Université de la Méditerranée, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille 05, France; ²CRO2, U911 INSERM, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille 05, France; ³UPCAM iSm2, Case 342, Université Paul Cézanne, Av. Escadrille Normandie Niemen, 13397 Marseille cedex 13, France

*Corresponding author. Tel: +33-4-86-13-68-30; Fax: +33-4-91-38-77-72; E-mail: bruneljm@yahoo.fr

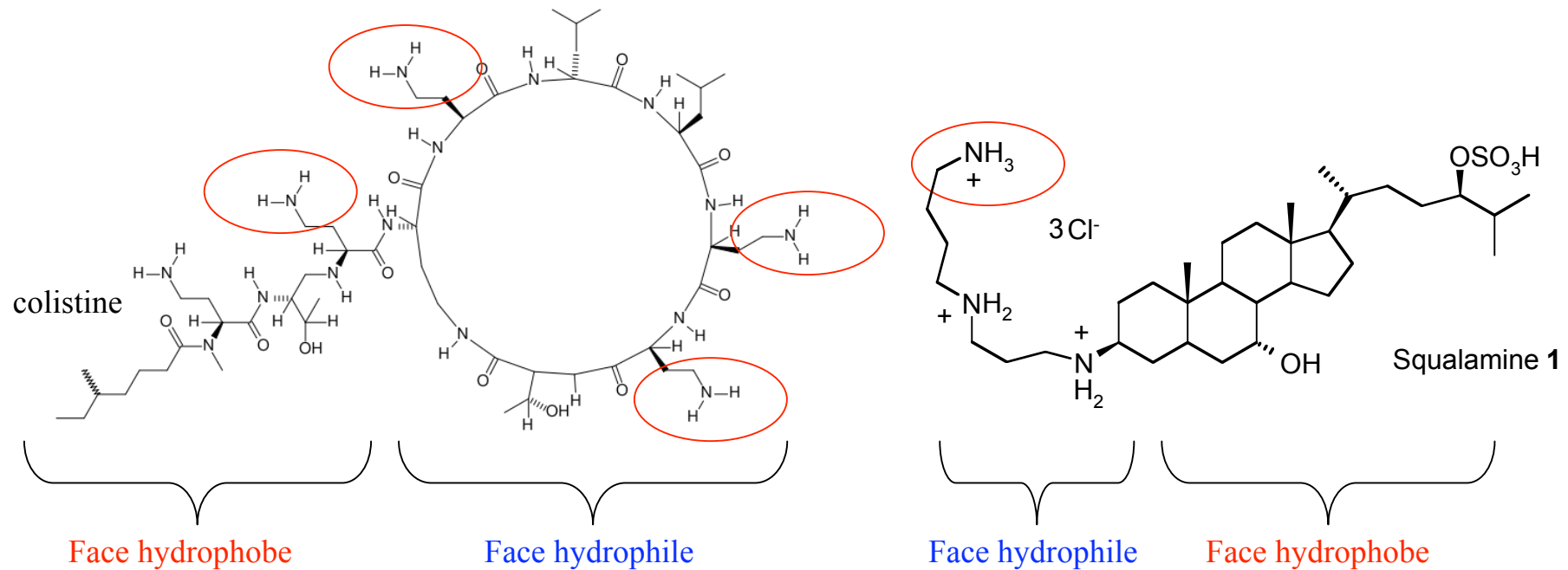
Received 14 March 2010; returned 6 April 2010; revised 1 May 2010; accepted 7 May 2010

Contexte

- Squalamine agit en perturbant la membrane des bactéries à Gram-négatif: interaction avec le LPS
- Pas d'information concernant les bactéries à Gram-positif
- Corrélation entre l'activité de la squalamine et celle de la colistine contre les bactéries à Gram-négatif
- Meilleure activité de la squalamine contre les bactéries à Gram-positif (résistante à la colistine): nouveau mécanisme d'action?

Mécanisme d'action de la squalamine

Similarité structurale entre la squalamine et la colistine



Structure de la colistine (gauche) et de la squalamine (droite) avec les faces hydrophobe et hydrophile

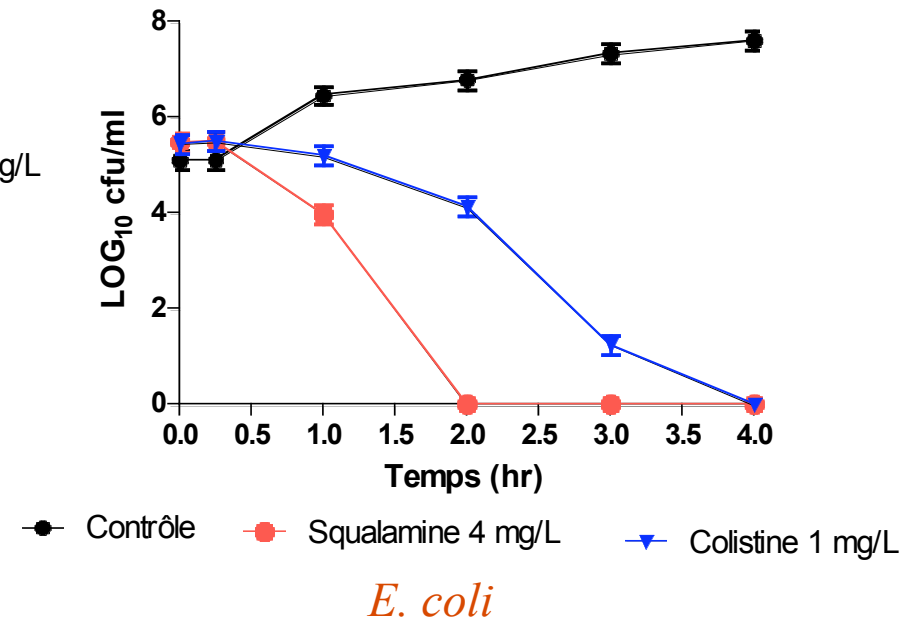
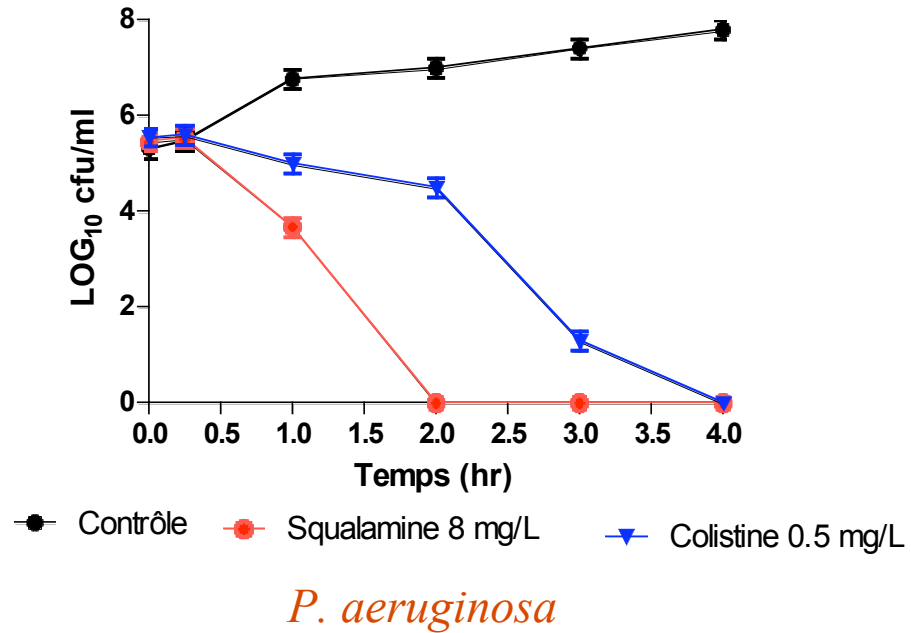
Nature Reviews Microbiology 3, 238-250 (March 2005) , *Expert Opin Investig Drugs*. 2007 Aug;16(8):1143-57

Rôle des charges négatives des LPSs? Effet des cations divalents

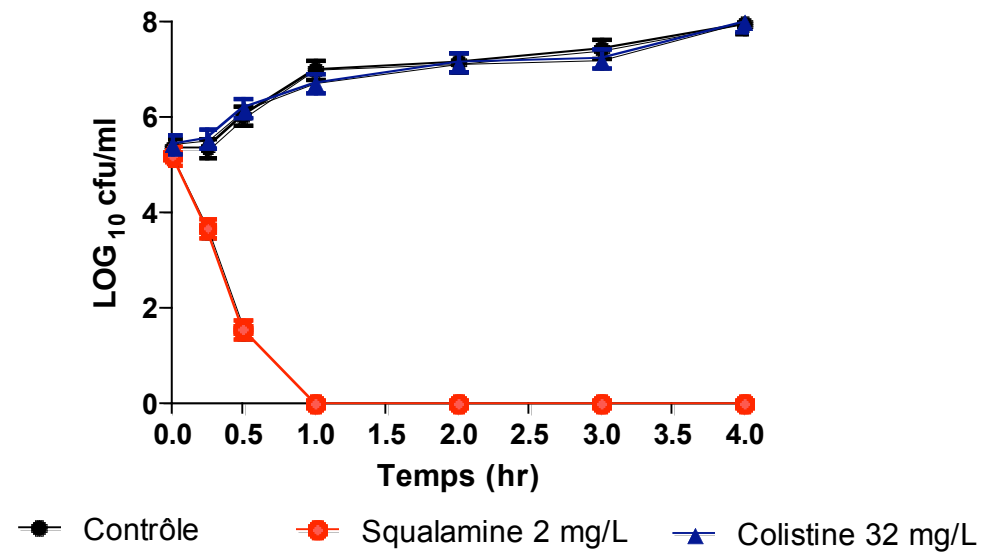
Souches	CMI (mg/L)					
	En absence de Mg ²⁺ ou de Ca ²⁺			En présence de 10 mM Mg ²⁺ ou de Ca ²⁺		
	Squalamine	Colistine	Tobramycine	Squalamine	Colistine	Tobramycine
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8	1	1	64	8	1
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4	0.5	2	64	16	1
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2	>128	1	2	>128	2

- Effet des cations divalents : inhibition Gram-négatif: squalamine –colistine
- Pas d'effet Gram-positif
- Pas d'effet: tobramycine

Effet bactéricide de la squalamine: bactéries à Gram-négatif

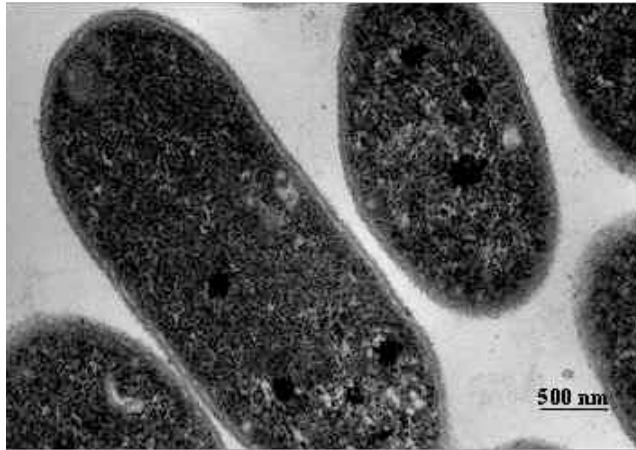


Effet bactéricide de la squalamine: bactéries à Gram-positif

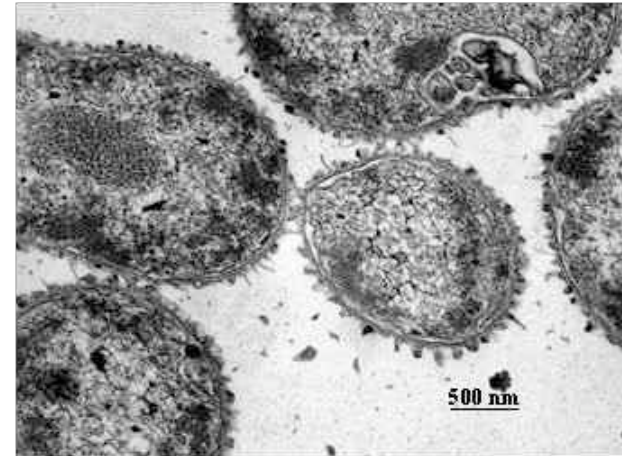


S. aureus

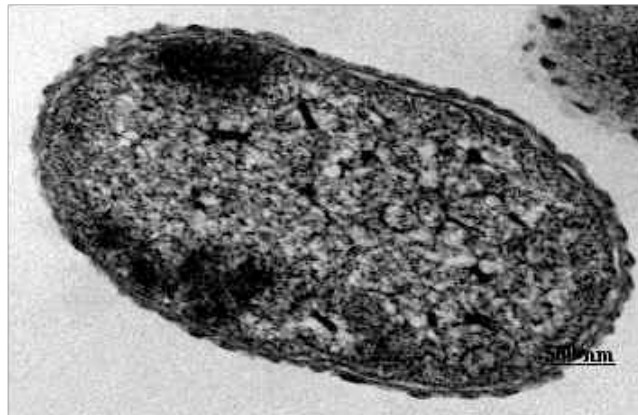
Effet de la squalamine sur la morphologie membranaire de *P. aeruginosa*



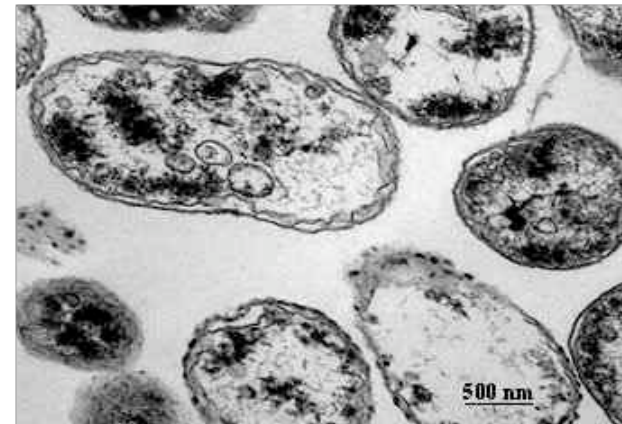
Contrôle de croissance



Colistine 2 mg/L

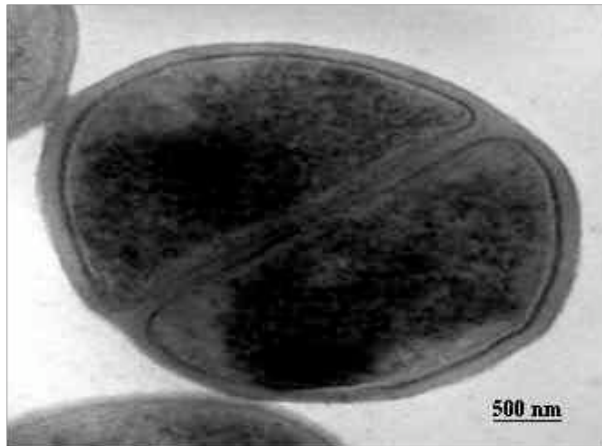


Squalamine 8 mg/L

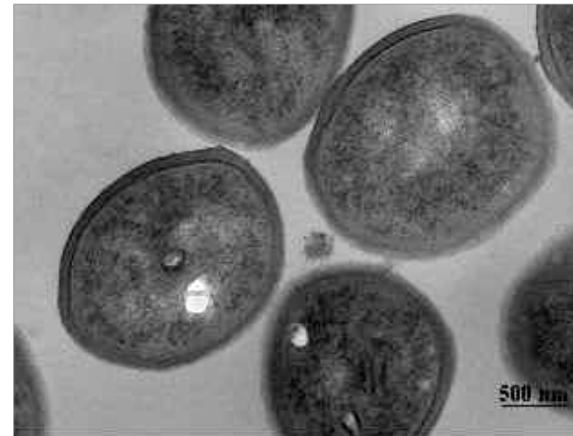


Squalamine 8 mg/L

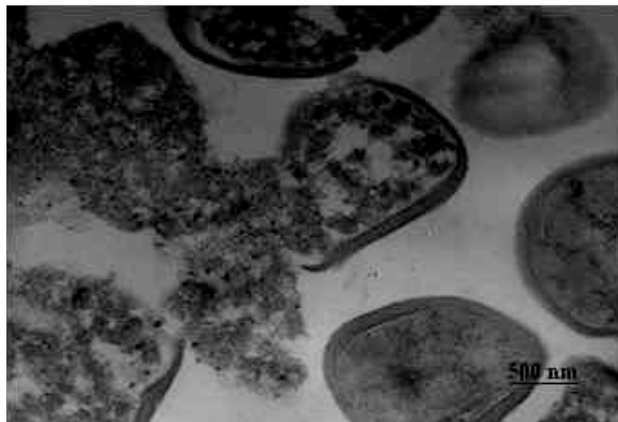
Effet de la squalamine sur la morphologie membranaire de *S. aureus*



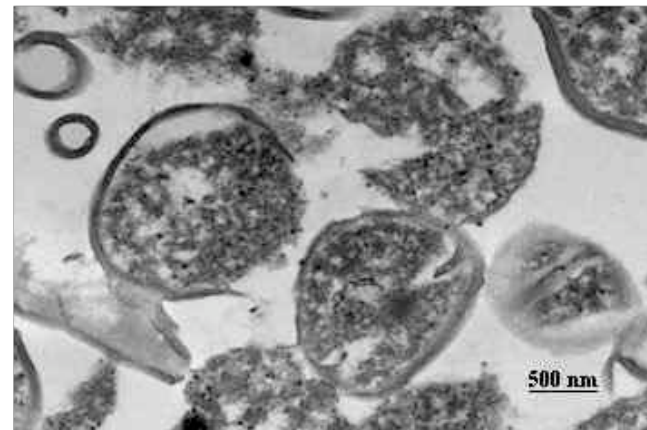
Contrôle de croissance



Colistine 32 mg/L

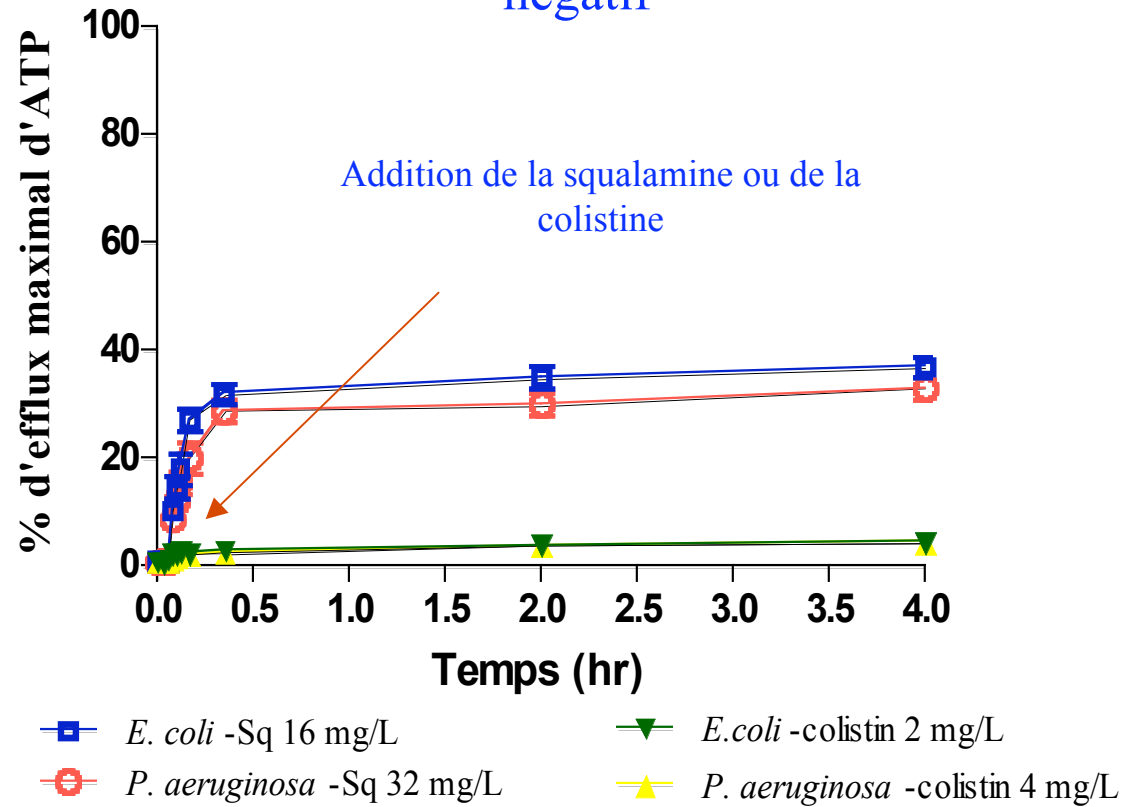


Squalamine 2 mg/L



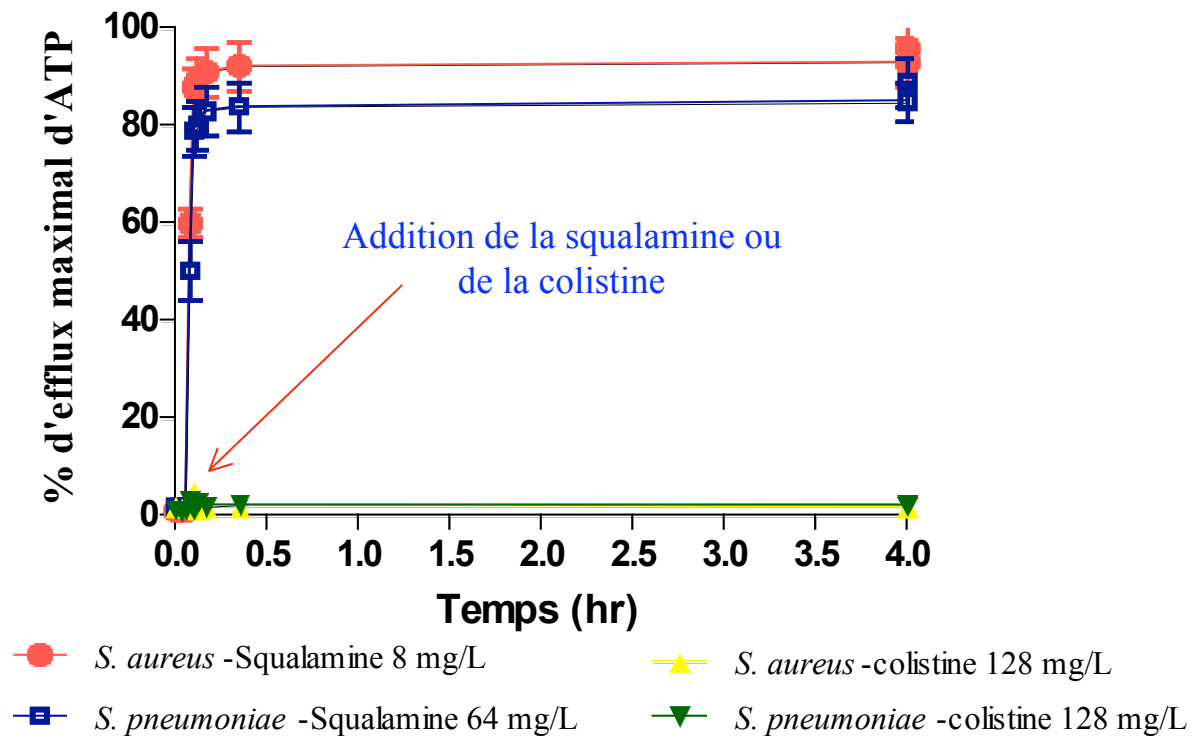
Squalamine 2 mg/L

Effet de la squalamine ou de la colistine sur l'efflux d'ATP des bactéries à Gram-négatif



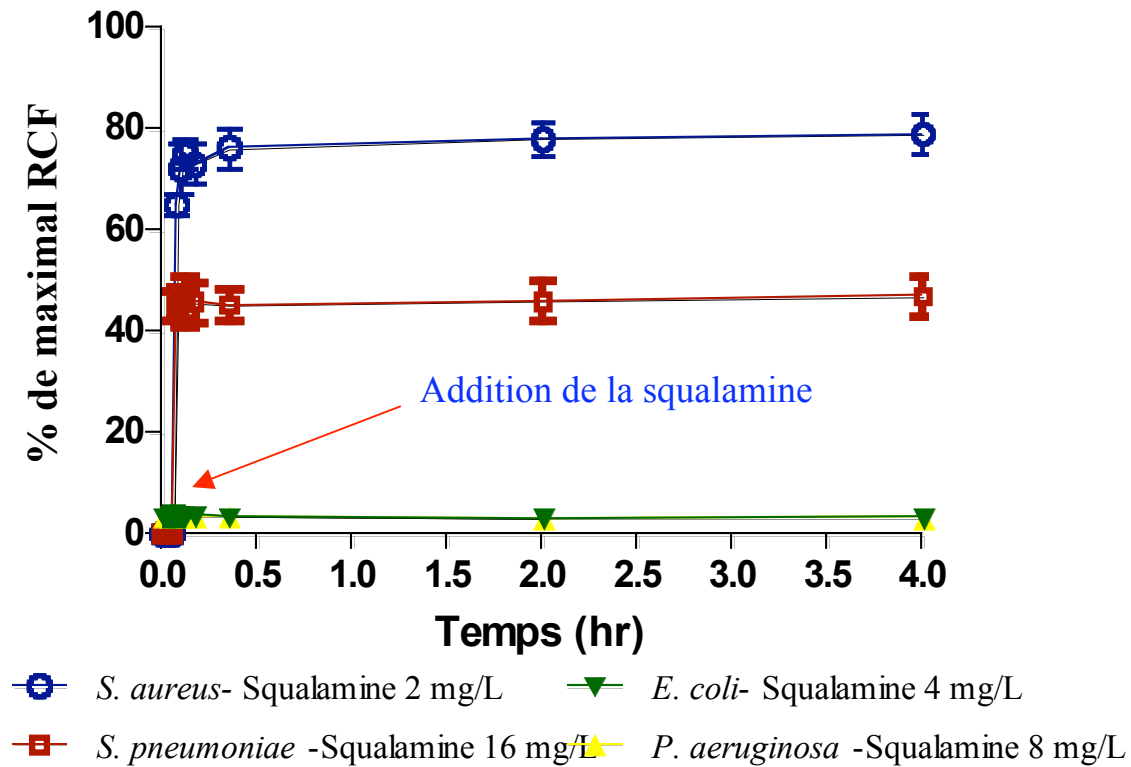
🧬 Mécanisme d'action différent de celui de la colistine

Effet de la squalamine ou de la colistine sur l'efflux d'ATP des bactéries à Gram-positif



🧫 Mécanisme d'action différent vis-à-vis des bactéries à Gram-positif

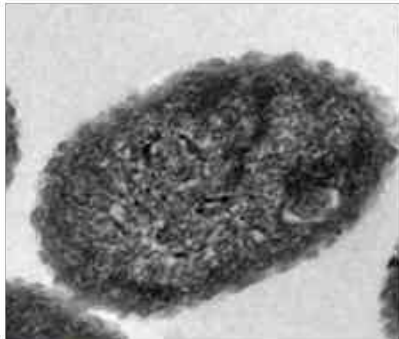
Effet de la squalamine sur la dépolarisation des membranes des bactéries à Gram-positif et à Gram-négatif



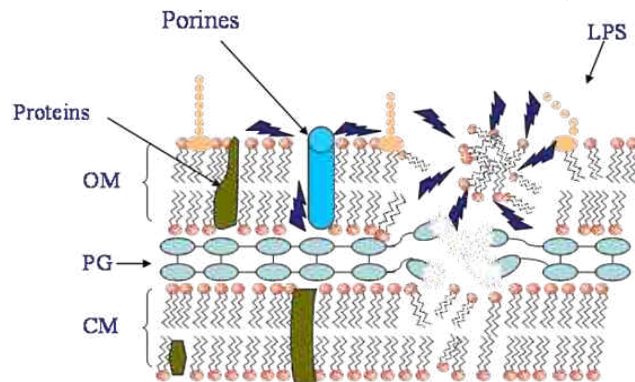
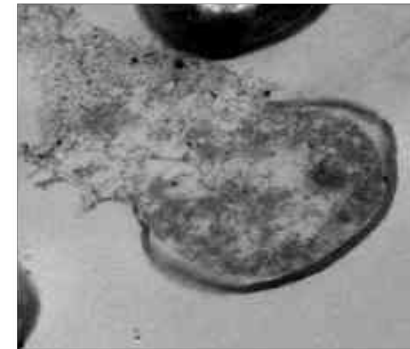
Conclusion

Speculated mechanism of action of squalamine

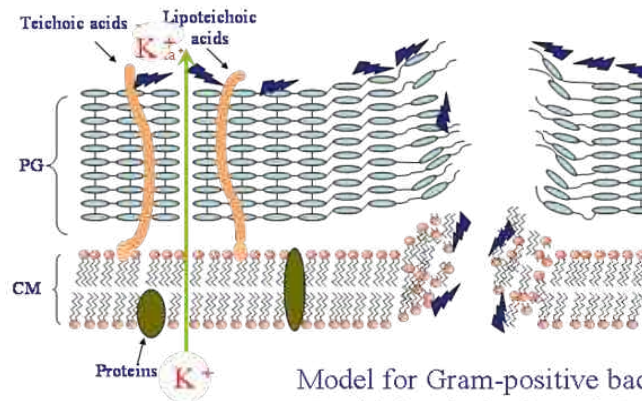
P. aeruginosa
traitée avec la
squalamine



S. aureus traitée
avec la
squalamine



Model for Gram-negative bacteria
Destruction of outer membrane of
Gram-negative bacteria



Model for Gram-positive bacteria
Rapid depolarization of Gram-
positive bacterial membrane with cell
lyses



OM: outer membrane (externe), PG: peptidoglycane, CM: cellular membrane (cellulaire)

Conclusion générale

- Les aminostérols possèdent un large spectre d'activité antimicrobien évalué vis-à-vis des souches cliniques.
- Les CMI de ces molécules sont relativement élevées imposant une utilisation par voie locale comme par exemple sous forme d'aérosol : intérêt dans le contexte de la mucoviscidose
- Leurs mécanisme d'action antibactérien et antifongique montre que ces composés perturbent l'intégrité des membranes : développement de résistance peu probable à cet effet « physique »

Perspectives

- Élaboration d'une formulation d'aérosol
- Modèle *in vivo*
- Autres utilisations: désinfectants, pommades
- En association avec d'autres antibiotiques: en tant qu'agents perméabilisants
- Mécanisme d'action antifongique