

BIOLOGIE CELLULAIRE – VIRUS ET PARASITES

Daniel THOMAS

Président

Claude Auriault

Véronique Baldin

Nicolas Bourmeyster

Daniel Brethes

Marie-France Cesbron-Delauw

Hélène Collandre

Bruno Gabriel

Alexandre Ghazi

Bruno Goud

Thierry Heidmann

Norbert Latruffe

Jérôme Lavergne

Jean-Pierre Mazat

Carl Mann

Claire Millot

Annie Molla

Gérard Pehau-Arnaudet

Françoise Russo-Marie

Annie Valette

Sylvie van der Werf

La cellule se retrouve actuellement au centre des recherches sur le vivant. Les avancées considérables réalisées ces dernières années dans de nombreuses disciplines (biologie et génétique moléculaire, biochimie, biologie structurale, microbiologie, nanophysique, etc.), ainsi que le développement de nouvelles méthodes d'analyse (microscopies à haute résolution, imagerie) vont permettre d'aborder les questions centrales que sont :

- connaître l'organisation et la dynamique des assemblages des molécules et macromolécules biologiques sur lesquels repose l'entité fonctionnelle de la cellule ;

- comprendre les mécanismes par lesquels la cellule répond ou communique avec son environnement immédiat, et ce dans un contexte normal ou pathologique.

Les axes majeurs abordés par les équipes relevant de la section peuvent actuellement se décliner ainsi :

- organisation et grandes fonctions de la cellule : enveloppes, membranes et protéines membranaires, cytosquelette et moteurs moléculaires, organelles, voies de signalisation, transport intracellulaire et trafic membranaire ;

- cycle cellulaire et apoptose ;

– interactions cellule/cellule : molécules d'adhérence, matrice extracellulaire ;

– biologie des virus, bactéries et parasites ;

– relations hôte-pathogène : mécanismes d'entrée, de multiplication et de développement dans la cellule, mécanismes de virulence et de défense de l'hôte.

Des nouvelles voies d'analyse en biologie cellulaire et en virologie et parasitologie ont été ouvertes grâce à des développements méthodologiques récents. Les débuts de la biologie cellulaire furent occupés par la description statique des cellules et de leurs composants par la microscopie optique et, à un niveau de résolution supérieur, par la microscopie électronique. La découverte des protéines à fluorescence intrinsèque, telles que la GFP (Green Fluorescent Protein) et ses dérivés, a révolutionné la biologie cellulaire en permettant la localisation dynamique des protéines dans des cellules vivantes. La découverte toute récente d'une méthode efficace pour induire la dégradation d'un ARN messager spécifique dans des cellules animales avec des petits ARN inhibiteurs (siRNA) permet pour la première fois une approche génétique relativement aisée pour étudier la fonction des protéines dans les cellules animales. Enfin, des progrès constants dans les domaines de la génomique et de la protéomique ont permis des approches systématiques de la classification des protéines en réseaux d'interaction, de localisation, et de fonctions qui ont bénéficié autant à la biologie cellulaire, la virologie, et la parasitologie que aux autres disciplines biologiques. Dans les pages suivantes, nous résumons ces progrès récents et décrivons les perspectives dans quelques domaines importants de la biologie cellulaire.

1 – L'ORGANISATION DE LA CELLULE

Grâce principalement à l'amélioration des techniques d'identification des protéines par spectrométrie de masse, nos connaissances de la composition protéique de plusieurs organites (mitochondries, chloroplastes, peroxyosomes) et structures sub-cellulaires (pore nucléaire, « spindle pole body » chez la levure) ont été grandement améliorées. D'autres structures sont plus difficiles à purifier (kinétochore, centrosome, compartiments membranaires transitoires de la voie de sécrétion ou de l'endocytose) et ne se prêtent pas encore à une démarche « protéomique ». Des résultats récents ont démontré la possibilité de criblages systématiques des interactions protéiques (combinant spectroscopie de masse et méthode du double hybride) donnant une image globale du réseau d'associations dans le protéome mitochondrial.

En France, des plates-formes performantes de spectroscopie de masse existent à Grenoble, Paris, et Toulouse, mais leur nombre est encore trop limité. Il est essentiel d'assurer la présence de services de base en spectrométrie de masse à proximité de tous les centres importants de recherche biologique. Très peu de gens en France mettent en œuvre des approches systématiques d'analyse fonctionnelle des génomes, cependant la création récente d'un réseau de Génomipoles pourrait aider à combler cette lacune.

D'autres projets visent à localiser systématiquement toutes les protéines exprimées dans un type cellulaire spécifique après leur fusion à un épitope ou à la GFP. Ces études devraient permettre de préciser la localisation de la plupart des protéines dans une cellule. Toutefois pour beaucoup de protéines cette localisation est dynamique et est régulée par des conditions spécifiques. Pour mieux comprendre les fonctions des protéines importantes, des études individuelles et approfondies de leur localisation seront souvent nécessaires.

Parmi les organites cellulaires, les systèmes bioénergétiques (mitochondrie et chloroplaste) sont l'objet d'un intérêt particulier et leur étude est abordée sous divers angles. En premier lieu, en tant que composants de la cellule eucaryote, leur rôle est analysé du point de vue des fonctions métaboliques, et plus largement de l'homéostasie cellulaire. Outre leur rôle bioénergétique, de nouvelles fonctions ou pathologies ont été découvertes dans la période récente. Il s'agit d'une part du rôle de la mitochondrie dans le déclenchement de l'apoptose (translocation du cytochrome-c vers le cytoplasme). D'autre part, les processus d'oxydoréduction intervenant dans la mitochondrie (ou le chloroplaste) génèrent des espèces réactives de l'oxygène, toxiques impliqués dans la sénescence. Un deuxième centre d'intérêt considère ces organites comme systèmes modèles de trafic des protéines et d'assemblage de complexes membranaires dont une partie est codée et synthétisée dans l'organite, une autre partie importée à partir du cytoplasme. La troisième thématique s'intéresse au fonctionnement moléculaire des membranes bioénergétiques : couplage des transferts d'électrons et de protons, régulations fonctionnelles. Les systèmes photosynthétiques (chloroplastes, bactéries) présentent de ce point de vue le grand avantage offert par le déclenchement photochimique, permettant une synchronisation parfaite des processus primaires. Toute une gamme d'études spectroscopiques résolues en temps est ainsi mise à profit pour la compréhension à l'échelle atomique des mécanismes de transfert d'excitation électronique, de transferts d'électrons et de protons.

La connaissance du noyau a progressé. Il est maintenant décrit comme un compartiment cellulaire hautement régulé dans l'espace mais aussi au cours du cycle cellulaire (nucléole, télomère). La topologie intranucléaire code une information épigénétique.

Notre compréhension des mécanismes de nucléation des cytosquelettes actinique et microtubulaire a bien progressé. Dans les deux cas, la nucléation fait appel à une structure contenant des protéines apparentées aux sous-unités principales des polymères

nucléés. Beaucoup de protéines associées aux cytosquelettes actinique et microtubulaire sont identifiées, mais la liste n'est sans doute pas exhaustive. Ces protéines contrôlent la dynamique de polymérisation/dépolymérisation du cytosquelette ou bien elles empruntent le réseau du cytosquelette afin d'acheminer des cargaisons variées (organites, vésicules de sécrétion ou d'endocytose, chromosomes condensés lors de la mitose, ARN messagers et protéines spécifiques) au sein de la cellule. L'ensemble des moteurs moléculaires classiques (myosines, kinésines, et dynéine) chargé des mouvements intracellulaires est identifié, et on a des bonnes notions de leur fonction cellulaire pour la plupart. Les études de pointe dans ce domaine vont des études biophysiques et de la détermination des structures cristallines des protéines ou des complexes purifiés, aux études de la visualisation dynamique des mouvements intracellulaires.

Des laboratoires français ont fait des contributions importantes dans ce domaine notamment sur la caractérisation des complexes de nucléation de l'actine, le rôle du centrosome dans la nucléation des microtubules, la caractérisation des protéines associées aux microtubules, et l'identification et le rôle des modifications post-traductionnelles de la tubuline.

La détermination de la polarité cellulaire dépend du cytosquelette et elle est importante aussi bien au niveau de la cellule individuelle qu'au niveau du développement de l'organisme multicellulaire. La régulation du cytosquelette est également importante dans la mobilité cellulaire, et dans ce cadre, les petites protéines G de la famille Rho jouent un rôle primordial. Au cours de ces dernières années, les voies de signalisation où ces GTPases sont impliquées ont été largement explorées, et de nombreuses protéines activatrices situées en amont (les facteurs d'échange) et effectrices situées en aval ont été caractérisées. La gamme de fonctions cellulaires impliquant ces GTPases de la famille Rho s'est élargie, du contrôle du cytosquelette à la régulation de l'apoptose et de la réponse au stress. De nouvelles technologies ont été mise en œuvre comme le FRET

(fluorescence resonance energy transfer) qui permet une étude spatio-temporelle de l'activation des petites protéines G, mais également le « triple hybride » pour déterminer la spécificité de facteurs d'échange de GTP (yeast exchange assay) ou la recherche en double hybride d'inhibiteurs peptidiques (aptamères) de ces facteurs d'échange.

La polarité cellulaire est étudiée en France avec les modèles levure, drosophile, embryons d'invertébré marin, et cellules épithéliales de mammifères en culture.

2 – LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE

Deux principaux types de transport existent dans les cellules eucaryotes : le transport de type vésiculaire (ou tubulaire) dans lequel les macromolécules sont transportées par des structures (intermédiaires de transport) délimitées par une membrane (voie de biosynthèse/sécrétion et d'endocytose), et le transport non vésiculaire dans lequel les macromolécules sont acheminées vers leur destination finale par diffusion ou en association avec les éléments du cytosquelette grâce à la présence de signaux spécifiques. L'étude des mécanismes du transport intracellulaire est un des domaines les plus actifs de la biologie cellulaire. Des avancées considérables ont été réalisées ces dernières années dans la description au niveau moléculaire des principales voies de transport, dans l'étude des mécanismes de tri et d'adressage des protéines et des lipides, et dans la compréhension des processus complexes et étroitement régulés qui permettent à la cellule de maintenir à tout moment l'intégrité fonctionnelle de ses compartiments. Cinq grandes familles de protéines interviennent directement dans les mécanismes du transport intracellulaire : les protéines de manteaux, les complexes SNAREs, les complexes d'arrimage, les petites GTPases Rab, et les moteurs

moléculaires. Le transport intracellulaire est actuellement en train d'évoluer d'une phase essentiellement descriptive et basée sur des concepts de ciblage et de reconnaissance moléculaire vers une phase plus sophistiquée d'analyse dynamique et de compréhension du rôle des processus d'auto-organisation dans la formation et le maintien des compartiments membranaires sur lesquels repose l'unité fonctionnelle de la cellule eucaryote.

- **Les domaines membranaires.** La formation d'un intermédiaire de transport à partir d'une membrane « donneuse » suppose la formation à un moment donné d'un domaine membranaire dans lequel sont ségrégués les protéines et lipides transportés ou destinés à former l'intermédiaire de transport. L'étude de ces processus a progressivement débouché sur le concept selon lequel l'organisation des membranes biologiques en sous-domaines est probablement un phénomène général et essentiel pour leur fonction. Un des exemples les plus connus est celui des radeaux (« rafts »), domaines membranaires riches en cholestérol et sphingolipides. Les relations entre microdomaines membranaires et processus de transport sont loin d'être éclaircies et commencent à modifier le cadre conceptuel de nos hypothèses sur les mécanismes du transport. Il semble par exemple de plus en plus probable que certaines étapes du transport (entre autres au niveau de l'appareil de Golgi) s'effectuent par des processus complexes de « maturation » ou transformation progressive des membranes du compartiment lui-même.

- **Le transport non vésiculaire et la biogenèse des organites.** Plusieurs types de signaux inscrits dans la structure primaire ou secondaire des protéines permettant de les cibler spécifiquement vers les compartiments de la cellule (réticulum endoplasmique, mitochondries, chloroplastes, peroxysomes) sont maintenant caractérisés. Notons que le décryptage de ces signaux (et en particulier de la séquence signal permettant la translocation des protéines au travers des membranes du réticulum endoplasmique) a valu le prix Nobel de Médecine à G. Blobel en 1999. Les signaux responsables de la localisation des protéines sur l'appareil

de Golgi ou certains sous-domaines membranaires restent néanmoins très mal connus, et les récepteurs à ces signaux d'adressage ainsi que l'assemblage et la dynamique des complexes ne sont pas complètement élucidés.

- Un domaine qui a connu un essor spectaculaire ces dernières années est celui du **transport nucléocytoplasmique** qui permet l'import vers le noyau de nombreuses protéines et la sortie des ARN messagers. La structure du pore nucléaire est maintenant connue, ainsi que la machinerie moléculaire du transport nucléocytoplasmique. Ces études ont mis en particulier en évidence le rôle-clé joué par la GTPase Ran dans ces processus (établissement d'un gradient Ran:GTP versus Ran:GDP). Une forte concentration de Ran:GTP près de la chromatine est également nécessaire pour l'assemblage normal du fuseau mitotique. Les multiples fonctions distinctes de la GTPase Ran illustrent bien la complexité des mailles des réseaux de régulation qui défie notre capacité actuelle de les cataloguer et de les comprendre comme un système intégré fonctionnel.

La France est globalement mal placée dans la compétition internationale dans le domaine du transport intracellulaire et des moteurs moléculaires. Il y a cependant de très bonnes équipes travaillant sur les GTPases de la superfamille Ras impliquées dans le transport intracellulaire (Rab et ARF), les mécanismes de base du transport intracellulaire, la sécrétion dite régulée dans les cellules neuronales et neuro-endocrines, et les mécanismes d'entrée de micro-organismes et les interactions avec la cellule-hôte.

3 – LA DUPLICATION, LA DIVISION, ET LA MORT PROGRAMMÉE DES CELLULES

L'importance de ce domaine d'études est soulignée par le fait que le Prix Nobel en physiologie ou médecine en 2001 a été attribué à Leland Hartwell, Paul Nurse, et Tim Hunt pour leurs travaux sur le cycle de division cellulaire et l'attribution du même prix en 2002 à Sidney Brenner, Robert Horvitz, et John Sulston pour leurs travaux sur l'organogenèse et la mort cellulaire programmée. Il faut remarquer la place primordiale des organismes modèles dans la réussite de ces travaux. Hartwell et Nurse ont étudié le cycle cellulaire chez les levures, Hunt a travaillé avec des embryons d'invertébré marin et d'amphibien, alors que Brenner, Horvitz, et Sulston ont étudié un nématode. La conservation forte de tous les processus communs aux cellules eucaryotes a permis l'extrapolation rapide à l'homme des résultats obtenus avec ces organismes modèles facilement manipulables.

- Il y a trois grands mécanismes contrôlant la progression du **cycle cellulaire** : la phosphorylation des protéines par des complexes Cdk (cycline-dépendent kinase)-cycline qui sont activés pendant des phases spécifiques du cycle cellulaire, l'expression des gènes codant pour des régulateurs du cycle cellulaire pendant des stades spécifiques du cycle, et la protéolyse par des voies ubiquitine-dépendantes des régulateurs clefs de la division cellulaire. Des voies de surveillance, dites « checkpoints » contrôlent le déroulement correct du cycle cellulaire. En présence de lésions de l'ADN, les transitions G1/S et G2/M sont inhibées ainsi que la progression de la réplication de l'ADN génomique. L'inhibition met en jeu soit des phosphorylations inhibitrices des Cdk soit l'expression des protéines (appelées CKI pour Cdk inhibiteurs) qui fixent et inhibent les Cdk. Une autre voie de surveillance empêche l'entrée en anaphase si des kinetochores ne sont pas attachés au fuseau et sous tension à la plaque métaphasique.

• **La mort cellulaire programmée** (apoptose) est essentielle pour l'organogenèse pendant le développement des métazoaires et pour la fonction normale du système immunitaire. Elle est également déclenchée par des voies de surveillance quand la cellule se trouve dans une situation où elle a reçu des lésions irréparables de l'ADN. La mort cellulaire dans cette situation empêche la prolifération des cellules qui auraient subi des remaniements génétiques importants avec le risque de l'inactivation des suppresseurs de tumeurs ou l'activation des oncogènes qui pourraient conduire à l'oncogenèse.

En France, quelques laboratoires ont fait des contributions importantes à l'analyse biochimique du cycle cellulaire et des voies de surveillance dans des extraits d'ovocyte de Xénope et d'embryons d'invertébré marin. Il y a également quelques laboratoires excellents travaillant sur ces sujets avec des cellules de mammifères en culture ou avec les levures ou la drosophile comme modèle. Dans le domaine de l'apoptose, des laboratoires français ont apporté des contributions significatives notamment en ce qui concerne le rôle des mitochondries dans le déclenchement de certaines voies. Il faut néanmoins constater le nombre des laboratoires français travaillant sur ces sujets est faible, ce qui explique l'impact relativement modeste de la France dans ces domaines sur le plan international.

La plupart des grandes voies de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose sont connues de façon schématique. Les travaux en cours cherchent à identifier l'ensemble des molécules composant ces voies et à préciser leur mécanisme d'action. Les progrès importants dans ces domaines ont été aiguillonnés par les retombées attendues dans la compréhension et le traitement des cancers. Grâce à ces travaux, nous comprenons le mécanisme d'action d'une classe importante de suppresseurs de tumeurs et de proto-oncogènes agissant au niveau du cycle cellulaire ou des voies de surveillance.

4 – LA SIGNALISATION CELLULAIRE

La signalisation cellulaire recouvre l'ensemble des mécanismes consistant en la perception par la cellule et la traduction à l'intérieur de la cellule des informations (signaux) qui lui permettent de déterminer sa conduite et l'accomplissement de ses grandes fonctions telles que croissance et prolifération, différenciation, morphologie, mouvements et migration, contrôle des fonctions spécialisées. Des progrès considérables ont été accomplis ces dernières années, en particulier au niveau de la biologie cellulaire de la signalisation. Les récepteurs de nombreuses molécules de signalisation ont été identifiés. Parallèlement à la caractérisation des récepteurs membranaires, la vaste quantité de travaux rapportés ces dernières années a permis une meilleure compréhension des voies de transduction du signal de la membrane au noyau, illustrant à la fois leur grande diversité et de nombreuses caractéristiques communes. La majorité de ces voies impliquent des cascades de phosphorylations initiées soit par l'autophosphorylation du récepteur lui-même (RTK), soit en réponse à des variations de concentration de petites molécules ou ions (Ca^{2+} , cAMP, cGMP, DAG, IP3, etc.). De nombreuses « protéines relais » ont été caractérisées. Elles présentent une structure modulaire composée de motifs peptidiques conservés.

Ces modules, combinés selon différentes déclinaisons au sein des protéines impliquées, permettent de structurer physiquement les cascades de signalisation. Étant donné que ces modules conditionnent l'agencement des voies de signalisation, leur recensement et la compréhension des mécanismes impliqués (structure tridimensionnelle, affinités mises en jeu) seront indispensables pour décoder les règles de la signalisation intracellulaire. Déjà, la possibilité de les repérer dans les séquences génomiques permet d'accélérer la caractérisation de nouvelles protéines essentielles et de prédire leur fonction. Les cascades de phosphorylation sont abondamment détaillées et des

clivages peptidiques ou des déstabilisations de protéines par ubiquitinylation ont été décrits. D'autres modifications post-traductionnelles, comme la conjugaison de peptides similaires à l'ubiquitine (SUMO, Nedd1, etc.), la glycosylation, l'acétylation, et la méthylation agissent en synergie avec les phosphorylations et sont de plus en plus étudiées dans la signalisation.

Si les mécanismes moléculaires qui sous-tendent le démarrage de la transcription restent mal définis, la dissection fine de plusieurs voies de signalisation permet maintenant d'avoir une image assez précise des diverses modalités utilisées pour contrôler la transcription en réponse à l'environnement cellulaire. On peut distinguer trois stratégies pour la transmission du signal au noyau :

- des cascades de phosphorylations aboutissent à l'entrée de kinases dans le noyau où elles modifient des facteurs de transcription ;

- des facteurs de transcription sont activés ou libérés d'une interaction inhibitrice dans le cytoplasme et transportés au noyau ;

- les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription directement activés par le ligand.

Si les données actuelles illustrent bien la diversité des stratégies utilisées, nos connaissances sur les modalités d'interaction entre les nombreuses voies de signalisation qui modulent l'expression génique restent encore très parcellaires. Décompactions de l'ADN et remodelage de la chromatine sont des champs d'investigation qui ont beaucoup progressé ces dernières années. Des facteurs de remodelage (SWI/SNF, CHRAC, NURD) ont été purifiés, il s'agit de complexes de très haut poids moléculaire composés entre autres :

- d'une ATPase (SWI2/ SNF2, Mi-2, ISWI) qui utilise l'énergie d'hydrolyse de l'ATP pour déplacer les nucléosomes ;

- d'une enzyme de modification traductionnelle (histone acetyl transferase ou déacétylase) ;

- des Arp (« Actin related proteins » telles Arp2/3 ou Arp7/9).

Actuellement le rôle respectif des différents acteurs et la dynamique de ces complexes restent à préciser. *Les équipes françaises sont peu investies dans l'étude des complexes de remodelage mais sont plus impliquées dans le décryptage du « code des histones » via les enzymes de modifications.*

• **Signalisation et cancer.** Le cancer est une maladie intrinsèque de la cellule, inhérente à la nature même de sa machinerie. Il provient du fait que certaines cellules ont perdu la capacité à contrôler leur prolifération et ont réussi à échapper aux mécanismes de surveillance qui, dans ces circonstances, entraîneraient l'apoptose. Normalement, les cellules contrôlent finement leur prolifération en fonction d'une multitude de signaux extrinsèques (hormones, cytokines, facteurs de croissance, conditions métaboliques) ou mécanique (contacts entre cellules ainsi qu'avec la matrice extracellulaire) qui assurent le maintien harmonieux de la taille et de la fonction de chaque organe, ainsi que le renouvellement nécessaire de certaines de leurs cellules au cours du temps. Le cancer est une maladie de la transduction de ces signaux ; c'est l'accumulation de défauts dans plusieurs de ces mécanismes de transduction et de surveillance qui permet le développement des cancers.

L'oncogenèse est un processus à plusieurs étapes qui nécessite conjointement l'activation d'oncogènes dominants et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. De nombreux oncogènes dominants, isolés à partir de tumeurs animales ou humaines, codent des protéines normalement impliquées dans la transduction de signaux mitogènes empruntant entre autres la voie Ras. Toutefois, l'activation d'oncogènes dominants n'est pas suffisante pour mener au cancer ; d'autres altérations génétiques, telles que l'inactivation de suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes, sont requises. Ces suppresseurs de tumeurs représentent les gardiens du contrôle de la prolifération ainsi que de l'intégrité de la cellule. Deux mécanismes principaux de surveillance exercent leur action au niveau du cycle cellulaire, les voies pRB/p16^{INK4a} et p53/p19^{ARF}. La voie pRB/p16 joue un rôle essentiel au niveau du contrôle du

cycle cellulaire, alors que l'activation de la voie p53 permet l'apoptose. L'inactivation des voies pRB/p16 ou p53/p19, permet donc à la future cellule cancéreuse d'échapper à la sénescence ou à l'apoptose ; l'invalidation de l'une d'entre elles, voire des deux, est constatée dans la très vaste majorité des tumeurs humaines.

La kinase c-abl fait partie aussi des voies de surveillance de l'intégrité de l'ADN. Dans les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), une translocation donne lieu à l'expression d'une protéine de fusion bcr-abl, responsable de la prolifération excessive des cellules myéloïdes. Le criblage des chimiothèques a identifié un inhibiteur de la kinase abl qui conduit à une rémission de la phase chronique de cette leucémie pour 90 % des patients traités. Cet inhibiteur est disponible depuis 2001 pour traiter la LMC et il représente le premier exemple d'un médicament ciblé contre un oncogène identifié sur la base des recherches fondamentales. Ces quelques éléments illustrent en quoi la connaissance des voies de signalisation contrôlant la prolifération cellulaire et l'apoptose sont essentielles pour le développement de nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre le cancer. En plus de son utilisation pratique pour la recherche des médicaments, le criblage des chimiothèques en combinaison avec des tests cellulaires est une approche puissante permettant d'identifier des inhibiteurs spécifiques et de disséquer des voies de régulation chez les cellules animales.

En France, quelques plates-formes de criblage de chimiothèques sont en cours d'installation dans des centres de recherche publique et cet effort mérite d'être soutenu.

• **L'intégration des voies de signalisation au niveau cellulaire.** L'ancienne vision d'un signal qui activerait une cascade unique aboutissant à une réponse particulière est maintenant remise en cause. Les différentes voies de signalisation semblent plutôt former un réseau intriqué de régulation. La formation de complexes macromoléculaires, rapprochant des protéines bien définies peut orienter les cascades de signalisation. Dans le même ordre d'idée, le couplage physique entre protéines

de signalisation et trafic intracellulaire permet probablement de compartimenter certaines voies et ainsi de les favoriser. Les structures cavéolaires, des régions de la membrane plasmique riches en cholestérol, glycosphingolipides et protéines, semblent participer à ce phénomène en couplant endocytose et signalisation cellulaire. L'activation spécifique d'une voie de signalisation peut aussi passer par l'inactivation ciblée d'autres voies. Une cellule est, à un moment donné, stimulée par plusieurs signaux et doit en tenir compte pour fournir une réponse cohérente. Quels sont les mécanismes qui vont permettre d'intégrer ces différents stimuli ? S'il est impossible d'avoir actuellement une vision globale des mécanismes mis en jeu, il semblerait néanmoins qu'une grande partie de cette intégration se fait au niveau des promoteurs et des enhanceurs des gènes cibles. Leur activité repose sur l'action combinée de nombreux facteurs de transcriptions stimulés par des voies différentes, mettant en jeu des phénomènes de coopérativité, de synergie ou d'inhibition.

La signalisation n'est pas un domaine particulièrement représenté en France. Il se développe autour de quelques pôles d'excellence et il existe quelques très bonnes équipes qui produisent des travaux de premier plan dans de nombreux domaines (biologie structurale, neurobiologie, hématologie, transduction des signaux hormonaux, des facteurs de croissance et des cytokines). La plupart d'entre elles travaillent sur les systèmes mammifères. Cependant, peu d'équipes utilisent la puissante approche que permet la génétique grâce à l'utilisation d'organismes modèles comme les levures, le nématode, et la drosophile.

• **Perspectives dans le domaine de la signalisation.** Les voies de signalisation reposent sur l'existence de jeux d'interactions entre protéines qui, d'une part, ordonnent le réseau de signalisations et, d'autre part conditionnent les modifications chimiques à la base de la transmission du signal. La connaissance de l'ensemble des interactions possibles sera nécessaire à la compréhension de la signalisation à l'échelle cellulaire. Répertoire ces complexes et en déterminer les fonctions sera

un enjeu majeur. Une carte globale des interactions protéiques pour les génomes de vertébrés n'est encore guère envisageable, au vu du nombre d'interactions à tester. En revanche, des cartes d'interactions ciblées produites par des cribles double-hybrides à haut débit, l'immunopurification des complexes ou l'utilisation des « puces à protéines », centrées sur des familles, des motifs, des voies ou des modifications, devraient déjà permettre de mieux circonscrire leurs rôles et d'aborder la question de l'organisation des réseaux. Cette approche nécessitera également le développement d'outils informatiques pour l'analyse des résultats et la modélisation des réseaux de régulation. De nombreuses interactions, labiles, de faible affinité ou impliquant des modifications post-traductionnelles ne pourront être étudiées hors de la cellule. Les résultats d'approches globales *in silico* devront en outre être confrontés au vivant. La possibilité de visualiser en temps réel non seulement les déplacements d'une protéine unique mais aussi son interaction avec d'autres partenaires et éventuellement des changements du comportement de cette protéine dans une cellule vivante après modifications devrait être possible par l'utilisation de protéines fluorescentes et le développement des techniques de nanovidéomicroscopie, de micro ou nanospectrofluorimétrie (SPT, SMT, FRET, FRAP, etc.).

5 – MEMBRANES ET PROTÉINES MEMBRANAIRES

• **Les membranes** (constituées de bicouches lipidiques associant des protéines) définissent les compartimentations de la cellule, à commencer par la cellule elle-même, permettant d'entretenir des différences de composition, de concentrations ioniques, de potentiel électrochimique. Elles jouent donc un rôle crucial dans l'organisation cellulaire. Les fonctions des organites et des structures membranaires

sont extrêmement variées : sites de synthèse et d'assemblage, relais ou vecteur du trafic intra et inter cellulaire, usines de dégradation, sièges des réactions de production d'ATP (respiration et photosynthèse). À quoi il convient évidemment d'ajouter les mécanismes de propagation et de transmission de l'influx nerveux.

• **Les protéines membranaires** ont une spécificité structurale : elles possèdent des domaines hydrophobes (souvent des hélices- transmembranaires) et leur organisation tridimensionnelle, comme leurs modalités d'assemblage sont fortement conditionnées par l'alternance de régions hydrophiles et hydrophobes. Leurs fonctions sont très diverses mais majoritairement dévolues aux différentes formes de communication et de transport transmembranaire : translocation de protéines, canaux ioniques, transfert transmembranaire d'électrons et de protons, transmission de signal par changement de conformation. Une autre famille fonctionnelle importante concerne les modifications topologiques des structures membranaires : reconnaissance, fusion et clivage de vésicules impliquées notamment dans les processus d'endo et exocytose. Dans tous ces processus, les interactions entre protéines membranaires ou entre celles-ci et les lipides contrôlent nombre d'aspects structuraux et dynamiques essentiels : formation de super-complexes, hétérogénéité latérale, dynamique de la morphologie membranaire. Les objectifs poursuivis par les chercheurs dans ce domaine se situent sur des plans très différents selon l'état d'avancement du système étudié : à un extrême, on mène une recherche de type protéomique sur tel type de membrane, dont la finalité est de découvrir de nouvelles protéines, puis d'en identifier la fonction ; à l'autre extrême, on a affaire à des complexes membranaires dont la structure et la fonction sont connues avec un grand raffinement et qui tendent à devenir des modèles d'étude physicochimiques.

Les protéines membranaires sont beaucoup plus difficiles à purifier et à cristalliser que les protéines hydrosolubles, en raison de leur hydrophobicité. Elles doivent être solubilisées dans des micelles de détergent, ce qui rend le processus de cristallisation délicat et

nécessite des protocoles spécifiques à chaque protéine. Il s'agit souvent de complexes de grande masse moléculaire, associant de multiples sous-unités. En outre, la purification de quantités de matériel suffisantes pour envisager la cristallisation est souvent problématique. Il y a donc un « retard » considérable du nombre de structures de ces protéines obtenues par cristallographie aux rayons X, en comparaison avec les protéines solubles. Cet état de fait doit toutefois être nuancé de façon très significative pour les raisons suivantes :

Tout d'abord, on a vu au cours des dix dernières années paraître les structures de bon nombre de protéines membranaires de première importance. C'est le cas notamment pour la plupart des complexes majeurs de la bioénergétique. La première structure à résolution atomique d'un centre réactionnel bactérien date d'une vingtaine d'années (prix Nobel de Michel, Huber et Deisenhofer), suivie quelques années plus tard de celle d'un autre centre réactionnel par une équipe française. Outre de nombreux centres réactionnels bactériens modifiés par mutagenèse dirigée, il faut maintenant ajouter les centres de types I et II de la photosynthèse oxygénique (chez Witt à Berlin), le complexe bc_1 (deux équipes américaines), la cytochrome-*c* oxydase (Michel à Francfort), la partie principalement non membranaire (F_1) de l'ATP-synthase mitochondriale (Walker à Cambridge), mais aussi, récemment, le dodécamaire membranaire qui constitue le rotor du moteur à protons F_0 . Parmi les structures récentes de protéines membranaires, mentionnons aussi la bactériorhodopsine, le canal facilitateur du glycérol, l'aquaporine, et surtout le canal à potassium (Ca^{2+} dépendant) dont la structure (MacKinnon) permet d'élucider le mécanisme d'ouverture et la sélectivité.

La cristallisation 3-D des protéines membranaires est difficile, cependant ces protéines présentent l'avantage spécifique de se prêter souvent à une cristallisation 2-D dans une membrane native ou artificielle. Ce type de réseaux est analysé en microscopie électronique et permet de résoudre la structure tridimensionnelle (à une résolution toutefois inférieure à celle de la cristallographie X).

Cette méthodologie a été appliquée avec succès, notamment à la bactériorhodopsine, aux complexes protéine-pigments (antennes) et au supercomplexe de la photosynthèse bactérienne. Une structure à 8 Å du complexe de translocation de protéines Sec vient d'être publiée. Les progrès des techniques de microscopie électronique (cryomicroscopie, canon à émission de champ, tomographie, techniques de traitement d'images) permettent également d'obtenir d'importantes informations structurales sur des systèmes non cristallins, là encore au prix d'une moindre résolution, mais avec l'avantage de pouvoir traiter des arrangements multimoléculaires dans leur environnement membranaire physiologique.

Enfin, il faut souligner que dans le cas au moins de la photosynthèse, les études fonctionnelles et spectroscopiques ont souvent fourni des informations structurales très précises (distances, orientations de cofacteurs, existence de supercomplexes) avant leur confirmation par les méthodes structurales. Il est également vrai que la résolution des structures a toujours apporté des informations inattendues de première importance (quasi-symétrie des centres réactionnels, mobilité de la protéine de Rieske du bc_1 , par exemple). Dans ce domaine comme dans d'autres, c'est la synergie des diverses approches (études fonctionnelles et spectroscopiques, approches biochimiques, mutagenèse dirigée, cristallisation -2 et -3D) qui a permis des progrès souvent spectaculaires.

Au total, on peut dire qu'en dépit des difficultés spécifiques aux protéines membranaires, c'est parmi elles que l'on trouve certains des objets complexes les mieux compris de la biologie (centres réactionnels photosynthétiques, bactériorhodopsine, cytochrome oxydase) ou en passe de le devenir (canal K^+ , ATP-ase, complexes bc_1 ou b_6-f).

Plutôt que de tenter d'énumérer les grandes avancées de la période récente, on peut évoquer un cas paradigmatique qui est celui de l'ATP-synthase. Dans les années 70, Mitchell (Nobel 1978) élabore le concept de couplage chimiosmotique postulant que l'enzyme responsable de la synthèse d'ATP

dans les mitochondries et les chloroplastes utilise comme force motrice la différence de potentiel électrochimique transmembranaire des protons. De délicats et subtils travaux d'enzymologie fonctionnelle (notamment ceux de Boyer, Nobel 1997) viennent ensuite conforter peu à peu cette hypothèse et aboutissent au modèle d'un moteur rotatif mu par le gradient de protons et induisant les déformations structurales qui apportent l'énergie libre nécessaire à la synthèse d'ATP. La partie catalytique de la protéine, le « stator » incluant son « rotor », est cristallisée et sa structure à résolution atomique publiée en 1994 (Walker, Nobel 1997), confirmant ce modèle. C'est maintenant aussi le cas d'une partie du moteur à protons membranaire. Enfin, par diverses méthodes combinant biochimie et mutagenèse dirigée, l'observation de la rotation du moteur sur molécule unique en vidéomicroscopie a été réalisée depuis 1997 (équipes de Kinoshita au Japon et de Junge en Allemagne). On est donc passé en une vingtaine d'années d'une série d'hypothèses audacieuses et vivement controversées à un objet nanotechnologique (un double moteur mécanico-chimique parfaitement couplé) connu à la résolution atomique et observable à l'échelle du complexe individuel.

La place de la recherche française dans ce domaine est mieux qu'honorable, parfois très bonne, mais elle n'a généralement pas su se hisser au tout premier plan. Les meilleurs laboratoires de structure de protéines membranaires sont allemands ou britanniques. On note toutefois un effort méthodologique important de la part d'équipes françaises sur les techniques de cristallisation de protéines membranaires, qui devrait faire évoluer cette situation. Une équipe française est également en pointe dans une approche de biochimie structurale sur l'ATPase. Nous avons quelques très bonnes équipes en microscopie électronique. Un autre point fort concerne les études fonctionnelles, cinétiques et spectroscopiques en photosynthèse ou sur les oxydases. Notre place est également très bonne sur les problèmes d'assemblage de protéines membranaires et de translocation de protéines. La communauté des « membranologistes »

français a créé et maintient de façon active diverses structures permettant circulation de l'information et collaborations.

• Perspectives dans le domaine des Membranes et protéines membranaires.

Nous avons souligné les difficultés spécifiques aux protéines membranaires – et aussi le bond en avant que permet la résolution de la structure quand elle aboutit. Le caractère long et aléatoire quant aux chances de succès (avec ce que cela implique comme déficit de publications) de la recherche dans ce domaine est probablement à l'origine du relatif retard des États-Unis et de la bonne place de l'Europe (Allemagne et GB), sans que la France ait su tirer profit de l'avantage potentiel que son système de recherche pouvait représenter dans une telle conjoncture. Il convient donc de remédier à ce retard en favorisant la constitution d'équipes multidisciplinaires (associant biochimistes, biologistes moléculaires, physico-chimistes, cristallographes), dotés de moyens suffisants. Une démarche essentielle pour l'avenir est de favoriser les innovations méthodologiques dans ce domaine, aussi bien dans les techniques de cristallisation (Voir les programmes actuellement développés par le GDR « Protéines Membranaires ») que dans l'acquisition des structures (techniques moins destructives, informations dynamiques). À cet égard, le potentiel que représente Soleil devra jouer un rôle important. À côté de la cristallographie-X, il faut développer d'autres techniques moins résolutes mais donnant accès à des informations dans la membrane native, concernant des associations multimoléculaires et leur dynamique : microscopie électronique, microscopies à champ proche.

Certaines protéines membranaires effectuant des fonctions particulièrement complexes, sont devenues, nous l'avons dit, des objets parmi les mieux connus de la biologie. Cela ne signifie nullement que leur étude est achevée, mais que l'on dispose à la fois de la structure à résolution atomique, des modifications permises par la mutagenèse dirigée, et d'une masse de données et de connaissances techniques permettant l'étude détaillée de leur fonctionnement. Ces objets deviennent de véritables « laboratoires »

de physique. Les centres réactionnels photosynthétiques sont le système privilégié d'étude du transfert d'électrons (théorie de Marcus). Ils le deviennent (avec la bactériorhodopsine et la cytochrome oxydase) pour le transfert de protons. Les premières réactions « cohérentes » (en phase avec la perturbation vibrationnelle déclenchée par excitation photochimique) ont été mises en évidence (par une équipe française) sur des centres réactionnels et des oxydases. Il est clair que des démarches de ce type, à l'interface entre biologie, physique, chimie et nanotechnologies, sont appelées à d'importants développements qu'il convient de stimuler. On peut là encore évoquer le cas de l'ATP-synthase, extraordinaire nanomoteur rotatif, couplant de façon extrêmement efficace catalyse enzymatique et déformations mécaniques. On peut citer d'autres exemples d'enzymes membranaires assurant un couplage strict entre déplacement de sous unités et processus catalytique : la H^+ transhydrogénase, les complexes bc_1 et b_6/f , le moteur du flagelle bactérien. Il s'agit là d'objets privilégiés pour la compréhension de la dynamique moléculaire et de la catalyse : c'est le type de problème pour lequel une collaboration entre physicochimistes (théoriciens et expérimentateurs) et biologistes doit être encouragée, et dotée de moyens appropriés (notamment en vidéomicroscopie et calculs de dynamique moléculaire).

Cependant que nombre de complexes individuels isolés sont de mieux en mieux connus, un intérêt accru se porte sur le niveau d'intégration supérieur, concernant par exemple leurs interactions dans la membrane. Les progrès de diverses techniques (microscopie électronique, sondes et pontages biochimiques) concourent à rendre possible ce type d'approche. Mentionnons les recherches menées sur les associations en supercomplexes intervenant dans les membranes photosynthétiques et mitochondriale. Ces associations peuvent constituer des unités fonctionnelles, mais aussi contrôler la structure membranaire à grande échelle : c'est le cas dans les bactéries photosynthétiques et aussi dans les mitochondries. La question des hétérogénéités latérales dans les membranes (exemple des « rafts »), et le rôle qu'y jouent lipides et protéines est un autre sujet de première importance.

6 – LES VIRUS

De par la diversité des organismes hôte infectés par les virus, auxquels s'ajoutent également les agents transmissibles non conventionnels (ATNC) ou prions, la virologie revêt une importance majeure sur le plan de la santé publique (sur 50 millions de morts par an dans la population mondiale, 10 millions sont attribuables à des virus) et de la santé animale, mais également sur le plan économique de par l'impact des maladies virales dans la production agricole et alimentaire. De plus, le risque sanitaire représenté par les virus et les ATNC ainsi que leur rôle potentialisateur dans le développement de certaines pathologies qui ne leur sont pas directement associées doivent être pris en compte.

La virologie est par essence multidisciplinaire. En effet, outre les études structurales des virus en tant qu'objets et l'analyse de leur organisation génétique, l'essentiel des recherches est consacré à l'étude des interactions des virus avec leur hôte tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme hôte, incluant notamment la réponse immunitaire, ou encore au niveau de la population par l'étude de l'écologie et de l'épidémiologie virale et des franchissements de la barrière d'espèce. En outre, il faut mentionner que l'étude des virus a permis la mise à jour de nombreux mécanismes cellulaires fondamentaux ainsi que le développement de nouveaux outils moléculaires d'intérêt au plan des recherches fondamentales concernant l'étude de la régulation et/ou de l'expression génétique (promoteurs SV40, CMV ; IRES des picornavirus) comme au plan des applications (vecteurs viraux d'intérêt comme vaccins ou pour la thérapie génique). Il n'est par conséquent pas surprenant que les chercheurs travaillant sur les virus se trouvent répartis au CNRS dans différentes sections du Comité National, mais sont également largement représentés au sein d'autres organismes en particulier l'INSERM, l'INRA et l'AFSSA ainsi que dans les structures hospitalo-universitaires. Paradoxalement, la

part réservée à l'enseignement de la virologie en France est faible et très peu d'enseignements de 3^{ème} cycle sont spécifiquement dédiés à cette discipline.

Au cours des dix dernières années, la découverte de nouveaux virus et ATNC (virus Hendra, virus Nipah, TTV, vCJD), l'identification d'homologues simiens de virus importants en pathologie humaine (herpesvirus simiens, SIV du chimpanzé), l'émergence chez l'homme de virus issus du réservoir animal (grippe du poulet à Hong Kong, monkeypox virus en Afrique), la survenue d'épidémies de virus de fièvres hémorragiques (Ebola, virus de la fièvre de la vallée du Rift), ainsi que l'extension géographique ou la réémergence de virus ou de variants viraux dans de nouvelles régions du globe (virus West-Nile, virus de la Dengue, entérovirus recombinants) sans oublier l'ampleur considérable prise par la pandémie liée au VIH, sont autant d'éléments rappelant l'extraordinaire plasticité et capacité d'adaptation des virus à de nouvelles niches écologiques.

Sur le plan moléculaire les avancées récentes dans le domaine de la biologie structurale ont permis d'établir la structure de plusieurs virus entiers, et la détermination de la structure d'un grand nombre de protéines virales, comme de protéines cellulaires avec lesquelles elles interagissent, a largement contribué à l'analyse des relations structure-fonctions au cours du cycle viral en relation avec le développement des techniques de génétique inverse pour de nouvelles familles virales (grippe, coronavirus). En particulier, des progrès considérables ont été réalisés dans l'élucidation des étapes de l'entrée virale avec l'identification de nouveaux récepteurs et co-récepteurs, l'analyse des changements conformationnels consécutifs à l'interaction virus-récepteurs et l'étude des processus de fusion membranaire. Parallèlement, les travaux visant à élucider les mécanismes de traduction, transcription et réplication des génomes viraux au cours du cycle viral ont été poursuivis permettant de préciser les assemblages moléculaires mis en jeu et dans certains cas leur reconstitution *in vitro*. Les avancées les plus significatives, qui ont largement bénéficié du développement

de la technique du double hybride et des techniques d'imagerie en biologie cellulaire, concernent l'identification des interactions des constituants viraux avec la machinerie cellulaire et de leur trafic intracellulaire (interactions avec le cytosquelette, trafic vésiculaire, translocation nucléaire). L'importance des structures membranaires intracellulaires dans la constitution des complexes de réplication viraux a été précisée, et le rôle des radeaux lipidiques (rafts) pour l'assemblage et la morphogénèse des particules virales mis en évidence. Par ailleurs, de nombreux travaux ont concerné l'étude de l'impact de l'infection virale sur la biologie de la cellule, notamment sur l'activation cellulaire et les voies de signalisation, le cycle cellulaire, la modulation de la structure de la chromatine (particulièrement dans le cadre de l'établissement de la latence virale et de sa réactivation), ainsi que sur l'induction de l'apoptose cellulaire. Parallèlement, l'étude des mécanismes d'échappement des virus à la réponse de l'hôte a permis l'identification de nombreuses protéines virales homologues de protéines cellulaires (virokines, virocepteurs, protéines anti-apoptotiques, etc.) et l'élucidation d'une variété de mécanismes moléculaires mis en jeu pour l'échappement aux réponses cellulaires antivirales non spécifiques (inhibition de la réponse interféron, de l'apoptose) ou spécifiques (inhibition de la présentation des épitopes par le CMH-I ou le CMH-II). De telles études, initialement menées dans des systèmes cellulaires modèles, ont été plus généralement appliquées aux cellules primaires (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, lymphocytes, hépatocytes, etc.) et en relation avec l'état de différenciation ou d'activation cellulaire, notamment grâce aux techniques de cytométrie. En terme de physiopathologie des infections, le modèle de la souris reste largement utilisé, de par les possibilités offertes par les techniques de transgénèse. Ainsi, ces approches ont permis de réaliser des progrès considérables dans la compréhension de la pathogénèse liée aux prions par l'emploi de souris transgéniques ou invalidées pour le gène de la PrP, dans l'évaluation de l'importance relative des différents compartiments de la réponse de l'hôte à

l'infection virale, ou encore pour l'évaluation de la contribution de l'expression de gènes viraux dans la carcinogenèse. Enfin, l'évaluation de nouveaux antiviraux ciblant notamment les étapes de l'entrée virale et l'analyse des mécanismes de résistance ont fait l'objet de nombreuses études. De nombreux travaux ont également été consacrés au développement des vecteurs viraux et à l'évaluation de leurs applications, pour la thérapie génique (rétrovirus, lentivirus, adénovirus, AAV), en s'attachant particulièrement à leur ciblage cellulaire, pour la thérapie anti-tumorale, ou encore dans le domaine de la vaccinologie. Ces recherches ont été largement menées à la fois par des structures académiques et par des sociétés de biotechnologies. On peut toutefois noter le désengagement relatif de l'industrie pharmaceutique dans la mise au point de nouveaux vaccins, jugés peu rentables.

En France, suite à la découverte des oncogènes, à la priorité donnée au SIDA et plus récemment aux prions, la virologie s'est progressivement appauvrie. Le déplacement des moyens vers ces thématiques prioritaires ainsi que vers des recherches finalisées (vectorologie, thérapie génique) s'est traduite par un appauvrissement de la diversité des modèles viraux étudiés et la disparition de compétences. Ainsi, la virologie française est aujourd'hui dominée par le VIH et des contributions significatives ont été faites par des laboratoires français dans ce domaine. On note également d'excellentes contributions dans le domaine de la rétrovirologie, et des rétrotransposons. La France occupe également une place honorable dans le domaine de la vectorologie. En dépit de quelques très bonnes équipes dans le domaine du VHC (Virus de l'Hépatite C), la France ne se situe pas au tout premier plan dans ce domaine. La mise en place du réseau « hépatites » dans le cadre du Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie et Maladies Infectieuses et Parasitaires (PRFMMIP) devrait faire évoluer cette situation. Des contributions importantes ont également été réalisées par des équipes françaises dans le domaine de la virologie structurale. Alors que plusieurs équipes du CNRS s'intéressent aux herpesvirus, et occupent

une place plus qu'honorable au plan international, les recherches dans ce domaine restent largement dominées par la virologie médicale. En revanche, d'autres modèles viraux d'importance en santé publique ou vétérinaire (virus respiratoires, virus entériques, arbovirus) sont aujourd'hui peu ou pas étudiés sur le plan fondamental même si quelques bonnes équipes peuvent être identifiées.

7 – LES PARASITES

Bien qu'il n'existe pas de définition satisfaisante du parasitisme, classiquement on le définit comme une relation écologique entre deux organismes eucaryotes, le parasite et son hôte, le parasite étant physiologiquement ou métaboliquement dépendant de l'hôte. Le parasitisme constitue le moyen de vie le plus répandu, ainsi plus de 50 % des espèces animales sont des parasites et beaucoup d'entre eux affectent la santé des individus et des animaux domestiques. La parasitologie est l'étude du parasitisme, c'est-à-dire de la biologie des parasites eux-mêmes, des modes d'infection de leurs hôtes et des interactions durables qu'ils y établissent mais aussi des pathologies qui y sont associées. Il s'agit d'une discipline transversale qui intéresse des domaines aussi divers que l'évolution, la taxonomie, la biologie moléculaire, la biologie cellulaire, l'immunologie, l'écologie, la physiopathologie, l'épidémiologie et la pharmaco-chimie.

Pendant de très nombreuses années, la recherche en parasitologie est restée confinée à l'étude de la morphologie des parasites et de leurs hôtes, des modalités de leur cycle biologique et à des recherches biocliniques. Depuis une quinzaine d'années, avec l'apparition de la parasitologie « moléculaire » et de manière concomitante, l'immunologie « vaccinale » anti-parasitaire, cette discipline a connu un véritable essor. Cette ouverture lui a permis de dégager très rapidement des concepts nouveaux et

fondamentaux tant pour la discipline elle-même que pour la biologie en général. Ainsi, il convient de rappeler que l'étude des trypanosomes a conduit à la découverte de l'ancrage GPI des protéines membranaires et l'édition de l'ARN mitochondrial. De même, que le concept de la polarité TH1/TH2 de la réponse immune, est issu des recherches sur la leishmaniose murine. Sur le plan de l'évolution, la découverte de groupes de parasites amitochondriaux tels que les microsporidies (responsables de pathologies associées au SIDA) ou les diplomonadines (dont le représentant le plus connu est *Giardia lamblia*, parasite humain responsable de diarrhées) constitue un exemple solide d'une évolution par simplification. Enfin, un autre exemple est la découverte de l'apicoplaste, un organite comportant un petit génome extranucléaire de 35 kb entouré de quatre membranes qui est retrouvé chez les Apicomplexa, phylum qui regroupe de nombreux protozoaires parasites dont les représentants les plus connus sont *Plasmodium* (l'agent du paludisme) et *Toxoplasma gondii* (responsable de la toxoplasmose congénitale et d'encéphalites mortelles chez les patients immunodéprimés). Ce plaste dont l'ADN l'apparente clairement à celui du chloroplaste, offre une possibilité de ciblage thérapeutique par des inhibiteurs du chloroplaste (« herbicides »).

L'utilisation de nombreuses souris homozygotes pour des mutations affectant des gènes du système immunitaire a permis des avancées importantes dans l'étude de la réponse immune de l'hôte contre le parasite, des mécanismes d'échappement/d'adaptation du parasite chez son hôte et des processus physiopathologique.

Enfin, récemment, le développement des outils de manipulation génique et la mise en place de programme de séquençage des génomes chez un certain nombre de parasites modèles (Trypanosomes, Leishmanies, Toxoplasmes, Plasmodies, Amibes) ont révolutionné la discipline. Ces outils ont permis l'émergence de la parasitologie « cellulaire » qui vise à comprendre le fonctionnement de la cellule parasitaire et ses interactions avec son hôte. C'est ainsi que par exemple, des contributions

importantes ont été faites ces toutes dernières années, concernant la biogenèse d'organites sécrétoires uniques chez les parasites apicomplexes et leur rôle dans l'invasion de la cellule-hôte et dans la formation de la vacuole parasitophore ainsi que la mise en évidence de facteurs de virulence parasitaires.

*Une dizaine de laboratoires rattachés à la commission 24 travaille dans le domaine de la parasitologie. L'essentiel de leurs activités porte sur des parasites pathogènes : les protozoaires Apicomplexes (*Plasmodium*, *Toxoplasma gondii*), les Kinetoplastidae (*Trypanosoma*, *Leishmania*), les microsporidies et enfin le trématode *Schistosoma*. Quelques chercheurs sont impliqués dans l'étude des insectes vecteurs tels que l'anophèle pour le paludisme. Les approches sont multiples, la plupart des groupes font à l'heure actuelle appel à la génomique fonctionnelle (génétique reverse, biologie cellulaire, biochimie etc.) et aux outils post-génomiques (transcriptome, protéome), d'autres sont plus impliqués dans l'étude des relations hôte-parasite (mécanismes de défense) ou dans des problèmes de biodiversité.*

Ces dernières années, les unités du CNRS ont fait des contributions importantes dans divers domaines de la parasitologie. Elles ont notamment participé à l'étude des :

- génomes parasitaires : avec une contribution française pour le séquençage et l'annotation du génome complet des microsporidies (le plus petit génome eucaryote décrit à ce jour, d'environ 2,9 Mb). On peut aussi citer, une participation à l'annotation du génome de *T. brucei* et au séquençage et l'annotation du génome de l'anophèle ainsi que des travaux sur le caryotype de leishmanies et l'analyse du polymorphisme des parasites ;

- mécanismes d'invasion/adaptation et évation des parasites : avec la découverte des gènes var impliqués dans la variation antigénique de *Plasmodium* et la cytoadhérence des cellules parasitées, des avancées significatives dans les mécanismes de motilité, d'adhérence et d'invasion cellulaire de *Toxoplasma gondii*, la découverte d'un locus de susceptibilité à l'infection toxoplasmique ainsi que celle du rôle de l'IL7 de l'hôte dans le développement de *Schistosoma* ;

– spécificités métaboliques et biologiques : avec l'étude des voies de biosynthèse des phospholipides chez *Plasmodium*, du métabolisme énergétique chez les trypanosomes et le toxoplasme, la biogenèse des organites et de la vacuole parasitophore chez *Toxoplasma* ainsi que la transcription polycystronique chez les leishmanies.

Cette dynamique de recherche en parasitologie était soutenue par quelques sources de cofinancements : programmes CEE, OMS, ANRS, sidaction, ministère de la coopération, GDR CNRS/armées et enfin le Programme de Recherche Fondamentale en Microbiologie et Maladies Infectieuses et Parasitaires (PRFMMIP), un véritable succès par sa capacité de financer des travaux fondamentaux non soutenus par les organismes cités ci-dessus. En outre, le PRFMMIP a permis la création d'un réseau « Analyse Génétique des Protozoaires ».

Cependant au moment où la génomique fonctionnelle « parasitaire » est en plein essor, où la discipline devient de plus en plus attractive et commence à s'enrichir de jeunes chercheurs venant d'autres domaines, de graves difficultés financières sont entrain d'apparaître par la disparition progressive des cofinancements. Il existe en effet une volonté très nette de l'UE de ne financer que les recherches sur le paludisme ce qui entraîne une disparité qui est aggravée par le refus d'autres organismes (ANRS, sidaction, OMS, ministère des affaires étrangères) de ne pas financer toute recherche fondamentale qui de leur avis relève des EPST et de l'Université. À cela s'ajoute, le désintérêt des industriels pharmaceutiques pour une recherche sur des pathologies qui le plus souvent sévissent dans les pays du tiers monde.

• **Perspectives dans l'étude des interactions hôte-pathogène.** Malgré les nombreux progrès réalisés dans la compréhension, la prévention et le traitement des maladies infectieuses, celles-ci demeurent une cause majeure de mortalité dans le monde, puisqu'elles sont responsables chaque année de près d'un tiers des décès. La recherche sur les agents infectieux (virus, parasites, bactéries) constitue donc une priorité en ce début de ce siècle. Elle vise à

définir à la fois des mécanismes fondamentaux du fonctionnement des micro-organismes, les spécificités liées à leur diversité et les bases des interactions hôte-pathogène avec, en perspective, le développement d'approches thérapeutiques et prophylactiques nouvelles.

L'étude des interactions pathogène-cellule hôte devrait bénéficier aujourd'hui de la connaissance de la séquence complète des génomes de nombreux pathogènes, ainsi que du génome d'organismes hôtes pour la mise en œuvre d'approches globales de génomique fonctionnelle et de biologie structurale qui permettront de préciser les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de l'infection et les mécanismes d'échappement aux réponses de l'hôte.

À l'heure actuelle, la notion de « biologie des systèmes intégrés » apparaît essentielle pour la découverte de nouveaux concepts concernant l'adaptation des micro-organismes chez l'hôte et l'expression de leur pouvoir pathogène. La notion de tropisme d'hôte devra également être prise en compte dans ces travaux. Ces phénomènes sont le plus souvent multifactoriels et l'identification des facteurs impliqués dans le cadre du fonctionnement global des micro-organismes face à leur environnement, passe par l'utilisation d'approches de génomique (étude du transcriptome, protéome, RNAi, etc.). La compréhension moléculaire de la relation structure-fonction de ces facteurs, de leur biogenèse et de leur régulation génétique pourra ensuite conduire à de nouvelles thérapeutiques. La biochimie avec l'étude des voies métaboliques et de leurs particularités restent également des champs d'investigation essentiels pour le développement de nouvelles drogues.

Ces recherches, qui devront intégrer la dynamique des interactions, feront appel aux disciplines de biologie cellulaire, immunologie, génétique / génomique fonctionnelle (facteurs de pathogénicité, facteurs de susceptibilité) et physiopathologie (modèles expérimentaux). Elles devraient s'appliquer non seulement au niveau cellulaire, *in vitro* ou *ex vivo*, y compris au niveau de la cellule isolée, mais également de façon plus intégrée au niveau d'un tissu, organe ou organisme entier, par le

développement de modèles d'étude physiopathologique pertinents *in vitro* et *in vivo* et l'utilisation des nouvelles techniques d'imagerie « *in vivo* ». Le développement de modèles d'étude du franchissement des barrières (hémato-encéphalique, intestinale) devrait constituer un enjeu particulier.

L'étude de la pathogénie des infections, en particulier chez l'homme, constitue toujours un enjeu essentiel et les études menées sur un pathogène humain chez la souris devraient à terme être considérées avec beaucoup de recul. La compréhension de la génétique de la réponse anti-microbienne ou de la sensibilité aux infections, des mécanismes de persistance, du rôle de l'immunité innée et de l'orientation des réponses immunes spécifiques à activité microbicide est en effet indispensable pour la mise en œuvre de moyens de lutte efficaces contre les maladies infectieuses.

Les recherches devraient également s'orienter vers la recherche de l'implication des micro-organismes dans des maladies d'étiologie inconnue. Outre le rôle potentiel d'agents

exogènes, la contribution d'agents endogènes tels que les rétrotransposons mérite une attention particulière. L'étude des interactions entre micro-organismes, encore peu explorée, devrait connaître des développements importants dans les années à venir. Enfin, l'étude de la dynamique des populations microbiennes tant au sein de l'hôte infecté que dans les cycles épidémiologiques et en relation avec les modifications des écosystèmes sont essentiels pour l'identification de déterminants prédictifs de l'évolution des infections permettant une meilleure prise en charge de l'émergence. Dans ce domaine, le recours à la modélisation mathématique, permettant d'intégrer données épidémiologiques et données de la génomique devrait se généraliser.

Cette vision intégrative de la recherche en microbiologie souligne l'importance d'actions multidisciplinaires qui devraient être soutenues par la mise en place d'une politique concertée des EPST (CNRS, INSERM, INRA, IRD) et surtout de Programmes de financement à la hauteur des enjeux.

