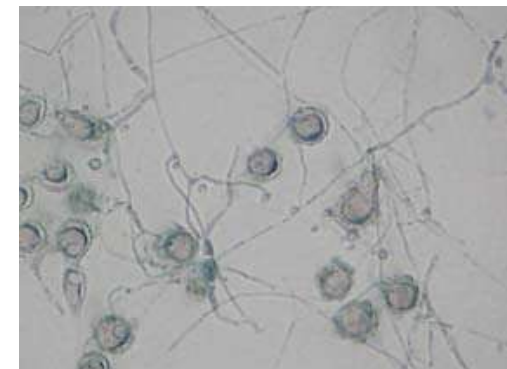
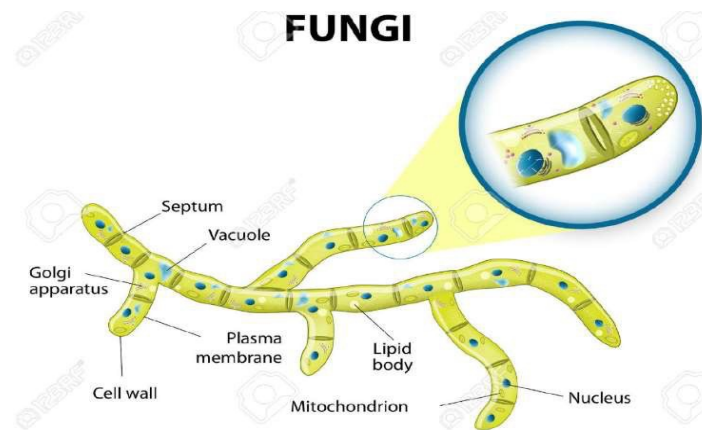
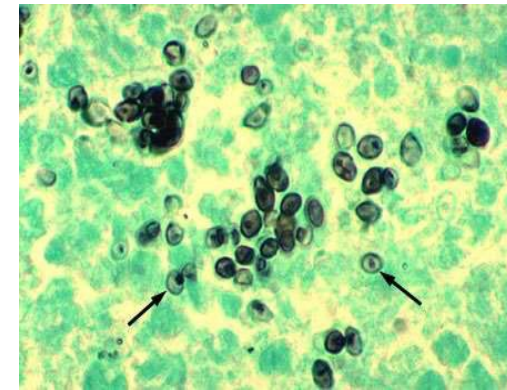


Stratégies thérapeutiques en mycologie médicale

Le groupe des fungi

Règne phylogénique avec plus de 100 000 espèces

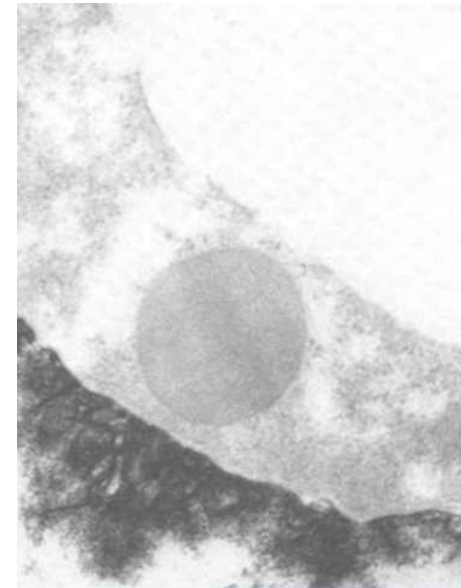
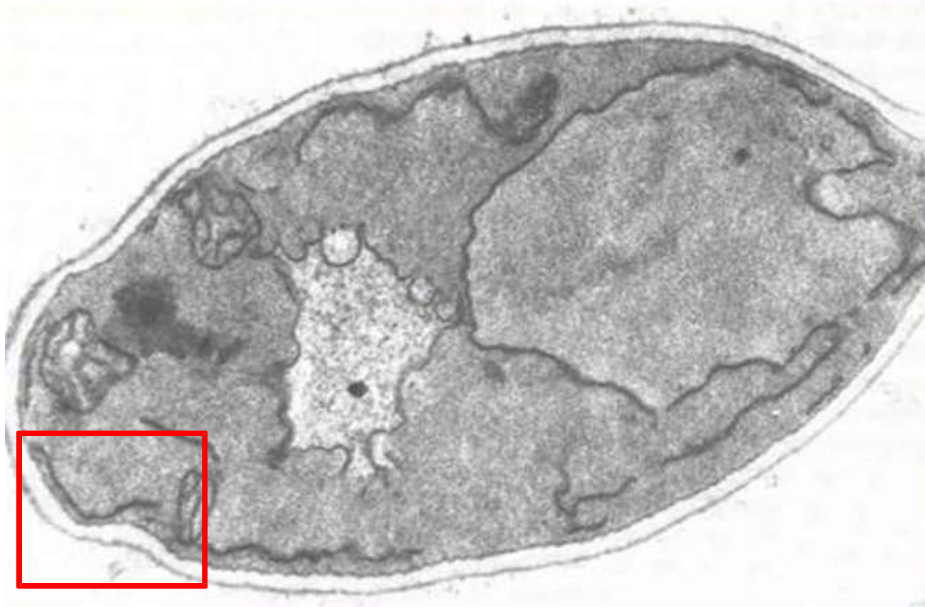
3 groupes: levures, filamenteux et dimorphiques



Organisation cellulaire

1. La paroi

Cellule eucaryote à paroi externe composée de chitine et de glycanes

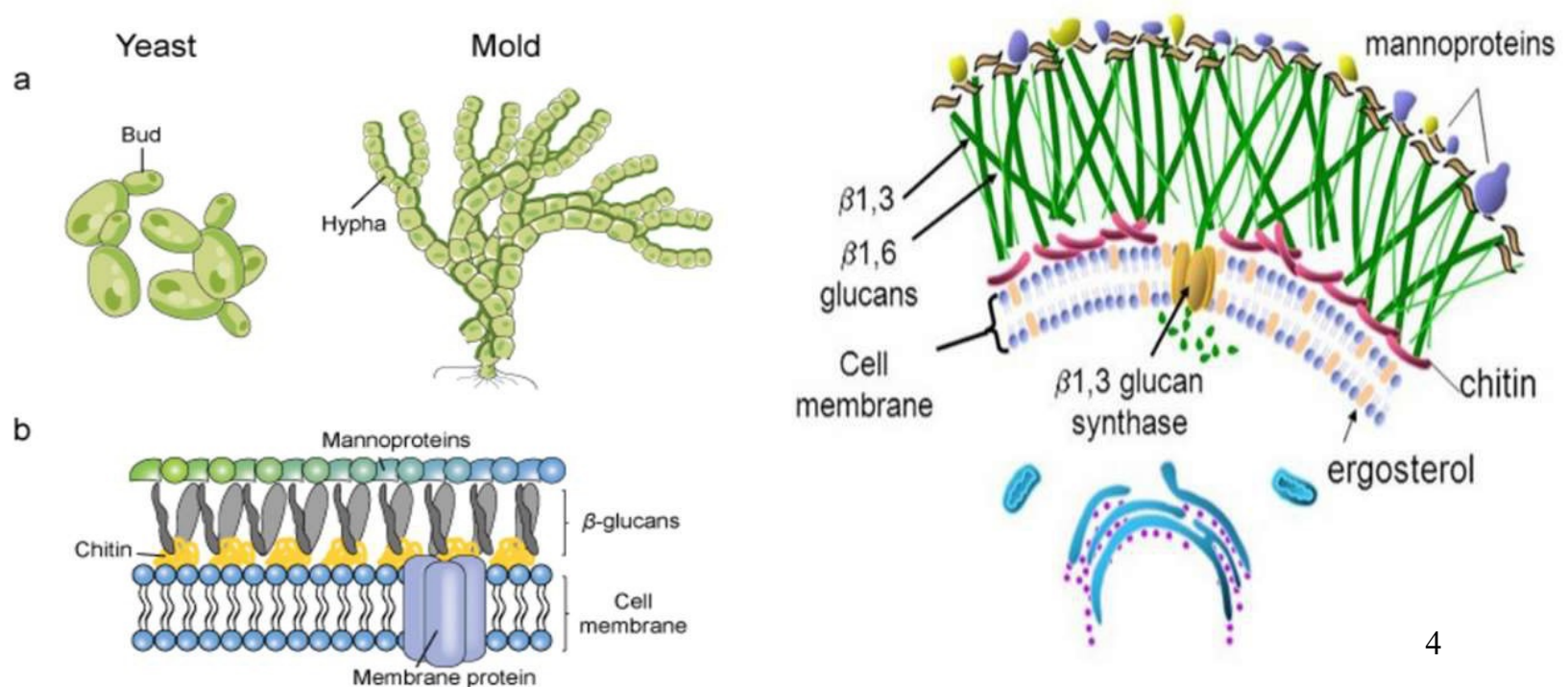


Organisation cellulaire

β -Glucane : polymère de β (1-3) glucose, synthèse par β (1-3) D glucane synthase

Chitine: homopolymère de β (1-4) N acetylglucosamine

Mannoprotéines: Galactomannane, mannane,

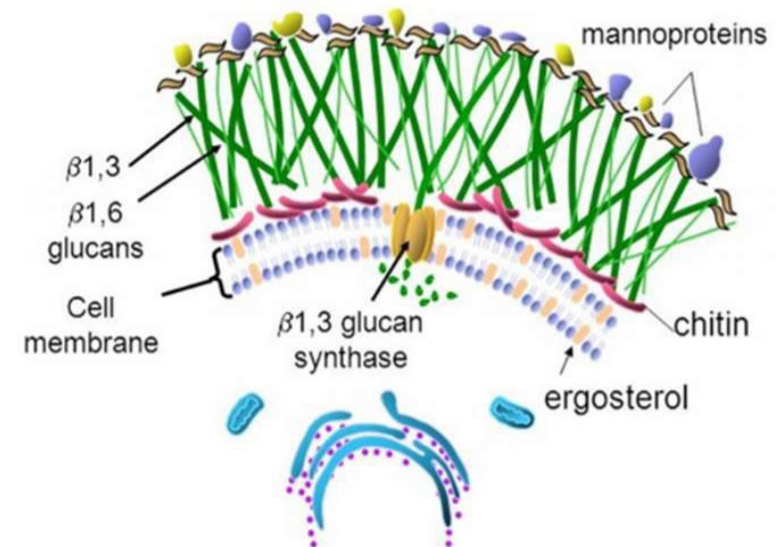
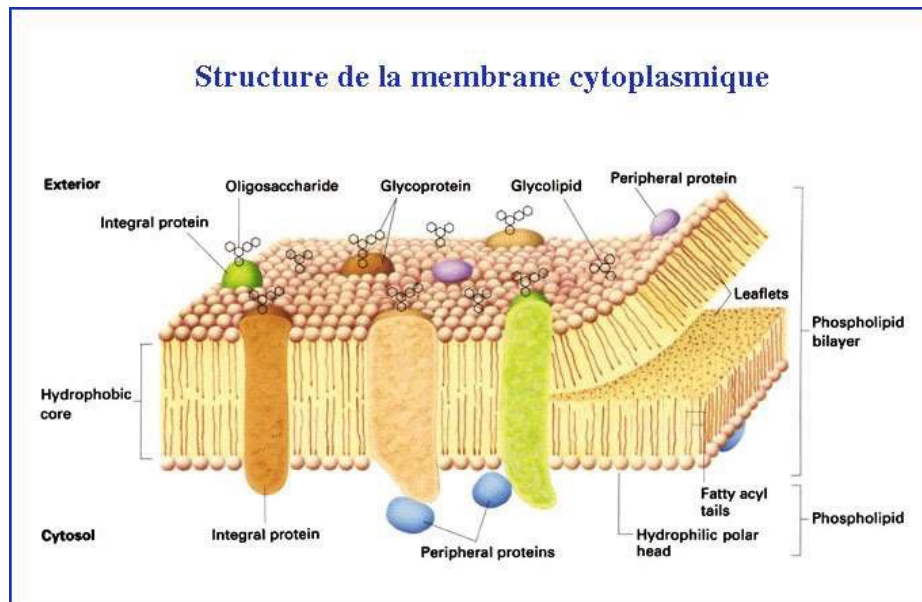


Organisation cellulaire

2. La membrane plasmique

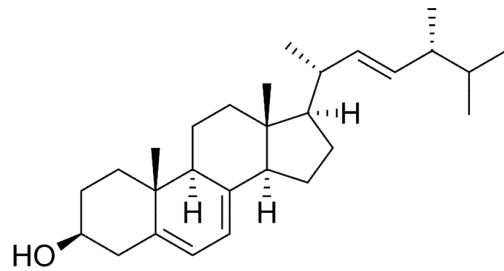
La bicouche lipidique, incrustée de protéines, barrière qui isole le micro-organisme du milieu extérieur, échanges par transport passif ou actif.

Modification de la membrane déjà constituée, ou perturbation de la synthèse de la membrane



Organisation cellulaire

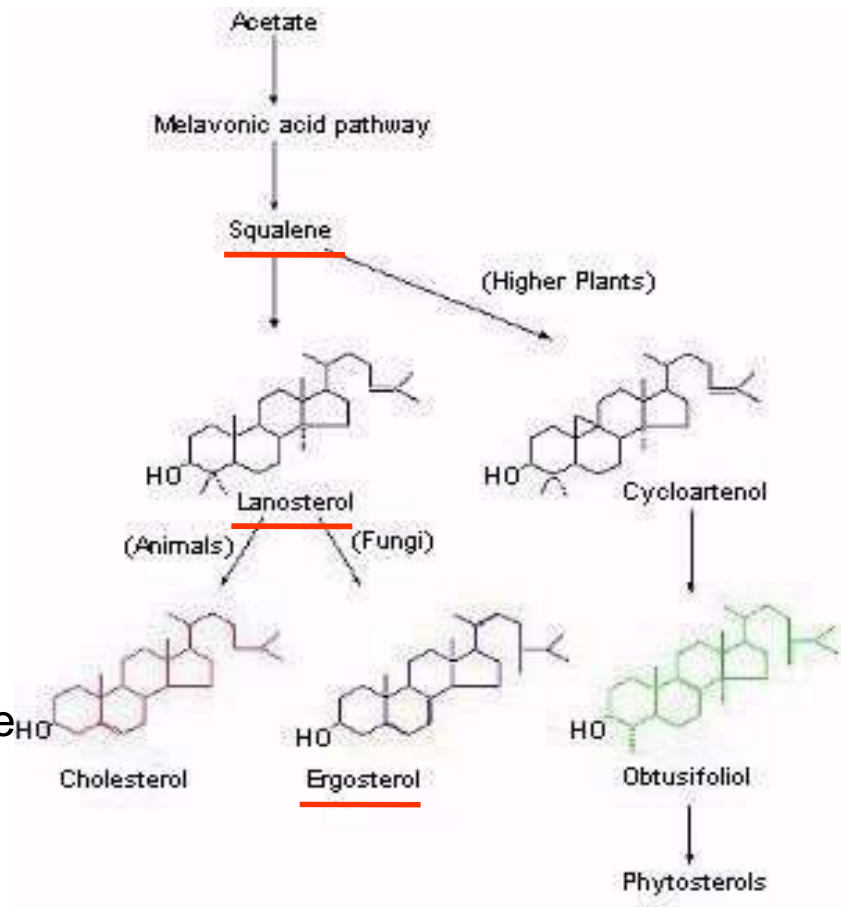
Ergostérol (ergosta-5,7,22-trién-3β-ol)



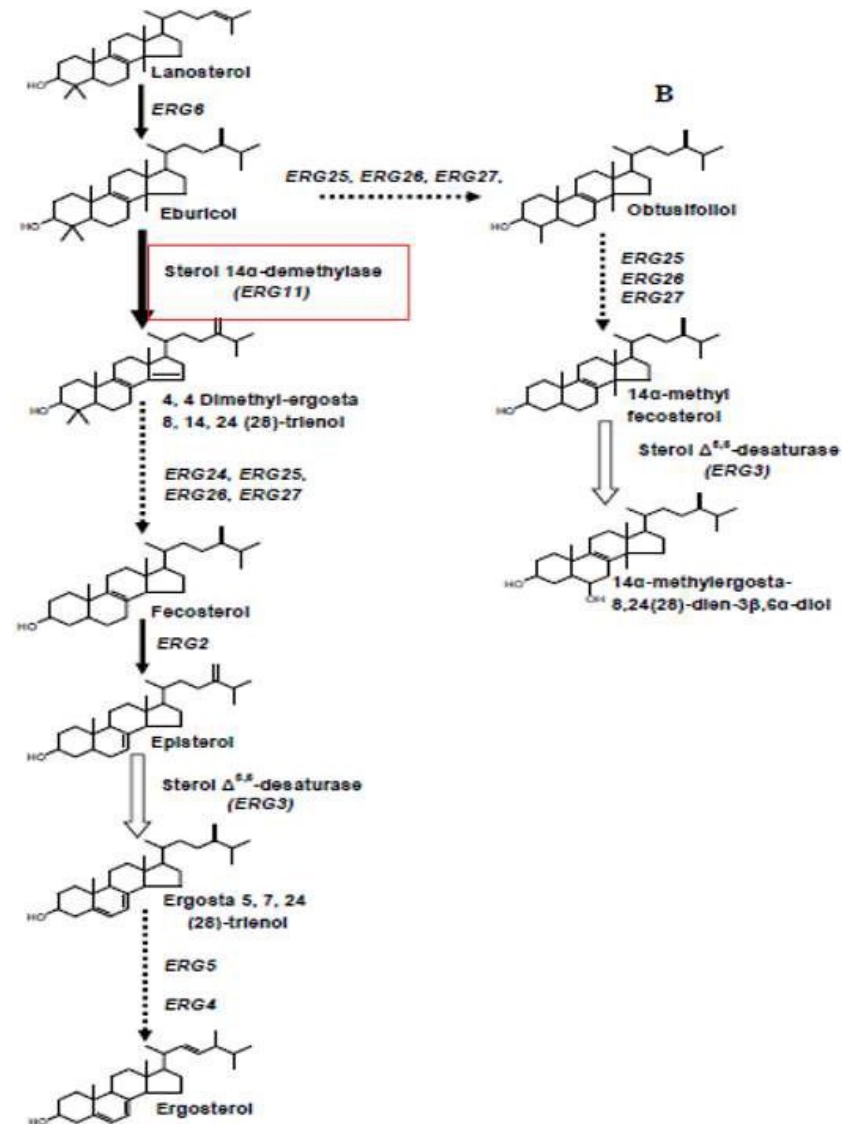
Croissance, fluidité et intégrité de la membrane

Synthèse dans le réticulum endoplasmique à partir du squalène puis du lanostérol

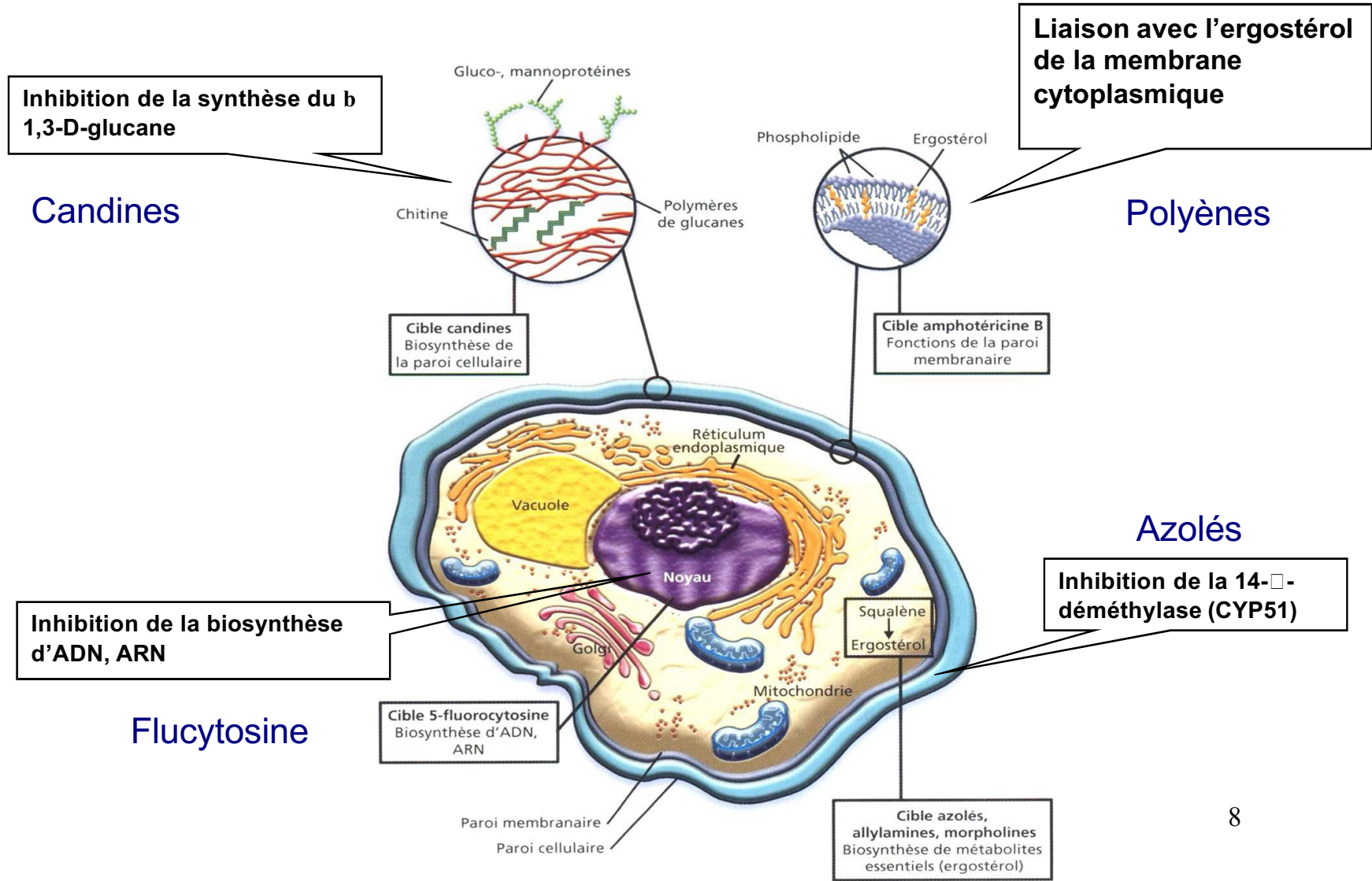
14- α -déméthylase (cytochrome P450) (ERG11/CYP51)



Organisation cellulaire



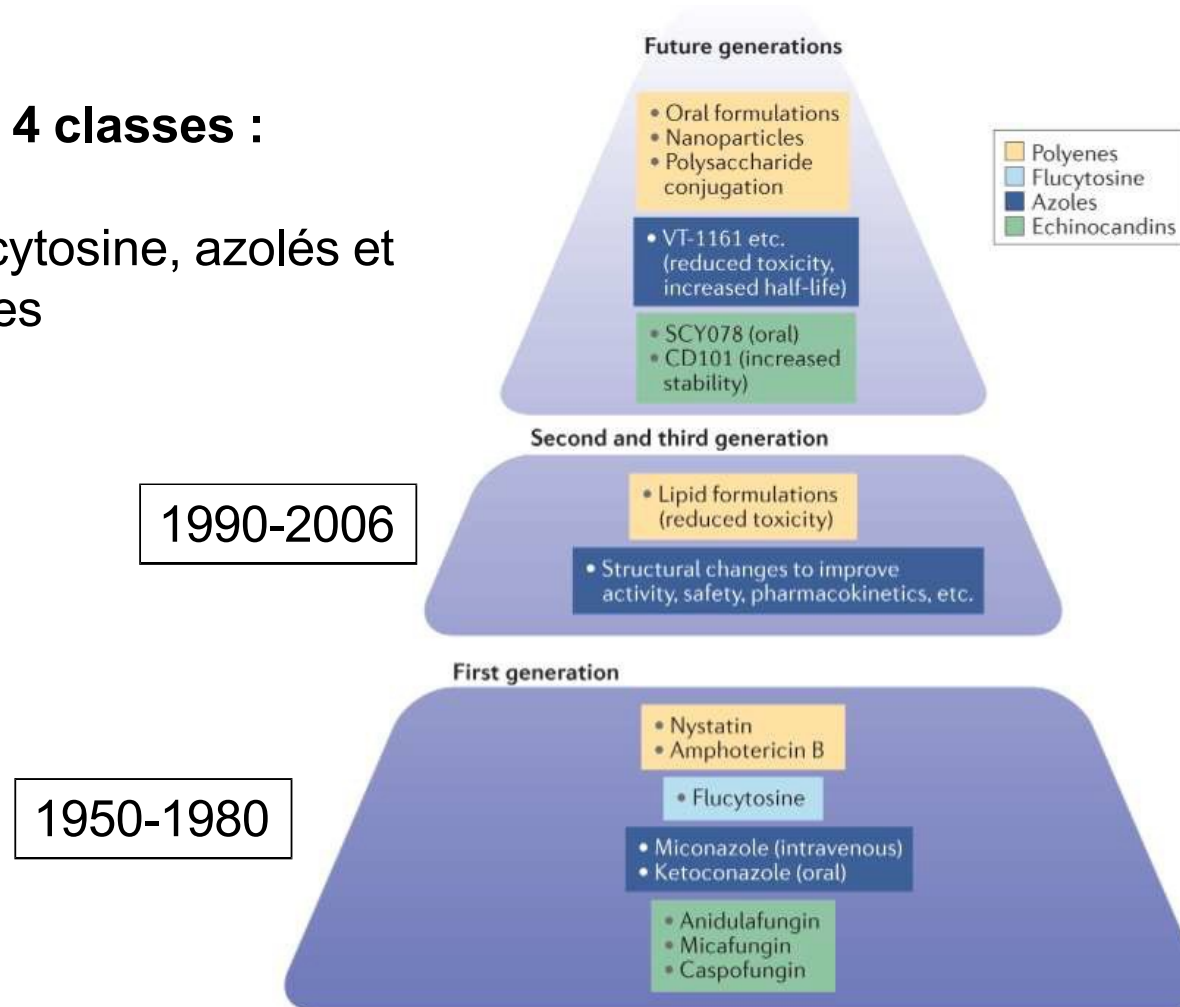
Les antifongiques



Les antifongiques

Globalement 4 classes :

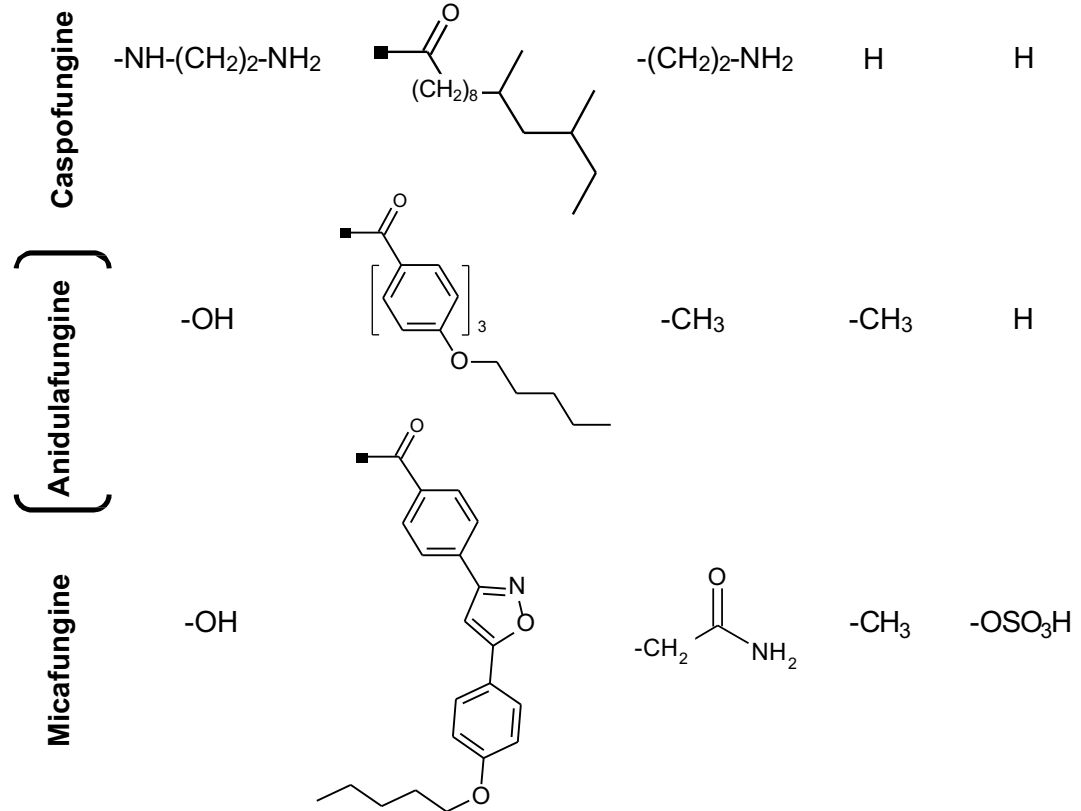
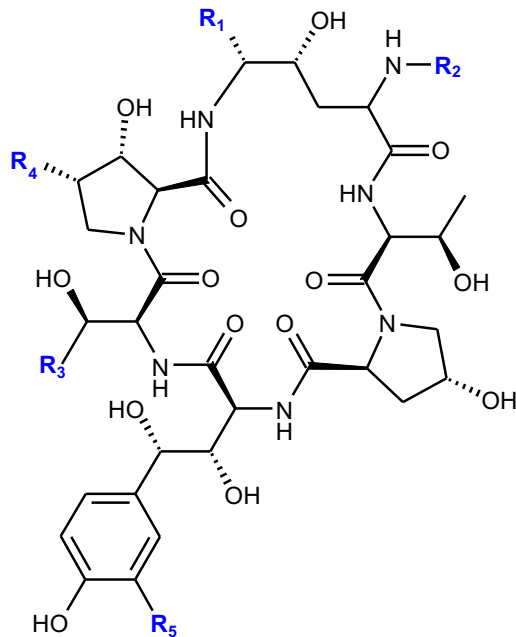
Polyènes, flucytosine, azolés et échinocandines



Perturbateurs de la synthèse de la paroi fongique

Echinocandines

Classe chimique : **lipopeptides cycliques** semi-synthétiques

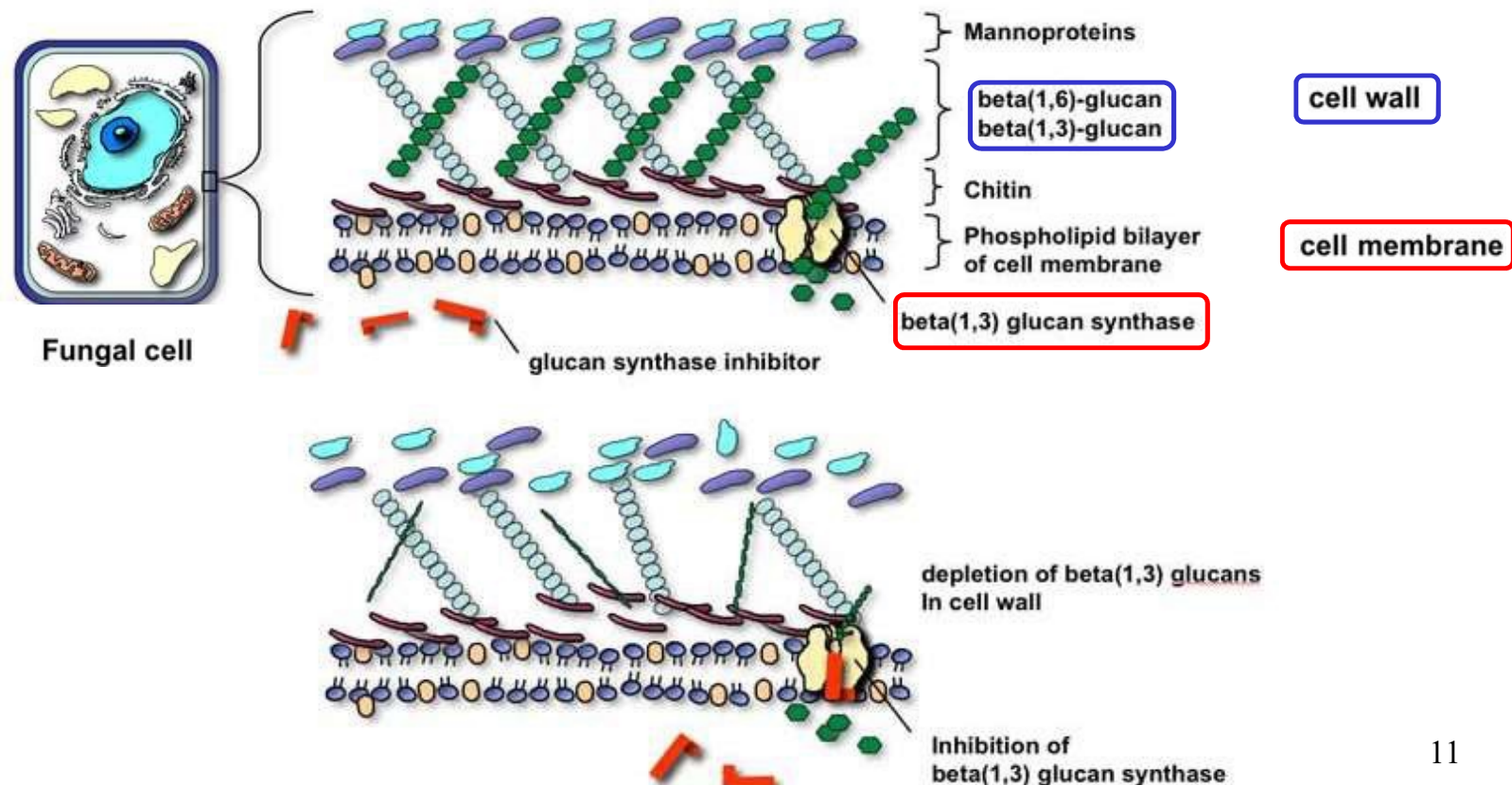


Synthétisés à partir de produits de fermentation de certains champignons (~~pour~~ pour la caspofungine, ~~pour~~ pour l'anidulafungine, ~~pour~~ pour la micafungine)

Perturbateurs de la synthèse de la paroi fongique

Mécanisme d'action : Inhibition non compétitive de la β -(1,3)-D-glucane synthase (enzyme présente chez la plupart des champignons pathogènes mais pas chez mammifères)

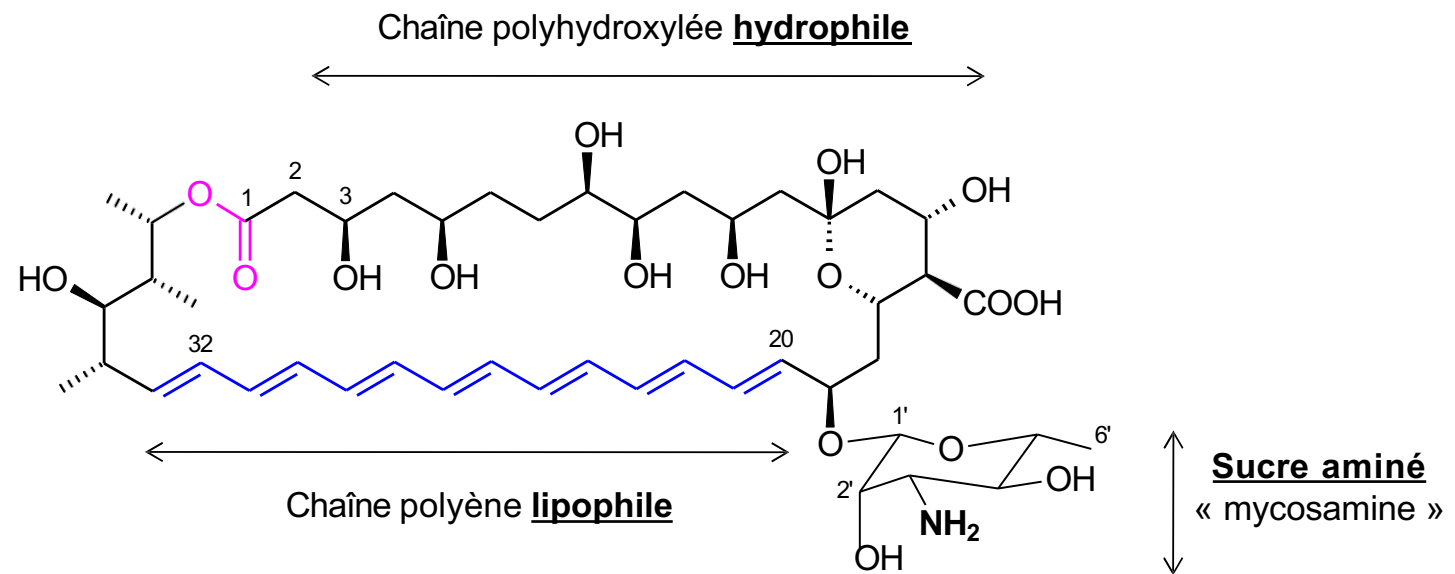
□ déficit en β -(1,3)-glucane (polysaccharide essentiel de la paroi fongique) □ perte d'intégrité de la paroi cellulaire, déséquilibre osmotique et lyse cellulaire



ATF se liant à l'ergostérol membranaire

Amphotéricine B

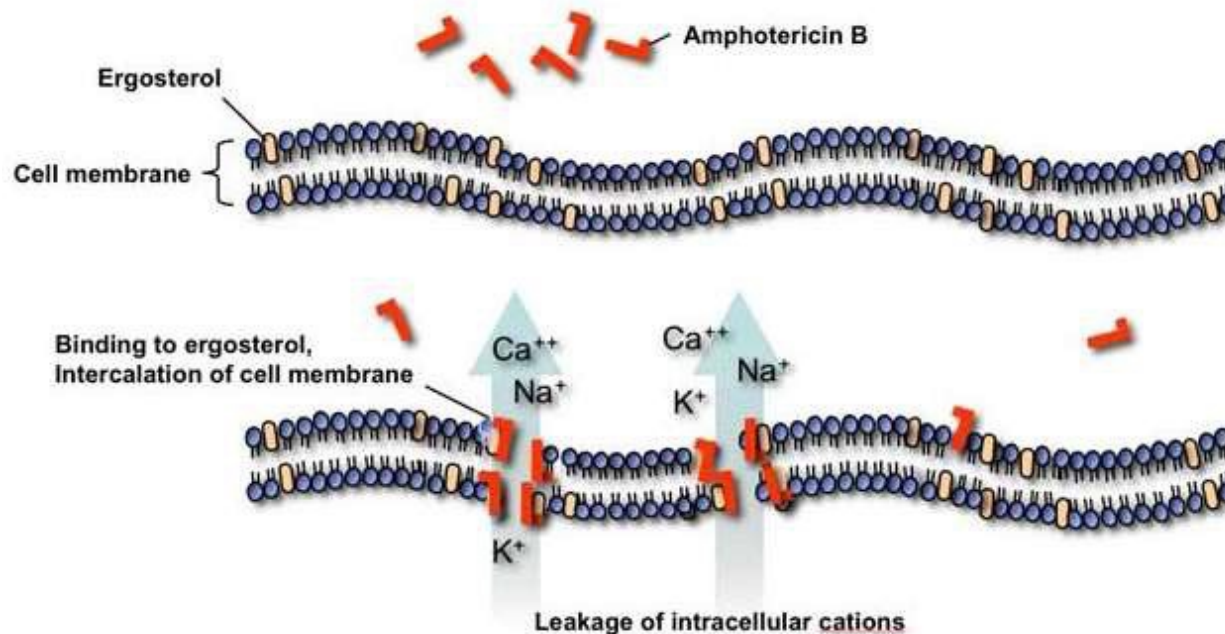
Classe chimique : **macrolactone polyénique** ($C_{47}H_{73}NO_{17}$, PM=924.1 g/mol)
pratiquement insoluble dans l'eau



Produite par fermentation ~~de~~ **epizoa**

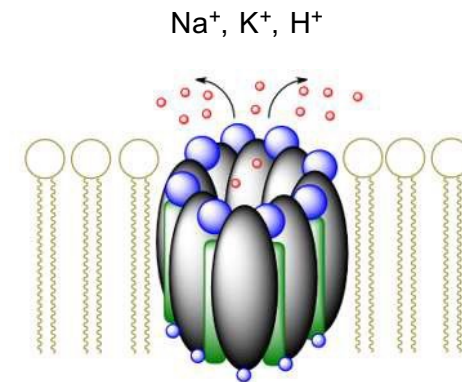
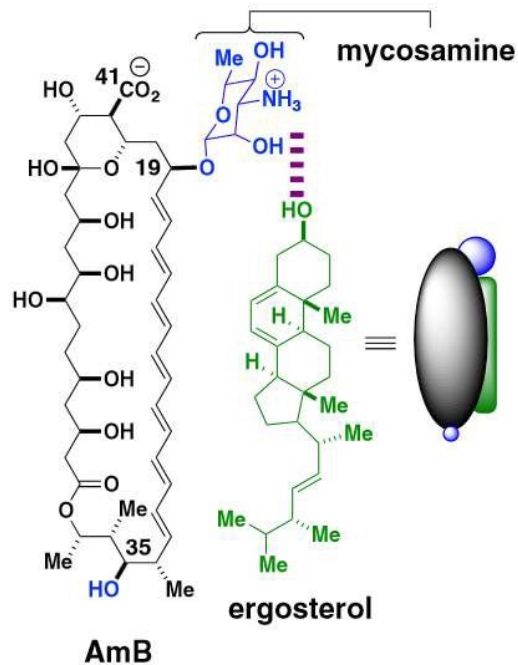
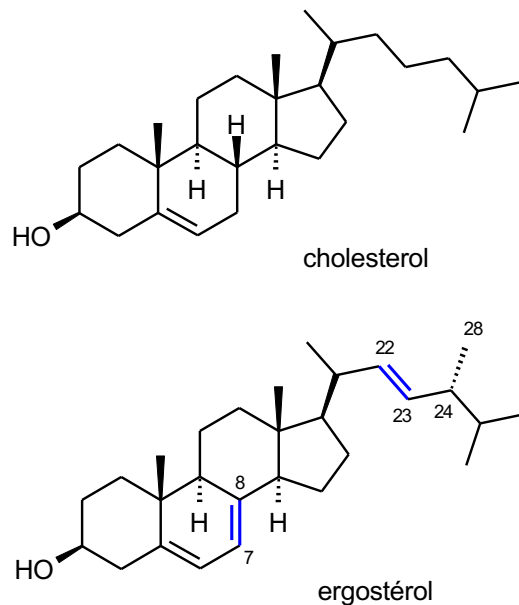
ATF se liant à l'ergostérol membranaire

Mécanisme d'action (1) : Liaison avec l'ergostérol de la membrane cellulaire fongique. Formations de pores transmembranaires (chaîne lipophile orientée vers la membrane et chaîne hydrophile vers la lumière du pore) □ altération de la perméabilité membranaire avec fuite de cations cytoplasmiques (Na^+ , K^+ , H^+) □ perte de l'homéostasie et lyse cellulaire)



ATF se liant à l'ergostérol membranaire

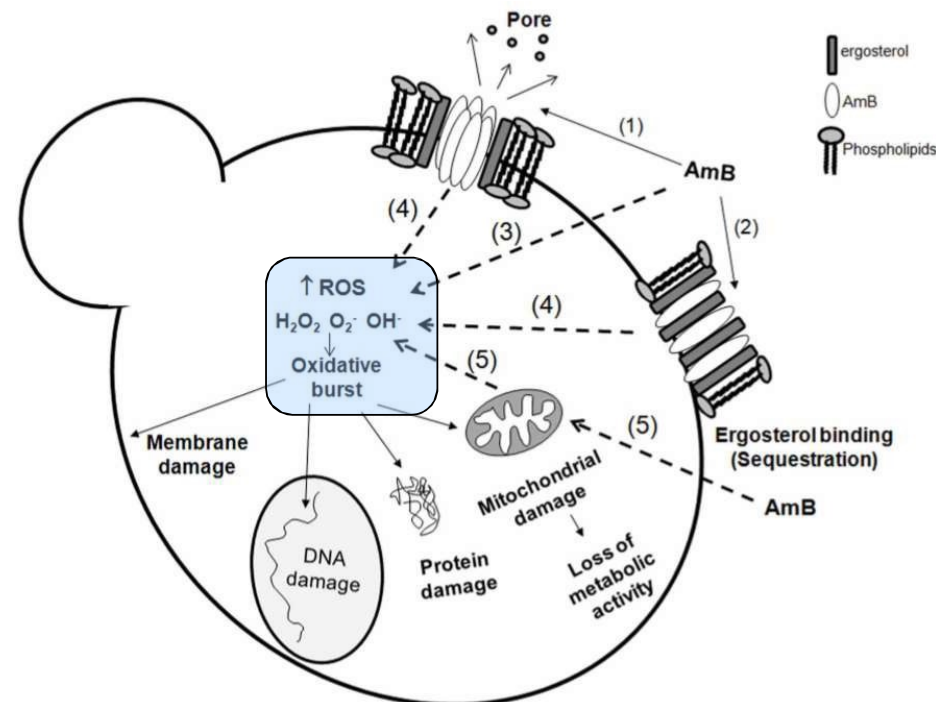
Mécanisme d'action (1) : **Liaison avec l'ergostérol de la membrane cellulaire fongique. Formations de pores transmembranaires** (chaîne lipophile orientée vers la membrane et chaîne hydrophile vers la lumière du pore) □ altération de la perméabilité membranaire avec fuite de cations cytoplasmiques (Na^+ , K^+ , H^+) □ perte de l'homéostasie et lyse cellulaire)



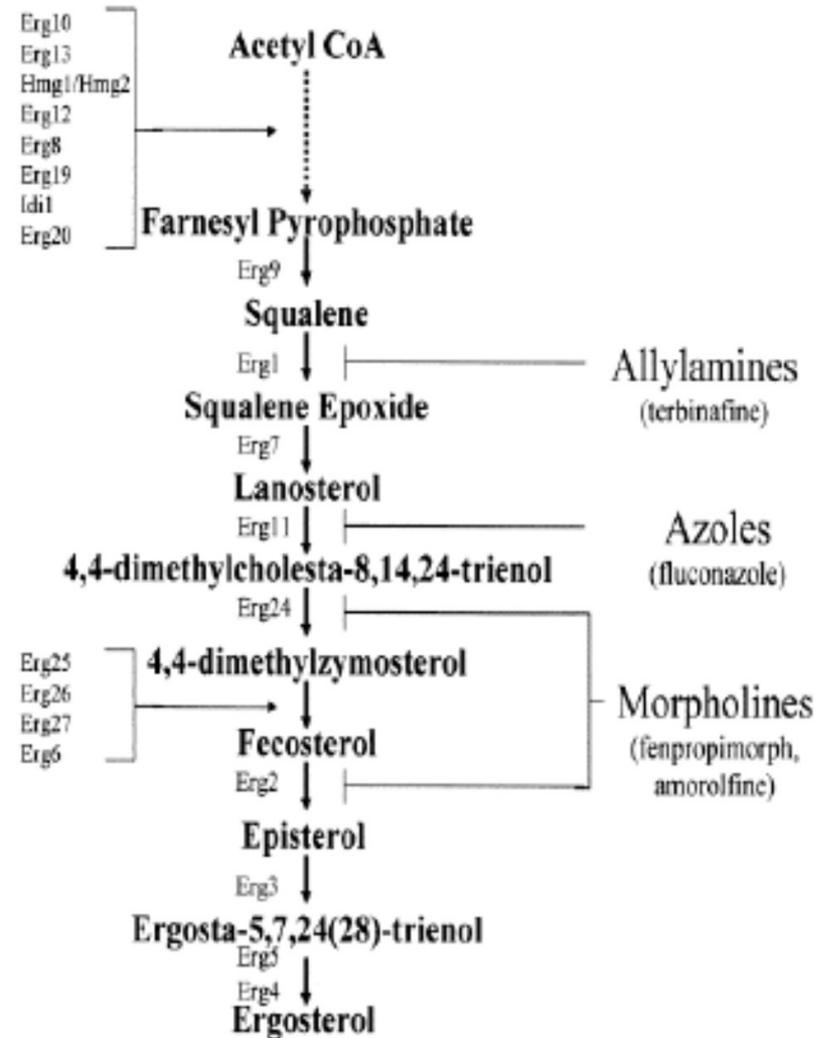
Interaction □-□ supp. = □ affinité ?

ATF se liant à l'ergostérol membranaire

Mécanisme d'action (2) : « ...In the cell, AmB also induces **an oxidative burst**. The mechanism of this induction remains unknown, but there are several possibilities: AmB can act directly as a prooxidant (3) and induce accumulation of reactive oxygen species (ROS). However, it is also possible that this intracellular effect requires previous binding to ergosterol (4). Since ROS are natural products of the respiratory chain, it cannot be discarded that AmB influences the mitochondrial activity (5), and contribute in this way to the oxidative burst. **The accumulation of free radicals has multiple deleterious effects on the essential components of the cell** (membrane, proteins, DNA and mitochondria) **resulting in cell death** » (Ana C. Mesa-Arango, *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, 3: 286)

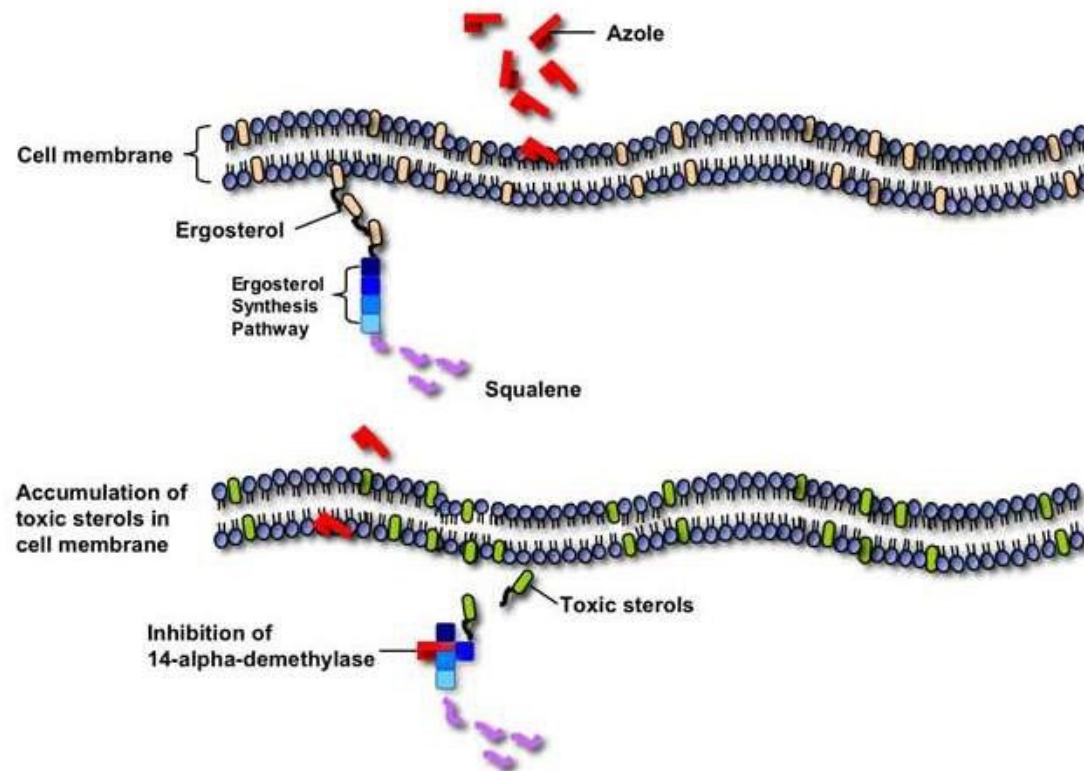


ATF inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol



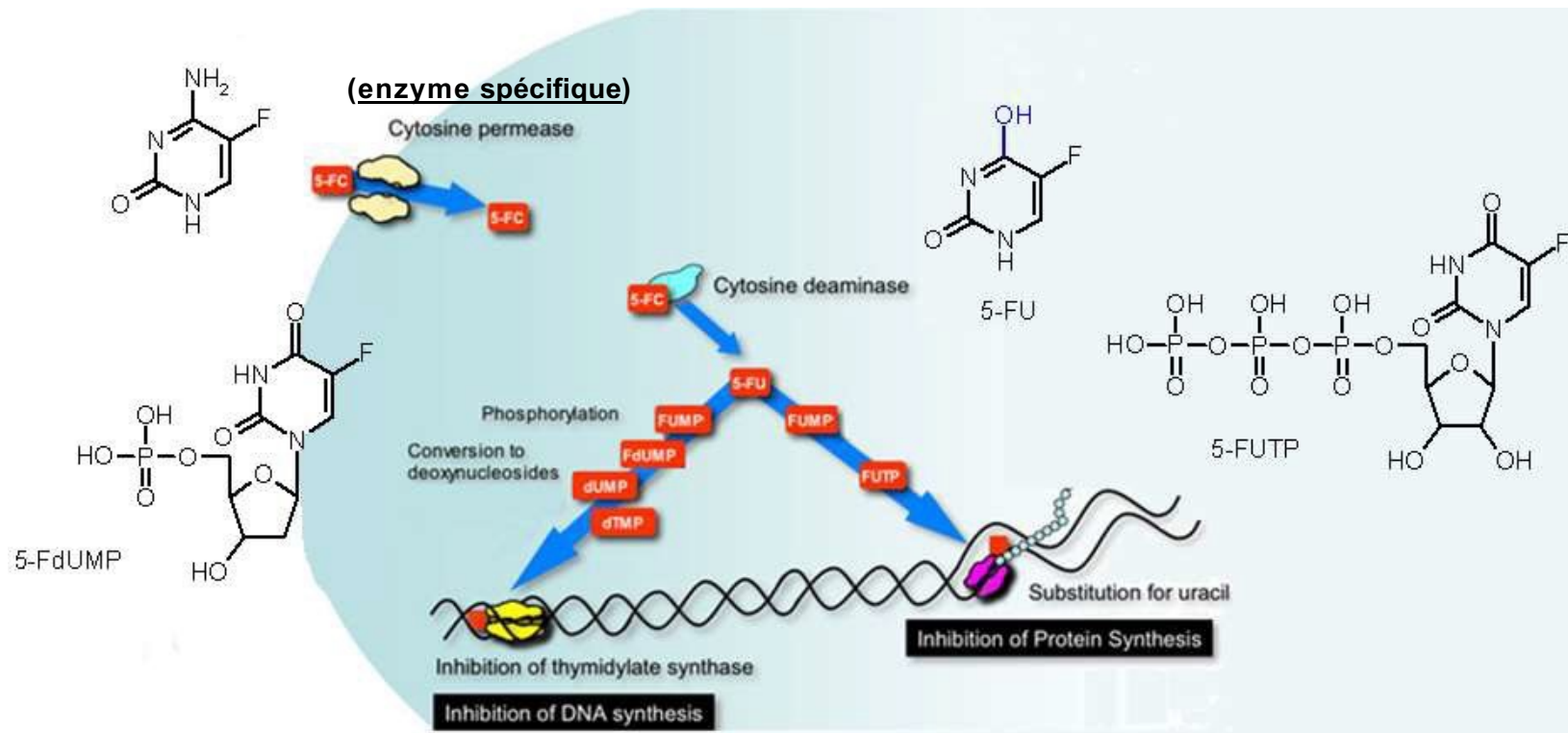
ATF inhibiteurs de la synthèse de l'ergostérol

Mécanisme d'action : Tous les azolés agissent principalement sur la biosynthèse de l'ergostérol en inhibant la 14- α -déméthylase (CYP51) □ accumulation de précurseurs méthylés et de stérols toxiques (la voie de la $\Delta^{5,6}$ -désaturase) □ désorganisation de la membrane fongique



ATF inhibiteurs de la synthèse d'ADN et d'ARN fongique

Mécanisme d'action : **Pénétration du 5-FC dans le cytoplasme fongique grâce à une cytosine perméase (enzyme spécifique)** puis conversion en 5-fluorouracile (5-FU, puissant antimétabolite) par une cytosine déaminase. (1) Phosphorylation du 5-FU en 5-FUTP et incorporation dans l'ARN à la place de l'uracile (□ erreur de lecture du code génétique □ inhibition de la synthèse protéique) + (2) conversion en 5-FdUMP (déoxynucléoside, analogue du dUMP) (□ inhibition de la synthèse de l'ADN par inhibition de la thymidylate synthase)



Indications des ATF

Activité *in vitro* des antifongiques

En fonction de l'espèce isolée :

**notion de spectre d'un ATF donné
notion de sensibilité d'une espèce donnée**


Indications des ATF


- ✓ **Fréquence des mycoses invasives en augmentation**
- ✓ **Nouvelles molécules antifongiques**
- ✓ **Pathogènes fongiques émergents**
- ✓ **Infections nosocomiales**


- ✓ **Epidémiologie** : Surveillance des résistances
- ✓ **Clinique** :
 - Prédiction de l'efficacité thérapeutique
 - Adaptation du traitement


Indications des ATF

Yeasts	FLC	VRC	POS	ISA	AMB	ANI	CAS	MIC	5FC
<i>Candida albicans</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida glabrata</i>	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida krusei</i>	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida tropicalis</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida parapsilosis</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Green
<i>Candida lusitanae</i>	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	Green
<i>Candida guilliermondii</i>	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Candida norvegensis</i>	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida inconspicua</i>	Red	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
<i>Candida kefyr</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow
<i>Candida auris</i>	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green
<i>Rhodotorula</i> s pp.	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Green	Red	Red	Red	Green
<i>Trichosporon</i> s pp.	Red	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red	Red
<i>Geotrichum</i> s pp.	Red	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Green

 Intrinsically susceptible (S)

 Intrinsically intermediately susceptible (I)

 Resistant (R)

 There is insufficient evidence that this species is a good target for the compound in question

Indications des ATF

Champignons filamenteux *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedo*, *Zygo*

	AMB	5FC	FCZ	ITZ	VRZ	PSZ	CAS
<i>Aspergillus fumigatus</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Aspergillus terreus</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Fusarium</i> spp.	■	■	■	■	■	*	■
<i>Scedo. apiospermum</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Scedo. prolificans</i>	■	■	■	■	■	■	■
<i>Rhizopus</i> spp.	■	■	■	■	■	■	■
<i>Absidia</i> spp.	■	■	■	■	■	■	■
<i>Mucor</i> spp.	■	■	■	■	■	■	■

* Résistant in vitro

Mesure des niveaux de sensibilité aux ATF

Technique	Principe	Avantages	Inconvénients
CLSI / EUCAST	Microdilution liquide	Méthode de Référence	Non commercialisée Lourd, CQ ++
CLSI	Diffusion en gélose (disques)	Méthode de Référence	lourd
Sensititre Yeast one	Microdilution liquide colorimétrique	Standardisée Commercialisée	Kit
Etest	Diffusion en gélose	Commercialisée Simple, Validée	Coût
Autres	Variable	Certaines commercialisées	Non validées



µg/ml

64

32

16

8

4

2

1

0,5

0,25

0,12

Mesure des niveaux de sensibilité aux ATF

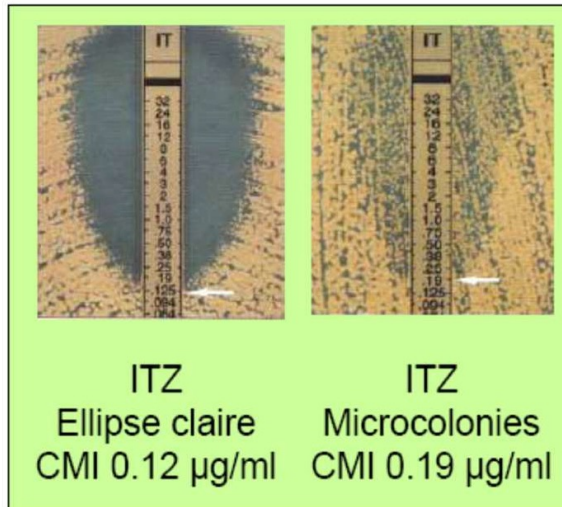
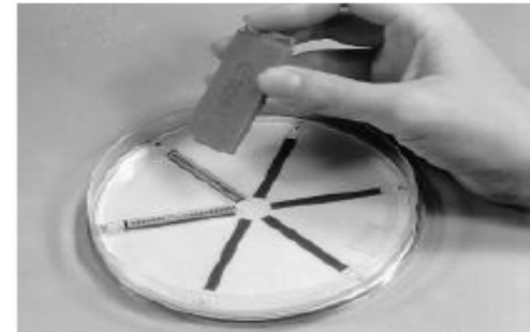
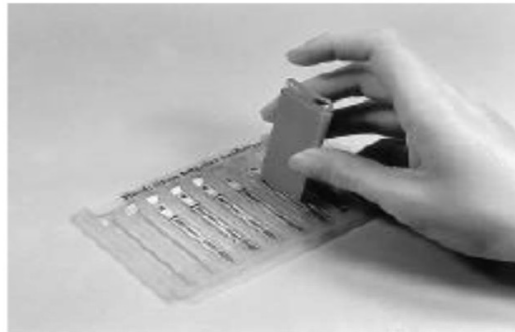
Méthode alternative: Etest



Corrélation
au NCCLS
C. glabrata

Lecture
100 % d'inhib.
(AmB)
Lecture
80% d'inhib
(Azolés, 5FC)

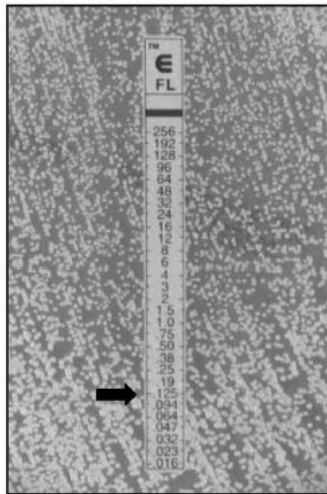
Labo spécialisés
(CHU)
Pb de lecture
Pb de conservation



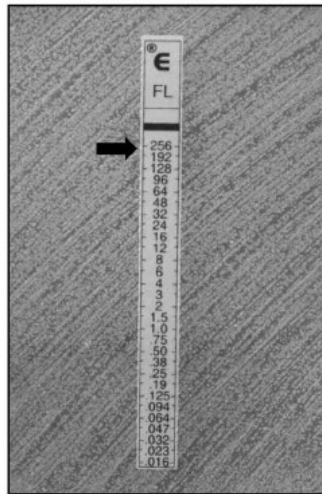
ITZ
Ellipse claire
CMI 0.12 µg/ml

ITZ
Microcolonies
CMI 0.19 µg/ml

Azolés

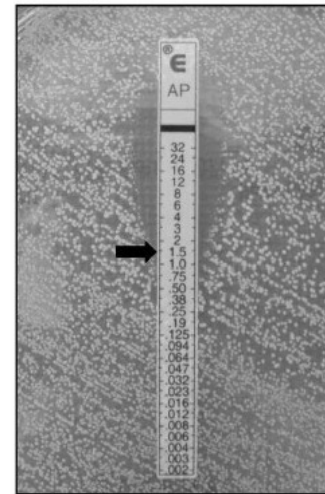


C. albicans: Noter la présence du phénomène de traîne rendant la lecture de la CMI plus difficile (0.125 µg/mL)



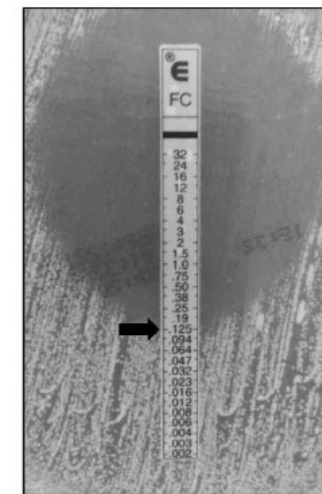
C. albicans: Souche résistante (CMI>256 µg/mL)

Amphotéricine B



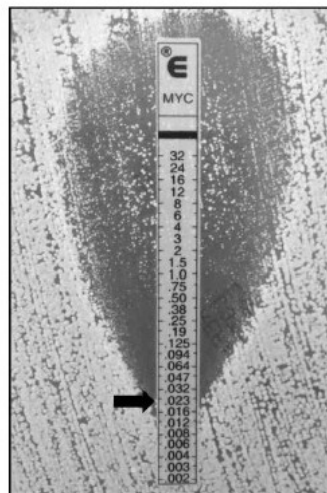
C. albicans: CMI élevée liée à la présence d'une mutation du gène *ERG3* (CMI=1.5 µg/mL)

Flucytosine

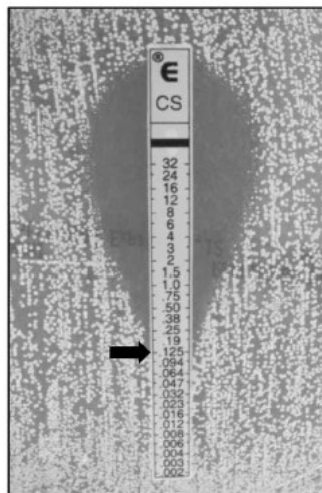


C. albicans: Souche sensible (CMI=0.125 µg/mL)

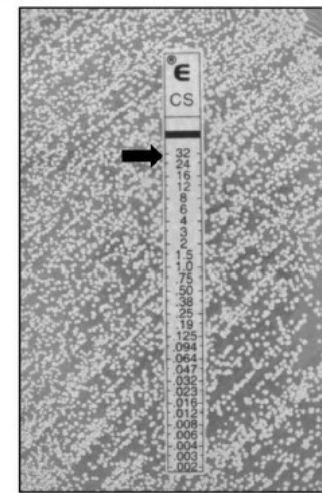
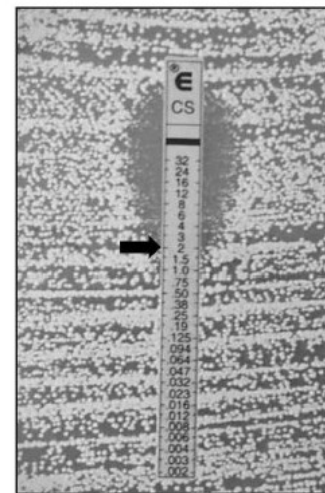
Echinocandines



C. tropicalis: « Eagle effect » ou phénomène de croissance paradoxale. CMI=0.023 µg/mL



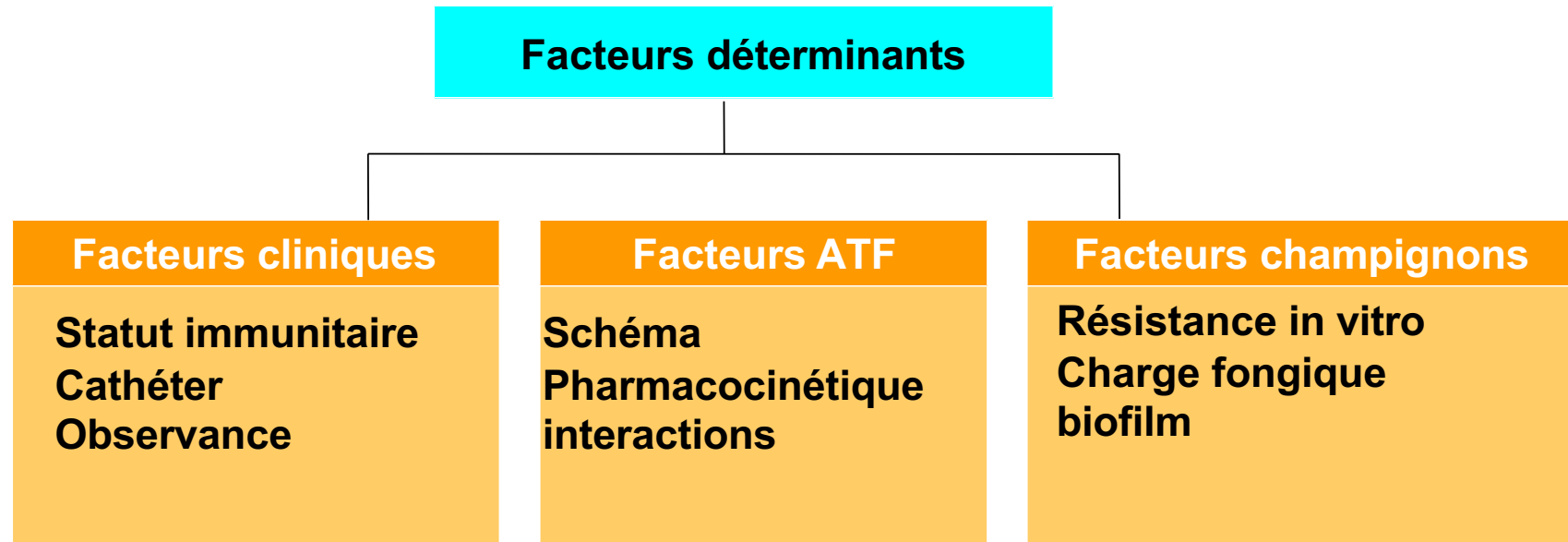
C. albicans: Isolats séquentiels et isogéniques obtenus chez un patient traité par caspofungine pendant plusieurs semaines. Noter l'augmentation progressive de la CMI au décours de la prise en charge thérapeutique (isolat initial à gauche). Cette résistance acquise *in vivo* est ici liée à l'apparition de la mutation S645P du gène *FKS1*, d'abord à l'état hétérozygote (photo du milieu, CMI=2 µg/mL) puis à l'état homozygote (illustration de droite, CMI>32 µg/mL).



Mesure des niveaux de sensibilité aux ATF

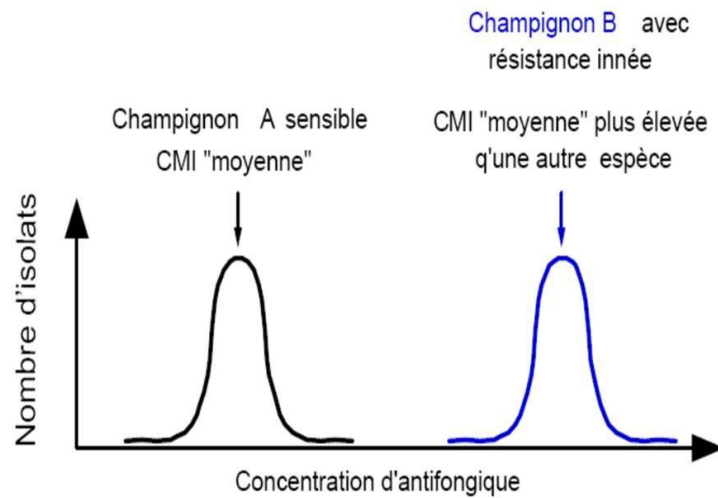
Prédiction de l'efficacité thérapeutique

Les tests explorent un seul facteur mais en réalité l'échec thérapeutique dépend de 3 acteurs: champignon, antifongique et hôte



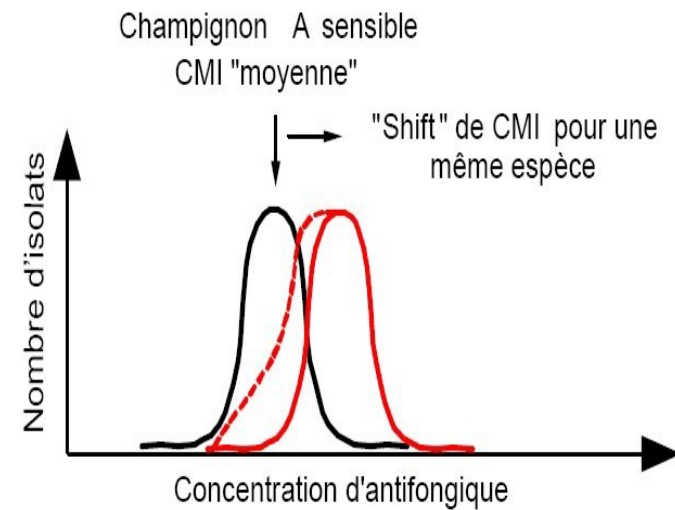
Mécanismes de résistance

Résistance innée



Ex.: Résistance au fluconazole chez *C. krusei*

Résistance acquise



Ex.: Résistance au fluconazole chez *C. albicans*

Mécanismes de résistance

Résistance acquise de *Candida spp* aux azolés

1- Surproduction de la cible CYP51 codée par le gène *ERG11*

- * Augmentation de la transcription de *ERG11* → surexpression mRNA augmentés par facteur 3 à 5 (modéré)

- * Amplification génique de *ERG11*

 - Duplication en plusieurs copies → augmentation mRNA

2 - Modification de la cible : diminution de l'affinité pour l'azolé

- * Mutations ponctuelles du gène *ERG11*

 - Substitution d'un acide aminé → altération de la liaison CYP51-Azole

3- Systèmes d'efflux

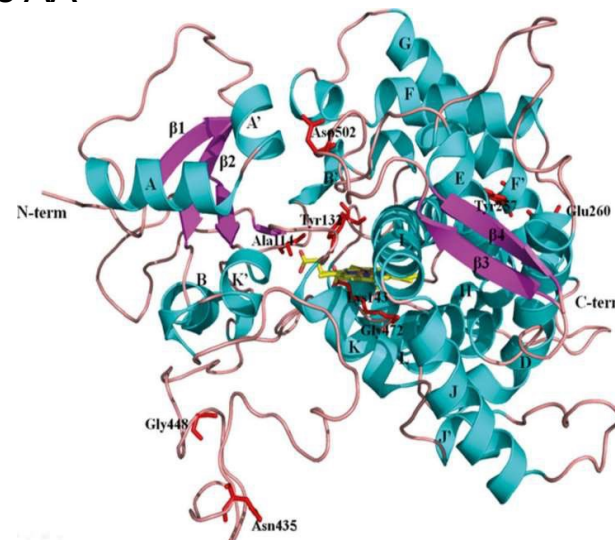
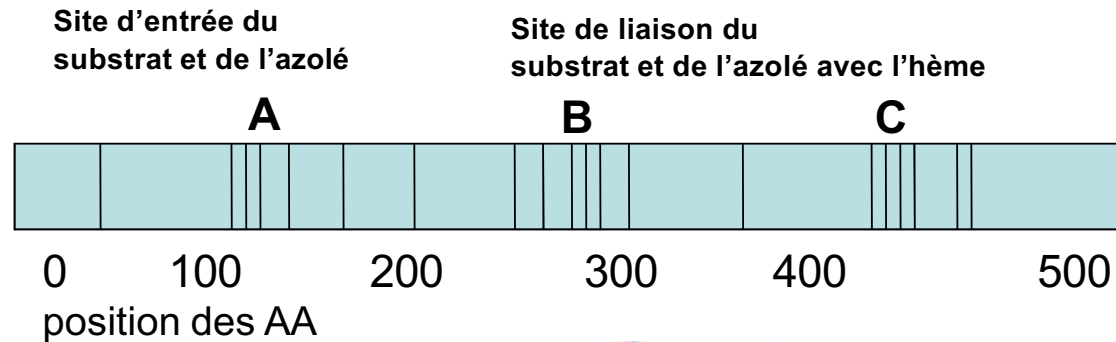
- * transporteurs membranaires → pompes

- * Chez champignons (levures) 2 familles de pompes impliquées dans la résistance aux antifongiques azolés CDR, MDR

Mécanismes de résistance

Mutations sur ERG11 codant pour la 14 α -déméthylase

Plus de 20 mutations concernant des substitutions sur 3 hot spots



Dans la pratique

1. Identifier le genre et l'espèce (notion de résistance innée)

Mise en place de la thérapeutique

2. Déterminer la sensibilité si :

- Infections invasives à levures (hémoc, liquides profonds normalement stériles, biopsie, KT)
- Atteintes superficielles de l'immunodéprimé
- Traitement ATF au long cours (R secondaire), réévaluation thérapeutique
- Patient immunocompétent: atteintes récidivantes, échec clinique
- Souches ou espèces peu fréquentes

3. Choisir une technique standardisée: E-test et comparaison avec les données obtenues pour la même espèce

Réévaluation de la thérapeutique