

24

Interactions cellulaires

Président

Bruno LUCAS

Membres de la section

Jean-Vianney BARNIER

Ulrich BLANK

Francis CASTETS

Christophe COMBADIÈRE

Francine COTE

Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN

Aline DUMUIS

Anne HUCHENQ-CHAMPAGNE

Armelle LETURQUE

Fatima MECHTA-GRIGORIOU

Julie MERVILLE-DECHANET

Pierre PAOLETTI

Joël PESTEL

Eric PINAUD

Serge ROCHE

Michel ROUX

Paule SANTANTONIO

Michael SCHUBERT

Nathalie SPASSKY

La mission de recherche de la section 24 vise à comprendre comment les réseaux de cellules s'organisent dans le temps et dans l'espace pour conférer aux cellules les propriétés qui leur sont propres. L'objectif de ce vaste domaine de recherche est de comprendre comment des signaux, émis ou reçus, modifient le destin des cellules ou leur activité, et organisent les réseaux cellulaires. De façon plus précise, il s'agit d'analyser comment des signaux, en général de nature chimique (hormones, cytokines, chimiokines, neuromédiateurs, molécules d'adhérence, métabolites, etc.) ou physique (lumière, charge électrique, tension superficielle, etc.), sont transformés en informations significatives. Ces informations tendent à adapter le fonctionnement d'une cellule à celui d'un réseau ou d'un organe ou à modifier le destin des cellules (mitose, différenciation, apoptose) en fonction de son microenvironnement.

L'évolution de la neurobiologie, de l'immuno-hématologie et de la cancérologie a été considérable ces dernières années. Sorties de l'ère phénoménologique puis de l'ère réductionniste, ces disciplines sont entrées dans celle de l'intégration. L'expérimentation reste centrée sur la cellule mais intégrée dans l'organisme, structurée en système, lui-même en interaction permanente avec les autres grands systèmes. Le spectre de ces disciplines va des données les plus structurales aux données les plus physiologiques et physiopathologiques.

Ces définitions étant posées, les membres de la section 24 ont identifié quelques thèmes de recherche et les approches méthodologiques qui leur semblent importants pour les années à venir.

1 – ÉVOLUTION DES THÉMATIQUES

L'évolution des connaissances a continué à un rythme très rapide tant au niveau moléculaire que cellulaire. Elle a conduit à renouveler profondément nos conceptions de l'organisation des molécules dans les cellules, et des cellules dans les réseaux (réseaux neuronaux, organes lymphoïdes, etc.). Le changement le plus sensible est le passage d'une analyse des molécules ou des cellules isolées les unes des autres, très réductrice, à l'étude des complexes moléculaires ou des systèmes, tissus et organismes, plus intégratrice. En effet, la cellule intègre de manière efficace de nombreux signaux, nécessitant des analyses quantitatives et interactives plus complexes couplées à des approches bioinformatiques. Une grande partie des découvertes majeures concerne la dynamique des interactions cellulaires dans les organes, ce qui est particulièrement marquant dans le cas des organes lymphoïdes, du système nerveux et des tumeurs. Par exemple, l'essor de la cyto-fluorimétrie a permis

de montrer une diversité insoupçonnée des lignages cellulaires. Il est clair désormais que c'est de la régulation de l'organisation spatiotemporelle des molécules et des composants de la cellule que dépend la spécificité du traitement des signaux reçus et émis par les cellules. Le développement de ces concepts a conduit les chercheurs à modifier sensiblement leurs méthodes d'investigation. Il est maintenant indispensable d'étudier l'activité des molécules et des cellules in situ, dans les cellules elles-mêmes, au sein de réseaux cellulaires fonctionnels, voir dans l'organisme entier. Les méthodes d'analyse cellulaire d'imagerie et toutes les techniques afférentes connaissent un développement considérable, tout comme l'obtention et l'étude d'animaux génétiquement modifiés (knock-out, knock-in, expression sélective d'une protéine dans un tissu ou organe). Un dernier groupe de méthodes se développe très vite, celles qui permettent d'analyser et de modéliser les interactions moléculaires de façon plus globale, telle l'essor des nouvelles techniques d'acquisition et de traitement des grandes quantités d'information (métadonnées) générées par les technologies actuelles. Pour les prochaines années, l'un des enjeux est de pouvoir prédire et intervenir sur le fonctionnement cellulaire au sein d'un système biologique intégré. Le défi est, comme toujours, autant conceptuel que méthodologique. Il s'agit de ré-introduire la dimension spatio-temporelle dans les investigations.

1.1 LA MISE EN PLACE DES RESEAUX MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES

La différenciation des tissus, la morphogénèse du système nerveux et la réponse immunitaire présentent de nombreux points communs : différenciation cellulaire en réponse à des signaux, migration de tout ou partie des cellules, constitution de réseaux cellulaires. Il faut souligner que ces signaux sont extraordinairement conservés au cours de l'évolution, et qu'ils sont étudiés dans un très large éventail d'espèces, des éponges à l'homme.

Signaux de différenciation et développement

Les bases moléculaires et cellulaires de la différenciation ont été clarifiées avec l'identification et le traçage des grands lignages cellulaires et des systèmes de signalisation particuliers qui sont mis en jeu dans la morphogénèse et la différenciation des organes. Des avancées importantes ont été réalisées dans l'étude des interactions entre gènes et entre gènes et environnement lors de la différenciation cellulaire, ainsi que dans celle des mécanismes d'expression génique (remodelage chromatinien, facteurs de transcription, réarrangement des gènes, épigénétique et remodelage du génome). L'identification des cellules souches a ouvert des perspectives considérables dans le domaine de la thérapie génique ou cellulaire.

Ces résultats ont permis de classer de nombreux syndromes d'immunodéficience, d'états cancéreux (leucémies, lymphomes, etc.) et des maladies neurologiques. La différenciation cellulaire dépend de la mise en œuvre de programmes génétiques qui impliquent des réseaux de gènes plus ou moins spécifiques

(gènes de différenciation comme les facteurs forkhead de la famille Foxo), régulés et coordonnés par des signaux extracellulaires et l'expression des régulateurs nouvellement découverts que sont les microARN. Ces phénomènes doivent être aussi coordonnés avec la sortie du cycle cellulaire et l'apoptose, dont le rôle est majeur au cours de l'embryogénèse. Ces étapes de régulations sont également celles dont le dysfonctionnement concourt à la transformation cancéreuse des cellules.

La mise en jeu de combinaisons spécifiques de régulateurs de l'expression génique (facteurs se fixant à l'ADN), est au cœur des mécanismes de mise en place des différents réseaux de communication cellulaire. La nature des signaux pouvant moduler l'expression génique est variée. Parmi les effecteurs extracellulaires, on peut compter les protéines solubles ou tissulaires, des acides nucléiques, des médiateurs lipidiques, des polymères osidiques, des ions. L'intégration des stimuli extérieurs par la cellule implique des voies de signalisation intracytoplasmiques et intranucléaires, le plus souvent en cascade, et aboutissent à l'activation de facteurs de transcription. Les sites de fixation de ces facteurs peuvent être différents (régions codantes, régions permettant la production d'ARN régulateurs, régions régulatrices intergéniques) et leur mode d'action varie selon la cible (expression ou répression de gène, production de micro-ARN, modification de l'état de condensation de la chromatine traduisant l'accessibilité de régions chromosomiques). L'analyse de la perméabilité de la chromatine et de l'expression génique en fonction des diverses signalisations représente un nouvel enjeu défini sous le terme d'étude épigénétique.

Établissement des interactions cellulaires, des connexions

Dans le système nerveux, l'établissement des contacts synaptiques nécessite en premier lieu la croissance et le guidage des neurites vers leurs cibles, mettant en jeu des molécules de guidance spécifique (telles que les sémaphorines, les nétrines, les éphrines, et les slits) et leurs récepteurs transmembranaires (plexin, DCC, EphR et Robo). De même, l'attraction des cellules immunitaires dans les organes lymphoïdes ou les tissus lésés met en jeu des couples de chimiokines et leurs récepteurs. D'une manière générale, dans un organisme, tout échange d'informations implique la rencontre des acteurs mis en jeu. Une deuxième étape est représentée par la stabilisation transitoire de l'interaction via des molécules de reconnaissance intercellulaire: l'interaction entre les molécules de la matrice extracellulaire et les molécules d'adhérence CAM (Cell Adhesion Molecules), la formation de plates-formes de signalisation, le recrutement des récepteurs des neurotransmetteurs, des cytokines et des facteurs de croissance. La troisième étape correspond à la dissociation et à la résolution de l'interaction conférant la dynamique du système.

Il est, de ce point de vue, tout à fait significatif d'observer que de nombreuses molécules que l'on pensait spécifiques, soit du système nerveux, soit du système immunitaire sont maintenant trouvées comme intervenant dans les deux systèmes, où elles contribuent aux mécanismes de reconnaissance entre cellules et à la formation des

connexions synaptiques. La synapse immunologique et la synapse neuronale ne sont pas que des métaphores pédagogiques, mais bien l'expression d'une réalité biologique commune.

1.2 DYNAMIQUE DES RESEAUX MOLÉCULAIRES ET CELLULAIRES

La spécificité de la transmission des signaux repose sur l'organisation spatiale des molécules dans la cellule qui donne un sens à l'émission et la réception des signaux pour modifier le comportement cellulaire et élaborer les réponses appropriées au sein des réseaux et des systèmes cellulaires. Le neurone étant par excellence une cellule polarisée et fortement différenciée, la mise en place des assemblées moléculaires y prend un relief particulier, comme dans les synapses (pré et post-synapse), le segment initial de l'axone et les nœuds de Ranvier. La synapse immunologique formée par les cellules présentatrices de l'antigène et les cellules T est un autre exemple. Cette organisation n'est pas figée, bien au contraire. L'organisation synaptique et sa dynamique, le réaménagement des connexions en fonction de l'activité sont des phénomènes fondamentaux de la physiologie nerveuse et de la réponse immune.

Propriétés élémentaires des molécules de signalisation

L'identification des propriétés élémentaires des canaux ioniques, des récepteurs, des transporteurs, des molécules d'adhérences, ou de toute autre molécule impliquée dans la signalisation intercellulaire, est toujours un champ d'investigation important. Cette thématique, à la frontière entre biologie structurale, pharmacologie et physiologie, bénéficie désormais des progrès des techniques de modélisation moléculaire, d'analyse structurale des protéines membranaires et des progrès de la mutagenèse. En particulier, le développement des techniques de biophysique (cristallographie, RMN du solide et en solution, spectroscopies optiques) appliquées aux protéines membranaires complexes permettent d'apporter une description moléculaire de leurs propriétés fonctionnelles (mécanismes d'activation, multiplicités conformationnelles associées à la sélectivité de signalisation). Ces analyses ont permis de concevoir de nouveaux outils pour l'analyse fonctionnelle des cellules (sondes photoactivables) in vivo. Les recherches visent également à comprendre les propriétés des molécules de signalisation et la dynamique de leurs modifications (phosphorylation, glycosylation, ubiquitinylation, sumoylation, neddylation des protéines) pouvant réguler leurs interactions avec les autres partenaires.

L'assemblage des molécules de signalisation

L'étude biochimique des récepteurs et des molécules de la signalisation intracellulaire a révélé l'extraordinaire multiplicité de combinaisons moléculaires qui conditionne la survenue d'une réponse cellulaire. Chaque récepteur, métabotrope ou ionotrope existe sous plusieurs formes moléculaires (gènes paralogues, variants d'épissage ou d'édition, etc.) et chaque récepteur peut

être associé à plusieurs ensembles de molécules de signalisation. Par exemple, on ne compte pas moins de 12 protéines de signalisation associées aux facteurs de croissance de type PDGF, une fois activés. Cet assemblage moléculaire permet la propagation du signal biologique. Un excellent exemple concerne le mécanisme par lequel ces récepteurs activent la voie de signalisation Ras/MAP kinase de la membrane vers le noyau. Ces récepteurs à activité tyrosine kinase permettent le recrutement du complexe activateur SOS-Grb2 de la petite GTPase Ras du cytosol vers la membrane via une interaction directe de type SH2-pTry dépendant. De la même façon, les récepteurs métabotropiques comme les récepteurs tyrosine-kinase ou les récepteurs couplés aux protéines G sont associés à des protéines qui assurent leur localisation au sein des compartiments cellulaires et à d'autres protéines qui participent à des voies de signalisation intracellulaires, l'ensemble étant fortement compartimenté dans la cellule. La spécificité de ces réponses dépend principalement de la manière dont les récepteurs membranaires et les protéines de signalisation s'assemblent à la synapse ou dans des microdomaines de la membrane des cellules, en partie grâce à des molécules d'échafaudage.

Dynamique moléculaire et cellulaire

L'étude en temps réel de la formation des complexes moléculaires, la transmission des signaux et leur intégration en fonction du type cellulaire ou des compartiments subcellulaires va rester, sans aucun doute, l'un des axes forts des recherches pour les années qui viennent. La localisation et la composition des molécules qui composent les complexes moléculaires sont finement régulées. Les mécanismes appelés désensibilisation, séquestration, ou changement d'état conditionnent la manière dont une cellule est capable de recevoir et de répondre aux informations extérieures, en fonction de son histoire récente. Les interactions entre le cytosquelette, les compartiments vésiculaires et les molécules de la signalisation cellulaire ne sont que les différentes facettes d'un trafic moléculaire très complexe qui commence d'être finement analysé. Il est également étonnant de voir que la communication entre différentes voies d'activation outre ses effets synergiques peut mener à de nouveaux types de réponses cellulaires.

2 - POINTS SPECIFIQUES

* Plasticité synaptique :

- L'étude des protéines synaptiques membranaires doit dorénavant intégrer celle de leurs partenaires intracellulaires. Grâce aux données de ces 10 dernières années, nous pouvons aujourd'hui construire, de façon théorique, des échafaudages multimoléculaires synaptiques, mais leur dynamique d'assemblage, leur régulation et leurs fonctions demeurent très mal connues. Quels sont leurs rôles dans l'activité des récepteurs et des canaux, leur adressage subcellulaire et leur signalisation ? Couplent-ils plusieurs systèmes de signalisation intra- et inter-cellulaires ? Sont-ils impliqués dans des maladies neurologiques ? Nous devons répondre à ces questions, à l'aide des techniques adaptées (imagerie quantitative, FRET/BRET, approches peptidiques ...etc..) dans le but de mieux comprendre le développement du cerveau, sa

plasticité et ses pathologies.

- Des progrès importants ont été réalisés ces dernières années sur les mécanismes qui sous-tendent la transmission synaptique rapide et sa plasticité dans le système nerveux central. Ainsi, au niveau post-synaptique, les récepteurs-canaux qui assurent la transduction du message chimique (neurotransmetteur) en message électrique sont maintenant connus à un niveau de détail sans précédent, notamment grâce à l'obtention des premières structures cristallographiques de ces protéines membranaires. Cela est vrai également pour les récepteurs aux neurotransmetteurs couplés aux protéines G. Une connaissance détaillée de l'architecture moléculaire et du mode de fonctionnement des récepteurs aux neurotransmetteurs est essentielle non seulement pour la compréhension en profondeur de la transmission synaptique mais ouvre également de nombreuses pistes pour le développement de nouveaux composés d'intérêt pharmacologique et thérapeutique. Outre l'importance de l'échafaudage sous-synaptique dans la localisation et la concentration des récepteurs à la synapse (cf paragraphe ci-dessus), l'implémentation de techniques de suivi de particules élémentaires en temps réel a également permis de révéler que les récepteurs synaptiques ne sont pas statiques à la synapse mais peuvent s'échanger rapidement entre les compartiments synaptiques, extra-synaptiques et intracellulaires. Des changements dans la proportion entre ces différents "pools" de récepteurs sont impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique à court et/ou long-terme, aboutissant au renforcement, ou au contraire à l'affaiblissement, de l'efficacité de la transmission synaptique. Les années récentes ont également été riches en avancées sur l'implication de mécanismes présynaptiques dans la régulation de la communication neuronale : présence, plus large que supposée initialement, de récepteurs présynaptiques métabotropiques mais également ionotropiques (autorécepteurs) influençant la probabilité de libération, action de nouveaux messagers intercellulaires transsynaptiques tels les endocannabinoïdes, possibilités de co-transmission multiples (glutamate/monoamine, glutamate/zinc, GABA/glycine) etc... Par ailleurs, grâce à la combinaison d'approches structurales, biophysiques, cellulaires et génétiques, la dissection des mécanismes d'exocytose aboutissant à la fusion vésiculaire et à la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique a fortement progressé. Toutefois, une description complète de la cascade d'événements allant de la détection de l'augmentation de calcium dans l'élément présynaptique à la fusion vésiculaire manque encore ; c'est là un des défis importants à relever dans le domaine pour les années à venir.

* **Interactions Neurone-Glie** : La place accordée aux cellules gliales dans la mise en place et la modulation de l'activité neuronale est en constante augmentation. De simple support veillant à l'homéostasie du milieu extracellulaire (notamment à travers leur rôle dans la barrière hémato-encéphalique), les astrocytes ont maintenant des fonctions clairement établies dans le développement du système nerveux, au cours duquel ils participent au guidage de la croissance neuritique et/ou de la migration des neurones. A travers l'expression de nombreux récepteurs aux neuromédiateurs, et la

capacité de libérer certains de ces médiateurs (par un ou des mécanismes encore largement débattus), ils peuvent moduler l'activité neuronale, favoriser la synchronisation de l'activité de groupes de neurones et assurer un couplage neurovasculaire permettant d'adapter la circulation locale aux besoins énergétiques. C'est la découverte de ces fonctions qui a conduit à la notion de synapse tripartite. Ce concept pourrait encore être insuffisant, les précurseurs des oligodendrocytes (cellules NG2) et les cellules microgliales sont regardés par les neurobiologistes avec un œil nouveau, abandonnant progressivement leur statut de pourvoyeur de gaine de myéline et de macrophages du système nerveux pour devenir des partenaires à part entière de la fonction synaptique. Si ce dernier aspect a connu un essor remarquable, c'est notamment grâce à l'émergence de techniques d'imagerie *in vitro* et *in vivo* de plus en plus performantes (voir développement technologique et instrumentation) et à la découverte que ces cellules (microgliales et NG2) expriment de nombreux récepteurs aux neuromédiateurs et influencent le développement et l'activité des neurones. Ceci devrait amener une meilleure compréhension de la mise en place des différentes structures du système nerveux central et de l'étiologie de maladies trouvant leurs origines dans des défauts développementaux (les récepteurs des différentes populations de cellules gliales peuvent être activés, voire désensibilisés, par des concentrations de différentes substances retrouvées dans la circulation au cours du développement fœtal). Un autre aspect particulièrement prometteur est la redéfinition du rôle des astrocytes dans la neuroénergétique : en plus de l'élégance de ces nouveaux concepts, ces travaux ouvrent la voie à une meilleure compréhension des données issues de l'imagerie cérébrale (IRM fonctionnelle).

* **Dysfonctionnements synaptiques** : On sait désormais que des dysfonctionnements de la mise en place des synapses ou de leur fonctionnement sont impliqués dans de nombreuses maladies neurologiques, neurodégénératives ou non. C'est le cas dans l'autisme, l'épilepsie, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer par exemple. Dans certains cas, de tels dysfonctionnements synaptiques seraient à l'œuvre dès les étapes les plus précoces de la maladie. C'est pourquoi de nombreux laboratoires travaillant sur le fonctionnement synaptique se sont impliqués dans la recherche des dysfonctionnements synaptiques dans les diverses pathologies citées ci-dessus.

* **Neurogénèse, cellules souches et régénération** : Les cellules souches neurales sont des cellules indifférenciées que l'on trouve dans le cerveau tout au long de la vie. Elles persistent donc dans le cerveau adulte des Vertébrés. Par définition, elles sont capables de donner naissance à des neurones ou à des cellules gliales par différenciation cellulaire, mais aussi se renouveler indéfiniment. Leur identification récente a provoqué un grand enthousiasme quant à la possibilité de leur utilisation afin de développer de nouvelles stratégies neurorégénératives. A l'inverse, elles peuvent être à l'origine de certains cancers. Le but des recherches actuelles est de mieux comprendre comment ces cellules intègrent les informations de l'environnement et quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires de leur différenciation.

*** Immunité innée et inflammation :**

- Au cours des quatre dernières années, les études sur les cellules dendritiques se sont encore largement développées dans de nombreux laboratoires. Une attention particulière a été portée sur une meilleure caractérisation génomique et fonctionnelle des populations de cellules dendritiques chez l'homme et la souris. Les différences d'action et les nouvelles interactions entre cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes ont été analysées et rapportées aux diverses situations pathologiques (défense infectieuse et anti-virale dont anti-HIV, auto-immunité, neuroinflammation, allergie, cancer). La dynamique des interactions entre cellules T et cellules dendritiques a été approfondie tant au cours des processus d'initiation de la réponse immune que des phases de régulation et de mise en place de tolérance. Les mécanismes intracellulaires conduisant à la "cross-presentation" et à l'activation sélective des lymphocytes T CD8 ont été précisément étudiés dans de nombreux modèles expérimentaux dont le cancer. Il a été plus spécifiquement souligné l'importance des TLR, des "scavenger receptors", des intégrines, des corps lipidiques, du processus protéolytique post-protéasome dans cette phase de réponse originale. De plus, le rôle des cellules dendritiques plasmacytoïdes (cellules qui ont une forte capacité à produire de nombreuses cytokines de l'immunité innée dont les interférons de type I) dans la régulation des réponses adaptatives a été largement étudié. Enfin, le développement de souris génétiquement modifiées a permis d'approfondir nos connaissances des fonctions des populations de cellules dendritiques en situation physiologique et en conditions pathologiques.

- Plusieurs nouveaux acteurs cellulaires connus depuis longtemps, mais ignorés suite à des difficultés de manipulation ou d'accessibilité, ont récemment pris un nouvel essor comme acteurs de l'immunité innée. Ces derniers incluent les neutrophiles, les basophiles, les éosinophiles ou encore les mastocytes. Outre leur rôle de cellules sentinelles dans la défense immunitaire contre les pathogènes, de nombreux travaux récents montrent leur implication dans l'immunité et leurs propriétés immunorégulatrices. Ainsi le basophile a été reconnu comme acteur important de la différenciation des cellules T en cellules de type TH2 par sa capacité à produire des cytokines clés. Les mastocytes, initialement étudiés pour leur rôle dans l'allergie, représentent des intermédiaires importants dans l'orchestration des réponses inflammatoires et/ou immunitaires. Les neutrophiles ne sont pas seulement des phagocytes qui produisent des substances cytotoxiques, mais ils peuvent également avoir des rôles immunorégulateurs.

- La génération de lignées murines dites "Knockin" permettant une visualisation des populations cellulaires exprimant notamment le récepteur de chimiokine CX3CR1 ou la Langerin (CD207), a permis la caractérisation de nouvelles sous-populations monocytaires et dendritiques, respectivement. Elles ont rendu possibles des études de redistribution spatio-temporelle très précises et permis d'attribuer des fonctions spécifiques à ces nouvelles populations (angiogéniques, inflammatoires, "cross-présentatrices").

*** Les cellules T pro-inflammatoires productrices d'IL-17 :**

Jusqu'à récemment, les lymphocytes T CD4+ périphériques étaient répartis en trois grandes sous-populations. Premièrement, les cellules T CD4+ Th1, caractérisées par leur capacité à produire de l'interféron gamma (IFN- γ), permettent l'activation des macrophages pour lutter contre les pathogènes intracellulaires et privilégient de ce fait une réponse immunitaire à médiation cellulaire. Deuxièmement, les cellules T CD4+ Th2 caractérisées par leur production d'interleukine 4 (IL-4) délivrent un effet "helper" aux cellules B et induisent une réponse immunitaire à médiation humorale. Enfin, les cellules T régulatrices CD4+ Foxp3+ représentent une population cruciale pour le contrôle des réponses immunitaires et pour le maintien de la tolérance vis-à-vis du soi. Cependant, ce modèle a été récemment remis en question par la découverte d'une nouvelle population de lymphocytes T CD4+ "helper", les lymphocytes T CD4+ Th17. Ces cellules, générées par stimulation des cellules naïves en présence d'IL-6 et de TGF β , se caractérisent par leur production importante d'IL-17 et représentent une lignée distincte des autres lymphocytes T CD4+ périphériques. L'IL-17 joue un rôle important dans les réponses de types anti-microbiennes. En effet, elle représente un lien entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs en favorisant l'accumulation des granulocytes au niveau du site de l'inflammation. A l'inverse, l'IL-17 est également décrite comme étant fortement impliquée lors du développement de maladies auto-immunes telles que, la poly-arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, les colites ou l'asthme. L'étude des lymphocytes T producteurs d'IL-17 est donc naturellement un enjeu d'importance. Récemment, d'autres sous-populations de lymphocytes T (cellules T $\gamma\delta$ et lymphocytes T-NK) ont pu également être identifiées comme de potentielles sources d'IL-17 in vivo.

*** Les cellules régulatrices :**

- Récemment, les avancées dans l'identification des sous-populations de lymphocytes T et l'utilisation de souris génétiquement modifiées ont permis de relancer le concept des cellules T régulatrices. Ce concept, en association avec les mécanismes de délétion et d'anergie, permet d'expliquer le maintien de la tolérance périphérique vis-à-vis du soi et le contrôle des réponses immunes contre les agents pathogènes. Plusieurs types de cellules T régulatrices ont été décrites parmi lesquelles les cellules T CD4+ Foxp3+ représentent la sous-population la plus importante en nombre absolu dans les organes lymphoïdes secondaires et la plus largement étudiée. Ces cellules sont soit générées dans le thymus (régulatrices naturelles), soit issues de la différenciation de cellules T naïves à la périphérie (régulatrices induites). Les nombreux travaux récents disséquant les mécanismes permettant leur néo-génération in vitro ou leur expansion ex vivo laissent entrevoir la possibilité d'utiliser ces cellules dans des protocoles de thérapie cellulaire visant à prévenir ou à guérir les maladies auto-immunes.

- La redécouverte de cellules appelées dans les années 70 "suppressives naturelles" et aujourd'hui "myéloïdes suppressives" (MDSC, Myeloid-derived Suppressor Cells) fait l'objet d'une intense recherche, en particulier en immuno-oncologie. La présence de ces cellules

myéloïdes immatures, précurseurs des cellules dendritiques, macrophages et granulocytes, a été retrouvée dans différentes situations inflammatoires (cancers, infections virales et bactériennes, auto-immunité, stress). Elles sont capables d'inhiber les réponses innées et adaptatives au cours de l'inflammation, et ainsi subvertir le système immunitaire. Les modes d'action des MDSC sont multiples comme, par exemple l'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T, le blocage de la différenciation des macrophages de type I, la régulation négative de la chaîne ζ du TCR ou de la molécule à tropisme lymphoïde CD62L, ou encore l'induction de cellules T régulatrices.

* **Vaccinologie** : Une part importante des projets des équipes d'immunologie s'intéresse à la vaccinologie lymphocytaire T qui comprend soit la vaccination active par l'injection d'antigènes spécifiques seuls ou en association avec des cellules présentatrices, soit le transfert adoptif de cellules T activées ex-vivo. Ce type d'immunothérapie cellulaire est un objectif important dans le cadre des pathologies infectieuses et du cancer. Ce domaine a beaucoup bénéficié de l'amélioration des connaissances et des techniques d'évaluation de la qualité de la réponse immune.

* **Cancer** : les processus d'interactions cellulaires jouent des rôles essentiels dans la formation des cancers chez l'homme. Un effort sans précédent est mené pour comprendre comment une cellule au sein d'un organisme acquiert des propriétés transformantes. Ceci se traduit par la capacité d'une cellule à proliférer de manière incontrôlée dans un environnement inapproprié (croissance, survie, immortalisation, angiogénèse) conduisant à la formation d'une tumeur « primaire » au sein de l'organisme. A cela s'ajoute leur capacité à disséminer (migration, intra- et extra-vasion), pour coloniser des organes distants et former des métastases. Ces mécanismes sont initiés par des altérations génétiques et épigénétique, appelées processus d'oncogénèse. Un des challenges actuels est de comprendre les mécanismes moléculaires associés à ces processus cellulaires, et ce, via le développement de modèles intégrés et d'analyses moléculaires à grande échelle. De manière intéressante, ces propriétés transformantes sont induites par la dérégulation de voies de signalisation cellulaires conduisant à ces processus de "cancérisation". Le ciblage de ces voies impliquées est devenu l'une des stratégies prometteuses en oncologie. Elle est connue sous la dénomination de "thérapie ciblée". L'un des meilleurs exemples est celui de l'imatinib/Glivec, un inhibiteur de l'oncoprotéine de fusion et tyrosine kinase Bcr-Abl, responsable de la formation des leucémies myéloïdes chroniques. Cet inhibiteur bloque la signalisation oncogénique induite par Bcr-Abl conduisant à une régression spectaculaire de la leucémogénèse chez les patients. De nouveaux acteurs de cette transformation cellulaire ont été largement étudiés ces dernières années et concernent l'interaction des cellules cancéreuses avec les cellules du stroma environnant et du système immunitaire. En effet, ces interactions cellulaires souvent activées par des processus d'inflammation jouent des rôles essentiels dans le développement optimal de la tumeur, dont la formation de métastases. L'identification des acteurs moléculaires régulant ces interactions est

devenue un enjeu crucial en oncologie fondamentale et médicale.

* **Métabolisme et Cancer** : un aspect récemment découvert dans le domaine du cancer est le changement du métabolisme cellulaire induit au cours de la tumorigénèse et de divers syndromes métaboliques. En effet, les cellules cancéreuses présentent une consommation accrue de glucose, c'est ce qui a permis grâce à l'utilisation d'un analogue du glucose le FDG de visualiser les tumeurs par tomographie à émission de positrons. La "reprogrammation métabolique" des cellules cancéreuses est actuellement très étudiée pour comprendre comment le changement du programme transcriptionnel couple aussi efficacement la machinerie de croissance cellulaire au métabolisme glucidique et lipidique. De nouvelles voies thérapeutiques anticancéreuses ciblent des enzymes du métabolisme et des facteurs de transcription, mais la faible spécificité des inhibiteurs reste un obstacle majeur. De plus, depuis l'observation d'O. Warburg, il est connu que des cellules cancéreuses sont capables de dégrader le glucose de façon anaérobie. Cela se traduit par une activité réduite des mitochondries, délétère pour le déclenchement de l'apoptose et de la réponse immunitaire. La réactivation des mitochondries est aussi une option thérapeutique à suivre.

3 – DÉVELOPPEMENT TECHNOLOGIQUE ET INSTRUMENTATION

La réflexion menée ici concerne les développements méthodologiques et instrumentaux récents qui ont considérablement modifié les questions posées et qui sont souvent moteur dans l'évolution des thématiques. Par exemple :

* Les méthodes de modification génique par perte ou gain de fonctions inductible et tissu spécifique sont en plein essor. Le défi est de pouvoir utiliser ces techniques de manière plus souple et plus rapide. Cet essor pose des problèmes de logistique au sein des animaleries, loin d'être résolu. De plus, des banques de ressources seront de plus en plus nécessaires (congélation d'embryons, cellulothèques, etc.). Le développement de nouveaux modèles animaux plus souples serait une alternative possible.

* De nouvelles méthodes d'inactivation génique utilisables in vivo se sont développées : interférence par les ARN ou vecteurs viraux. Ces méthodologies devraient permettre l'étude ciblée de la fonction des gènes et de leurs produits à l'échelle de l'organisme.

* Les méthodes d'analyse principalement basées sur l'imagerie dynamique ont permis d'identifier de nouvelles structures et fonctions cellulaires. Un important effort a été fait dans le développement des moyens de quantification de ces signaux.

* De nombreuses méthodes d'imagerie photonique ont été développées (ou adaptées des méthodes de microscopie classique) dans le but de

réaliser des observations chez l'animal vivant. Parmi les moyens d'imagerie du petit animal, on peut citer: l'épifluorescence sur l'animal entier ou sur une portion de l'animal (cette technique appelée microscopie intravitale a été sensiblement améliorée par le développement de l'imagerie multiphotonique) ; l'imagerie à l'aide de sondes fluorescentes utilisables *in vivo* ; l'imagerie par bioluminescence pour la détection de gènes rapporteurs "luciférase" ; l'acquisition d'images en 3 dimensions par tomographie de fluorescence moléculaire (FMT) ou encore la microscopie confocale par fibre optique qui combine les méthodes d'exploration endoscopique à la résolution microscopique. Pour les animaux ou des objets transparents (*C. elegans*, Poisson zèbre, ...etc.), la mise en place de la LSM (Light sheet based Fluorescence microscopy) permet de diminuer considérablement la photo-toxicité liée à l'illumination.

* La lumière est également devenue un outil de stimulation. En effet, diverses molécules ou ions "cagés" (glutamate, GABA, Ca²⁺ ...) peuvent être libérés sous forme active suite à l'absorption de photons. Ce domaine est en développement actif, avec une recherche de nouveaux composés cagés et/ou de composés pouvant être décagés à travers des illuminations multi-photons, afin de favoriser leur utilisation *in vivo*. Un autre domaine en pleine expansion est l'optogénétique : l'expression ciblée de canaux ou de pompes ioniques photoactivables (channelrhodopsin 2, halorhodopsin) permet un contrôle non invasif de l'activité neuronale avec une grande précision à la fois spatiale et temporelle, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. L'expression de ces protéines par infection virale, électroporation ou transgénèse, éventuellement sous la dépendance de promoteurs spécifiques de sous-populations neuronales ou nécessitant l'expression d'une recombinase, permet d'imposer à une population neuronale des patrons d'activité dans une gamme de 0 à au moins 30 Hz, ou de faire une cartographie des entrées synaptiques d'une structure. Les possibilités offertes tant par l'optogénétique que par le décageage de molécules se voient encore augmentées par le développement de méthodes de modulation spatiale de la lumière comme l'holographie.

* A l'échelle moléculaire, la microscopie de force atomique (AFM) en milieu liquide offre la perspective d'étudier la dynamique des complexes macromoléculaires (par exemple les complexes nucléoprotéiques) pour en caractériser les propriétés cinétiques dans des conditions se rapprochant du contexte physiologique cellulaire. Des méthodes utilisant les propriétés de fluorescence de molécules uniques sont également en développement. Par exemple, on peut citer les Quantum-dots et le suivi de particule unique, la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS) qui permet d'étudier des processus dynamiques de molécules marquées et l'imagerie par durée de vie de fluorescence (FLIM) qui autorise l'étude des interactions protéine-protéine à l'aide de couples donneur-accepteur en transfert d'énergie de fluorescence (FRET). Une des avancées majeures des dernières années est sans nul doute l'application à la biologie de l'imagerie fluorescente à super résolution permettant d'imager des cellules et des tissus avec une résolution inférieure aux limites de diffraction optique. Ces méthodes basées soit

sur une amélioration de l'imagerie confocale (STED), soit sur l'utilisation de molécules à fluorescence limitée (PALM/STORM) ont permis de visualiser les cellules avec une précision jamais égalée (de l'ordre de 10 nm). Enfin, l'utilisation des ondes évanescentes (TIRF) a aussi permis de visualiser spécifiquement les mécanismes se déroulant au voisinage de la membrane plasmique.

* L'utilisation de la Cytométrie en flux s'est élargie au cours des dix dernières années, en partie grâce à l'amélioration des instruments sur la rapidité d'acquisition des échantillons, la convivialité des logiciels d'analyse et la possibilité de réaliser des marquages multiparamétriques (jusqu'à 19 paramètres évalués simultanément à l'échelle cellulaire aussi bien au niveau phénotypique que fonctionnel). De même, les techniques de dosage de la production de facteurs solubles multiples sur billes a beaucoup facilité l'étude à grande échelle de la communication cellulaire.

* L'utilisation croissante de méthodes "omiques", comme les analyses de transcriptome (par séquençage à haut-débit), les données génétiques issues de patients ou de lignées tumorales, les données de phénotypage d'animaux génétiquement modifiés, les patrons d'expression de gènes obtenus par hybridation *in situ*, entraîne une augmentation exponentielle du nombre de données à analyser, non seulement séparément, mais surtout à croiser entre elles pour pouvoir en tirer le meilleur parti. Le recoupement des données produites indépendamment devra permettre à la fois de reconstituer des réseaux de régulation et de pouvoir anticiper le fonctionnement de ces réseaux par l'utilisation de techniques de modélisation. Afin de faciliter le partage des données et des analyses combinant des données acquises dans des centres et/ou des périodes différents, il est important de promouvoir des standards d'acquisition et d'annotation des données, et le maintien de bases de données avec un haut niveau de contrôle qualité. Cet effort est à développer en concertation au moins à l'échelle européenne (EMBL-EBI, Genepaint, Europhenome...) en soutenant et en valorisant pour les chercheurs l'alimentation des bases de données.

Dans le domaine des méthodes optiques, les physiciens, les chimistes et les informaticiens ont joué et continueront à jouer un rôle important dans le développement de nouvelles approches et outils pour la biologie. Certaines des techniques évoquées ci-dessus ont entraîné le renforcement de la notion de plates-formes et leur mise en réseau.

4 – CONCLUSIONS

Vers plus de quantification, d'intégration, de régulation et de moyens d'intervention ? L'intégration augmente à tous les niveaux d'étude mais en ce qui concerne le domaine des interactions cellulaires, on peut citer quelques applications majeures : régulation génique à grande échelle lors de la mise en place des fonctions cellulaires (transcriptome, protéome), analyse de fonctions cellulaires à l'échelle de populations, suivi dynamique dans le temps (résolution temporelle de plus en plus fine) ou l'espace (imagerie du petit animal, imagerie intra-vitale), intégration des fonctions des cellules

au sein de l'organisme (interface entre l'immunologie, la microbiologie, l'endocrinologie, la neurologie notamment justifiant parfaitement le format de la section 24). Si les deux premiers niveaux d'étude sont surtout affectés par des phases de développement méthodologique, le dernier niveau repose plus sur l'émergence de nouveaux concepts : identité de fonctions cellulaires et moléculaires entre les différents modèles d'étude (fonction des cytokines dans le cerveau, interactions entre métabolisme lipidique et inflammation, rôle des neuromédiateurs ou des canaux ioniques sur les fonctions lymphocytaires, etc.), analyse de nouveaux modes d'interaction inter-systèmes (lignages cellulaires communs : macrophage et ostéoclaste, microglie ; re-programmation cellulaire ; rôle du système immunitaire dans les pathologies neurodégénératives).

5 – COMMENTAIRES GÉNÉRAUX

Les études des interactions cellulaires ont évolué au cours des dix dernières années et nécessitent actuellement le développement de modèles animaux pour tester la validité de ce qui a été démontré dans des études *in vitro* et *ex vivo*, et pour analyser dans des conditions physiologiques l'effet des mutations activatrices ou inactivatrices des voies de signalisation mises en jeu lors des interactions cellulaires. De même, ces modèles sont un préalable pour toutes les approches physiopathologiques liées aux dysfonctionnements des interactions et des communications intercellulaires, que ce soit en immunologie, en neurologie, en endocrinologie et en cancérologie. Il semble que la France ait pris un retard certain dans le développement d'animalerie de qualité (tant en termes d'infrastructures que du personnel dédié à leur bon fonctionnement).

*** La section 24 à la croisée du fondamental et du physiopathologique** : De par les thèmes qu'elle couvre, la section 24 aborde la grande majorité des pathologies du 21^{ème} siècle, à savoir les déficits cognitifs et les maladies neurodégénératives, les troubles immunitaires et l'allergie, et les différentes formes de cancer. Les pressions politiques, la baisse des financements récurrents alloués aux laboratoires, et l'instauration d'une évaluation jugeant plus la rentabilité en termes de publications que la génération d'idées et de concepts nouveaux ont forcé une majorité des équipes à orienter leurs travaux vers une recherche plus appliquée aux résultats plus rapides mais moins ambitieux. Bien que la recherche translationnelle (de la paillasse au lit du patient) représente un maillon crucial de la recherche médicale, elle ne peut aboutir que si ces fondations reposent sur une recherche fondamentale de qualité basée sur des projets à long terme permettant de formuler des hypothèses nouvelles. La section 24 affirme donc la nécessité de maintenir une recherche fondamentale indépendante et de qualité dans l'espace de liberté qui lui est nécessaire et que représente en France le CNRS.