

Génétique

L'analyse fonctionnelle des gènes chez les protozoaires parasites

Le séquençage des génomes de protozoaires parasites a ouvert de nouvelles perspectives de lutte contre ces pathogènes responsables de graves maladies humaines et animales. Toutefois, l'analyse fonctionnelle des gènes reste indispensable à la détermination de leur fonction biologique et nécessaire à leur validation en tant que cibles thérapeutiques.

Les protozoaires parasites, organismes eucaryotes unicellulaires microscopiques, sont responsables de graves maladies humaines et animales comme le paludisme, qui menace 40 % de la population mondiale, mais aussi les leishmanioses, la maladie du sommeil, la maladie de Chagas, la toxoplasmose, etc.

Nos moyens de lutte contre ces maladies sont limités. Aucun vaccin n'a encore été mis au point et les médicaments dont on dispose présentent la plupart du temps des défauts d'efficacité dus au développement de chimiorésistances par les parasites, voire de toxicité. La recherche de vaccins et de nouveaux types de médicaments est un enjeu majeur en parasitologie depuis déjà plusieurs décennies. Cette recherche a pris un nouvel essor avec l'avènement de la génomique et le séquençage des génomes de nombreux protozoaires parasites, qui permettent d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Les analyses fonctionnelles servent, quant à elles, à déterminer la fonction biologique des gènes prédits et à tester s'ils jouent ou non un rôle vital pour la survie du parasite. Elles sont incontournables pour la validation des cibles thérapeutiques.

cerevisiae en 1996, la plupart des eucaryotes dont les génomes ont été séquencés sont pluricellulaires : l'homme, le ver *Caenorhabditis elegans*, la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster*, des plantes telle *Arabidopsis thaliana*... Dans le monde des protozoaires – qui regroupe plus de 92 000 espèces – la plupart des génomes séquencés sont ceux de protozoaires parasites, pour la majorité des pathogènes humains, mais leur nombre reste restreint (tableau).

Ces séquençages ont généré d'immenses masses de données qui ont permis l'identification virtuelle de gènes, au sein desquelles les espoirs de faire émerger les vaccins et les médicaments de demain sont réels. Les analyses post-génomiques – transcriptomiques et protéomiques – ont apporté des informations relatives à l'expression spatio-temporelle de ces gènes.

Toutefois, dans le cas des protozoaires parasites, les gènes sont pour la plupart très dissemblables des gènes connus dans le reste du monde vivant. Ainsi, malgré toutes les données obtenues, on n'a aucune idée du rôle qu'ils jouent dans la biologie et la pathogénicité de ces organismes. À titre d'exemple, on ignore totalement la fonction biologique de 60 % des gènes de *Plasmodium falciparum*, l'agent du paludisme (1), alors que cela n'est vrai que pour 16 % des gènes de la levure *S. cerevisiae*. Le seul moyen de déterminer la fonction biologique de ces gènes atypiques est de procéder à leur étude expérimentale. Pour cela, il est essentiel de disposer d'outils d'analyse fonctionnelle performants.

(1) Gardner MJ *et al.* (2002) *Nature* 419 (6906), 498-511

Le séquençage des génomes de protozoaires parasites : une explosion de données

Depuis la publication du premier génome eucaryote entièrement séquencé, celui de la levure *Saccharomyces*

La transfection ouvre la voie de l'analyse fonctionnelle

L'analyse fonctionnelle des gènes nécessite de pouvoir transfecter les cellules, c'est-à-dire y introduire artificiellement un ADN exogène qui permettra de supprimer, surexprimer ou modifier le gène à étudier. Chez les protozoaires parasites, la transfection a été décrite pour la première fois en 1987 pour *Trypanosoma brucei*. Elle a ensuite été mise au point pour d'autres parasites mais pour certains comme *Cryptosporidium* ou *Encephalitozoon*, cela reste à faire.

En pratique, la molécule d'ADN exogène – linéaire ou circulaire – est introduite dans le protozoaire parasite, le plus souvent par choc électrique. Le succès d'une transfection étant un évènement rare (un pour un million en moyenne), il faut impérativement traiter une population très nombreuse de parasites pour que cet évènement survienne. Il faut ensuite sélectionner le parasite correctement transfecté. Ceci s'effectue par l'introduction, en même temps que la séquence parasitaire ciblée, d'un gène dit de sélection qui exprimera un facteur de résistance à un agent chimique. En présence de cet agent chimique, seuls les parasites ayant reçu le gène de sélection seront capables de se développer. Un des freins au développement des outils de transfection pour les protozoaires parasites, outre la capacité physique d'introduction de molécules d'ADN exogènes, a été l'identification de ces gènes de sélection. Leur nombre reste réduit (deux à quatre) comparé au panel dont on dispose pour la plupart des autres organismes.

Deux voies principales d'analyses fonctionnelles s'ouvrent alors, selon les éléments génétiques que l'on aura greffés sur l'ADN exogène, par génie génétique. On pourra soit modifier les gènes dans le génome, soit détruire l'ARN messager correspondant à ces gènes.

Modifier les gènes dans le génome

La recombinaison homologue

Chez les protozoaires parasites, il est possible de modifier localement une partie du génome en exploitant une propriété intrinsèque de la cellule : la recombinaison homologue (figure 1). En pratique, on greffe sur la molécule d'ADN exogène qui va être introduite dans le parasite quelques centaines de paires de bases parfaitement similaires à la partie du génome que l'on souhaite modifier. Après transfection, cet ADN exogène va être pris en charge par la machinerie moléculaire de la cellule. Une recombinaison dite homologue va alors s'effectuer et conduire à l'intégration de l'ADN exogène à l'endroit de similitude.

Selon la construction d'ADN utilisée, la recombinaison homologue permet de détruire entièrement ou partiellement le gène cible, ou de le remplacer soit par une forme mutée soit par une forme fusionnée à une protéine rapporteur, aisément visualisable dans la cellule.

Le knock out ou la destruction d'un gène cible

Une des applications de la transfection est donc la destruction d'un gène cible dont on souhaite déterminer

Caractéristiques des principaux protozoaires parasites dont le génome a été séquencé et outils d'analyse fonctionnelle disponibles					
	Nom du parasite	Taille du parasite	Maladie associée	Taille du génome, nombre de gènes	Outils d'analyse fonctionnelle
Phylum des excavates	<i>Giardia lamblia</i>	6-17µm	giardiose	11.7Mb/6470 gènes (2007)	GFP
	<i>Leishmania major</i>	2-20µm	leishmaniose	32.8Mb/8272 gènes (2005)	KO, GFP
	<i>Trypanosoma brucei</i>	20µm	maladie du sommeil	26Mb/9068 gènes (2005)	KO, ARNi, GFP
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	3-20µm	maladie de Chagas	55Mb/12000 gènes (2005)	KO, GFP
Phylum des chromalvéolés	<i>Toxoplasma gondii</i>	15-200µm	toxoplasmose	65Mb en cours	KO, ARNi, GFP
	<i>Plasmodium falciparum</i>	2-15µm	paludisme	22.9Mb/5288 gènes (2002)	KO, GFP
	<i>Theileria</i> spp	2-5µm	theileriose	8.3Mb/4035 gènes (2005)	GFP
	<i>Babesia bovis</i>	2-5µm	babésiose	8.2Mb/3671 gènes (2007)	GFP
Phylum des unicomités	<i>Cryptosporidium parvum</i>	4-5µm	cryptosporidiose	9.1Mb/3807 gènes (2005)	pas d'outils disponibles
	<i>Entamoeba histolytica</i>	10-15µm	amibiase	23.7Mb/8938 gènes (2005)	ARNi, GFP
	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	1-7µm (spores)	microsporidiose	2.9Mb/2000 gènes (2001)	pas d'outils disponibles

GFP : green fluorescent protein ; KO : knock out ; ARNi : interférence ARN