

## LA LUTTE CONTRE LE PALUDISME A L'HEURE POST-GENOMIQUE

O. MERCEREAU-PUIJALON

*Med Trop* 2003 ; 63 : 241-244

**RESUME** • Avec la publication des articles princeps à l'automne dernier sur la séquence du génome de *Plasmodium falciparum* et de *P. yoelii yoelii*, quelques mois après celles d'*Anopheles gambiae*, du génome humain et du génome murin, la paludologie est sans conteste entrée dans une ère nouvelle. Une des leçons importantes de l'annotation du génome est que près de 60% des séquences des *Plasmodium* sp. sont sans fonction attribuée, et qu'une proportion importante des séquences de *P. falciparum* n'a pas d'équivalent chez *P. yoelii*. Ce sont donc à la fois les spécificités du genre *Plasmodium* et les particularités de chaque espèce - et *in fine* la pertinence de la modélisation du paludisme chez l'animal - qui peuvent maintenant être explorées. De nombreuses perspectives de recherches s'ouvrent pour la découverte de nouveaux médicaments, pour les recherches vaccinales, pour la compréhension de la cascade d'événements conduisant à la pathologie ou à la protection, mais aussi pour la biologie des populations et des échanges génétiques au sein des populations de terrain. C'est l'espace même de la recherche qui en est remodelé, avec la nécessité de regrouper les efforts pour les explorations systématiques qu'offrent les nouvelles technologies de la post-génomique. Il est urgent d'exploiter au mieux cette masse de données nouvelles pour développer de nouveaux outils de lutte. Ce développement passe par des approches rationnelles de génomique fonctionnelle et de biologie intégrative. Cet article résume brièvement les données acquises et discute les approches expérimentales et les perspectives.

**MOTS-CLES** • *Plasmodium falciparum* - Génomique - Génomique fonctionnelle - Génétique des populations - Polymorphisme - Pathologie - médicaments.

### MALARIA CONTROL IN THE POST-GENOMIC ERA

**ABSTRACT** • With the publication of seminal articles on the genomic sequence of *Plasmodium falciparum* and *P. yoelii yoelii* last autumn following the articles on genome of *Anopheles gambiae*, man, and mice, malariology stepped indubitably into a new era. A major finding of genome annotation is that nearly 60% of *Plasmodium* sp. have no functional attribution and that a high proportion of *P. falciparum* sequences have no counterpart in *P. yoelii*. In the light of these findings it will now be possible to explore the specificities of the *Plasmodium* genus and particularities of each species - and ultimately the relevance of animal malaria models. Numerous avenues of research have been opened not only for drug discovery, vaccine development, dissecting the cascade of events contributing to pathology or protection, but also for population biology studies and analysis of genetic exchanges within field parasite populations. The field has been radically changed, and coordinated efforts are needed to implement the powerful post genomic technologies. There is an urgent need to exploit this huge mass of new data for the development of new control methods. This development requires a rational approach of functional genomics and integrative biology. The purpose of this article is to briefly summarize current data and discuss experimental approaches and perspectives.

**KEY WORDS** • *Plasmodium falciparum* - Genome - Functional genomics - Population genetics - Diversity - Pathology - Drugs.

La séquence du génome du clone 3D7 de la souche NF54 de *Plasmodium falciparum* a été divulguée en octobre dernier (1). Dans le même temps était publiée une première analyse du protéome de 3D7 à plusieurs stades du cycle biologique (2) et l'analyse préliminaire du génome de la lignée 17XNL de *P. yoelii yoelii* (3). La mise à disposition de la communauté scientifique de cette masse considérable d'informations, obtenue par un consortium d'équipes qui ont travaillé de concert à cet énorme travail de déchiffrement, constitue sans aucun doute un tournant dans les recherches sur la biologie parasitaire. Nous disposons dorénavant à la fois de l'information génétique du parasite (au moins *P. falciparum*,

d'autres espèces comme *P. vivax*, *P. berghei*, *P. chabaudi* ou *P. knowlesi* sont en cours de séquençage), et des deux hôtes, le moustique et l'homme, et depuis peu, de celle de deux hôtes mammifères expérimentaux, la souris et le rat. Tout - ou presque - est là, mais tout n'est pas dit, loin s'en faut !

### CE N'EST QU'UN DEBUT...

Tout - ou presque - est là : nous avons une somme très impressionnante de données nouvelles, mais il manque encore des informations. La séquence du génome humain n'est pas complète, la séquence du génome de référence qu'est le clone 3D7 ne rend pas compte de l'importante diversité au sein de l'espèce *P. falciparum*. Nous savons que certaines extrémités chromosomiques y sont tronquées, que certains gènes y sont inactivés par des mutations. Nous savons qu'il ne représente qu'un spécimen d'une très grande panoplie de souches. Il nous faut, comme des enfants insatiables,

• Travail de l'Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites (O.M.P., Titres hospitalo-universitaires de l'auteur ??), CNRS URA 2581, Institut Pasteur, Paris, France.

• Correspondance : O. MERCEREAU-PUIJALON, Unité d'Immunologie Moléculaire des Parasites, CNRS URA 2581, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux - 75015 Paris, France • Fax : +33 (0)1 40 61 35 84 • E-mail : omp@pasteur.fr •

encore et toujours d'autres séquences. Séquences d'autres souches de la même espèce parasitaire : l'expérience dans le monde de la recherche sur les bactéries prouve que c'est incontournable. Séquences d'autres espèces vectrices qu'*Anopheles gambiae*. Séquences des polymorphismes importants chez les parasites et leurs hôtes. C'est indispensable pour mener *in fine* une lutte contre les parasites en prenant en compte la complexité de leurs écosystèmes, et donc pour gagner cette lutte.

Beaucoup reste à faire sur ce que nous venons de recevoir comme information. Les annotations actuelles sont, par définition, incomplètes. En effet, nous pouvons, grâce à la bioinformatique, reconnaître la présence de signaux de transcription et de traduction, de signaux d'épissage et les phases ouvertes de lecture. Mais, nous ne détectons ainsi que ce qui est connu à l'heure actuelle dans l'une ou l'autre espèce. On peut déduire la structure des gènes sur la base des connaissances actuelles, et l'on peut assigner une fonction à ces gènes hypothétiques en recherchant des signatures moléculaires, des similarités significatives et des motifs consensus. Mais il reste encore à identifier les gènes, en particulier dans un génome aussi complexe que l'homme. Quant à celui de *P. falciparum*, sa richesse exceptionnelle en A+T complique considérablement l'analyse. L'annotation princeps est à poursuivre, à enrichir et à vérifier. Cela ne pourra se faire qu'au prix d'un important travail expérimental.

Beaucoup est dit, parce que l'on a maintenant en main le programme génétique des 23 millions de bp de *P. falciparum*, programme qui suffit à ce clone 3D7 à effectuer le cycle biologique complet. Tous les gènes essentiels sont donc présents et ne demandent qu'à être étudiés. L'annotation a permis d'assigner à près de 40 % des gènes une fonction probable, de décrire dans ces grandes lignes le métabolisme cellulaire, d'y repérer des voies métaboliques originales et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (4), dont certaines ont déjà fait l'objet d'essais cliniques (5). Elle a permis d'avoir une première vue d'ensemble sur les grandes fonctions cellulaires : réplication, réparation de l'ADN, transcription, traduction (1). Elle a fourni pour la première fois le répertoire complet des familles multigéniques et permis ainsi la découverte de nombreuses familles multigéniques insoupçonnées jusqu'alors (1, 3). Cette information a fourni des lumières nouvelles sur l'origine de *P. falciparum*, sur les échanges génétiques avec les endosymbiontes (devenus par la suite la mitochondrie et le plastide), et sur l'architecture des chromosomes.

Mais tout n'est pas dit, loin de là. Plus de 60 % des séquences de *P. falciparum* identifiées comme codantes n'ont pas de fonction connue, et n'ont pas d'homologue dans les autres espèces séquencées jusqu'à maintenant. Près d'un tiers des protéines de *P. falciparum* n'a pas d'homologue chez *P. yoelii*. Les *Plasmodium* sp. sont les organismes pour lesquels la part d'inconnu est la plus importante. Beaucoup reste donc à faire pour confirmer la fonction des gènes auxquels il a été possible d'attribuer une, et pour identifier la fonction des gènes inconnus, et leur rôle dans la biologie parasitaire. C'est une énorme tâche qui est devant nous, pour laquelle il faudra mettre en œuvre des stratégies innovantes de recherche.

D'autre part, au-delà du premier degré d'annotation par recherche de structure organisationnelle connue et de similarité, se pose le problème du second degré, qui est la dynamique de l'expression des gènes, leur stade d'expression bien-entendu, mais aussi l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles de leurs produits. À l'univers en une dimension de la séquence linéaire, d'autres dimensions restent à incorporer par l'analyse de la fonction et de sa modulation/régulation. L'étape cruciale du séquençage du génome est l'aboutissement de la première manche d'un match qui sera long. C'est le début d'une longue démarche vers la compréhension de la biologie parasitaire au niveau cellulaire et au niveau des interactions avec les hôtes.

### LA GENOMIQUE FONCTIONNELLE AU SERVICE DE LA LUTTE

La longue période de recherches qui s'ouvre à nous devra s'attacher à tirer le meilleur bénéfice de ces informations pour comprendre comment fonctionnent les parasites, disséquer les interactions avec les hôtes - à la fois du côté des parasites et du côté des hôtes - et enfin concevoir de nouvelles stratégies de lutte, de nouveaux outils de contrôle et de surveillance.

Nous disposons d'informations sur le métabolisme qui devraient permettre de développer de nouveaux médicaments et permettre de mieux comprendre la résistance à certains antipaludéens existants. Nous disposons de la séquence protéique d'un très grand nombre de molécules potentiellement antigéniques d'un clone de *P. falciparum* et de *P. yoelii*. Le séquençage a fait prendre conscience de la pauvreté de nos connaissances sur les antigènes parasitaires. Des centaines de protéines inconnues possédant des séquences trans-membranaires ont été identifiées, dont certaines sont très probablement des antigènes de surface. Comment explorer les propriétés antigéniques de ces centaines de protéines ? Comment utiliser ces données pour disséquer les processus contribuant à la pathogenèse et la dynamique des événements intervenant lors de l'infection de l'hôte ?

Il n'y a pas une seule réponse à ces questions, ni une seule voie royale, de recherches. L'exploration systématique des événements transcriptionnels et traductionnels, des interactions protéine/protéine au niveau d'un génome entier est l'étape suivante, indispensable à la description moléculaire des parasites. Elle requiert des plates-formes technologiques, qui appellent une organisation de la recherche différente de celle qui a prévalu en biologie avant l'ère des génomes. Elle implique une répartition des tâches entre différents groupes spécialistes de l'un ou l'autre aspect de la biologie au sein de consortium, à l'image de ce qui a été fait pour les séquençages des génomes eucaryotes. Cette étape est nécessaire pour comprendre le bagage génétique de ces parasites et leur mode de fonctionnement. Le développement de technologies de criblage à l'échelle du génome est loin d'être achevé, de même que les stratégies d'analyse permettant de comprendre les hiérarchies dans les signaux transcriptionnels, et d'identifier des patrons antigéniques. Mais il est indispensable qu'en

parallèle aux approches systématiques, l'imagination reprenne le pouvoir. La séquence du génome a montré l'étendue de notre ignorance sur les parasites, et la recherche fondée sur la mise à l'épreuve d'hypothèses imaginatives et novatrices a plus que jamais sa place. Elle sera facilitée par la possibilité de rechercher plus rapidement les acteurs en cause au sein du parasite ou des réponses de l'hôte grâce aux outils puissants et sensibles de post-génomique.

La phase de criblage qui s'est ouverte va permettre une annotation fonctionnelle des gènes parasitaires, de leur temporalité d'expression (6) et de l'antigénicité des molécules. La compréhension des processus régissant la construction de l'édifice qu'est la cellule parasitaire à ses différentes étapes de développement va nécessiter le recours au criblage des gènes individuels, à leur inactivation permanente ou temporaire. Dans ce cadre tout particulièrement, le recours aux modèles murins, plus faciles à manier et à manipuler, devrait être d'un très grand secours.

---

### LA BIOLOGIE DES POPULATIONS ET LES PRESSIONS DE SÉLECTION

---

Au-delà de la recherche de nouvelles voies d'intervention anti-parasitaire par l'identification des talons d'Achille du parasite au cours de son cycle biologique et par la mise à plat de son répertoire antigénique, la biologie parasitaire devrait être considérablement enrichie. Les technologies à haut débit de criblage du génome permettent maintenant d'explorer des aspects extrêmement importants de la biologie parasitaire. Une étude pionnière criblant toutes les phases codantes du chromosome 2 a mis en évidence un polymorphisme particulièrement élevé des protéines de surface (7). Ceci reflète très probablement des pressions de sélection lors d'interactions clés du parasite avec ses hôtes: reconnaissance de récepteurs de l'hôte polymorphes, échappement immunitaire... L'identification des acteurs en jeu dans ces interactions sera l'étape suivante. Si l'on veut concevoir des moyens de lutte ciblant ces étapes clés, il faudra aussi analyser ces pressions et les quantifier, et trouver les moyens de prévenir l'échappement parasitaire.

La séquence complète du génome parasitaire ouvre des perspectives extrêmement riches pour comprendre la biologie des populations. La connaissance de la carte génétique du parasite et l'analyse systématique de mutations au sein des populations sauvages - rendue plus facile par les progrès des techniques de séquençage - a dévoilé une origine beaucoup plus ancienne qu'il était admis jusqu'à présent de *P. falciparum* (8).

La cartographie physique va permettre une analyse beaucoup plus fine et pertinente des populations parasitaires de terrain, des flux génétiques et des associations génétiques favorisant la survie parasitaire dans les diverses conditions de sélection sur le terrain. La cartographie des microsatellites de *P. falciparum* est disponible depuis quelques années (9). Cette stratégie a été utilisée pour rechercher les régions chromosomiques associées à la résistance à la chloroquine et a démontré sans ambiguïté que l'extension de la résistance

était due à l'invasion des populations parasitaires par un allèle de résistance (10). Des stratégies identiques peuvent être mises en place pour comprendre les échanges génétiques au sein des populations et identifier les facteurs qui favorisent les flux génétiques. Cette compréhension est la pierre angulaire sur laquelle se bâtiront des stratégies de lutte rationnelles.

### Etude de la pathologie palustre

La pathologie résulte de la rencontre entre le ou les parasites et la réponse de l'hôte. Dans ce domaine aussi, le champ de la recherche s'est considérablement élargi. Le déchiffrement du génome humain et la carte fine des microsatellites qui en résulte facilitent considérablement la tâche des généticiens, qui pourront plus rapidement mettre la main sur les gènes candidats de la susceptibilité génétique et identifier les variants en cause. Mais, comme pour la biologie parasitaire, le fin mot du problème n'est pas l'identification des variants, ce sera l'étude des conséquences fonctionnelles de ces variants sur les interactions avec le parasite.

Il est en de même pour l'analyse des réponses de l'hôte à l'infection. Le fait de pouvoir les étudier à une échelle encore inexplorée et d'étudier en parallèle de nombreux facteurs devrait mettre en évidence des profils de réponses particuliers à certaines formes cliniques, comme c'est le cas dans certains cancers. Une fois ces profils identifiés, encore faut-il trouver les voies d'intervention pour prévenir les conséquences pathologiques et faire basculer la balance en faveur de la protection. Nous avons des outils plus puissants pour travailler, mais ce sont les questions qui seront posées qui seront déterminantes pour que les réponses se traduisent par de nouvelles voies d'intervention.

---

### CONCLUSIONS

---

Les promesses de l'ère post-génomique tiennent souvent du chant des sirènes. C'est une dimension complètement nouvelle, mais les obstacles pour concrétiser la découverte d'une nouvelle voie métabolique, ou d'un talon d'Achille en une nouvelle intervention efficace sur le terrain demeurent tout autant qu'avant. Plusieurs étapes du cycle sont très difficiles à appréhender sur le plan expérimental. La modélisation animale ou *in vitro* demeure un défi considérable, dont nous pouvons maintenant mieux connaître les limites et les richesses, grâce aux avancées sur les génomes des *Plasmodium* murin et sur les génomes de la souris, du rat et de l'Homme. Toutes les compétences, depuis la génomique *in silico* jusqu'aux travaux de terrain, sont nécessaires pour tirer la substance la plus précieuse de cette masse de données et d'analyse systématique. Toutes les compétences sont nécessaires pour trouver les moyens pratiques et conceptuels pour mieux lutter et pour mieux évaluer les conséquences des interventions. Il faut que la lutte dispose de nouvelles armes, et que celles-ci soient réalistes et utilisables pour ceux qui en ont besoin et pour qui elles sont développées.

---

**REFERENCES**

---

- 1 - GARDNER MJ, HALL N, FUNG E *et Coll* - Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; **419** : 496-511.
  - 2 - FLORENS L, WASHBURN MP, RAINE JD *et Coll* - A proteomic view of the *Plasmodium falciparum* life cycle. *Nature* 2002; **419** : 520-525.
  - 3 - CARLTON JM, ANGIUOLI SV, SUH BB *et Coll* - Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature* 2002; **419** : 512-519.
  - 4 - JOMAA H, WIESNER J, SANDERBRAND S *et Coll* - Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 1999; **285** : 1573-1576.
  - 5 - LELL B, RUANGWEERAYUT R, WIESNER J *et Coll* - Fosmidomycin, a novel chemotherapeutic agent for malaria. *Anticancer Agents Chemotherapy* 2003; **47** : 735-738.
  - 6 - RATHOD PK, GANESAN K, HAYWARD RE *et Coll* - DNA microarrays for malaria. *Trends in Parasitology* 2002; **18** : 39-45.
  - 7 - VOLKMAN S, HARTL DL, WIRTH DF *et Coll* - Excess polymorphism in genes for membrane proteins in *Plasmodium falciparum*. *Science* 2002; **298** : 216-218.
  - 8 - MU J, DUAN J, MAKOVA KD *et Coll* - Chromosome-wide SNPs reveal an ancient origin for *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; **418** : 323-323.
  - 9 - SU XZ, FERDIG MT, HUANG Y *et Coll* - A genetic map and recombination parameters of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 1999; **286** : 1531-1533.
  - 10 - WOOTON JC, FENG X, FERDIG MT *et Coll* - Genetic diversity and chloroquine selective sweeps in *Plasmodium falciparum*. *Nature* 2002; **418** : 320-323.
-