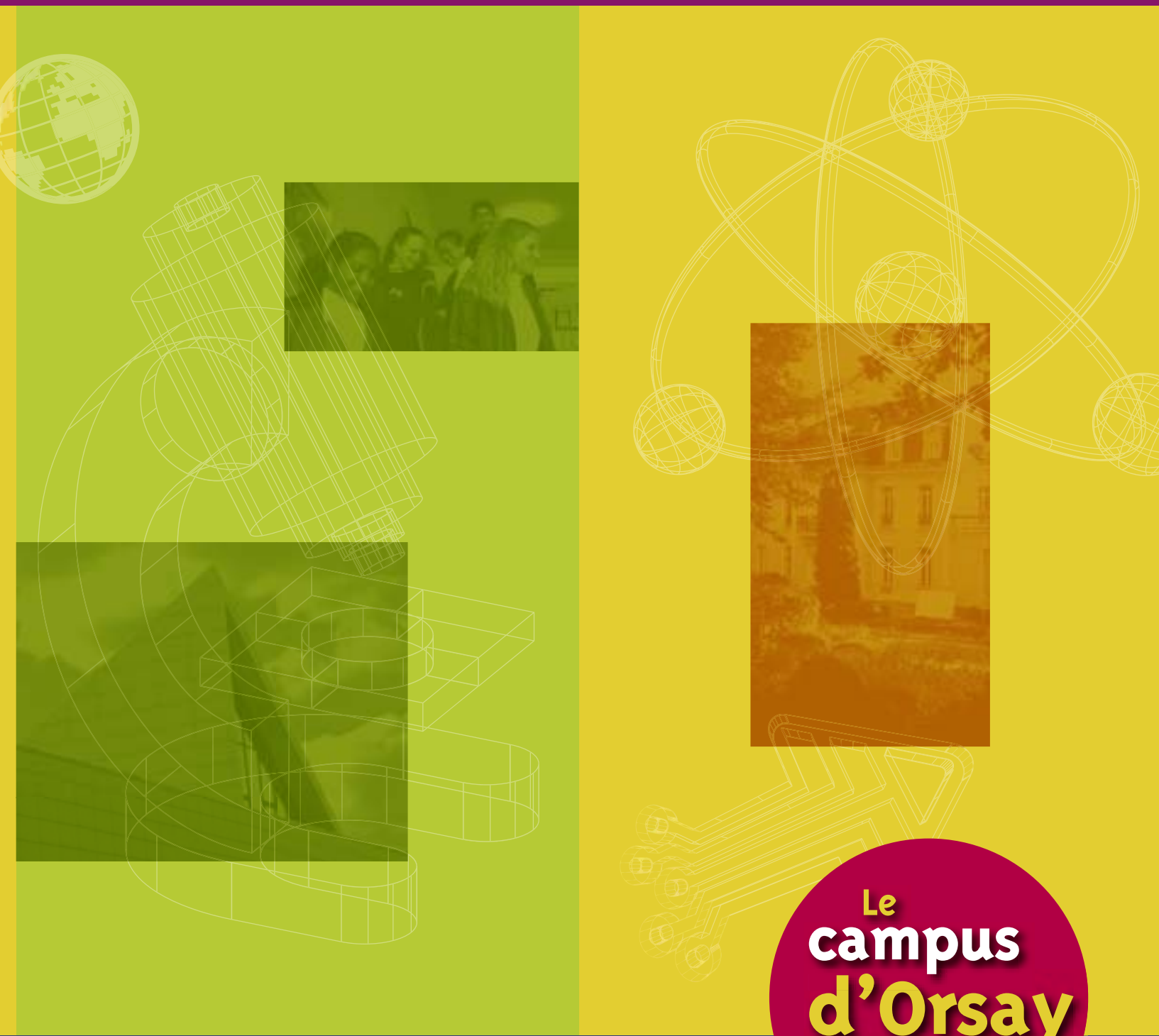


Plein Sud



Le magazine d'information de l'université Paris-Sud
avril - mai 2005 numéro 60

Bimestriel - CPPAP : 0205 B 05152



Le
**campus
d'Orsay**
a **50** ans

Printemps de la culture

Einstein : génie scientifique, figure publique

Prix L'oréal-Unesco : que d'émulsion !



Physique et Chimie à la rencontre des Sciences du Vivant

Lors du colloque multidisciplinaire organisé en décembre dernier par la Faculté d'Orsay (Cf Plein Sud 59), des équipes pluridisciplinaires ont présenté leurs collaborations. Six d'entre elles sont décrites ici par Séverine Martrenchard, Isabelle Masson et Roger Moret du CVC.

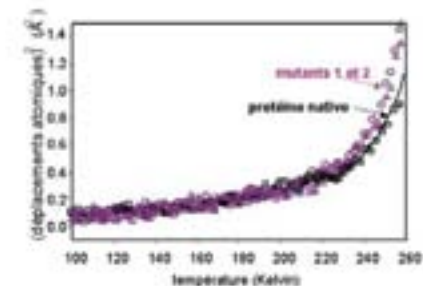
■ Une protéine doit-elle être flexible ou rigide ?

Les protéines ont un rôle majeur dans les activités cellulaires de tous les organismes vivants. Elles ont diverses fonctions : assurer la cohésion des cellules, piloter des réactions chimiques... Ce sont de très grosses molécules composées de plusieurs dizaines ou centaines d'unités de base, les acides aminés, liés les uns aux autres pour former des structures variées. Environ 30 % des protéines servent à constituer les membranes cellulaires, où elles contrôlent les échanges (énergétiques et chimiques) entre les cellules et leur environnement. L'analyse du fonctionnement des protéines membranaires est nécessaire à la compréhension de leur rôle.

Des chercheurs biologistes et physico-chimistes d'Orsay étudient en commun (ceci définit la discipline nommée « biophysique ») le fonctionnement de certaines protéines membranaires qui assurent l'approvisionnement de la cellule en énergie (par l'intermédiaire d'un transfert d'électrons et de proton). Dans une première étape, après cristallisation des protéines, on peut déterminer leur struc-

ture détaillée par diffraction des rayons X. On sait également que de légères modifications de cette structure (induites parfois par une seule mutation dans la protéine !) interviennent de façon déterminante dans l'activité des protéines. En outre, la géométrie des protéines n'est pas figée : les atomes qui les constituent vibrent légèrement et de plus en plus quand la température s'élève. Enfin, les protéines sont « flexibles » et peuvent passer rapidement d'une conformation à une autre.

Pour comprendre l'influence de ces phénomènes « dynamiques » sur le fonctionnement d'une protéine associée à la photosynthèse (appelée *Rhodobacter sphaeroides*), les chercheurs couplent des mesures de l'activité de cette protéine (son efficacité) à des mesures de diffusion des neutrons. Ces dernières sont appropriées pour étudier la dynamique des mouvements évoqués ci-dessus. Ils observent que l'amplitude de déplacement des atomes augmente naturellement avec la température et qu'il existe des fluctuations « par saut » entre



conformations voisines, qui apparaissent au dessus de 220 K environ (**voir figure**). Lorsque les mêmes mesures sont effectuées avec des protéines dont la structure a été très légèrement modifiée (des mutants), les déplacements sont plus importants mais, contrairement à l'intuition et aux résultats obtenus sur d'autres protéines de membrane, l'activité des mutants est plus faible. Une certaine « rigidité » est-elle donc favorable aux processus mis en jeu dans l'activité des protéines ? Cela pourrait bien dépendre de la fonction spécifique d'une protéine donnée et peut être de l'organisme où elle est rencontrée. Ces questions posent le problème de l'Évolution moléculaire des protéines.

■ Comprendre les mécanismes de transmission des prions

La maladie de la « vache folle » et, chez l'homme, celle de Creutzfeldt-Jakob sont dues à des protéines anormales qui s'assemblent pour former des fibres et qu'on appelle prions. Elles se distinguent des protéines normales par leur conformation, c'est-à-dire leur structure dans l'espace. On peut ainsi reconnaître dans les protéines des conformations en hélices ou en feuillets, très caractéristiques. Les prions sont capables de modifier la conformation des protéines normales, assurant ainsi la transmission de la maladie. Ces mécanismes de transmission sont mal connus bien qu'essentiels à la compréhension des maladies à prions.

Une des voies d'approche consiste à étudier ces mécanismes en fonction de la conformation de prions « modèles », qui n'infectent pas l'homme et que l'on trouve dans certaines levures. Ainsi, des

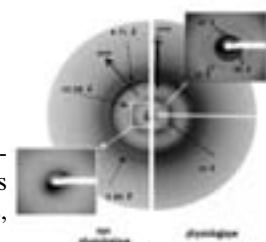
biologistes de Gif-sur-Yvette et des physiciens d'Orsay collaborent pour analyser la conformation d'un prion nommé prion Ure2p. La protéine normale (native) correspondante, se trouve dans une levure au nom également érotérique, *Saccharomyces cerevisiae*, très familière en réalité puisqu'il s'agit de la « levure du boulanger ». Sa conformation est connue avec précision, à l'échelle atomique.

Dans des conditions non-physiologiques, *in vitro*, les conformations des prions Ure2p sont modifiées de façon importante par rapport à la protéine normale. Elles s'assemblent en fibres bien particulières d'environ 20 nanomètres de diamètre et 1 à 2 microns de longueur. Sous cette forme, elles ont perdu la propriété de transmission de leur conformation à des protéines normales : elles sont donc inertes.

Dans des conditions physiologiques, l'assemblage des prions en fibres présente

des caractéristiques structurales très différentes, comme le montre l'analyse des clichés de diffraction des rayons X (**voir figure**). En outre, dans ce cas, l'assemblage en fibres n'est associé qu'à un faible changement de conformation du prion (par rapport à la structure de la protéine native).

Ces résultats peuvent être éclairés par la connaissance, à plus petite échelle, de la structure atomique d'Ure2p, permettant d'identifier les zones de la molécule qui sont impliquées dans les changements de conformation et dans l'assemblage du prion Ure2p sous forme de fibres. Au-delà, ces connaissances pourraient être mises à profit pour concevoir des moyens de bloquer ces transformations : une voie thérapeutique prometteuse pour les maladies à prions.





■ Des virus à l'assaut des bactéries : une piste pour soigner les maladies infectieuses ?

Certains virus n'attaquent pas les cellules animales (ou humaines) mais spécifiquement les bactéries. Ces bactériophages ou phages (qui « mangent » des bactéries) sont présents dans tous les milieux colonisés par les bactéries, des plus extrêmes (sources chaudes à 80°C...) aux plus communs (corps humain, sol, eau de mer...). Ce sont les microbes les plus répandus sur terre. Ils diffèrent par leur morphologie, leur taille et la nature de leur génome. Pourquoi ne pas les utiliser pour tuer les bactéries responsables de nombre d'infections ? L'idée avait été déjà avancée puis abandonnée car les bactériophages apparaissaient peu utilisables. Un regain d'intérêt pour une éventuelle « thérapie phagique » stimule actuellement de nouvelles études sur ces virus dont certaines étapes du processus infectieux sont encore mal connues.

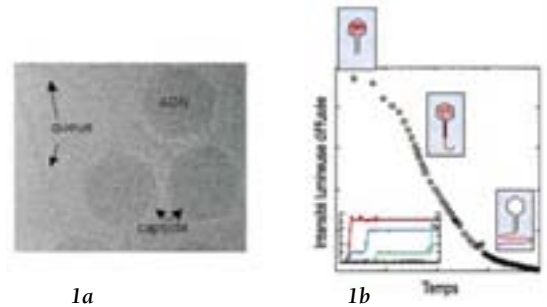
La plupart des phages sont composés d'une tête (la capsid) contenant une molécule d'ADN (sa carte d'identité génétique) et d'une queue permettant son ancrage à la surface de la bactérie :

l'ADN du phage peut être injecté à l'intérieur de la bactérie à travers son enveloppe. La bactérie est alors reprogrammée par l'ADN viral pour produire d'autres phages libérés ensuite par éclatement de la bactérie.

A Orsay, des biologistes et des physiciens se concentrent sur le mécanisme de transfert de l'ADN de la capsid vers la bactérie. Le modèle d'étude est un phage (T5) qui infecte *Escherichia coli*, une bactérie très commune localisée dans l'intestin. Ces études associent différentes techniques : génétique, microbiologie, biochimie, microscopie de fluorescence, cryo-microscopie électronique et diffusion de la lumière. Elles montrent que le « moteur » principal du transfert de l'ADN du phage vers la bactérie est la forte pression exercée par la capsid (environ 60 atmosphères) sur l'ADN, qui est replié de façon très compacte à l'intérieur de celle-ci (l'ADN déplié mesure environ 40 microns, la capsid 100 nm) (voir figure 1a). Ainsi, lorsqu'on réduit cette pression (sous l'effet d'un agent de condensation de l'ADN par exemple) le

transfert est incomplet. Par ailleurs, des expériences de diffusion de lumière et de microscopie de fluorescence permettent d'avoir accès à la cinétique du transfert de l'ADN (voir figure 1b). Celle-ci est complexe et fait apparaître des arrêts du transfert (voir insert, figure 1b) dont l'origine, encore incertaine, pourrait être liée à la présence, dans la structure de l'ADN, de régions particulières susceptibles de ralentir l'éjection.

Ces travaux se poursuivent pour déterminer l'organisation de l'ADN dans la capsid et évaluer la généralité de ces mécanismes. Au-delà ces approches pourraient être transposées à d'autres types de virus.



■ Observer le fonctionnement du cerveau : Imagerie et modélisation

Physique et neurobiologie dialoguent au sein du groupe « interface physique/biologie » de l'Institut de Physique Nucléaire. Constitué en 1985 pour l'étude et le développement de dispositifs d'imagerie pour la recherche en biologie, ce groupe a depuis structuré ses activités autour de trois axes : la neurobiologie s'appuyant sur l'imagerie « petits animaux », l'imagerie médicale en bloc opératoire et le séquençage de l'ADN.

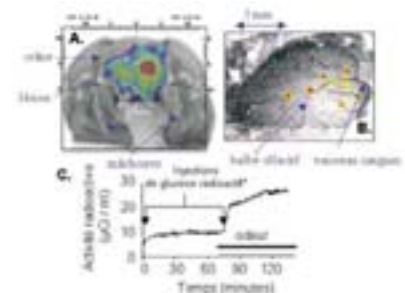
L'étude du fonctionnement du cerveau s'appuie traditionnellement sur deux approches extrêmes : une approche à l'échelle moléculaire (neurotransmetteurs qui relaient les messages nerveux) et des études comportementales. Pour jeter un pont entre ces deux approches, il était nécessaire de développer des méthodes d'investigation moléculaires *in vivo* chez le petit animal de laboratoire (généralement le rat ou la souris), ce qui permet de mener des expérimentations plus poussées que chez l'homme. En complément de l'imagerie optique, deux méthodes ont été développées par le groupe :

la TOMographie à Haute Résolution (TOHR) et la sonde intra-cérébrale.

La tomographie d'émission est utilisée en clinique par exemple pour le diagnostic de cancers. Elle s'appuie sur la détection des radiations émises par des molécules radioactives convenablement choisies. Cette technique a été adaptée au petit animal. TOHR est une approche originale qui permet d'atteindre une résolution sous-millimétrique dans l'exploration du cerveau. Elle est utilisée pour étudier des modèles animaux de maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, chorée de Huntington) (fig. A) : suivi de l'évolution de la maladie et des effets de différents traitements.

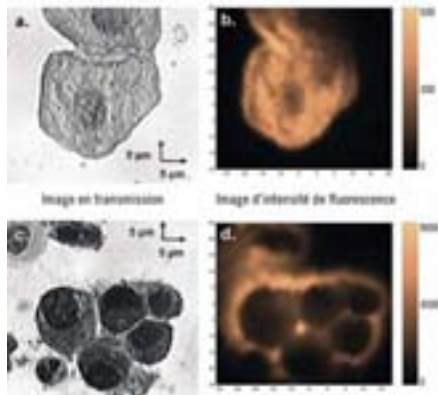
La sonde intra-cérébrale est un local de radioactivité : après injection d'un traceur radioactif, la sonde, implantée dans une zone d'intérêt du cerveau du rat, mesure la radioactivité émise en fonction du temps. Elle permet de scruter le fonctionnement des réseaux de neurones utilisant des neurotransmetteurs comme

la dopamine (impliquée dans la maladie de Parkinson) ou la sérotonine (impliquée dans la dépression). Autre application : l'étude du métabolisme cérébral, en liaison avec l'imagerie optique. Tout processus cérébral requiert de l'énergie, qui est apportée par la consommation de glucose et d'oxygène. L'imagerie optique visualise l'augmentation de la consommation d'oxygène (fig. B) ; la sonde intra-cérébrale mesure celle de glucose (fig. C). Elles s'appuient sur l'étude d'un système sensoriel précis : le système olfactif du rat, activé en lui faisant sentir une odeur. Ces techniques permettent de mieux comprendre et de modéliser les mécanismes cellulaires sous-tendant le métabolisme cérébral.





■ Les cellules cancéreuses sont fluorescentes !



Images de cellules urinaires (cytologies) par microscopie en transmission « classique » : a/ cellule normale, b/ amas de cellules tumorales par imagerie de fluorescence (les dégradés de couleur représentent les différentes intensités de fluorescence), c/ cellule normale, d/ amas de cellules tumorales. On observe bien la différence de localisation des molécules fluorescentes.

Plus un cancer est détecté précocement, plus les chances de succès des thérapies entreprises sont grandes. Les médecins ont donc besoin de techniques de dépistage efficaces mais peu contraignantes pour pouvoir surveiller les populations à risque : les fumeurs dans le cas du cancer de la ves-

sie en sont un exemple. Une possibilité actuelle est de pratiquer une cytologie urinaire : cela consiste à recueillir des cellules provenant des urines, à les déposer sur une plaque et à les observer au microscope. Le médecin établit son diagnostic en examinant l'aspect de la cellule, mais cette technique n'est pas suffisamment fiable (le taux de cancers de la vessie ainsi détecté est de seulement 60%). Pour dépister à coup sûr un cancer, il faut donc recourir à des techniques beaucoup plus invasives comme les biopsies qui nécessitent de prélever des tissus.

En vue de développer une méthode pour « lire » différemment ces cytologies, une collaboration autour du dispositif expérimental IDEFIX* est née entre l'équipe de Photobiologie et Biophotonique du laboratoire de Photophysique Moléculaire et des médecins (urologue et anatomopathologiste) de l'hôpital du Kremlin-Bicêtre. Au lieu de la simple image en transmission du microscope « classique », les chercheurs réalisent une cartographie en envoyant un fin pinceau de lumière laser en différents points de la cellule. Certaines molécules contenues naturellement dans la cellule absorbent cette lumière et émettent une lumière fluorescente que l'on peut détecter. L'intensité

de cette fluorescence ainsi que sa durée de vie donnent des informations liées à la nature même des molécules qui sont présentes dans la cellule.

Dans le cas des cellules urinaires, la différence entre une cellule saine et une cellule cancéreuse est très visible : comme le montre la comparaison des figures 1b et 1d, le signal de fluorescence de la cellule saine est réparti uniformément à l'intérieur alors que dans le cas de la cellule cancéreuse, les molécules qui fluorescent sont localisées à l'extérieur de la membrane cellulaire. On peut les différencier très aisément. Une première série de tests a été réalisée à partir de cellules malades : toutes présentaient ce même phénomène de fluorescence extracellulaire. D'autres tests ont été pratiqués « en aveugle » (sans information sur la malignité ou non de la cellule) et sont en cours de dépouillement.

Les recherches sur ce sujet sont aujourd'hui poursuivies notamment en étendant la méthode de diagnostic à d'autres cancers.

* *Imagerie de la Dynamique d'Emission de Fluorescence Intracellulaire par excitation à X photons*

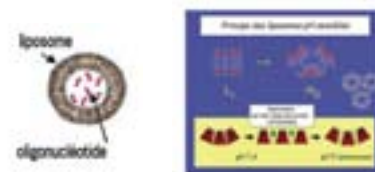
■ Comment acheminer les molécules actives au cœur des cellules malades

Il ne suffit pas qu'une molécule d'intérêt thérapeutique soit efficace pour qu'un médicament voit le jour. Une des étapes cruciales pour la mise en œuvre d'une telle molécule est sa rencontre dans l'organisme avec, par exemple, le virus ou la tumeur qu'elle doit traiter et ceci dans de bonnes conditions. Il faut donc assurer son transport (que l'on appelle « vectorisation ») en la préservant des interactions néfastes susceptibles d'interrompre son parcours au sein de l'organisme, ou même de la détruire. Une méthode fréquemment utilisée consiste à associer la molécule active à d'autres molécules (composant ainsi un « vecteur ») qui vont la transporter en la protégeant. C'est la problématique que se posent des chercheurs du Centre d'Études Pharmaceutiques de Châtenay-Malabry. Ils étudient certaines molécules qui ont la capacité de bloquer la synthèse de protéines malignes, synthèse dont sont le siège les cellules d'un organisme atteint d'une infection virale, ou d'un cancer. Ces molécules sont de courts fragments d'ADN,

appelés oligonucléotides. Il est possible de les enfermer dans des vésicules sphériques de taille inférieure au micron : les liposomes. Ceux-ci permettent de véhiculer les oligonucléotides jusqu'au cœur de la cellule. Les liposomes sont constitués de phospholipides, « longues » molécules ayant une tête hydrophile et une queue hydrophobe qui leur permettent de s'auto-organiser en couches (voir figure). En combinant différentes méthodes (calorimétrie différentielle, diffraction des rayons X aux petits et grands angles) les chercheurs ont analysé comment les lipides et les oligonucléotides s'associent au sein des couches pour former des structures particulières. Celles-ci dépendent de la concentration relative oligonucléotides/lipides et l'analyse de cette dépendance permet d'obtenir des informations sur les interactions entre ces molécules.

Un grand intérêt des liposomes choisis est leur sensibilité à l'acidité (le pH) du milieu où ils se trouvent (on les nomme liposomes pH sensibles). Cette dépen-

dance peut être mise à profit pour qu'ils libèrent l'oligonucléotide actif uniquement à l'intérieur de la cellule à traiter, dans un compartiment acide, leur évitant ainsi une dégradation par différents enzymes. Un résultat encourageant : la combinaison oligonucléotides + lipides n'altère pas ce caractère pH sensible et les espoirs d'utilisation des liposomes comme vecteurs thérapeutiques sont ainsi renforcés.



Les liposomes sont des vésicules dont la membrane est constituée de phospholipides arrangés en bicouche (L α). La bicouche des liposomes pH sensibles qui est constituée d'un mélange de phosphatidyléthanolamine (en rouge) et d'acide oléique (en vert) s'autodétruit en milieu acide (pH5) en donnant une structure hexagonale (H $_I$), ce qui libère les oligonucléotides.

Fertile convergence

Les hormones interviennent dans de nombreux processus vitaux tels que la reproduction ou la différenciation cellulaire. La compréhension de leurs mécanismes d'actions est cruciale pour faire avancer les recherches thérapeutiques liées à certaines maladies : affections cardiovasculaires, troubles de la fertilité, voire certains cancers... S'intéressant plus particulièrement aux hormones stéroïdes, l'unité « récepteurs stéroïdiens : physiopathologie endocrinienne et métabolique » vient d'être créée à la Faculté de Médecine du CHU de Bicêtre (Val-de-Marne)*. Elle est dirigée par Marc Lombès, médecin endocrinologue et directeur de recherche à l'Inserm.

* L'Unité 693 mixte Inserm/ Paris-Sud 11 est rattachée à l'IFR 93 dirigé par Marc Tardieu.

Dans quel contexte avez-vous proposé la création de votre Unité ?

J'étais responsable d'une équipe dédiée à la recherche sur l'expression, la fonction et la régulation physiopathologique du récepteur minéralocorticoïde humain (U478 de l'Inserm). Parallèlement, Anne Guiochon-Mantel travaillait en pharmacologie moléculaire des récepteurs de la progestérone au sein (U473), et Bruno Fève en physiologie et physiopathologie adipocytaire (UMR CNRS 7079). Il nous a semblé intéressant de réunir nos compétences pour centrer nos recherches sur les mécanismes d'action des hormones stéroïdes, en particulier l'aldostérone et la progestérone, et leurs implications physiologiques et physiopathologiques, métaboliques et endocriniennes. De plus, l'Université Paris 11 souhaitait un rapprochement avec le service d'Endocrinologie et des maladies de la reproduction du CHU de Bicêtre dirigé par les Professeurs Philippe Chanson et Jacques Young afin de développer des interfaces entre les activités cliniques de ce service et la recherche fondamentale.

Comment votre unité est-elle organisée ?

A travers l'étude du récepteur des minéralocorticoïdes (MR), de la progestérone (PR) et de leurs cofacteurs, plusieurs axes de recherche fondamentale, de physiologie intégrée et de physiopathologie sont abordés. D'un point de vue fondamental, nous étudions la régulation de l'expression de MR, élément clé de la réponse hormonale. Nous cherchons à définir les fonctions des cofacteurs que nous avons déjà isolés et tentons également de préciser d'éventuelles interactions fonctionnelles par d'autres voies de transduction de signal,

ainsi que leur influence sur la réponse hormonale finale. Nous étudions aussi les mécanismes de trafic nucléo-cytoplasmique et de signalisation hormonale. L'approche physiologique et physiopathologique nous permet d'ouvrir des perspectives thérapeutiques pour des affections qui posent des problèmes cruciaux de santé publique : les affections cardiovasculaires, les troubles de la fertilité, l'obésité et certaines affections hormono-dépendantes (fibromes, cancers etc.). Nous travaillons en effet sur l'implication de MR en physiopathologie rénale et cardiovasculaire. Nous recherchons des anomalies génétiques des cofacteurs dans les syndromes de résistance multiple aux stéroïdes. Nous examinons également l'implication des récepteurs stéroïdiens sur les fonctions de reproduction. Nous travaillons enfin sur le tissu adipeux comme nouvelle cible de l'action des hormones stéroïdes. Nous pouvons ainsi commencer à évaluer l'implication de PR et MR sur les fonctions lipogéniques, lipolytiques, thermogéniques et sécrétoires de lignées d'adipocytes blancs et bruns, murines et humaines. A terme, nous envisageons d'étendre ces études en pathologie humaine pour appréhender les récepteurs en fonction du tissu et de la corrélation avec le phénotype, les paramètres cliniques et biologiques.

Vous voici donc installé avec votre structure dans les locaux même de la Faculté de médecine de Bicêtre, juste en face de l'Hôpital...

Cette implantation, ainsi que l'important soutien de l'Université Paris 11 pour notre installation, me semble tout à fait révélatrice d'une volonté de favoriser les interactions entre notre unité et les autres structures de recherche



Marc Lombès

déjà présentes, et avec la Faculté de Médecine. La proximité des services cliniques et l'implication importante de Philippe Chanson et de Jacques Young rendent l'unité attractive pour les internes en endocrinologie. Ces interfaces rentrent tout à fait dans l'historique du CHU de Bicêtre qui est un grand centre d'endocrinologie dont la réputation s'appuie aussi sur les travaux des anciennes unités dirigées par Etienne Emile-Baulieu et par Edwin Milgrom. J'ai moi-même été interne en endocrinologie dans cet Hôpital dans le service du Pr Schaison et travaillé dans l'unité du Pr Baulieu dans les années 90. Je suis donc heureux que notre unité soit installée sur ce lieu historiquement dédié à l'Endocrinologie. Au-delà de l'Hôpital du Kremlin-Bicêtre, notre localisation et notre partenariat avec Paris 11 permettent également de bonnes synergies avec l'Hôpital Antoine Bécclère où Jacques Young tient consultation et avec la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry avec qui nous avons déjà eu des collaborations (Jacques Bertoglio et Marc Pallardy). C'est une très bonne chose que nos travaux s'effectuent sur un lieu hospitalier car ils ouvrent la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. De voir les malades juste en face de notre laboratoire nous donnent envie de les faire bénéficier des résultats de nos recherches.

BÉATRICE PRESLES
RÉDACTRICE DE LA LETTRE RÉGIONALE PARIS 11
DE L'INSERM

