

25

# INTERACTIONS CELLULAIRES

JOEL BOCKAERT

Président de la section

GABRIEL ROSELIN

Rapporteur

Bernadette Allinquant

Alain Anselmet

Philippe Ascher

Patrice Binder

Bertrand Bloch

Jean-Jacques Bourgarit

Jonathan Coles

Jean-Louis Cousin

André Dautigny

Michel Fougereau

Didier Fradelizi

Annick Guimezanes

Véronique Le Comte

Sylviane Levy Toledano

Raymond Miquelis

Jean-Pierre Regnault

Geneviève Rougon

Alain Trautmann

## AVANT-PROPOS

Chez les êtres unicellulaires, chaque cellule est capable d'assurer tous les processus biochimiques et physiologiques pour lesquels elle est génétiquement programmée. La seule occasion de coopération survient quand la nourriture devient rare et que la reproduction sexuée est nécessaire pour la formation des spores. Une vraie communication intercellulaire apparaît chez la levure où les facteurs de conjugaison, nécessaires à l'accouplement, fonctionnent comme des hormones. Il est intéressant de noter que ces facteurs de conjugaison utilisent des récepteurs couplés aux protéines G homologues de ceux des hormones et neurotransmetteurs des êtres multicellulaires.

Le développement des interactions cellulaires fut la condition de l'évolution des êtres multicellulaires.

Ce développement fut bien entendu nécessaire pour :

- assurer un contrôle harmonieux des divisions et des différenciations cellulaires, notamment au cours du développement embryonnaire ;

- faire fonctionner l'organisme dans son entier (mouvement, métabolisme, reproduction, comportements divers etc.) ;

- intégrer les informations sensorielles venant du monde extérieur, les comparer avec les connaissances mémorisées au sein de l'organisme afin de générer un comportement ou une adaptation.

Le problème majeur fut de générer des mécanismes suffisamment nombreux pour assurer la spécificité des innombrables interactions cellulaires nécessaires pour assurer ces fonctions.

Une avancée conceptuelle essentielle émerge des récents travaux d'identification et de clonage des molécules de la communication qui montrent que les molécules sont relativement peu nombreuses, eu égard au nombre de communications à établir. De plus, elles appartiennent à un petit nombre de familles de protéines. Pour ne citer qu'un seul exemple, ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (RCPG), très homologues entre eux, ayant évolué à partir d'un petit nombre de gènes ancestraux, qui assurent la réception de messages aussi différents que des photons, des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , des odeurs, des saveurs sucrées ou amères, de nombreuses hormones peptidiques, des neurotransmetteurs de nature chimique variées, des chimiokines, etc.

On vient de découvrir, ces derniers mois, que ce sont des récepteurs de ce type (récepteurs CCR5 des chimiokines de type fusine, Rantes MIP , MIP ) qui, en association avec le récepteur CD4, sont utilisés par le virus HIV pour pénétrer dans les cellules qu'il infecte, notamment les macrophages. On pourrait faire les mêmes observations pour la plupart des molécules de la communication cellulaire (protéines G, transporteurs, canaux ioniques, kinases, facteurs de transcription, ...).

La diversité des communications cellulaires est générée par l'association combinatoire des molécules de la communication et par leur "bricolage" durant l'évolution.

Deux conséquences découlent de ces remarques :

- Après avoir cloné et/ou isolé la majorité des molécules impliquées dans la communication cellulaire, mais surtout trouvé leurs fonctions, travail

qui est bien commencé mais qui demandera encore de nombreuses années d'effort, le défi majeur sera d'analyser les interactions entre toutes ces molécules et l'intégration de leurs fonctions au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme.

- Puisque les patrons de base des communications cellulaires sont identiques dans le système nerveux, le système endocrinien, le système immunitaire, la recherche sur les interactions cellulaires a sa propre identité et doit être évaluée par une commission dont c'est la préoccupation essentielle.

## **1 - QUELQUES EXEMPLES RÉCENTS DE FERTILISATION CROISÉE ENTRE LES DISCIPLINES CLASSIQUES, (ENDOCRINOLOGIE, NEUROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE) QUI ONT PERMIS DE RÉSOUTRE DES PROBLÈMES DE LA COMMUNICATION CELLULAIRE**

La rencontre, depuis de nombreuses années, des chercheurs travaillant sur les problèmes de communication cellulaire en endocrinologie, neurobiologie, immunologie au sein de la commission 25 permet en permanence de comparer les avancées de chacun et de transposer plus rapidement les concepts d'une discipline à l'autre. Cette interdisciplinarité, initiée par le CNRS il y a maintenant de nombreuses années, est habituelle dans de nombreux colloques internationaux qui réunissent les spécialistes de la communication cellulaire quel que soit leur système d'étude (conférences Gordon, Cold Spring Harbor, conférences Jacques Monod, conférences EMBO, NATO advanced study summer school etc.).

Il y a une quinzaine d'années, au sein de la commission 25, les préoccupations des endocrinologistes et des neurobiologistes ne se situaient pas au même niveau que les préoccupations des immunologistes. Ceux-ci étaient beaucoup plus en avance que leurs collègues sur le clonage et la caractérisation des récepteurs de surface notam-

ment ceux des lymphocytes B. En revanche, ils étaient très en retrait sur tout ce qui concernait les événements intracellulaires suivant l'activation des récepteurs membranaires (cascades de transduction). Les avancées conceptuelles et techniques des endocrinologues et neurobiologistes sur les seconds messagers, les mouvements du  $\text{Ca}^{2+}$ , les kinases etc. ont certainement contribué à accélérer les progrès des immunologistes dans l'analyse des transductions intracellulaires.

Un autre exemple de fertilisation croisée entre les disciplines concerne l'analyse moléculaire des phénomènes d'apoptose (mort cellulaire programmée) reconnus comme essentiels : lors des effets cytotoxiques des lymphocytes T ou des drogues anticancéreuses, au cours du développement du système nerveux et immunitaire, au cours des phénomènes neurodégénératifs etc.

Ce sont les endocrinologues Kerr, Wyllie, et Currie qui ont proposé ce nom d'apoptose pour décrire la mort des cellules de la cortico-surréale après réduction de l'effet trophique exercé par l'ACTH, une hormone hypophysaire. L'apoptose des lymphocytes T induite par les glucocorticoïdes, a ensuite intéressé les immunologistes. La balle est revenue dans le camp des neurobiologistes du développement. La découverte chez le ver *Caenorhabditis elegans* des gènes induisant la mort génétiquement programmée, ced3 et ced4, puis des gènes comme ced9 s'opposant à ce programme ont ouvert la voie de la biologie moléculaire de l'apoptose chez les vertébrés ou les gènes correspondants ont été clonés (bcl2 est l'homologue de ced9 et la cystéine protéase ICE (interleukine converting enzyme) l'homologue de ced3). Les immunologistes ont maintenant repris le flambeau en montrant récemment que les récepteurs du ligand Fas, localisés sur la membrane des lymphocytes T cytotoxiques et le TNF, tuent leur cible par apoptose en se liant à des récepteurs qui, via des séquences dites "death domains" recrutent une série de protéines adaptatrices, dont des cystéines protéases de type ICE. Ces protéases se retrouvent donc être au centre de la transduction apoptotique. Des inhibiteurs des cystéines protéases inhibent aussi bien l'apoptose induite par Fas, le TNF ou l'absence de facteurs neurotrophiques, que celle induite par

l'anti-oncogène p53. L'apoptose n'a pas de frontière disciplinaire.

Un troisième et dernier exemple concerne la récente découverte du récepteur défectueux des chimiokines, CCR5, qui protège contre l'infection HIV. L'équipe européenne ayant contribué à cette découverte qui date de l'été 1996 est celle de G. Vassart et M. Parmentier, une équipe d'endocrinologues. Cette équipe avait cloné un récepteur couplé aux protéines G orphelin (un récepteur orphelin est un récepteur dont on ne connaît pas le ligand) qui s'est avéré être le récepteur CCR5 qui, en coopération avec le récepteur CD4, permet l'entrée du virus HIV dit "M-tropique" dans les macrophages. Cette équipe a pu rapidement montrer que 16 % des Européens (les Caucasiens) présentent une mutation de ce récepteur à l'état hétérozygote et 1 % à l'état homozygote. Les homozygotes ont une résistance importante sinon complète au HIV ; les hétérozygotes sont plus résistants que les individus ne présentant pas de mutation de ce récepteur. De l'endocrinologie à l'immunologie il n'y avait qu'un pas...

## **2 - LA DÉCOUVERTE DES MESSAGES DE LA COMMUNICATION CELLULAIRE ET DE LEURS RÉCEPTEURS SE POURSUIT**

Bien que plusieurs centaines de molécules solubles de communication intercellulaire aient été découvertes depuis le début du siècle, (dont la majorité ces deux dernières décennies), on en découvre encore chaque année plusieurs dizaines dont certaines ont un rôle physiologique primordial. Nous en citerons quelques-unes pour illustrer leur diversité chimique et fonctionnelle. Le monoxyde d'azote (NO), mis en évidence par R.F. Furchtgott, en 1980, comme un facteur libéré par l'endothélium vasculaire sous l'action de neurotransmetteurs et ayant une action vasodilatatrice, a été identifié comme étant NO par S. Moncada, en 1987 (ils viennent d'obtenir le prix Lasker 96). Cette molécule de communication cellulaire, certainement la plus simple de la création (dixit P. Potier), a des propriétés particulières du fait qu'elle passe librement les membranes biologiques. C'est donc

un messager idéal pour affecter l'ensemble des cellules de l'environnement dans lequel il est produit. Ses rôles physiologiques sont variés : régulation de la pression artérielle, contractilité des sphincters, érection, effets cytotoxiques des macrophages vis-à-vis des bactéries et des cellules tumorales, plasticité synaptique etc. Il est intéressant de noter que l'action thérapeutique de NO (administré sous forme de donneurs de NO comme la trinitroglycérine pour traiter l'angine de poitrine) était connue depuis un siècle. La thérapeutique précède souvent la connaissance des mécanismes moléculaires !

Dans un autre registre, citons la découverte très récente de l'anandamide (qui signifie "bonheur supérieur"), un lipide du cerveau, ligand endogène de récepteurs aussi stimulés par le cannabis. Des analogues de l'anandamide ont aussi été trouvés dans le chocolat, pouvant, peut-être, expliquer la consommation excessive de cette gourmandise dans certaines névroses !

En endocrinologie, la découverte de la leptine, un peptide sécrété par les adipocytes et agissant sur la prise alimentaire via des récepteurs de l'hypothalamus, a réactivé les travaux sur l'obésité et notamment sur les composantes héréditaires de cette pathologie. En neurobiologie du développement, on a montré que de nombreux signaux extracellulaires règlent la capacité des cellules à se diviser, migrer ou encore se différencier en un type cellulaire donné. La plupart de ces signaux sont dit "instructifs". Parmi les signaux instructifs, citons des protéines solubles de type wint et hedgehog. Tout récemment, les récepteurs pour ces facteurs viennent d'être caractérisés Dfz2, pour wint, et smoothened (smo) pour hedgehog. Ils font partie de la famille des RCPG. Un second type de signal, appelé "inhibition latérale" a été décrit. Contrairement aux premiers qui confèrent une identité cellulaire particulière, ces derniers stabilisent une différence de destinée au sein d'une population de cellules équivalentes. Parmi les facteurs responsables de l'inhibition latérale, le prototype d'étude est notch et son ligand delta. Lorsque notch ou delta sont inactivés, les cellules du neuro-ectoderme deviennent des neuroblastes. Notch est un récepteur complexe qui comprend chez la Drosophile, comme chez la souris, 36 répétitions de type EGF, 3 répétitions de type notch dans la partie extracellulaire et 6 répéti-

tions de type ankyrine dans la partie intracellulaire. Dans notre section, une médaille de bronze a été attribuée à François Schweiguth pour ses travaux sur les voies de signalisation de notch.

Nous avons déjà cité la découverte des chimiokines agissant sur des récepteurs couplés à des protéines G, utilisés par les virus HIV pour pénétrer dans les cellules hôtes. Une de ces chimiokines, agissant sur les récepteurs appelés "fusine" (car ils participent à la fusion du virus HIV avec la membrane des lymphocytes T) vient d'être découverte en septembre de cette année. Il s'agit de SDF-1 (stromal cell-derived factor 1).

Enfin, nous pouvons citer la nociceptine, un peptide isolé du cerveau par une équipe de Toulouse en collaboration avec une équipe belge. Elle aurait des effets inverses de ceux de la morphine, donc nociceptifs.

On le voit, les chercheurs chasseurs de molécules de la communication cellulaire et de leurs récepteurs, qui ont constitué un tableau de chasse impressionnant ces vingt dernières années, ont encore de beaux jours à passer dans nos laboratoires.

### **3 - L'ADHÉSION CELLULAIRE EST PLUS QU'UN CONTACT**

Quels sont les mécanismes moléculaires qui font qu'une cellule reste à une place donnée, ou se détache pour migrer ? Et lorsqu'elle migre, quelles sont les molécules qui déterminent son trajet et quand elle doit s'arrêter ? Ces questions sont importantes au cours du développement, en particulier du système nerveux, mais aussi lorsque l'on considère des processus physiologiques et pathologiques tels le trafic lymphocytaire, la cicatrisation, l'hémostase, l'inflammation ou la formation de métastases. Tous ces processus mettent en jeu des associations entre cellules ou entre cellule et matrice extracellulaire, plus ou moins durables dans le temps mais toujours spécifiques. Les bases moléculaires de l'adhérence cellulaire sous-tendant ces processus ont été élucidées ces dernières années. L'adhérence est assurée par des glycoprotéines membranaires,

généralement multi-modulaires, appelées CAM (cell adhesion molecules), dépendantes ou non du calcium. Sur la base de leur structure primaire, on peut les classer en quatre grandes familles : les molécules de la super-famille des immunoglobulines, les cadhérines, les intégrines et les sélectines. Une molécule donnée peut intervenir dans des processus physiologiques différents. Les données obtenues dans un modèle sont souvent transposables dans un autre modèle. Dans ce domaine également, une fertilisation croisée entre les disciplines (immunologie, développement, neurobiologie) s'est avérée fructueuse. La plupart des événements adhésifs mettent en jeu des molécules de diverses familles. La spécificité ne semble pas résulter de la sélectivité des molécules individuelles, mais d'une combinatoire entre diverses molécules d'adhérence d'une part, et d'une coopération avec d'autres récepteurs de membrane d'autre part. La nature de "l'activation" de ces molécules membranaires n'est toujours pas parfaitement comprise. Il est probable qu'après leur interaction avec leur ligand, les molécules s'organisent de façon dynamique, via des interactions en *cis* (sur la même membrane) avec d'autres récepteurs pour former des complexes macromoléculaires fonctionnels.

L'activation de ces molécules entraîne également des conséquences intracellulaires, qui incluent des réorganisations du cytosquelette mais aussi divers événements de signalisation pouvant résulter en l'expression de gènes. De ce fait, les disciplines de l'adhésion cellulaire et de la traduction de signaux sont en train de converger. À titre d'exemple, on peut considérer les intégrines et les cadhérines. Pour les intégrines, l'occupation du site de liaison par un ligand va entraîner l'agrégation à la membrane et la formation de points focaux. Dans ces points focaux, les parties intracytoplasmiques des intégrines, qui ne présentent pas d'activité enzymatique, se lient à des protéines sous-membranaires ( $\beta$ -actinine, vinculine, taline, tensine) qui constituent le point de nucléation de gros complexes protéiques contenant à la fois des éléments du cytosquelette (filaments d'actine) et des protéines à activité catalytique. En effet, la phosphorylation de tyrosines peut être considérée comme un des événements précoce qui suivent l'activation des intégrines ; la tyrosine-kinase FAK (focal adhesion kinase) semble jouer un rôle cen-

tral. FAK peut à son tour se lier à des protéines qui contiennent des domaines SH2 (famille des src kinases par exemple, mais aussi ras-MAP kinases) et à travers ces liaisons, FAK est capable d'intégrer les multiples signaux qui découlent de l'activation d'une intégrine. Il faut aussi considérer le fait que la voie de signalisation des intégrines opère en synergie avec d'autres voies de signalisation, comme celles des récepteurs à activité tyrosine-kinase, des cytokines, des récepteurs couplés aux protéines G.

Ces mécanismes ne semblent pas propres aux intégrines, comme le prouvent les données très récentes obtenues sur les cadhérines. Le domaine extracellulaire des cadhérines assure une liaison de type homophilique entre cellules, tandis que leurs domaines intracellulaires organisent des complexes macromoléculaires contenant les  $\alpha$ - et  $\beta$ -caténines (armadillo, chez la Drosophile). L' $\alpha$ -caténine se lie à l'actine via des molécules comme la fascine. En plus de ce rôle dans le contrôle de l'adhérence, assurée par les cadhérines, les caténines participent aux voies de signalisation. Par exemple, ces protéines multi-modulaires, s'associent directement avec des récepteurs tyrosine-kinases et traduisent les signaux qui suivent l'activation des récepteurs de wnt impliqués dans le choix de la destinée cellulaire durant le développement. À la suite d'un signal wnt, armadillo est retrouvé dans le noyau comme une preuve de son potentiel à contrôler l'expression de gènes comme engrailed. La  $\beta$ -caténine se complexe aussi avec le suppresseur de tumeurs APC (adenoma polyposis coli) qui régule la prolifération cellulaire. On peut envisager l'hypothèse selon laquelle des protéines relais comme les  $\beta$ -caténines, ou la FAK-kinase, peuvent intervenir dans différents processus apparemment indépendants, tels la motilité, ou à l'inverse l'adhérence, mais aussi la détermination de l'identité cellulaire ou la division cellulaire. Quoiqu'il en soit, il n'y a aucun doute que les molécules d'adhérence sont des molécules pivot dans les échanges d'information entre la membrane et le noyau. Elles ne constituent pas une simple colle entre cellules, mais participent activement à l'organisation de cellules en tissus et à la fonction des différents organes.

## 4 - SIGNAUX CONVERGENTS ET LEUR INTÉGRATION

Dans le système nerveux central, la plasticité synaptique est une réponse adaptative des neurones à des signaux externes et souvent à la convergence de deux signaux séparés. Cette intégration de stimuli séparés dans une fenêtre temporelle généralement courte est aussi appelée détection coïncidente. Elle est souvent critiquée pour l'acquisition des informations. La convergence des signaux analysée à plusieurs niveaux et notamment cellulaire est relativement classique.

Cependant, récemment, de nombreuses molécules ont été décrites comme ayant la propriété d'intégrer au moins deux signaux convergents et d'y répondre par un comportement parfois imprévisible par rapport au comportement qu'elles ont en réponse à chacun des deux stimuli appliqué individuellement.

Un exemple bien connu de convergence de signaux au niveau cellulaire est celui de la sécrétion de l'interleukine 2 par les lymphocytes T. Cette sécrétion est induite par deux signaux convergents portés par les cellules présentatrices des antigènes, le complexe majeur d'histocompatibilité ayant fixé l'antigène et une autre molécule de surface (B7/BB1) se fixant respectivement sur le récepteur T et le récepteur CD28 des lymphocytes T. Si un seul signal est présent sur la cellule présentatrice, il n'y a pas de sécrétion d'interleukine.

Un exemple remarquable de convergence de deux signaux au niveau moléculaire peut être illustré par le récepteur NMDA. Ce récepteur du glutamate, neurotransmetteur majeur (souvent mais pas toujours excitateur) du système nerveux central, est un élément clé de la plasticité neuronale au cours du développement, de l'apprentissage et de l'établissement des processus mnésiques. Ce récepteur n'est actif que si deux événements l'affectent : une simulation par du glutamate libéré par la pré-synapse, et une dépolarisation de la post-synapse dans laquelle il se trouve localisé. Sans ces deux événements, il n'y a pas d'activation du récepteur et donc pas de plasticité synaptique.

Un autre exemple particulièrement intéressant concerne l'adénylyl cyclase de type II. Cette enzyme est une des enzymes qui synthétise l'AMP cyclique, un des messagers intracellulaires les plus importants. Elle est activée par des récepteurs de neuromédiateurs qui activent des protéines G de type Gs (par exemple la noradrénaline), elle est inhibée par d'autres neuromédiateurs qui activent des protéines G de type Gi (par exemple le GABA). La stimulation coïncidente de l'adénylyl cyclase de type II par ces deux types de signaux produit une stimulation qui n'est pas la résultante algébrique d'une stimulation et d'une inhibition, mais une stimulation bien supérieure à celle obtenue par la seule activation des récepteurs stimulateurs. Sur un plan physiologique, ce type de convergence au niveau de l'adénylyl cyclase II contrôle la fréquence des potentiels d'action des neurones de l'hippocampe.

On pourrait citer beaucoup d'autres exemples de molécules dites coïncidentes : le récepteur des inositol trisphosphates qui libère le  $\text{Ca}^{2+}$  des réserves intracellulaires sous l'influence convergente des inositol trisphosphates et du  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même, l'adénylyl cyclase de type I qui est activée par deux signaux, Gs et le  $\text{Ca}^{2+}$ , la phospholipase A2 qui est activée par deux récepteurs du glutamate de type AMPA et métabotropique mais pas par un seul etc.

Bien entendu, cette intégration de deux signaux au niveau moléculaire n'est qu'un maillon dans l'intégration des milliers de signaux que reçoit en permanence un neurone et qui conditionne son comportement : produire ou pas un potentiel d'action.

## 5 - ANISOTROPIE DES COMMUNICATIONS CELLULAIRES

La distribution spatiale des récepteurs de la membrane plasmique n'est pas homogène. Dans le cas des cellules épithéliales, on commence à comprendre les mécanismes qui déterminent la localisation des protéines membranaires sur la face apicale ou la face basale ; dans le cas des cellules musculaires squelettiques, des progrès importants ont été faits sur les processus qui aboutissent à la

différenciation des zones sous-synaptiques où se concentrent les récepteurs à l'acétylcholine et les protéines qui leur sont associées. Dans le système nerveux, les mêmes problèmes d'adressage différentiel et d'ancre local se posent à beaucoup plus grande échelle. Des progrès considérables ont été faits ces dernières années pour caractériser les processus qui font que le neurone envoie des molécules différentes vers les terminaisons axonales et vers les dendrites, mais il est devenu clair qu'au-delà de cette division, il existe des répartitions différentes de récepteurs d'un dendrite à l'autre, et que le long d'un même dendrite on peut trouver des récepteurs aux caractéristiques cinétiques et pharmacologiques différentes. Les mécanismes des adressages différentiels qu'implique cette diversité restent à établir, comme il reste à comprendre comment les processus de plasticité synaptique arrivent à modifier sélectivement une épine synaptique parmi des centaines, souvent à grande distance du corps cellulaire. Il s'agit d'un problème qui intéresse tous les domaines mais qui est particulièrement important en neurobiologie.

## 6 - DYNAMIQUE DES RÉSEAUX

Si l'étude de la structure des réseaux neuronaux peut ne pas être considérée comme un objectif central de la section 25, celle-ci se sent directement concernée par les processus qui peuvent moduler l'organisation de ces réseaux et en particulier les processus de plasticité. Au cours des dix dernières années, l'analyse de deux processus de plasticité neuronale – les phénomènes de LTP (long-term potentiation) et de LTD (long-term depression) – ont occupé un nombre croissant de neurobiologistes. Il s'agit de variations d'efficacité synaptique observables au niveau d'une synapse individuelle (entre deux neurones identifiés) dont la très longue durée a suggéré qu'ils pourraient sous-tendre les processus de mémorisation et d'apprentissage. Même si cette conclusion peut être contestée, il est indubitable que la convergence des efforts de plusieurs dizaines de laboratoires sur l'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires des deux processus de LTP et LTD a engendré une extraordinaire moisson de données et fait avancer aussi bien l'analyse de la libération des transmet-

teurs que l'analyse des mécanismes d'action des neurotransmetteurs, qu'il s'agisse des phénomènes membranaires, de la production de seconds messagers ou des effets exercés au niveau du noyau. Et si les prédictions naïves qui envisageaient la résolution de ces problèmes bien avant l'an 2000 ne sont plus aujourd'hui prises au sérieux, plusieurs points paraissent désormais acquis : il existe plus d'un mécanisme conduisant à chacun des deux effets (LTP et LTD) ; des modifications de longue durée peuvent se produire des deux côtés d'une synapse, et ces modifications impliquent à la fois des signaux antérogrades et rétrogrades. L'identification de ces signaux modulateurs sera sans doute une des grandes tâches des années à venir.

Dans le système immunitaire, le problème des bases génétiques de la diversité des récepteurs B et T, connu généralement sous le vocable de "répertoire", peut être considéré comme pratiquement élucidé. Les mécanismes enzymatiques des rearrangements géniques ont beaucoup progressé récemment, bien que les mécanismes enzymatiques qui contrôlent la commutation et les mutations somatiques dans le système B soient encore peu avancés. La structure tridimensionnelle du complexe ternaire TCR-CMH-Peptide reste encore à établir. L'approche globale de l'homéostasie du système immunitaire reste par contre un problème majeur. L'organisation en réseau des interactions moléculaires (immunoglobulines et TCR) a été proposée par Jerne en 1974, sur la base des interactions idiotypiques du système des anticorps. De nombreux travaux ont été consacrés à ce sujet, y compris diverses tentatives de modélisations mathématiques, dont aucune n'a réussi à déterminer une quelconque valeur prédictive sur les états de perturbation apportés par l'administration de l'antigène, le maintien d'un état d'immunisation intégrant le phénomène de mémoire tout en assurant le retour à l'équilibre du système. Il est clair que le système immunitaire représente un équilibre dynamique en perpétuel remaniement, lié à l'apport quasi continué tout au long de la vie de nouveaux lymphocytes qui doivent se confronter en permanence à l'environnement. Les principaux réseaux de communication doivent intégrer un dialogue entre les différentes molécules du système immunitaire elles-mêmes, dont une large

partie se déroule sous la contrainte sélective de l'environnement immédiat. À côté du réseau idiotypique, dont la vogue s'est largement refroidie (ce qui ne veut pas dire qu'il soit inexistant), l'existence de cellules spécialisées dans la fixation des immunoglobulines par leur fragment Fc entraîne un second réseau de régulation qui amplifie les fonctions effectrices des anticorps. Un réseau du "troisième type", et qui pourrait bien apparaître comme déterminant dans l'homéostasie du système est le réseau des cytokines, qui est bien illustré par l'existence de sous-populations de cellules T auxiliaires (TH0, TH1, TH2...), permettant d'orienter les réponses vers des manifestations biologiques très différentes. À ce titre, l'immunologie est, à l'instar de toute la biologie, partagée entre la nécessité de l'approche réductionniste et le désir d'une compréhension globale. Source évidente de frustration pour qui voudrait tout comprendre... "Il n'y a pas de réductionniste heureux" (J.-D. Vincent, La chair et le Diable).

## **7- CASCADES INTRACELLULAIRES DE SIGNALISATION ET ASSEMBLAGES MOLÉCULAIRES**

Dans la dernière décennie, une meilleure compréhension des voies de signalisation intracellulaires a découlé de la mise en évidence de plusieurs structures élémentaires (domaines dits PH, SH2, SH3) permettant à différentes protéines de se lier temporairement les unes aux autres pour constituer des cascades de signalisation.

Ces domaines d'adhésion protéique fonctionnant comme du "velcro moléculaire" peuvent permettre le rapprochement de deux partenaires (notamment un enzyme et son substrat), mais aussi induire des changements de conformation et d'activité d'enzyme. Comme la simple phosphorylation d'une tyrosine peut déclencher une énorme augmentation d'affinité pour un domaine SH2, la dynamique de ces interactions est sous le contrôle de familles de tyrosine kinases et phosphatases. L'importance de ces phénomènes est considérable, mais certains chercheurs sont guettés par le "syndrome du Meccano",

qui les amène à privilégier le répertoire foisonnant des interactions protéiques possibles, et à négliger de démontrer l'existence et la pertinence physiologiques de telles interactions.

Or, cette démonstration est indispensable : ces domaines adhésifs sont si nombreux que l'on pourrait s'attendre à ce que tout se colle à n'importe quoi. Les mécanismes mis en jeu pour permettre les spécificités nécessaires dépendent des affinités de ces interactions (qu'il faut pouvoir mesurer, voir plus loin), d'éventuelles compartmentalisations subcellulaires (par ex. dans des domaines sous-membranaires, ou associés au cytosquelette), et coïncidences temporelles.

Il n'en demeure pas moins que certaines cascades de signalisation sont maintenant bien caractérisées. C'est le cas en particulier de la cascade des MAP kinases, qui permet à des messagers extracellulaires (comme des facteurs de croissance) de déclencher la transcription de certains gènes, après avoir mis en jeu des petites protéines G et pas moins de 5 kinases. Cette voie des MAP kinase est un exemple de cascade ayant une fonction d'intégrateur de signaux. Ce principe d'intégration, ou de convergence, peut servir à détecter des coïncidences dans les messages extracellulaires.

Soulignons à nouveau que le caractère ubiquitaire de ces cascades de signalisation, présentes aussi bien dans les cellules nerveuses que celles du système immunitaire, justifie que soient favorisés les échanges entre neurobiologistes et immunologistes. Ceci n'amène en rien à nier les spécificités de ces domaines : la calcineurine, une phosphatase activée par la  $\text{Ca}^{2+}$  - calmoduline, joue un rôle dans la croissance neuritique, et constitue par ailleurs un point de contrôle essentiel de la réponse des lymphocytes T, ainsi qu'en témoigne l'effet immuno-supresseur puissant de son antagoniste, la cyclosporine.

## 8 - STRUCTURES DES PROTÉINES MEMBRANAIRES : UNE PRIORITÉ ?

Les chercheurs s'intéressant aux molécules des communications cellulaires sont tous préoccupés par le problème de la structure de ces molécules afin de comprendre comment leurs activités sont modifiées sous l'influence d'un message intercellulaire ou intracellulaire. Cet intérêt est à la fois fondamental et appliqué. En effet, la détermination des règles définissant les interactions des protéines avec des petites molécules ou d'autres protéines est essentiellement empirique. En conséquence, la plupart des médicaments et agents régulateurs de ces protéines sont encore découverts à partir de techniques de screening.

Si la détermination de la structure des protéines solubles par RMN (limitée à des masses moléculaires inférieures à 20 kD) ou, après cristallisation, par diffraction des RX reste encore difficile, le progrès des méthodes d'obtention des cristaux, la montée vers des RMN de très hauts champs (700-800 MHz) associée au marquage isotopique (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C, <sup>2</sup>H) accélère le travail. On peut même maintenant étudier la structure de complexes moléculaires co-cristallisés. Parmi les résultats spectaculaires, citons la structure, avec une résolution de 2Å, du complexe hétérotrimérique des protéines G ( $\alpha\beta\gamma$ ). Ces protéines assurent le premier relais intracellulaire de la signalisation des récepteurs à sept domaines transmembranaires (qui sont codés par quelques milliers de gènes, 0.1 % du génome). Ces protéines sont associées à la membrane par des lipides. La cristallisation a été réalisée sans ces lipides, donc avec des protéines solubles. Notons que beaucoup de molécules qui intéressent notre domaine sont des protéines intrinsèques à la membrane (récepteurs, canaux, pompes etc.). Pour ces protéines, un effort technologique, non encore pris en compte en France, doit être réalisé. En effet, la production en masse et la cristallisation de ces protéines posent des problèmes considérables. Pour le moment, seules des protéines des membranes bactériennes (bactiorhodopsine, porine etc.) ou des membranes des mitochondries (une théorie rapproche d'ailleurs ces entités cellulaires) comme la cytochrome C oxidase ont été cristallisées. Les raisons de l'absence de cristaux pour des

protéines d'intérêt majeur comme des récepteurs ne sont pas claires : absence de concertation entre les biologistes et les cristallographes ? obstacle théorique ? Quoiqu'il en soit, nous n'avons à notre disposition que des images de ces protéines obtenues à partir de cristaux 2D (résolution de 9Å), ce qui limite beaucoup les interprétations. On a aussi quelques cristaux de domaines fonctionnels de ces protéines lorsqu'ils peuvent être obtenus sous une forme soluble, par exemple le domaine externe des complexes HLA.

Il serait opportun de débattre, entre biologistes et physico-chimistes, des raisons de cet échec et d'essayer de les surpasser. Des étudiants bien formés en biologie et en structure des protéines devraient être la clé de la résolution de ce problème.

En attendant, beaucoup de travaux fort intéressants sont réalisés par les biologistes en utilisant la mutagenèse dirigée. Ils font considérablement avancer nos connaissances des relations structure-fonction, bien que les interprétations des résultats obtenus ne soient jamais univoques.

## 9 - INTERACTIONS CELLULAIRES : LE CARREFOUR DES TECHNOLOGIES

Le nombre de technologies développées ces dernières années est particulièrement impressionnant. Ces technologies ne sont pas toutes spécifiques à notre discipline, mais sont largement utilisées dans nos domaines d'investigations.

### 9. 1 Des souris pour des hommes

Nous avons dit que l'intégration des fonctions des molécules de la communication au niveau cellulaire et de l'organisme est le défi majeur des prochaines années. Un des moyens d'évaluer, sinon de comprendre, le rôle de telle ou telle molécule dans une fonction complexe au niveau d'un organe ou d'un organisme est d'utiliser des souris transgéniques.

Plusieurs générations de souris transgéniques ont déjà été produites. Les premières

exprimaient au niveau de l'ensemble des cellules un gène donné. On comprendra les limitations d'une telle approche si l'on rappelle que la plupart des gènes ne sont exprimés que dans quelques types cellulaires. On préfère donc actuellement cibler l'expression d'un gène dans un type cellulaire donné. Ce ciblage est généralement réalisé en utilisant des promoteurs spécifiques d'un organe ou d'une cellule. Pour donner un seul exemple, si l'on injecte dans un ovocyte de souris un gène sous le contrôle du promoteur de l'hormone de croissance (GH), seules les cellules produisant cette hormone (les cellules somatotropes de l'hypophyse) exprimeront ce gène. On peut aussi utiliser ce promoteur pour inactiver un gène de ces cellules en mettant un construction antisens de ce gène sous le contrôle de ce promoteur. On peut tuer spécifiquement ces cellules somatotropes, au moment du développement désiré. Pour cela, on fait exprimer le gène de la thymidine kinase sous le contrôle du promoteur GH dans ces cellules (il ne sera pas exprimé dans les autres cellules de l'organisme). On injecte ensuite un anti-herpétique (comme le ganciclovir) au moment voulu, induisant la mort des cellules exprimant la thymidine kinase. Malheureusement, on n'a qu'un petit nombre de promoteurs spécifiques d'un tissu ou d'une cellule.

Une technique récente (Capecchi, 1987), actuellement populaire, consiste à produire des souris dans lesquelles un gène a été invalidé par recombinaison homologue dans des cellules embryonnaires ("stem cells") qu'on réimplante dans des blastocystes. Des souris chimères sont obtenues portant la mutation de façon aléatoire dans certaines de leurs cellules. Si la mutation passe dans la lignée germinale, on peut obtenir par génétique classique des souris homozygotes pour la mutation (souris "knock-out"). Des centaines de souris de ce type ont été produites durant les cinq dernières années. La technique est lourde et coûteuse, mais elle est devenue indispensable pour comprendre les fonctions de nombreuses molécules de la communication au niveau de l'organisme. Elle a permis de démontrer le rôle des récepteurs 5-HT<sub>1C</sub> dans la prise de nourriture sans ces souris, ou le rôle de la protéine CREB (un facteur de transcription dépendant de l'AMP cyclique) dans les phénomènes d'abstinence à la morphine. De même, l'invalidation

de gènes que l'on croyait indispensables à la survie de l'organisme s'est révélée peu traumatisante (invalidation du proto-oncogène ras pourtant très important pour le contrôle de la division cellulaire, ou de l'anti-oncogène p53), révélant la redondance des systèmes de contrôle d'une fonction. Les animaux "knock-out" se sont aussi révélés de bons modèles animaux de maladies génétiques humaines : souris invalidées pour le gène CFTR impliqué dans la mucoviscidose, souris mutée pour le gène des récepteurs D2 ayant des défauts du comportement moteur (Parkinson), souris mutées pour le gène BTK responsable de la gammaglobulinémie liée au chromosome X chez l'homme (maladie de Burton) etc. Bien sûr, les pathologies de l'animal ne reproduisent qu'imparfaitement les pathologies humaines ; bien sûr, on aimerait pouvoir invalider le gène au moment du développement désiré, notamment chez l'animal adulte ("knock-out" conditionnel) et non plus au moment des premières divisions. Les techniques adaptées à ces objectifs sont en train d'être développées. Une technique permettant d'inactiver le gène désiré au moment désiré, sous le contrôle d'une drogue comme la tétracycline, est déjà utilisée. On pourra certainement, avec le système Cre-loxP, inactiver le gène sélectionné au moment désiré et dans la cellule désirée.

Ce qui limite les travaux actuels n'est pas un obstacle théorique, mais le financement de ces recherches, notamment en France. Seuls quelques laboratoires (probablement une dizaine) sont capables (financement, animaleries, chercheurs formés) de produire ces souris. Certains travaillent en artisan avec des animaleries à la limite de ce qu'il est raisonnable d'utiliser. Le retard sur la production de souris "knock-out" de première génération est considérable, le retard sur les souris "knock-out" conditionnelles sera encore plus grand au moment où, chaque semaine, 20 % des articles publiés dans la revue Nature font état de l'utilisation de ce type d'animaux. À notre connaissance, aucune commission nationale inter-organisme n'a sérieusement réfléchi à cette question.

## 9. 2 Nouveaux développements en biologie moléculaire

Actuellement, les outils de biologie moléculaire font partie intégrante de l'arsenal méthodologique d'un laboratoire de biologie qui s'intéresse aux interactions cellulaires. Depuis une dizaine d'années, des progrès significatifs ont été réalisés tant au niveau de la qualité (enzymes de coupure ou de modification clonées assurant une meilleure reproductibilité des résultats) qu'au niveau des possibilités (vecteurs de clonage et d'expression dans les cellules procaryotes et eucaryotes), permettant au chercheur de disposer d'un large éventail d'outils qui lui permettent de répondre à des problèmes biologiques particuliers avec une plus grande efficacité. La recherche de partenaire d'interaction par la technique du double hybride est un exemple de synthèse des connaissances issues de la biologie moléculaire de la levure et de la vectorologie. Il ne faut pas oublier les outils informatiques dont dispose le chercheur, en particulier les banques de séquence d'acides nucléiques (EMBL, GENE BANK, SWISS PROT) et plus récemment les banques d'EST correspondant à des séquences partielles d'ARN messagers d'un tissu donné, permettant d'identifier, à partir de très peu d'éléments, par exemple quelques acides aminés identifiés par microséquençage d'une bande de gel (en spectrométrie de masse par exemple), la protéine recherchée.

Une des limitations de ces techniques concerne l'étude des interactions dues aux glycoconjugués où, jusqu'à présent, seules les techniques classiques de biochimie et d'immunocytochimie restent encore performantes ; l'outil magique (l'équivalent de la PCR des acides nucléiques) permettant de caractériser la structure des chaînes glycosylées n'a pas encore été trouvé.

## 9. 3 Approches méthodologiques nouvelles

La biologie moléculaire (voir plus loin) fournit un ensemble d'outils performants pour caractériser des molécules, ou des fragments de molécules impliqués dans une interaction moléculaire, parfois une fonction. On peut en obtenir une classification extrêmement précise de molécules-clés et de leurs

composantes en acides aminés, mais sans réelle dimension temporelle. Pour comprendre le fonctionnement de ces molécules, il importe de compléter cette systématique par des approches donnant accès à une composante dynamique. À cette fin, la collaboration de biologistes et de physiciens ou de chimistes a permis la mise au point de méthodes de mesures optiques (sondes fluorescentes, pinces optiques) ou électriques (patch-clamp, électrochimie cellulaire).

- Les sondes calciques fluorescentes constituent un outil unique pour suivre l'évolution temporelle d'un messager intracellulaire (aucun autre messager que le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est encore ainsi mesuré couramment dans une cellule vivante). Les méthodologies les plus puissantes pour suivre cette fluorescence sont la cytométrie de flux, qui permet en outre le tri cellulaire, et l'imagerie de fluorescence – confocale ou non – qui permet une résolution au niveau subcellulaire. Dans la famille des sondes calciques, l'aequorine est une sonde non pas fluorescente, mais chimiluminescente. Tirant parti du fait que c'est une protéine, des chercheurs l'utilisent, après l'avoir ciblée vers un organite intracellulaire, pour la détermination du calcium ionisé dans cet organite (la mitochondrie par exemple).

- Une autre protéine fluorescente, la GFP (green fluorescent protein), est un outil de choix comme alternative à la  $\beta$ -galactosidase pour servir de marqueur d'activation d'un gène. L'avantage spécifique de la GFP est qu'elle est détectable sur la cellule vivante. On voit par ailleurs émerger l'utilisation de chimères entre GFP et d'autres protéines dont on cherche à connaître, grâce à l'imagerie, la localisation subcellulaire.

- Le transfert d'énergie de fluorescence par résonance (FRET) permet de déterminer la proximité de deux molécules. Cette méthode, bien connue de physico-chimistes travaillant en spectrofluorimétrie classique, commence à être utilisée pour des questions de biologie cellulaire, y compris en imagerie ; elle a servi par exemple à mesurer l'activité de la protéine kinase A dans une cellule vivante, ou à détecter l'activité de protéases. La mesure par FRET d'une activité enzymatique est une approche encore lourde et très peu utilisée, mais qui pourrait se généraliser.

- Les méthodes optiques permettent non seulement d'observer, mais également d'agir. Par exemple, avec des pinces optiques, qui tirent parti du fait qu'un faisceau laser d'intensité élevée focalisé sur un disque de l'ordre du micron fonctionne comme un piège optique pour des objets de dimensions proches de la longueur d'onde utilisée (dans l'infrarouge en général). Ce système permet de manipuler sans les toucher des microsphères de latex couvertes de streptavidine, par exemple. Si ces microsphères interagissent avec des molécules biotinyllées associées au cytosquelette, on peut estimer au niveau moléculaire la force des interactions entre le cytosquelette et ces molécules qui lui sont associées.

- L'optique permet également d'effectuer des sauts de concentration quasi instantanés, grâce à des composés cagés dont la cage est photolysable, c'est-à-dire qu'elle peut être détruite à la suite d'un flash qui libère le composé actif. De nombreux composés cagés sont disponibles actuellement ( $\text{Ca}^{2+}$ , nucléotides cycliques, neuromédiateurs) pour des études cinétiques fines.

- En ce qui concerne les mesures de phénomènes électriques pertinents pour la signalisation intracellulaire, on rappellera que le patch-clamp, ou électrophysiologie moléculaire, a valu à ses auteurs, E. Neher et B. Sakmann, le prix Nobel de Médecine en 1991. L'équipe internationale ayant contribué à l'article princeps décrivant cette méthode comportait un Français, A. Marty, membre de la section 25.

- Enfin, l'électrochimie cellulaire est une électrochimie miniaturisée (avec des fibres de carbone de diamètre micronique) qui permet la détection de quantités très faibles de molécules ayant un potentiel redox caractéristique. On peut par exemple mesurer la libération de quelques vésicules chargées de catécholamines, au niveau d'une seule cellule. Ces méthodes sont très performantes par elles-mêmes, mais leur association (par exemple : patch-clamp, électrochimie cellulaire et calci-fluorimétrie) s'est révélée à maintes occasions encore bien plus féconde. Toutes les approches méthodologiques mentionnées ci-dessus avaient pour intérêt commun de fournir une information temporelle sur des phénomènes biologiques. On

rappellera enfin deux approches en microscopie qui ont pour objectif premier la meilleure résolution spatiale possible : la microscopie confocale à deux photons et la microscopie à force atomique.

- Dans la microscopie confocale à deux photons, on utilise un laser infrarouge très puissant. À ces longueurs d'onde, les photons sont très peu absorbés par les cellules, mais l'arrivée simultanée de deux "photons infrarouges" au point de focalisation du faisceau est équivalente à l'arrivée d'un "photon ultraviolet" (avec une longueur d'onde caractéristique deux fois plus faible que celle du laser). Cette excitation ultraviolette obtenue avec un laser infrarouge ne se produit qu'au point de focalisation du laser, ce qui diminue les dégâts photolytiques pour la cellule et pour la sonde fluorescente, par rapport à une excitation classique effectuée dans un double cône de part et d'autre du point de focalisation. En outre, et pour la même raison, cette méthode améliore très sensiblement la résolution spatiale en réduisant la fluorescence émise hors du plan de mise au point. La France est clairement en retard pour la mise au point et l'utilisation de tels microscopes d'ores et déjà très performants.

- Le microscope à force atomique (AFM) permet, à la façon d'un lecteur de Braille, de palper des surfaces variées, y compris cellulaires, avec un bras articulé portant une pointe qui théoriquement permet d'obtenir une résolution au niveau atomique ; les déflections du bras sont mesurées avec un laser illuminant un miroir fixé au bras. Ce microscope nécessite encore une phase importante de mise au point car, actuellement, les temps d'échantillonnage sont élevés, les balayages répétés ou trop rapides ont tendance à abraser l'objet étudié, et enfin la résolution obtenue sur des objets biologiques reste très inférieure au niveau atomique parfois atteint pour des surfaces solides.

## 9. 4 Molécules nouvelles

Les chercheurs s'intéressant aux interactions cellulaires n'ont pas comme mission principale de générer des molécules nouvelles par synthèse chimique ou biologique. Cependant, ils sont en étroite collaboration avec ceux dont c'est la mission, car ils

fournissent tous les jours des cibles biologiques nouvelles potentiellement intéressantes pour ces molécules : récepteurs (voir l'exemple des récepteurs des chimiokines de l'été 96, pour lesquels des dizaines d'industries pharmaceutiques recherchent déjà des ligands), transporteurs (pompe à proton de la muqueuse gastrique, protéases, phosphodiesterases, domaines actifs d'interaction moléculaire (SH2, SH3, Grb2) etc. Les techniques traditionnelles de criblage de bibliothèques chimiques associées à une synthèse chimique efficace ont encore eu de grands succès, comme les découvertes récentes de nombreux antagonistes non peptidiques de récepteurs de peptides qui vont être utilisés comme médicaments, notamment en psychiatrie et neurologie. Mais la recherche de molécules nouvelles change aussi très vite, la détermination de la structure des cibles biologiques (chapitre 8) aidées par la modélisation moléculaire, permettra de "tailler sur mesure" un composé chimique capable d'inhiber un site enzymatique, d'activer ou bloquer un récepteur. Il existe désormais plusieurs exemples de telles réussites, en particulier dans le domaine des enzymes (protéase HIV-1, peptidases impliquées dans le contrôle de la douleur, de la pression artérielle...). À l'opposé, un autre domaine prometteur est celui de bibliothèques constituées de séquences d'acides aminés ou de nucléotides dont les constituants (jusqu'à 10) sont arrangés dans toutes les dispositions possibles, générant plusieurs millions de molécules parmi lesquelles on espère trouver un composé adapté à la structure macromoléculaire ciblée. Cette chimie combinatoire aléatoire peut s'effectuer par des voies chimiques classiques (synthèse en phase solide de peptides) ou génétique (technique de "présentation de phage" ou "phage display" en anglais). Dans cette dernière technique, de courtes séquences, totalement ou partiellement aléatoires, codant pour une énorme variété de peptides, sont intégrées dans des protéines d'enveloppe de phages filamentueux qui sont produits en masse. Chaque séquence est reproduite plusieurs dizaines de fois. Le criblage des phages est réalisé par affinité sélective sur la cible. On a pu récemment isoler un peptide de 14 résidus cyclisé qui est actif sur le récepteur de l'érythropoïétine, une hormone de 165 résidus ! Quand on sait le prix et les usages divers de l'érythropoïétine recombinante (traite-

ments de l'anémie notamment de patients ayant des insuffisances rénales, mais aussi des cancers, auquel il faut malheureusement ajouter son utilisation abusive chez des sportifs dont certains en sont morts), on peut dire que les découvreurs (industries pharmaceutiques et biotechnologie américaines) auront du succès. On peut imaginer une stratégie similaire pour trouver des peptides mimant diverses hormones difficiles à produire : hormone de croissance, insuline, glucagon, etc.

## 9. 5 Accès au tissus d'origine humaine

L'accès à l'analyse des tissus et du génome chez l'homme normal et malade a été, ces dernières années, source d'interactions particulièrement fécondes entre la recherche fondamentale et médicale. Cet accès est indispensable pour comprendre l'organisation et les dysfonctionnements du vivant dans l'espèce humaine.

L'utilisation des souris transgéniques et de l'inactivation génique ciblée est, comme il a été dit plus haut, un outil puissant et indispensable. Il ne peut pour autant se substituer totalement à l'utilisation de tissus d'origine humaine, en particulier lorsque le modèle animal n'existe pas (voir ci-dessus la mise en évidence des nouveaux récepteurs au HIV et la liaison cruciale avec l'approche génétique). L'importance de l'utilisation des myélomes pour l'étude des immunoglobulines, le cadrage des déficits immunitaires primitifs (BTK par exemple, dont l'équivalent "knock-out" chez la souris ne correspond pas strictement au même phénotype), l'apport des translocations ou mutations dans les processus tumoraux, l'analyse post-mortem des lésions cérébrales, des modifications biochimiques et génétiques impliquées dans des maladies psychiatriques et neurologiques ne sont que quelques exemples qui, s'il en était besoin, soulignent l'importance des tissus d'origine humaine. Il est indispensable à la fois comme modèle et comme fin en soi, avec les retombées cliniques qui sont toujours sous-jacentes. Il est aussi indispensable pour explorer *in vitro* certaines approches thérapeutiques (pharmacologie sur cellules en culture, thérapie génique, ...). Travailler sur des tissus humains constitue une difficulté majeure pour les chercheurs fondamentalistes, particulièrement pour

ceux qui ne sont pas implantés en milieu hospitalier, ce qui est le cas de la majorité des biologistes du CNRS.

Dans ce contexte, malgré les efforts législatifs récents et à l'exception notable des analyses portant sur le génome et les premiers stades du développement, la logistique permettant de disposer de prélèvements humains pour des travaux de recherche, dans des conditions éthiques et techniques acceptables et transparentes, reste très insuffisante. Cette logistique est généralement le fruit d'initiatives individuelles. Des interactions plus fortes entre milieu scientifique et médical pourrait permettre, à travers des réseaux impliquant les organismes de recherches, la mise en place et l'exploitation de banques de tissus humains normaux et pathologiques (pièces opératoires, prélèvements autopsiques, prélèvements chez le sujet sain, tissus embryonnaires et foetaux) ouvertes à la communauté des chercheurs. Citons en particulier les besoins en cerveaux adultes, tissus et cellules lympho-hématopoïétique, tissus foetaux, tumeurs rares – dont tumeurs endocrines.

## **10 - L'HEURE EST-ELLE VENUE D'INFORMATISER NOS CONNAISSANCES SUR LES INTERACTIONS CELLULAIRES ?**

Nous avons souligné que la diversité des messages inter- et intracellulaires est générée par la grande diversité des molécules impliquées, mais aussi par leur utilisation combinatoire. Déjà, il devient assez difficile pour le chercheur d'intégrer les schémas de communications même si, pris individuellement, ils apparaissent simples. Cette intégration sera cependant nécessaire à court terme pour tenter d'expliquer les propriétés nouvelles qui émergent de ces communications. L'exemple le plus complexe d'une propriété émergente à partir des réseaux de communications intercellulaires est certainement la conscience. On commence à avoir une idée des phénomènes qui engendrent la prise de conscience d'un objet que l'on voit. Bien que l'analyse de ces propriétés émergentes puissent paraître en dehors des compétences de notre sec-

tion, nous aurons probablement notre mot à dire sur les phénomènes moléculaires impliqués. On est cependant loin du but. Il nous manque certainement des concepts fondamentaux pour comprendre les propriétés émergentes des réseaux de communications. Plus modestement, on peut se demander s'il ne faut pas commencer à aider le chercheur en établissant des programmes informatiques pour qu'il puisse plus facilement "naviguer" à l'intérieur des systèmes de communications inter- et intracellulaires déjà connus.

## **11 - PATHOLOGIES ET THÉRAPEUTIQUES LIÉES AUX INTERACTIONS CELLULAIRES**

On aura bien compris l'importance des interactions cellulaires dans l'existence et même l'essence des êtres multicellulaires. Il n'est donc pas étonnant que la majorité des pathologies fassent intervenir des protéines ou des systèmes qu'étudient les chercheurs relevant de la commission 25. Corrélativement, beaucoup de médicaments ont pour cible les molécules de la communication cellulaire, et notamment la cible privilégiée que sont les récepteurs membranaires.

Depuis une décennie, on savait que la majorité des maladies endocriniennes, génétiques ou non, résultent d'un défaut de synthèse ou de sécrétion des hormones circulantes (hyper- ou hypothyroïdie, hypo-insulinémie (diabète), hyperprolactinémie responsable de nombreuses stérilités etc.). Depuis peu, on a relevé de nombreuses pathologies endocriniennes dues à des mutations génétiques ou somatiques des récepteurs qui reconnaissent ces hormones (beaucoup de goitres toxiques sont dus à une mutation des récepteurs de la thyroéstimuline, beaucoup de diabètes insipides familiaux sont dus à des mutations du récepteur de la vasopressine, etc.) ou des protéines de transduction comme les protéines G. Si le défaut de sécrétion d'une hormone peut être "facilement" corrigé, la thérapie génique, pour le moment encore balbutiante, pourra peut-être un jour corriger les défauts génétiques. On peut aussi penser à des thérapies qui s'intéresseraient aux cascades de

**transductions en aval des protéines mutées.** Pour l'heure, peu de médicaments ont pour cible des messagers intracellulaires. Ce sont certainement des cibles d'avenir. Parmi les cibles intracellulaires de médicaments, on peut citer une nouvelle fois l'utilisation du NO dans l'angine de poitrine, de la caféine ou de la théophylline (inhibiteurs des phosphodiestérases) dans l'asthme ou la migraine, et de notre bonne fée, l'aspirine, un inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, pour traiter la douleur.

La plupart des maladies psychiatriques et certaines maladies neurologiques font intervenir un mauvais fonctionnement de la transmission synaptique dans un ou plusieurs grands systèmes de communication du système nerveux central. Les systèmes noradrénériques et sérotoninergiques sont impliqués dans certaines formes de dépressions et dans les troubles compulsifs, les systèmes dopaminergiques sont impliqués dans les pathologies schizophréniques, les systèmes glutamatergiques dans l'épilepsie et les attaques cérébrales, etc. La majorité des médicaments utilisés en psychiatrie modifient l'activité de synapses particulières en agissant sur les récepteurs des neurotransmetteurs ou leur concentration, les neuroleptiques sont des antagonistes des récepteurs dopaminergiques, les anxiolytiques sont des agonistes des récepteurs du GABA, les morphiniques sont des agonistes des récepteurs des enképhalines etc. Notons aussi que la plupart des drogues légales (nicotine, alcool) ou illégales (morphine, cannabis, cocaïne, amphétamine, etc.) agissent sur la transmission synaptique de systèmes spécifiques.

Les récepteurs, les molécules de transduction intracellulaires comme les protéines G, les molécules d'adhésion, les molécules impliquées dans l'exocytose, sont aussi la cible des toxines (choléatoxine, toxine botulinique, toxine tétanique), des virus et bactéries, notamment pour pénétrer dans les cellules, (virus HIV utilisant le CD4 et les récepteurs des chimiokines, *Listeria monocytogènes* utilisant la E-cadhéchine).

Des récepteurs et des protéines des transductions intracellulaires souvent mutés deviennent des oncogènes impliqués dans de nombreux cancers par exemple les oncogènes de type

récepteurs tyrosines kinases (scr), oncogène ras, etc. Des hormones favorisent le développement de cancers comme les cancers mammaires œstrogénodépendants.

Le système immunitaire, est-il besoin de le dire, est un des grands défenseurs de l'organisme grâce à sa capacité de distinguer les protéines du soi et du non-soi acquise au cours de l'ontogenèse (prix Nobel 96), un phénomène fondamental de communication et de sélection cellulaire. Les protéines et cellules étrangères sont éliminées par un ensemble de réactions cellulaires et humorales (anticorps, complément). Mais des pathologies de ces systèmes de reconnaissance et communications cellulaires existent bien évidemment, anaphylaxie ou hypersensibilité dont l'asthme, l'urticaire sont des exemples, les maladies auto-immunes (mauvaise distinction du soi et du non-soi), dont la sclérose en plaque, le diabète juvénile insulino-dépendant sont des exemples, les déficiences immunitaires acquises (Sida) ou primaires etc. De nombreuses thérapeutiques font appel à une approche immunologique. La pratique vaccinale est bien entendu l'approche la plus populaire. L'utilisation des cytokines (une trentaine de membres, interleukines, chimiokines, interférons), protéines glycosylées, sécrétées par une grande variété de cellules sous l'action d'un signal comme la pénétration d'un agent infectieux ou la confrontation avec des antigènes d'histocompatibilité étrangers en cas de greffe allogénique, commencent à être utilisées en immunothérapie des cancers (interleukine 2), pour traiter une affection auto-immune comme la polyarthrite rhumatoïde et peut-être bientôt le Sida (en bloquant la pénétration du virus par des chimiokines).

En conclusion, l'avenir des thérapies, visant à moduler pharmacologiquement l'activité des cibles mises en évidence par les chercheurs travaillant sur les interactions cellulaires, est encore prometteur sur le plan stratégique et économique.

## CONCLUSION

La recherche biologique a subi depuis dix ans une accélération vertigineuse, traduite principalement par l'émergence d'outils sophistiqués permettant, comme on l'a vu ci-dessus, des approches réductionnistes très performantes. Il serait faux de croire que les biologistes pourraient assimiler le réductionnisme à la quête du Graal, et tous sont bien conscients qu'il ne s'agit là que d'une voie de passage obligatoire – mais pour combien de temps ? Il est assez frappant de voir que de nombreux chercheurs ont effectué, assez récemment, une évolution stratégique aboutissant souvent à une redistribution des rôles. Tel qui ne jurait que par la biochimie se découvre une passion pour la cellule, tel autre qui a passé vingt ans de sa vie à étudier les récepteurs de surface se trouve plongé dans les profondeurs cellulaires et les délices de la transduction, tel généticien pur et dur ne rêve que de voir sous une forme cristallisée le produit du gène de sa vie... Les barrières "disciplinaires" s'estompent, et, finalement, peut-il en être autrement, lorsque toute vie est synonyme de communication, que toute communication implique une diversité de messages, que toute diversité est nécessairement codée, et que la limitation de la place sur le génome impose que soient mises en place des procédures d'économie, impliquant, selon l'expression de François Jacob, un vaste "bricolage". Chaque chaîne de fonctionnement cellulaire empruntant, par voie de conséquence, quelques éléments à plusieurs de ses voisines (récepteurs polymériques, voies de transduction, facteurs de transcription...), il s'ensuit inévitablement que les biologistes se rencontrent de plus en plus souvent à la surface et à l'intérieur des cellules. Ce n'est sans doute pas la moindre fierté de la commission 25 que de se sentir au centre de cette révolution-là. Les frontières entre les disciplines biologiques se sont considérablement estompées au

cours de la dernière décennie. Un bien ? Un mal ? En tous cas, certainement une complication qui devient parfois inextricable pour le chercheur individuel, ou pour une équipe de taille modeste, qui souhaite comprendre, de A à Z, un problème qui prend naissance au niveau d'un récepteur membranaire, et qui finit par la transcription d'un gène, celui-là et pas un autre. De ces constatations, il nous semble émerger deux problèmes essentiels.

- L'un concerne l'organisation des sections biologiques (mais peut-être d'autres ?) du comité national. Les chevauchements d'intérêts et la nécessaire mise en commun au jour le jour de complémentarités techniques, mais aussi thématiques, apparaissent en totale contradiction avec un cloisonnement excessif des sections. Comment les physiologistes peuvent-ils faire l'économie d'être au contact des cristallographes etc., vice-versa ?

- Le second est probablement plus fondamental encore. La multiplicité des techniques et leur haut degré de complexité rend impossible l'approche linéaire d'un problème complet par une équipe de petite taille. Il semble inéluctable que l'activité de recherche des biologistes – en tous cas d'un pourcentage important d'entre eux, tant il est vrai que l'originalité a toutes chances de se développer en marge des grands boulevards – s'organise à la manière des physiciens, impliquant la mise en commun de très gros plateaux techniques performants, organisés de façon très professionnelle, avec le concours de spécialistes de niveau incontestable et de formation complémentaire (biologistes, chimistes mais aussi physiciens).

C'est à ce prix que la recherche biologique au CNRS restera compétitive. Il n'y a, de ce point de vue, plus de temps à perdre. Il ne faut pas se cacher qu'au-delà des considérations matérielles, c'est d'une véritable révolution de la sociologie des chercheurs, des ingénieurs et des techniciens qu'il s'agit.