

ITMO BCDE

Biologie Cellulaire, Développement et Pathologies

1. Etat des lieux

De très nombreuses maladies (ou malformations) ont une étiologie multifactorielle impliquant plusieurs gènes et plusieurs mécanismes. Avec le vieillissement de la population des pays industrialisés, nous voyons apparaître de nouvelles maladies ayant pour origine des facteurs génétiques associés à des facteurs environnementaux. La biologie du développement et la biologie cellulaire sont nécessaires à l'étude et la compréhension, voire la thérapie de ces maladies multifactorielles (diabète, asthme...), aussi bien que des maladies monogéniques.

La qualité de nos centres hospitalo-universitaires se traduit par la précision des diagnostics faits par les cliniciens ce qui facilite la constitution de groupes homogènes de patients. La plupart de nos centres et instituts de recherche travaillant dans les domaines de la biologie cellulaire et de la biologie du développement sont d'un très bon niveau. Cependant, nous constatons que peu de chercheurs de ces centres développent réellement des projets translationnels associant biologie cellulaire et pathologies humaines. Les efforts de ces dernières années ont été concentrés plutôt sur le développement de nouvelles technologies à l'interface de la biologie et de la physique ou de la biologie et de la chimie. Dans le contexte actuel, il existe un réel besoin de recherches du type " bench to bedside " et vice versa.

Les observations cliniques et les travaux des généticiens induisent des questions quant aux mécanismes sous-jacents des pathologies, les médecins demandant aux chercheurs d'identifier les marqueurs pouvant aider le diagnostic, au pronostic d'évolution de la maladie ou encore à la proposition de nouvelles cibles thérapeutiques. De plus en plus souvent les expérimentations concernant physiopathologie et biologie cellulaire sont initiées à partir d'observations cliniques et d'identification de nouveaux gènes mutés. L'inverse est également fréquent puisque les études fonctionnelles chez l'animal permettent d'orienter les généticiens humains vers des gènes candidats pour une maladie donnée. Dans un certain nombre de cas, du matériel biologique est alors disponible (cellules, ADN...) et de nouveaux modèles expérimentaux sont créés. Quand il s'agit de maladies génétiques, la séquence des approches est la suivante : identification de gènes mutés chez l'homme ou la souris ou autres modèles, par exemple le zebrafish, création de modèles cellulaires ou animaux (le plus souvent murins) permettant des analyses phénotypiques, expériences de biologie cellulaire et de biochimie pour élucider la (les) fonction(s) de la (des) protéine(s) impliquée(s). La combinaison de ces approches a, par exemple, révélé que certaines microcéphalies étaient dues à des perturbations de la neurogenèse, de la division cellulaire et de la fonction des centrosomes. D'autres exemples peuvent être cités : certaines formes de retard mental dues à des défauts de signalisation, de développement et de fonction synaptique ; des formes d'autisme ayant leur origine dans une communication anormale entre certains neurones ; des anomalies de la polarité cellulaire ou des protéines membranaires qui sont impliquées dans certains cancers et d'autres maladies comme la polykystose rénale, la mucoviscidose, certaines formes d'hypercholestérolémies familiales.

C'est ainsi que des essais cliniques actuellement en cours sur certaines maladies rares trouvent leurs fondements dans la compréhension de mécanismes fondamentaux, puis l'élaboration de stratégies visant à contourner le processus biologique défectueux et la validation de cette stratégie sur un modèle animal de la maladie.

C'est le cas de la thérapie par saut d'exon dans la myopathie de Duchenne qui s'appuie sur une meilleure connaissance et maîtrise des mécanismes d'épissage puis la validation dans un modèle souris d'une stratégie dont l'objectif est de récupérer la synthèse d'une dystrophine tronquée mais fonctionnelle. C'est également le cas pour la progéria responsable d'un vieillissement accéléré et prématuré. La pathologie est liée à l'accumulation au niveau de la membrane nucléaire d'une forme mutée de lamine A (progérine) dont la toxicité est liée à la présence d'un acide gras qui reste fixé à la protéine mutée alors qu'il est éliminé dans les cellules normales. Une approche thérapeutique basée sur l'inhibition de la synthèse de cet acide gras, par une combinaison de deux molécules pharmacologiques connues, a pu être validée sur des modèles cellulaires et un modèle murin de la maladie, avec un développement nettement ralenti de la maladie. Ainsi, cinq ans après la découverte du gène impliqué, un essai clinique incluant 15 enfants progéria provenant de toute l'Europe a pu démarrer à Marseille. De façon intéressante, des mécanismes similaires pourraient être à l'œuvre dans le vieillissement normal et dans la toxicité de certaines molécules anti-rétrovirales.

Les travaux sur les pathologies du développement peuvent non seulement conduire à élucider de nouveaux mécanismes physiopathologiques, mais aussi casser les barrières entre les pathologies dont des formes variées résultent parfois de l'expression de plusieurs formes alléliques du même défaut. La mucoviscidose est un autre exemple d'une recherche translationnelle. Cette maladie génétique est causée par des mutations du gène CFTR. Les observations des physiologistes ont été confortées par l'identification du gène, la protéine mutée conduisant au dysfonctionnement des épithéliums sécrétoires associant les infections/inflammations chroniques au dysfonctionnement de transport des fluides. L'atteinte la plus grave est pulmonaire, mais d'autres organes sont également atteints. Par la suite, les travaux des biologistes et biochimistes ont montré la complexité des relations phénotype-génotype, même pour une maladie monogénique. Les études fondamentales ont conduit à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et à celle de nouvelles molécules qui sont aujourd'hui testées à travers des essais cliniques.

La collaboration entre les laboratoires de recherche, les services cliniques et les plateaux technologiques est fondamentale dans le développement de ces recherches.

Les allers-retours entre observation clinique, génétique humaine et recherche en biologie cellulaire et biologie du développement sur des modèles très divers sont souvent indispensables à la compréhension d'une pathologie. C'est le cas remarquable des maladies associées à un dysfonctionnement des cils et flagelles, regroupées maintenant sous le terme de ciliopathies. Les avancées majeures des dix dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de ces maladies multisystèmes ont pour origine l'étude d'un organisme unicellulaire, l'algue verte *Chlamydomonas*. C'est chez cet organisme que la plupart des gènes impliqués dans le transport intraflagellaire et la machinerie de construction du cil et du flagelle, ont été identifiés. Par la suite, la découverte que de nombreux gènes impliqués dans ces syndromes codaient des protéines localisées dans le cil ou à sa base, et l'utilisation de nombreux modèles animaux (en particulier souris, zebrafish, Xenope, Drosophile, *C. elegans*) de ces maladies ont permis de comprendre que la plupart de ces syndromes étaient des manifestations de sévérité différentes d'une même maladie génétique. De façon parallèle les études des fonctions respiratoires de la levure (essentiellement *Saccharomyces cerevisiae* mais aussi *S. pombe*) ont été séminales pour l'identification de maladies mitochondriales humaines en permettant l'identification de nombreux gènes de sous unités de structure de la chaîne des oxydations phosphorylantes, de facteurs d'assemblage de la chaîne ou de protéines impliquées dans la dynamique du compartiment mitochondrial. En retour, des altérations génétiques directement identifiées chez l'Homme par la stratégie de liaison génétique ont été validées par l'étude de leurs conséquences délétères chez la levure et c'est la levure qui sert

actuellement dans le screening de banques de substances chimiques potentiellement thérapeutiques. Cependant les conséquences délétères de l'altération de certaines protéines peuvent ne s'exprimer que dans des tissus différenciés qui ne sont alors accessibles que dans les modèles animaux et non dans les modèles cellulaires. Ces modèles animaux sont particulièrement indispensables lorsque l'étude des mécanismes pathogènes est impossible chez l'Homme, par exemple dans le cas de maladie purement cérébrale.

Ces différents exemples soulignent combien des modèles très variés restent essentiels pour la dissection des mécanismes moléculaires.

La collaboration entre cliniciens, généticiens et chercheurs biologistes est donc indispensable. Les travaux expérimentaux constituent un pont entre les données médicales et les éventuelles thérapies. Ces travaux sont multidisciplinaires et associent recherche clinique, physiologie, biochimie, biologie moléculaire, cellulaire et structurale, imagerie, « omics » et bioinformatique.

2. Enjeux scientifiques, priorités et nouvelles frontières

Enjeux scientifiques

Il s'agit des impacts des études en biologie cellulaire et en biologie du développement sur la compréhension des mécanismes conduisant aux pathologies. L'enjeu principal est de démasquer les mécanismes sous-jacents des pathologies. L'identification d'un grand nombre de gènes impliqués dans les maladies rares ou fréquentes n'est pas la fin mais seulement le début de l'étude étiologique de ces maladies. Il faut donc travailler maintenant au niveau cellulaire et moléculaire pour comprendre les mécanismes conduisant à ces pathologies. Il apparaît évident que les compétences multiples sont un atout dans ce domaine et les collaborations associant cliniciens et chercheurs doivent être mises en avant. Pour cela, l'ANR a déjà mis en place des financements sur projets « Maladies Rares » ou « GENOPAT » qui ont encouragé ce type de collaborations. Cependant, l'expérience montre qu'il ne faut pas favoriser une pathologie en particulier mais au contraire diversifier nos recherches.

Priorités

Il s'agit de favoriser les recherches transversales et multidisciplinaires associant recherche fondamentale et recherche clinique. La notion d'interdisciplinarité doit ressortir davantage dans les réseaux de recherche.

En l'absence d'échantillons humains accessibles, la création de modèles cellulaires ou animaux est de première importance car elle conditionne la qualité des travaux de biologie cellulaire. En ce qui concerne les modèles murins, l'exploitation des ressources existantes (gene trap, ENU, EMMA repositories) est très utile mais la création de nouveaux modèles reste indispensable. En effet, les mutations identifiées dans les maladies humaines sont rarement de simples inactivations de gènes. Il s'agit très souvent au contraire d'allèles hypomorphes, hypermorphes ou antimorphes, correspondant à des mutations fines voire ponctuelles. Les modèles murins de ces maladies doivent donc être des mutants conditionnels floxés. Les travaux basés sur l'utilisation du poisson zèbre doivent aussi être accrus, car ils permettent une étude dynamique des processus de développement dans l'organisme entier, grâce à l'imagerie *in vivo*. Le développement actuel de la génétique inverse chez le rat permet d'envisager une importance croissante de ce modèle, plus proche que la souris de la

physiologie humaine, dans les études physiopathologiques. Il ne faut pas oublier que l'exploitation et l'analyse physiologique et phénotypique de modèles bien caractérisés et validés est essentielle pour faciliter une démarche vers les thérapies.

Par ailleurs, l'utilisation des cellules ES, iPS et d'autres, trop peu développée en France, doit être fortement encouragée. Les approches cellulaires de cette nature seront très importantes par exemple pour la modélisation de maladies cérébrales rares, pour le traitement de maladies invalidantes (diabète de type 1) et pour des cribles pharmacologiques.

La mise en place des plateaux technologiques de haut niveau, facilement accessibles, est nécessaire.

Une autre priorité est la structuration de la recherche clinique en association étroite avec les chercheurs fondamentales. Dans ce contexte, il serait souhaitable de modifier l'organisation du travail de certains internes et médecins dans le but d'augmenter la partie de leur temps passée dans les laboratoires de recherche. Dans le même ordre d'idée, les contrats d'interface pour hospitaliers doivent être renforcés ce qui permettrait à de jeunes médecins de venir faire de la recherche dans des laboratoires de recherche fondamentale.

Souvent, l'identification des mutations des gènes n'explique pas l'ensemble des phénotypes. La première raison semble être l'insuffisance de la connaissance de la fonction des gènes, de leurs rôles dans les différents tissus de l'organisme et aussi du déficit de compréhension du fonctionnement des gènes de manière intégrée avec l'expression d'autres gènes. Les facteurs épigénétiques ont également une place de plus en plus importante dans l'analyse. La mise en place des approches à haut débit, des méthodes d'analyse *in silico*, des analyses statistiques, est primordiale. L'enseignement universitaire des statisticiens, des bio-informaticiens, des mathématiciens-biologistes, des chimistes tournés vers la biologie doit constituer une priorité. Il est également indispensable de valider les hypothèses de mécanismes pathogènes en les intégrant à la logique physiologique, et notamment la bioénergétique, du tissu concerné en s'aidant des modélisations mathématiques des interactions biochimiques cellulaires.

Nouvelles frontières

La recherche connaît depuis quelques années une avancée dans les domaines de l'imagerie, de l'identification de mutations (séquençage à haut débit, puces à ADN), des « omics » et de l'épigénétique (par ex. méthylome). Ces nouvelles techniques devraient être utilisées dans le cadre de recherches interdisciplinaires, notamment à la lumière des résultats suggérant le rôle important des variations des régions non codantes des génomes et des modifications épigénétiques. C'est pourquoi il est crucial de mieux former les acteurs de la recherche aux nouvelles techniques. Dans le cas de la biologie cellulaire, un exemple de « challenge » important est celui de l'analyse tri-dimensionnelle des cellules : développer des modèles permettant de visualiser une cellule pathologique au cours du développement dans son environnement 3D doit être encouragé. D'autres exemples sont ceux de l'analyse fonctionnelle des moteurs moléculaires, de l'interactomique fonctionnelle. Des collaborations avec les chimistes doivent être développées. Le secteur de l'imagerie est en forte évolution, mais cela implique une meilleure diffusion des connaissances récentes et une formation des chercheurs. L'intégration des données « omiques » et des données physio-pathologiques est l'objectif de la biologie des systèmes qui fera travailler bioinformaticiens et modélisateurs. Enfin, la constitution de cohortes de qualité, bien définies au départ, demeure essentielle (cf cohorte ELFE et NUTRINET en cours de constitution). Ces cohortes permettent d'accéder à du matériel biologique et de réaliser l'étude de marqueurs. Outre les analyses effectuées à partir de sang et d'urine, il faut aussi citer l'intérêt de travailler sur les exosomes urinaires.

3. Forces, faiblesses, goulots d'étranglement

Forces

- force structurelle du milieu hospitalo-universitaire et des grands centres de recherche Français
- qualité des diagnostics, homogénéité des groupes de patients pour certaines maladies et excellentes collections de patients (maladies rares, maladies du muscle, maladies métaboliques...)
- ressources d'intérêt en foeto-pathologie humaine
- résultats importants obtenus en France, par exemple en génétique du neurodéveloppement (identification de mutations dans les gènes TBR2, DCX, TUBA1A, TUBB2B ..), du retard mental, (gènes OPHN1, ARX, IL1RAPL, TMSF4, MECP2.....), de l'autisme (gènes NLGN3/4, SHANK3...).
- qualité des acteurs de la recherche fondamentale français : exemple des travaux sur la migration neuronale (par exemple modèles cellulaires avec différentes populations de neurones rendus fluorescents et suivis par vidéo-microscopie), le guidage axonal (caractérisation de nouvelles molécules de guidage et leurs récepteurs à travers des souris knock-out, dissection fine du développement de différentes voies axonales), en neurophysiologie (caractérisation des fonctions et des activités de différentes populations neuronales par exemple dans l'hippocampe ou le subiculum, pendant le développement et chez l'adulte), en développement cardiaque (découverte de l'origine extra-cardiaque de cellules constituant des régions importantes du coeur, ce qui contribue à une meilleure compréhension du développement embryonnaire de cet organe vital et laisse entrevoir une meilleure prise en charge des anomalies cardiaques).
- multidisciplinarité du milieu de la recherche en France (CNRS, INSERM, INRA, CEA...)
- existence de financements spécifiques comme les ANR-GENOPAT, la FRM, les financements de GIS, mais aussi des labellisations (Centre de Référence Maladies Rares) permettant un regroupement des patients
- forte implication des associations de patients (AFM, Vaincre la Mucoviscidose...)

Faiblesses

- qualité des diagnostics et de l'homogénéité des groupes de patients pour certaines maladies
- insuffisance ou difficultés de communication réelle entre cliniciens et fondamentalistes
- manque de coordination et de synergie entre les hôpitaux et les EPST
- insuffisance du nombre de centres de recherche mixtes associant réellement cliniciens et fondamentalistes
- manque de plateformes d'imagerie dans les grands centres hospitalo-universitaires
- plateformes manquant très souvent de personnel

- amélioration de la visibilité et de l'accès aux CRB (informations sur leur contenu, sur les moyens d'accès aux échantillons)
- sous-utilisation des ressources de la foeto-pathologie
- PHRC trop peu ouverts à ce type de recherche multidisciplinaire
- nombre insuffisant de modèles d'étude des mécanismes cellulaires liés aux pathologies (poisson zèbre...)
- situation difficile de la physiologie, discipline injustement dévalorisée et cependant essentielle à la biologie et à la physio-pathologie
- financements trop courts sur 3 ans
- difficultés pour prolonger des financements de personnels très qualifiés et recrutés sur CDD

Goulots d'étranglement

- coût important de la recherche multidisciplinaire
- augmentation croissante des données provenant de l'imagerie ou de la transcriptomique alors que les moyens humains pour traiter et analyser les données sont insuffisants
- insuffisance de méthodes de mesure des interactions entre protéines (autre que le FRET)
- manque de statisticiens

4. Propositions d'actions

Dans le domaine de la formation et de l'animation, pour faciliter et inciter le dialogue entre chercheurs et cliniciens:

- formation croisée/réciproque des étudiants en permettant à des médecins de faire des stages dans des laboratoires de recherche (Master M2-R mais aussi thèse de Science) et aux scientifiques de faire des stages à l'hôpital. La question de l'accroissement des étudiants médecins de l'Ecole de l'INSERM doit être posée, de même que celle de l'augmentation du nombre de poste d'accueil INSERM pour médecins.
 - attribution des postes d'accueil pour deux ans, sans évaluation intermédiaire à un an, et renouvelables pour une année, sur évaluation compétitive
 - mise en œuvre et augmentation du nombre des contrats d'interface pour médecins et pharmaciens, sur un mode symétrique des contrats d'interface attribués aux chercheurs
 - soutien à l'école de l'INSERM et aux différents parcours de type « MD-PhD »
- sans ajouter des cours spécifiques science/recherche au programme très chargé des études de médecine, il est concevable d'accroître la part « recherche » de l'enseignement de certaines disciplines telles la cancérologie
- réévaluation de l'enseignement de la physiologie aux étudiants scientifiques, avec renforcement de la physio-pathologie
- formation des physiologistes, électrophysiologistes
- colloques et animations scientifiques entre scientifiques et cliniciens (rôle de l'ITMO et des sociétés savantes) avec accroissement fort de séances « recherche » lors des réunions des sociétés savantes médicales, en donnant la parole à des chercheurs non médecins. Parallèlement, les revues de spécialités médicales doivent inviter des chercheurs fondamentalistes à écrire des revues, mises au point, hypothèses

- formation générale aux techniques et contraintes de la recherche clinique (lois de protection des personnes, cadres juridiques, instances décisionnelles, techniques statistiques adaptées aux petits échantillons...) de manière à ce qu'un chercheur demandeur d'une étude en collaboration avec des cliniciens ait en main toutes les informations et justifications nécessaires à son protocole
- mise en place de formations « Nouvelles Frontières » en imagerie, épigénétique, utilisation de vecteurs viraux, analyse de données 'omiques'comme cela a été fait dans les années 80 pour le clonage et la biologie moléculaire de l'ADN

Dans l'organisation de la recherche:

- création de Centres-Instituts regroupant les biostatisticiens, les biologistes les cliniciens et les plateformes dans un environnement hospitalier ou ailleurs
- Nous proposons qu'un label « équipes de recherche translationnelle » soit créé. Ces équipes, dédiées spécifiquement à des projets de recherche clinique ou pré-clinique, permettraient de valoriser la proximité entre chercheurs et cliniciens
- développement des réseaux multidisciplinaires nationaux et internationaux permettant la constitution de cohortes importantes
- soutien de la recherche physio-pathologique en finançant les études précliniques et les modèles animaux pertinents
- renforcement des plateformes technologiques, et mise en place de nouvelles plateformes (ex. méthylomes)
- renforcement des plateformes d'imagerie et de transcriptome au sein des structures hospitalo-universitaires et de recherche; nombre insuffisant de microscopes 2 photons
- augmentation de l'espace d'accueil de souris mutantes (cas des modèles multi-allèles) et abaissement du coût
- réduction des coûts de création de nouveaux modèles murins
- facilitation de l'accès au séquençage haut-débit à un coût raisonnable
- ouverture des PHRC en facilitant la coopération entre cliniciens et biologistes
- recrutement des ingénieurs et techniciens en CDI
- Faciliter l'accès au matériel biologique humain et aux banques de données
- Réintégration du GIS-Maladies Rares au sein de l'AVIESAN.

**Comité d'experts « Biologie cellulaire, Développement et Pathologies »
de l'ITMO BCDE - coordonné par Daniel Ricquier**

Dominique DAEGELEN, Inserm, Paris, *Directrice Adjointe de l'ITMO BCDE*

Aleksander EDELMAN, CNRS, Paris

Fiona FRANCIS, CNRS, Paris

Fabienne FOUFELLE, Inserm, Paris

Anne LOMBES, Inserm, Paris

Stanislas LYONNET, PU-PH, Paris

Daniel RICQUIER, HU, Paris, *Coordonnateur du Comité d'experts « Biologie cellulaire, Développement et Pathologies »*

Sylvie SCHNEIDER-MAUNOURY, Inserm, Paris

Stéphane ZAFFRAN, Inserm, Marseille