

Champignons pathogènes

Un nouvel espoir de traitement des infections généralisées

Carlo Petosa¹, Jérôme Govin², Flore Mietton^{1,2}

Candida albicans, un champignon pathogène dangereux

Les champignons pathogènes sont responsables d'infections généralisées et représentent un problème majeur de santé mondiale, avec 2 millions de malades chaque année. Candidose, méningite cryptococcique, aspergillose et pneumocystose sont responsables à elles seules de plus de 800 000 décès par an [1]. Les patients immunodéprimés sont particulièrement vulnérables à ces infections, notamment ceux atteints par le virus de l'immunodéficience humaine, ceux traités par chimiothérapie ou les receveurs de greffes d'organes. Sur les plans épidémiologique et pharmaco-économique, ces infections invasives représentent aujourd'hui un poids social considérable, en France [2] et dans le monde [3].

Parmi les différentes espèces de champignons, *Candida albicans* est impliqué dans plus de la moitié des candidoses et est toujours considéré comme un agent pathogène majeur. Cette levure est responsable d'infections des muqueuses gynécologique et digestive, qui peuvent évoluer en maladies systémiques. Cela concerne 0,3 % des admissions hospitalières en France et 50 % des patients touchés par ces infections généralisées en meurent [4].

L'arsenal de médicaments antifongiques à la disposition des hôpitaux se limite à quatre classes de molécules : les polyènes qui ciblent la membrane cellulaire du champignon et les échinocandines qui agissent sur sa paroi ; les azolés, qui inhibent la synthèse de l'ergostérol (équivalent du cholestérol

chez les cellules animales) et la flucytosine, qui interfère avec celle des acides nucléiques [5]. Leur efficacité clinique pour traiter les infections invasives est très limitée. L'utilisation massive de ces drogues, en lien avec l'augmentation des patients à risque, a favorisé l'émergence de souches résistantes. De plus, la toxicité et le coût élevé de ces traitements entraînent un besoin urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques [6].

Les protéines BET, une nouvelle cible antifongique

Les protéines de la famille BET (*bromodomain and extra-terminal*) ont été très conservées au cours de l'évolution et sont

¹Université Grenoble Alpes, CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale, 38000 Grenoble, France.

²Université Grenoble Alpes, CEA, Inserm, Institut de Biosciences et Biotechnologies de Grenoble, Laboratoire Biologie à Grande Échelle, 38000 Grenoble, France. fmietton@chu-grenoble.fr

retrouvées à la fois chez les champignons et chez l'homme. Ces protéines possèdent deux régions particulières, appelées bromodomaines, dont la poche hydrophobe reconnaît les lysines acétylées des histones. Cette liaison leur permet de se fixer à la chromatine et de moduler l'expression des gènes [7, 8] (→).

Ces dernières années, de petites molécules inhibitrices, qui bloquent la poche de liaison des bromodomaines BET, ont été développées avec succès chez l'homme (Figure 1). Les protéines BET ne sont alors plus capables de remplir leur mission, ce qui entraîne une dérégulation massive du programme d'expression

(→) Voir la Nouvelle de S. Rousseaux et al., m/s n° 2, février 2010, page 130

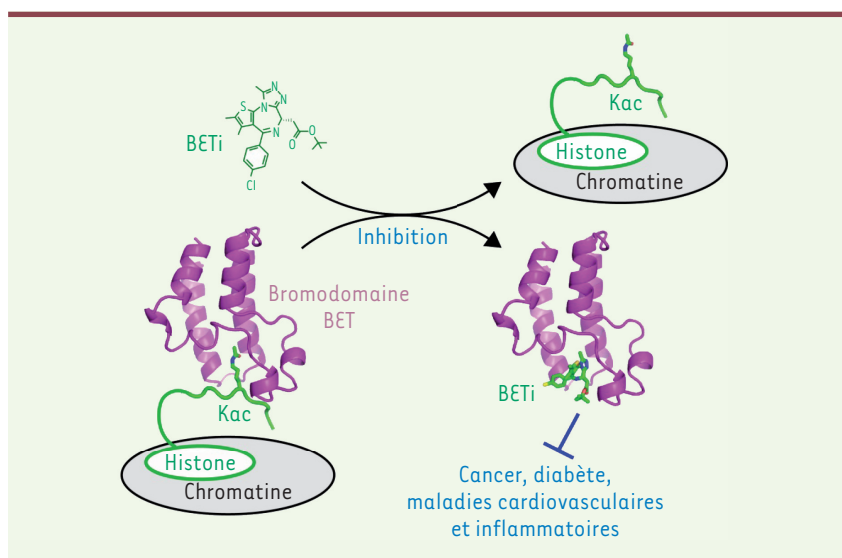


Figure 1. Inhibition d'un bromodomaine BET humain par une petite molécule. Les bromodomaines BET s'associent à la chromatine en reconnaissant les lysines acétylées (Kac) des histones. La fixation d'une petite molécule inhibitrice (BETi) dans la poche de liaison du bromodomaine décroche la protéine de la chromatine et module le niveau d'expression de nombreux gènes associés à diverses maladies.



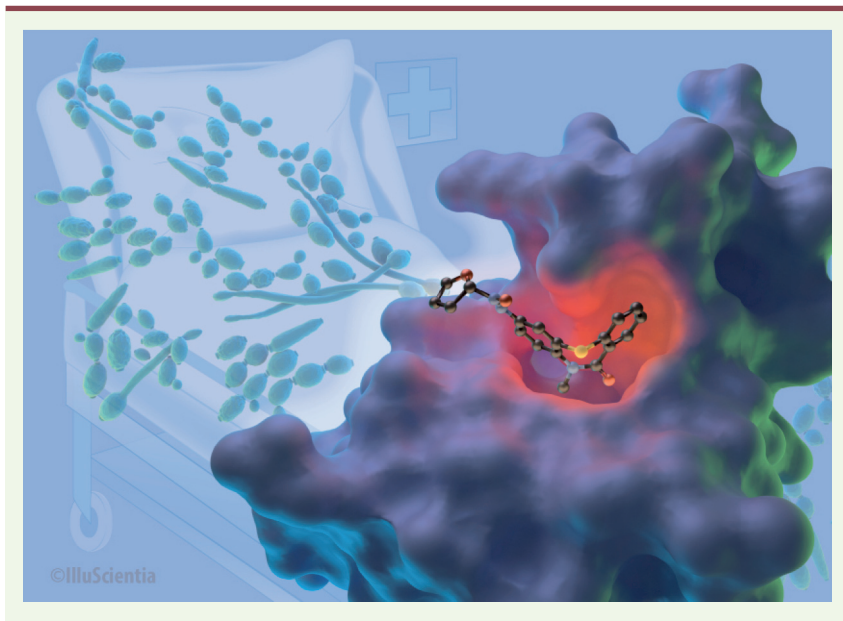


Figure 2. Modèle tridimensionnel du premier bromodomaine de Bdf1, en complexe avec un inhibiteur spécifique (© IlluScientia). L'arrière-plan présente des cellules du champignon pathogène *Candida albicans*.

génique. Le potentiel thérapeutique de ces inhibiteurs est large et est actuellement confirmé par plusieurs essais cliniques dédiés au traitement des cancers, du diabète, des maladies inflammatoires et cardiovasculaires [9].

Comme de nombreux champignons pathogènes, la levure *Candida albicans* ne possède qu'un seul membre de la famille BET, appelé Bdf1 (*bromodomain factor 1*). Cette protéine est un régulateur global de la transcription chez la levure boulangère, *Saccharomyces cerevisiae* [10]. Nous avons uni nos efforts avec l'Université de Californie du Sud, l'Institut californien de recherche biomédicale (Calibr), le CHU de Grenoble et l'Institut Pasteur afin d'explorer le potentiel de Bdf1 comme nouvelle cible thérapeutique pour traiter les infections causées par *C. albicans* [11].

Par des expériences de génétique de la levure et à l'aide d'un promoteur inducible, nous avons retiré le gène *BDF1* chez *C. albicans* : quand la protéine n'est plus exprimée, il en résulte une absence de croissance, ce qui démontre que la

présence de Bdf1 est indispensable à la survie de la levure. De même, la délétion ou la mutation ponctuelle des deux bromodomains de Bdf1 inhibe la croissance de *C. albicans*. Cela démontre que la présence de bromodomains fonctionnels de Bdf1 est essentielle à la survie du pathogène. Enfin chez la souris, la virulence de *C. albicans* dépend également de la présence de Bdf1 et de la fonctionnalité de ses bromodomains. L'analyse de la structure atomique des deux bromodomains de Bdf1 a révélé que leurs poches de liaison étaient plus larges de celles des protéines BET humaines. Ces différences structurales expliquent pourquoi les inhibiteurs de bromodomains BET humains sont inefficaces contre Bdf1 et suggèrent que les bromodomains de Bdf1 pourraient être inhibés de manière sélective.

Identification de nouvelles molécules inhibitrices par un criblage à haut débit

L'identification d'inhibiteurs sélectifs des bromodomains de Bdf1 a nécessité la mise au point et la miniaturisation

d'un test *in vitro* de mesure de fluorescence. Ce test est fondé sur la mesure de l'interaction entre le bromodomaine et son substrat, un peptide histone acétylé. L'ajout d'un inhibiteur diminue le signal fluorescent mesuré. Ce test a été robotisé pour cribler une chimiothèque de 80 000 composés, ce qui a permis d'identifier une centaine de molécules actives pour chacun des deux bromodomains de Bdf1. Les meilleurs composés présentent une concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) de l'ordre du micromolaire et une sélectivité plus de vingt fois supérieure pour Bdf1 en comparaison de son homologue humain.

L'analyse structurale de ces composés liés aux bromodomains de Bdf1 a permis d'identifier les résidus clés de leur mode de liaison et permettra, à terme, d'élaborer des inhibiteurs encore plus puissants et plus sélectifs (Figure 2). Enfin, nous avons démontré qu'au moins une de ces molécules possède la capacité d'interférer avec la croissance de *C. albicans*.

Nos résultats établissent la preuve de concept que des petites molécules peuvent inhiber sélectivement les bromodomains d'une protéine BET fongique, *in vitro* et dans un contexte cellulaire, tout en limitant leurs effets secondaires puisqu'elles épargnent les bromodomains humains.

Ces résultats, très prometteurs, ouvrent la voie au développement d'une nouvelle classe de médicaments antifongiques ciblant la protéine chromatinienne Bdf1. Cette étude a été menée sur *Candida albicans*, mais la conservation de la protéine Bdf1 parmi les espèces de champignons pathogènes laisse espérer qu'elle puisse représenter une cible thérapeutique pour un large spectre d'infections fongiques. ♦

A new hope to fight invasive fungal infection

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.



RÉFÉRENCES

1. Brown G D, Denning DW, Gow NA, et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012 ; 4 : 165rv113.
2. Gangneux JP, Bougnoux ME, Hennequin C, et al. LIFE program, SFMM-study group. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med* 2016 ; 26 : 385-90.
3. The burden of fungal disease: new evidence to show the scale of the problem across the globe (*Life*, 2017 : <http://go.nature.com/2sMKpuN>).
4. Leleu G, Aegerter P, Guidet B, Collège des utilisateurs de base de données en réanimation. Systemic candidiasis in intensive care units: a multicenter, matched-cohort study. *J Crit Care* 2002 ; 17 : 168-75.
5. Pound M W, Townsend M L, Dimondi V, et al. Overview of treatment options for invasive fungal infections. *Med Mycol* 2011 ; 49 : 561-80.
6. Denning D W, Bromley M J. Infectious disease. How to bolster the antifungal pipeline. *Science* 2015 ; 347 : 1414-6.
7. Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nat Rev Drug Discov* 2014 ; 13 : 337-56.
8. Rousseaux S, Petosa C, Müller CW, Khochbin S. Du nouveau dans la compréhension de la programmation postméiotique du génome mâle. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 130-2.
9. Ferri E, Petosa C, McKenna CE. Bromodomains: structure, function and pharmacology of inhibition. *Biochem Pharmacol* 2016 ; 106 : 1-18.
10. García-Oliver E, Ramus C, Perot J, et al. Bdf1 bromodomains are essential for meiosis and the expression of meiotic-specific genes. *PLoS Genet* 2017 ; 13 : e1006541.
11. Mietton F, Ferri E, Champeboux M, et al. Selective BET bromodomain inhibition as an antifungal therapeutic strategy. *Nat Commun* 2017 ; 8 : 15482.

NOUVELLE

Bio-impression assistée par laser

Une nouvelle approche pour la régénération osseuse

Hugo Oliveira¹⁻³, Nathalie Dusserre¹⁻³, Davit Hakobyan¹⁻³, Jean-Christophe Fricain^{1,2,4}

¹Université de Bordeaux, Bioingénierie tissulaire, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

²Inserm U1026, Bioingénierie tissulaire, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

³ART BioPrint, Inserm U1026, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

⁴CHU Bordeaux, Services d'odontologie et de santé buccale, 146, rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

hugo.de-oliveira@inserm.fr

> Les technologies de bio-impression permettent de positionner précisément les cellules et ainsi de mimer avec fidélité l'architecture des tissus natifs [1, 2]. Dans cette étude nous montrons que la bio-impression assistée par laser (LAB, *laser-assisted bio-printing*) permet d'imprimer *in situ* des cellules osseuses et de les agencer afin d'améliorer et de contrôler la réparation osseuse *in vivo* [3] (→).

(→) Voir la Synthèse de J.C. Fricain, *m/s* n° 1, janvier 2017, page 52

Le concept d'ingénierie tissulaire repose sur des constructions tridimensionnelles (3D) combinant des matériaux biocompatibles et bioactifs avec des cellules et des facteurs bioactifs. Deux stratégies majeures sont utilisées : les approches descendantes « *top down* » et ascendantes « *bottom-up* ».

Dans les approches « *top down* », les cellules sont souvent ensemencées de façon éparse à l'intérieur d'une matrice synthétique ou naturelle façonnée pour

s'adapter à la géométrie souhaitée de la lésion à régénérer. Au cours des deux dernières décennies, cette stratégie a conduit à des progrès scientifiques et des succès précliniques, en particulier pour la régénération de tissus minces ou peu vascularisés tels que la peau, le cartilage ou les tissus conjonctifs, ou pour recréer des tissus à haute capacité de régénération et/ou de remodelage, comme l'os. Cependant, les approches « *top down* » reproduisent avec imprécision les caractéristiques microstructurales complexes des tissus natifs. La colonisation et la différenciation des cellules au sein des échafaudages restent difficiles à contrôler. Ces limitations expliquent que seules quelques applications cliniques aient réellement abouti à des succès.

Les approches « *bottom-up* », fondées sur une reconstruction brique par brique d'un tissu, offrent la possibilité de disposer chaque composant selon un patron prédéfini qui guide la maturation subsé-

quente de la construction tissulaire vers son architecture fonctionnelle finale. La distribution des cellules peut être définie à l'échelle micrométrique. Le contrôle couche par couche de la distribution des cellules dans la matrice favorise la régénération tissulaire. Parmi les différentes techniques « *bottom-up* », la bio-impression est devenue, depuis ces cinq dernières années, une approche prometteuse permettant de maîtriser la géométrie des tissus imprimés. Elle bénéficie des capacités du prototypage rapide, facilité par des procédures de conception et / ou de fabrication assistées par ordinateur (respectivement CAO et FAO), qui contrôlent la géométrie de la structure interne et la forme externe des échafaudages cellulaires lors de leur impression [4].

Il existe trois techniques majeures de bio-impression : le jet d'encre, la micro-extrusion et l'impression laser. Leurs avantages et leurs limites respectives