

BIOLOGIE CELLULAIRE, VIRUS ET PARASITES

ALAIN BIENVENUE

Président de la section

JEAN-PIERRE HENRY

Rapporteur

Michèle Aubery

Claude Auriault

Théo Baltz

Pierre Billaut

Michel Brahic

Daniel Brethes

Claude Celati

Alice Dautry-Varsat

Ginette Devilliers

Laurent Dianoux

Yves Dupont

Bruno Goud

Ginette Jaureguiberry

Patricia Krief

Marc Le Maire

Jeanne Leung-Tack

Annie Molla

Marie-Anne Petit

Jean Philippot

INTRODUCTION

L'objectif de base des recherches relatives aux cellules, virus et parasites est actuellement de comprendre, en termes moléculaires, l'ensemble des processus qui caractérisent ces composants élémentaires du vivant. Ces processus montrent à la fois une stabilité structurale et une plasticité permettant leur survie (virus et parasites) ou leur adaptation à l'environnement (cellules). En utilisant concepts et moyens de disciplines fondamentales telles que la génétique moléculaire, la physique et la (bio) chimie, ces études ont apporté de nombreux concepts unificateurs qui s'étendent à tous les règnes du vivant et qui éclairent des disciplines plus intégrées comme la physiologie, l'embryologie, l'immunologie, la cancérologie, la pharmacologie, voire l'épidémiologie.

Les trois axes majeurs de la biologie des cellules, virus et parasites sont les suivants :

- Le premier axe est orienté vers l'analyse structurale et dynamique des composants essentiels : cytosquelette, organites et membranes, molécules d'adhérence, virus. Un des objectifs importants est ici de décrire quantitativement le fonctionnement et les régulations de ces mécanismes extrêmement complexes.

- Le deuxième, tout aussi important, consiste

à découvrir les molécules impliquées dans des grandes fonctions cellulaires (perméabilité et conduction membranaire, trafic membranaire, cycle cellulaire, adhérence et motilité, différenciation et apoptose, transduction des différents signaux en provenance de – ou destiné à – l'extérieur) ainsi que leurs perturbations par les agents avec lesquels les cellules interagissent (pénétration et réplication virale, interactions hôte-parasite, microbiologie péri- et intracellulaire).

- Enfin, les études des pathogénies virales et parasitaires nécessitent une caractérisation moléculaire des "nouveaux" agents pathogènes (prion, virus des hépatites...), afin de mieux comprendre les facteurs déterminants de leur infectivité (immunologie et épidémiologie), et de prévoir les thérapeutiques possibles ainsi que les mécanismes de résistance des agents pathogènes.

1 - BIOLOGIE CELLULAIRE

1. 1 DYNAMIQUE DE LA PRODUCTION DES CONNAISSANCES

La biologie cellulaire de la fin de ce siècle n'a plus l'image qu'on pouvait lui donner il y a une centaine d'années, alors que la théorie cellulaire était déjà bien acceptée dans la communauté scientifique, mais que la génétique se heurtait à de nombreuses difficultés pour s'imposer. Au début de ce siècle, les biologistes cellulaires, comme d'autres biologistes, se sont contentés d'une approche descriptive, non quantitative et peu encline à la recherche des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les fonctions complexes et intégrées de la cellule. Après une évolution méthodologique importante qui a vu le jour dans les années quarante et cinquante avec l'introduction de la microscopie électronique pour l'étude de l'organisation des cellules, le catalogue des structures subcellulaires et les démarches descriptives ont progressé rapidement et ont été achevées au début des

années soixante-dix. Dans le même temps, des progrès considérables en biochimie et en biologie moléculaire, puis en génétique moléculaire, sont venus rajeunir la biologie cellulaire qui a maintenant pour objectif d'interpréter en termes moléculaires l'ensemble des processus qui rendent compte de la stabilité structurale et fonctionnelle des cellules.

Une volonté de décrire les phénomènes biologiques en termes mécanistiques et quantitatifs a progressivement pris racine pour être appliquée à l'étude des cellules et à leur dynamique structurale et fonctionnelle. La différenciation cellulaire, le développement et le vieillissement, processus qui sous-tendent le fonctionnement normal et/ou pathologique des cellules d'origine animale ou végétale, sont ainsi devenus des champs d'investigation prioritaires pour les biologistes cellulaires.

Le langage des biologistes cellulaires aujourd'hui est celui des généticiens, des physico-chimistes et des biologistes moléculaires. Plusieurs objectifs princeps ont émergé. En premier lieu, on identifie des molécules impliquées dans une fonction cellulaire spécifique, puis on recherche les partenaires de ces protéines et on analyse leur contribution à la dynamique de fonctionnement des machines moléculaires asservies au fonctionnement intégré des cellules. On peut qualifier cette approche de "physiologie cellulaire", dans la mesure où elle part de la fonction pour aller vers la molécule. Inversement, on peut aussi définir une "enzymologie cellulaire", qui, partant de protéines caractérisées *in vitro*, s'efforce de comprendre la manière dont la cellule utilise les outils qu'elle a à sa disposition. Nous prendrons quelques exemples de domaines où ces approches se sont développées significativement, sans avoir l'intention de couvrir l'ensemble de la biologie cellulaire.

Transduction du signal

Il semble que l'étude de la nature des intermédiaires impliqués dans la prolifération ou la différenciation soit bien avancée pour les réponses aux hormones, facteurs de croissance et cytokines, ou à la stimulation des récepteurs T ou B. Beaucoup d'entre eux ont été identifiés (spécificité

de substrats et de sites de liaisons avec d'autres protéines), de même que les facteurs de transcription régulés par ces voies. L'assemblage des différents éléments impliqués dans la transduction est généralement représenté par des schémas raisonnables, bien que rarement démontrés précisément. Le poids des chercheurs et des laboratoires français dans ce champ de travail est tout à fait notable et doit être soutenu. La détermination expérimentale de la structure et de la dynamique des assemblages pourrait être l'un des objectifs importants de la recherche sur ce sujet.

De manière évidente, les avancées dans ce domaine intéressent d'autres disciplines comme l'immunologie, la différenciation, l'endocrinologie et en pathologie, la cancérogenèse et les interactions cellule-pathogènes : virus, parasites, bactéries.

Adhérence cellulaire

Deux principales découvertes de la décennie : l'adhérence cellulaire est médiée par une famille de récepteurs hétérodimériques : les intégrines. L'adhérence cellulaire contrôle la phosphorylation d'une tyrosine kinase associée aux domaines cytoplasmiques des intégrines, la FAK (pp125 fak, Focal Adhesion Kinase), point de départ d'une nouvelle voie de signalisation cellulaire.

Conséquences : un grand nombre de laboratoires travaillant dans des domaines divers (hémostase, immunologie, différenciation) ont réalisé qu'ils travaillaient sur les mêmes types de récepteurs. Un déplacement des thématiques vers l'étude des intégrines a été observé.

Retombées : un concept plus unitaire des mécanismes de la biologie cellulaire, une meilleure compréhension de la régulation de la prolifération cellulaire, des étapes précoces de l'hémostase, des mécanismes de l'inflammation et enfin la compréhension d'un certain nombre de maladies génétiques associées (LAD, Thrombasthénie de Glanzman...)

Intérêt majeur des laboratoires travaillant dans le domaine : principalement, l'analyse de la transduction des signaux vers le cytoplasme et,

dans une moindre mesure, l'analyse de la signalisation des intégrines vers l'extérieur (contrôle cellulaire du changement de l'affinité des intégrines pour leur substrat extracellulaire).

Cet intérêt est motivé pour une large part par les retombées industrielles potentielles à moyen ou court terme. En contrepartie, l'analyse des protéines du cytosquelette impliquées dans la formation des plaques d'adhérence ainsi que l'étude de la structure de ces dernières sont délaissées. Pourtant ces protéines peuvent également jouer un rôle dans la signalisation cellulaire. De plus, l'aspect structural de ces macrostructures rend probablement compte d'une partie des mécanismes de transduction.

Controverses scientifiques dans le domaine : ce n'est que depuis environ trois ans que le principe du contrôle cellulaire de l'affinité des intégrines a été admis (à opposer à un contrôle par des substrats extracellulaires). Par un effet de mode, la possibilité du contrôle extracellulaire de l'adhérence des cellules est pratiquement toujours écarté, ce qui est excessif. En effet, il est probable qu'une telle régulation ait lieu également dans certains cas.

Émergence des thématiques de recherche dans le domaine et prospective : l'analyse des voies de signalisation médiées par les intégrines n'en est qu'aux premiers balbutiements. Un champ important s'ouvre concernant les interconnexions entre les voies de signalisation *via* les intégrines et les autres voies de signalisation (par exemple celles induites par les facteurs de croissance, ou la signalisation, induite par le complexe TCR/CD3 lors de la présentation des antigènes). Les relations entre l'interaction cellule-matrice, et la prolifération cellulaire ou au contraire l'apoptose commencent à être étudiées. Il est probable qu'une partie des acteurs cellulaires est déjà connue et que des avancées significatives dans le domaine seront dues à des résultats obtenus dans des laboratoires travaillant dans d'autres champs.

Le rôle des intégrines comme voie d'entrée de pathogènes comme certaines bactéries et certains virus est également une ouverture inattendue de cette partie de la biologie cellulaire.

Trafic membranaire

La circulation membranaire dans les cellules eucaryotes est caractérisée par deux stades de réarrangements membranaires : la formation de vésicules à partir d'un compartiment donneur et la fusion avec les membranes d'un compartiment accepteur. Tout le processus est très régulé tant pour assurer une spécificité du transport du contenu intravésiculaire que pour maintenir la composition lipidique et protéique des organites impliqués.

Des avancées importantes ont eu lieu dans les domaines du ciblage vésiculaire et de la fusion membranaire. Elles résultent de la convergence de plusieurs approches (systèmes de fusion *in vitro*, génétique de la sécrétion chez *Saccharomyces cerevisiae*, transmission synaptique) et elles concernent la généralisation des hypothèses proposées pour la régulation de la fusion des navettes de transport vésiculaire avec les membranes des compartiments cibles. Dans le modèle conceptuel proposé, chaque type de vésicule de transport possède un étiquetage par une protéine transmembranaire caractéristique, appelée v-SNARE. Celle-ci interagit sélectivement avec un t-SNARE complémentaire localisé sur la membrane cible. La spécificité de l'appariement des deux protéines membranaires est un des éléments clés qui vient en complément du rôle des petites protéines G de la famille rab pour garantir la fidélité de l'accostage. En plus des SNARE, un complexe multiprotéique comprenant des protéines solubles, le NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Factor) et les SNAP (Soluble NSF Attachment Protein), est impliqué dans les fusions membranaires proprement dites, sans que le mécanisme intime de la fusion soit connu actuellement.

Des approches de biochimie, de génétique et d'électrophysiologie sont appliquées sur des modèles cellulaires variés : les cellules de mammifères, la drosophile, le ver *Caenorhabditis elegans*, l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*, la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Il est intéressant de noter que l'avancée venue de la biologie cellulaire féconde des domaines voisins, neurobiologie et endocrinologie. En effet, la sécrétion d'hormone ou de neurotransmetteur fait

appel au processus d'exocytose (fusion des membranes des vésicules de sécrétion et plasmiques). Néanmoins, l'exocytose régulée qui caractérise ces phénomènes implique des étapes de régulation encore à découvrir. Remarquons aussi que les efforts directs faits pour comprendre l'exocytose régulée, par la reconstitution *in vitro*, n'ont pas abouti.

Un aspect important est la régulation de trafic vésiculaire par les phosphoinositides et les inositols polyphosphates. Le cycle des phosphoinositides avait tout d'abord attiré l'attention par son importance dans la production des deux messagers secondaires que sont l'inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP3) et le diacylglycérol (DAG). L'InsP3 et son récepteur membranaire sont des éléments du contrôle de la mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire et le DAG active les protéines kinases C. L'intérêt reste clairement très marqué pour ces deux domaines. La complexité aujourd'hui reconnue du réseau métabolique des inositol phosphates se traduit par la recherche de fonctions cellulaires nouvelles pour les composés de cette famille, qu'ils soient localisés dans les fractions solubles ou dans les membranes cellulaires. Le débat reste en grande partie entier pour connaître les composés qui ne seraient que des intermédiaires métaboliques simples et ceux qui joueraient un véritable rôle de signalisation et de régulation.

Des avancées récentes montrent que les polyphosphoinositides, qui sont les phospholipides les plus chargés négativement que l'on connaisse actuellement, ont un rôle important dans le trafic vésiculaire. Des composés comme le phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate ou le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate activent les isoformes indépendantes du Ca^{2+} de la protéine kinase C. Un fort caractère de nouveauté se traduit dans des recherches sur les enzymes du métabolisme des phosphoinositides ainsi que sur les protéines membranaires intégrales ou solubles (mais associées fonctionnellement aux membranes) qui sont régulées par la fixation des phosphoinositides et/ou des inositols polyphosphates comme, par exemple, la synaptotagmine, les protéines AP2 adaptateurs de la clathrine ou la dynamine.

Il faut aussi citer des progrès importants dans l'identification des composants formant le pore

nucléaire et impliqués dans les échanges de protéines et d'acides nucléiques entre le cytoplasme et le noyau, dans les signaux d'adressage et de localisation de protéines solubles et membranaires et de quelques ARN messagers, dans l'étude du repliement et du contrôle de qualité des protéines membranaires et sécrétées.

Un autre domaine très important est l'étude du passage de macromolécules, principalement de protéines, à travers les membranes des compartiments cellulaires. Il est intéressant de constater que si l'étude de la biogenèse des protéines sécrétées et de leur passage à travers le reticulum endoplasmique est déjà ancienne, d'autres phénomènes du même ordre n'ont été étudiés que plus récemment : l'importation des protéines mitochondriales, la biogenèse des chloroplastes, ou l'importation peroxy-somiale. Il est regrettable que ces domaines ne soient pas plus développés en France. En fait, outre les difficultés expérimentales, il y a aussi vraisemblablement des réticences conceptuelles à aborder un domaine si nouveau ; comment une protéine soluble peut-elle franchir une barrière phospholipidique ?

Dans ce domaine, notre connaissance a progressé dans la compréhension des signaux de reconnaissance, dans l'inventaire des protéines participant aux appareils de translocation et dans la connaissance des mécanismes physico-chimiques, au moins au niveau des protéines sécrétées et mitochondriales. Il est loin d'être sûr que tous les mécanismes soient connus. En effet, de multiples exemples d'entrée dans le cytoplasme de toxines et protéines de virus, bactéries et parasites restent mal compris. Par ailleurs, même certains signaux cellulaires semblent faire appel à des passages de protéines de cellule à cellule. Citons, par exemple, des facteurs de croissance affectant la transcription d'une cellule cible ou l'effet de protéines à homéodomaines, mis en évidence par A. Prochiantz (ENS). Pour expliquer ces phénomènes, on ne possède pas de mécanisme et ce domaine donnera certainement naissance à une recherche active car il peut fournir des résultats intéressants pour résoudre le problème de la vectorisation des macromolécules et la translocation transmembranaire de toxines protéiques bactériennes, végétales ou fongiques.

Cycle cellulaire

Trois points paraissent à souligner :

- La découverte des inhibiteurs de CDKs (Cyclin Dependent Kinase), fin 1993, a conduit, en deux ans, à une explosion de données importantes liant ces inhibiteurs non seulement au contrôle de la prolifération cellulaire et à ses perturbations dans la transformation maligne, mais aussi au couplage entre arrêt de cycle cellulaire et mise en place de la différenciation cellulaire. Cette découverte conduit aussi à mieux comprendre le lien entre certains cancers et le développement du tissu dans lequel ils apparaissent. Avec une impressionnante efficacité, des groupes américains ont déjà fait l'expression tissulaire détaillée de plusieurs inhibiteurs, durant le développement de la souris. Les résultats montrent souvent une distribution très spécifique. Plusieurs "knock out" de gènes d'inhibiteurs ont déjà été publiés (une référence : *Curr. Opin. Genet. Develop.*, 1996, 56-64).

- L'importance de la protéolyse pour contrôler non seulement, comme on le savait depuis longtemps, la destruction des cyclines mitotiques à la sortie de la mitose, mais aussi celle des inhibiteurs de CDKs (pour permettre cette fois, comme dans la levure, l'entrée en phase S par exemple). Tout l'appareillage de destruction des protéines semble jouer un rôle plus important que prévu tout au long du cycle cellulaire, et les régulations de son activité impliquent probablement des boucles de rétroaction dans lesquelles un complexe donné d'effecteurs du cycle provoque sa propre destruction (une référence : *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 7, 781-789, déc. 1995).

- Le succès, sur le plan conceptuel et pratique, de la notion de mécanismes de surveillance (checkpoints), due L. Hartwell. Ces mécanismes, souvent assurés par des gènes non essentiels, sont importants pour maintenir une haute fidélité dans le déroulement des événements du cycle de division cellulaire. Leur dérèglement est probablement à l'origine de l'accumulation d'erreurs qui participent à la progression cancéreuse. Mieux compris, ils pourraient, dans un but thérapeutique, être utilisés pour éliminer des cellules pathologiques.

L'un de ces systèmes de surveillance concerne la transition métaphase-anaphase et dépend des microtubules. Le principe de son mécanisme a beaucoup progressé récemment et a révélé des aspects inattendus (voir *infra* "cytosquelette").

Il y aurait d'autres points à citer, la cascade des MAP kinases et sa généralité, la caractérisation des kinases activatrices des CDKs, qui sont aussi des CDKs, etc.

Les principales avancées sur le cycle cellulaire ont été réalisées grâce à l'utilisation de modèles biologiques simples (levures et ovocytes) où les mécanismes de contrôle du cycle pouvaient être étudiés indépendamment de la plupart des autres activités cellulaires (en particulier, la croissance cellulaire). Il s'agit maintenant d'étudier la modulation de ces mécanismes dans des circonstances plus complexes et plus ciblées, ce qui implique la pratique d'une interdisciplinarité dans le cadre de la biologie. Il est éminemment souhaitable d'articuler autour des équipes qui, dans un passé récent, ont su dégager, par l'analyse de modèles biologiques simples, un corps d'informations dont la portée semble générale, des groupes diversifiés de chercheurs plus spécialisés ayant une connaissance approfondie d'un matériel, ou d'une problématique biologique, mais pas nécessairement une vue d'ensemble de la thématique "cycle cellulaire". Il reste nécessaire d'approfondir l'analyse de système modèles, car en fait aucune des transitions du cycle cellulaire n'est encore réellement comprise, mais ceci dans le cadre d'une structure de laboratoires beaucoup plus diversifiée que par le passé.

Cytosquelette

- Le champ est immense, et on peut simplement noter :

- Une accumulation considérable de nouvelles molécules, le plus souvent identifiées par homologies de structures d'une espèce à l'autre, définissant des familles grandissantes, organisées en sous-familles plus spécialisées. C'est le cas des moteurs moléculaires, myosines ou kinésines, dont la diversité et l'importance fonctionnelles s'accroissent tous

les jours et qui sont présents dans tous les compartiments cellulaires, noyau compris.

- Pas de grandes révolutions dans les paradigmes, mais une rencontre de plus en plus fréquente et précise entre les mécanismes de développement de l'embryon et les réseaux du cytosquelette des cellules concernées. De nombreux exemples viennent de la drosophile, aussi bien dans l'embryon précoce, où le rôle du cytosquelette dans l'établissement de certains gradients de gènes de développement a été analysé en grand détail récemment, que dans des stades plus tardifs, où l'on a récemment montré la manière originale dont certains facteurs de transcription se distribuent de manière asymétrique entre deux cellules filles (en utilisant les asymétries de la membrane plasmique qui se mettent en place au moment de la mitose en regard d'un des pôles du fuseau mitotique). D'autres exemples viennent de *C. elegans*, du Xénope, de la souris.

- Un développement expérimental important et nouveau concernant des mesures de mouvement, de filaments ou de molécules individuelles, ou de forces développées par des moteurs individuels. À noter un intérêt croissant des physiciens pour ce genre de problème, intérêt qui se répand de manière rapide dans cette communauté. On peut en attendre un renouvellement conceptuel à terme. Les mesures de force semblent d'ailleurs être réalisées avec précision par la cellule dans certains cas. Un des résultats récents les plus frappants concerne à la fois les microtubules et le cycle cellulaire : le contrôle de la transition métaphase-anaphase, fondamental pour une ségrégation correcte des chromosomes, dépend des microtubules. Il a été montré de plusieurs manières, dans plusieurs groupes américains et parfois par des micromanipulations très élégantes, que c'est la tension équilibrée exercée sur les kinétochores encore appariés qui est l'événement mesuré : les kinétochores seraient des sortes de tensiomètres, l'état de phosphorylation de certains de leurs composants dépendant de l'équilibre des forces exercées sur eux (par l'intermédiaire des microtubules soumis à l'action de moteurs). C'est l'inverse du couplage mécano-chimique habituel.

- Pour les filaments intermédiaires, les principales découvertes sont :

- l'identification de nouvelles IFP (*Intermediate Filament Proteins*) et la démonstration de leur co-expression avec des IFP de type différent, qui infirme le dogme selon lequel une cellule donnée n'exprime qu'une IFP donnée. Le premier exemple fut la démonstration de la coexistence de la périphérine (type III) avec les protéines de neurofilaments (type IV). Cela suscita un nouvel intérêt pour le rôle des IFP, considéré jusqu'alors comme purement structural ;

- la découverte des lamines, seules IFP à la fois nucléaires et ubiquitaires, la description de leurs nombreuses modifications post-traductionnelles, la démonstration de leur liaison à la chromatine et des modifications de leurs réseaux au cours du cycle cellulaire. D'après les travaux de K. Weber, les premiers IFP apparues au cours de l'évolution présentent certaines caractéristiques des lamines (séquence de 42 acides aminés supplémentaires dans la région 1b du domaine central) ;

- la corrélation établie entre la présence de mutations dans les cytokératines et les épidermo-lyses bulleuses simples. Elles concernent un acide aminé localisé la plupart du temps dans le domaine central indispensable à la polymérisation des IFP ou dans une région très proche de ce domaine. Cela a permis de définir un rôle pour les réseaux de cytokératines : celui de maintien de la cohésion des épithéliums. Cela a aussi suscité des travaux de recherche de mutations affectant d'autres IFP dont les réseaux sont désorganisés dans des pathologies : par exemple, les NFP dans les maladies à motoneurones ; cependant, les corrélations ne sont pas aussi claires qu'avec les cytokératines.

"Enzymologie cellulaire" - Approche quantitative

C'est une thématique émergente qui consiste à étudier les systèmes dans leur globalité et dans leur contexte cellulaire. Une telle approche nécessite le développement et la description de modèles cellulaires tels que cellules perméabilisées, eucaryotes unicellulaires, systèmes de périfusion - voire réacteurs multienzymatiques ; et la mise en œuvre de méthodes de mesures non invasives telles que

RMN, spectroscopies diverses, microcalorimétrie, mesures multiparamétriques, etc.

Elle nécessite d'accumuler un grand nombre de données thermodynamiques, cinétiques, structurales concernant l'organisation des systèmes multienzymatiques ; d'étudier également le contrôle du métabolisme, le rôle du cytosquelette et les interactions fonctionnelles entre les différents compartiments cellulaires.

Cela a permis d'introduire et d'approfondir les notions nouvelles de métabolisme, de trafic, de "channeling".

Membranes : structure et fonction, bioénergétique

Structure des protéines membranaires

La détermination récente (ou les espoirs de détermination) de la structure de plusieurs protéines membranaires réveille l'espoir d'un secteur qui en a bien besoin. En effet, une génération entière de chercheurs s'est heurtée à ce problème. Ces dernières années ont vu plusieurs structures connues à l'échelle atomique : centre photo-synthétique bactérien (Andy Freer, Glasgow), cytochrome c oxydase (Hartmut Michel, Francfort), récepteur de l'acétylcholine (N. Unwin), ATP synthase F1 (Walker), Bactériorodopsine (R. Henderson), centre photosynthétique de plantes (Kühlbrandt, Heidelberg).

Ces avancées ont donné lieu à un mouvement d'intérêt très net vers des méthodes de biologie structurale innovantes, qui n'avaient que très peu été exploitées pour les études de structure des protéines solubles : cristallographie 2D, cryomicroscopie, méthodes de prédiction de structures. Cependant, ces succès récents ne doivent pas cacher l'extrême difficulté de ce domaine : tout d'abord, on peut considérer que les protéines dont les structures ont été déterminées sont des cas très particuliers et, en général, des transporteurs de protons..

Par contre, en ce qui concerne les structures de protéines de type pompe ionique (ATPase Ca,

Na-K, H-K, etc.), les tentatives d'étude structurale ne progressent que très lentement. Les méthodes mises au point pour les protéines citées plus haut n'ont, pour le moment, donné que peu de retombées. La résolution de la structure des ATPases ioniques constituerait une deuxième et décisive phase dans ce domaine. On observe effectivement une certaine érosion dans l'intérêt apporté à l'étude structurale de cette classe de protéine membranaire. Cette érosion de l'intérêt provient d'une part, de la complexité des méthodes de biologie structurale qui doivent être mises en œuvre, d'autre part, de la lenteur des progrès observés. Cette lenteur s'accomode mal de la pression actuelle qui s'exerce en général sur les chercheurs au niveau de la fréquence de publication.

Ce phénomène est particulièrement illustré par la divergence entre les attitudes constatées dans les laboratoires européens et les laboratoires d'outre-atlantique. Le système en vigueur aux États-Unis est de plus en plus difficilement compatible avec la lenteur des progrès de ce domaine. On constate que la quasi-totalité des structures de protéines membranaires résolues à ce jour l'ont été dans des laboratoires européens. Vu les moyens mis en œuvre, on peut facilement imaginer que cette situation a des chances de se reproduire en ce qui concerne les autres classes de protéines membranaires actuellement étudiées. Sur ce point, la faiblesse des laboratoires français est remarquable, car les structures résolues l'ont été presque exclusivement en Grande-Bretagne et en RFA (MRC, Max-Planck, EMBL).

Si la résolution de la structure des protéines à l'échelle atomique progresse lentement, les développements de la biologie moléculaire permettent des avancées utiles. Parmi ces développements, on peut citer : les systèmes d'expression hétérologues des protéines membranaires associés avec la mutagenèse dirigée pour étudier les relations structure/fonction, la découverte et le développement de diverses méthodes d'analyse expérimentale de la topologie des protéines membranaires, la comparaison et l'analyse de séquences des cDNA correspondant à des familles de protéines. Par ailleurs, un certain nombre d'approches biophysiques soulèvent un intérêt soutenu, par exemple, l'étude par RMN de peptides amphiphiles représentant des

domaines de protéines membranaires. La modélisation moléculaire attire beaucoup de jeunes chercheurs, peut-être trop ; il est important que les chercheurs ne se détournent pas du travail expérimental et, idéalement, le même chercheur devrait être modélisateur et expérimentateur. Il est donc important de soutenir les initiatives qui portent sur la chimie et la purification des protéines, leur métabolisme et leur dégradation, les interactions protéine-protéine et protéine-lipide dans les membranes, ainsi que sur les méthodes de cristallisation (2D et 3D), et d'étude structurale (diffraction, RMN, ...).

Il est clair que plus d'informations seraient nécessaires pour traiter des débats anciens, comme la prédiction des structures et/ou la topologie sur la base de la séquence protéique ou le rôle des lipides dans la relation structure/fonction, ou des débats nouveaux, comme la topologie fixe ou variable des protéines membranaires.

Fonction et mécanisme des pompes et transporteurs

Les pompes à protons, clefs de voûte de la bioénergétique, restent très étudiées. Mais des débats restent très actifs : y a-t-il une place dans les modèles mécanistiques et cinétiques proposés pour des systèmes à stoechiométrie variable ? Débat intéressant puisqu'il suppose un rendement variable et la production éventuelle de chaleur.

Dans le cas des transporteurs secondaires, le même débat se pose au niveau du couplage ion/soluté transporté. À ce niveau se pose la question des différences entre canaux ioniques et transporteurs : ces deux classes de protéines apparaissent classiquement comme nettement différentes, mais l'électrophysiologie (patch-clamp), souvent jointe à l'expression en système hétérologue, a permis d'entrer à un niveau d'analyse où ces différences doivent être redéfinies. Les transporteurs de neurotransmetteur illustrent bien les progrès rapides faits dans ce domaine puisque le premier transporteur a été cloné en 1991 et qu'à l'heure actuelle apparaissent des résultats sur la relation canal/transporteur (analysée par électrophysiologie) ou sur le knock-out du transporteur de la dopamine et son apport à la compréhension des effets de la cocaïne.

On enregistre aussi des progrès dans l'étude d'une classe de protéines que l'on pourrait ranger sous le patronyme de "ATPases et transporteurs de nouveau type", en général impliquées dans des maladies. La "driving force" concernant l'étude de cette classe de protéines provient de l'intérêt de plus en plus marqué des nouveaux et jeunes chercheurs (et des bailleurs de fonds) pour une orientation plus tournée vers les problèmes de santé que vers les connaissances fondamentales. Parmi ces transporteurs et ATPases, on peut citer les transporteurs ABC (multidrug ATPases, STE6 de levure), le récepteur CFTR, les transporteurs de peptide, ATPase de transport de cuivre dont les mutations sont à l'origine des maladies de Menkes et Willson, etc.

1. 2 CARACTÉRISTIQUES DES DÉVELOPPEMENTS RÉCENTS

Plusieurs aspects nous semblent pouvoir être soulignés dans la démarche suivie :

Existence de principes généraux

L'un des traits de l'évolution de la biologie cellulaire dans les dernières années est d'avoir réalisé la très grande conservation, dans des systèmes biologiques très divergents, des molécules et des procédures utilisées pour une fonction donnée, ce qui a supprimé les barrières méthodologiques (classiquement, l'opposition génétique/biochimie) imposées par chaque système expérimental. C'est une des principales raisons de certaines avancées significatives récentes.

Plus fondamentalement, les mécanismes moléculaires mis en œuvre dans toutes les grandes fonctions cellulaires et les paradigmes utilisés sont finalement très semblables, même si les acteurs moléculaires sont différents. Ce qui est établi dans un domaine de recherche vaut aussi pour des domaines voisins. Il faut signaler à ce propos l'intérêt porté tout récemment aux détournements que peuvent produire des agents pathogènes (virus, bactéries, parasites) dans le fonctionnement de la cellule comme méthode de connaissance de mécanismes cellulaires fondamentaux (organisation du

cytosquelette ; jonctions serrées, trafic vésiculaire ou cascade de transduction des signaux). Sur un autre plan, aurait-on pu envisager, il y a quelques années, que nos connaissances sur le fonctionnement de la synapse bénéficient des progrès de la génétique de la levure ? Ce point est très important, car il signifie que les différents domaines atteignent des niveaux de compréhension comparables. Mais il implique aussi que les chercheurs doivent ouvrir leur culture et bénéficier d'une information la plus large possible. Dans ce sens, le développement des réseaux informatiques comme moyen de communication est très important.

Importance des études d'interaction protéine-protéine

Afin de descendre à un niveau moléculaire d'explication, le biologiste cellulaire est amené à centrer ses recherches sur une protéine, définie "a priori" dans le cas de l'enzymologie cellulaire ou "a posteriori" dans le cas de la physiologie cellulaire. Il suit alors très généralement "sa" protéine en recherchant ses partenaires pour établir des "voies" analogues à celles du métabolisme, mais dans lesquelles sont échangés des signaux et non des métabolites. Les méthodes permettant de mettre en évidence les interactions entre les différents protagonistes d'une chaîne de réponses sont à peu près au point (overlays, chromatographie d'affinité, Biacore...). Toutefois, des progrès sont encore nécessaires pour mettre en évidence les interactions faibles ($K_d > 10 \mu M$) qui sont très importantes dans les conditions intracellulaires, où les concentrations sont élevées et le confinement important. Un effort méthodologique pourrait être soutenu sur ce point, en collaboration avec les physico-chimistes et les biophysiciens essentiellement. Les méthodes biologiques de mesure d'interaction (double hybride chez la levure) ont pris un développement considérable.

Le développement de l'interface cycle/signalisation dans des systèmes biologiques complexes nécessitera le développement d'une approche biochimique performante permettant d'identifier, à partir de faibles quantités de matériel, les protéines impliquées dans les cascades de régulation. Beaucoup d'efforts sont réalisés en France, à juste

titre, en vue du séquençage du génome. Par contre, les efforts en vue d'améliorer les techniques de microséquençage des protéines sont restés très insuffisants, malgré les progrès technologiques considérables réalisés à l'étranger dans ce domaine. Il serait important de veiller au développement des techniques de microséquençage des protéines, en particulier dans les laboratoires travaillant à l'interface cycle cellulaire/signalisation cellulaire.

Utilisation des techniques physiques

La nécessité d'appréhender des fonctions au niveau cellulaire a poussé le développement de l'imagerie cellulaire sous toutes ses formes : microscopie optique et confocale, vidéomicroscopie, pinces optiques, tomographie computationnelle (actuellement absente en France). Mais au-delà de l'imagerie, les techniques permettant d'intervenir au niveau cellulaire sont devenues indispensables : mesure de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, composés cagés, mesures électriques sur cellules isolées (patch-champ, ampérométrie, ...).

Protéines membranaires : enjeux et objectifs

Deux objectifs peuvent être avancés : manipulation aisée de toutes les protéines membranaires (pas de dénaturation, purification, analyse) ; description du fonctionnement moléculaire d'un récepteur, d'une pompe ou d'un canal.

À long terme, on peut espérer tirer un grand nombre d'informations par une simple analyse de la séquence de la protéine membranaire et de quelques expériences choisies, mais ceci implique d'avoir pour chaque type de protéines (de transport, canaux, récepteurs...) bien cerné le problème de la relation structure/fonction. La progression vers ces objectifs nécessitera des développements instrumentaux (spectromètre de masse : électrospray, MALDI, RMN à haut champs, cryomicroscopie, modélisation, spectroscopie, cinétique rapide), mais aussi des collaborations interdisciplinaires (chimie des détergents).

Les enjeux sont d'importance puisque les protéines membranaires jouent un rôle primordial en biologie cellulaire (exemples : étude des récepteurs, mais aussi interaction des virus et parasites avec la membrane de l'hôte). Cette importance est souvent bien comprise dans le domaine, et souvent les spécialistes des protéines membranaires s'intéressent maintenant à une vision plus intégrée des phénomènes cellulaires (voir "enzymologie cellulaire").

Cartographie des génomes

Le défi qui s'offre aux chercheurs en biologie cellulaire est – entre autres – de proposer pour chaque gène identifié, sa structure, son organisation, sa régulation et son rôle dans la fonction cellulaire au cours du développement embryonnaire et de la vie adulte (normale ou pathologique). Mais, inversement, la connaissance des génomes peut aider le biologiste. Un exemple : malgré des efforts soutenus de plusieurs laboratoires, personne n'avait pu mettre en évidence une α -tubuline dans la levure *S. cerevisiae*. Elle est sortie du séquençage du génome (sa divergence explique les échecs des approches génétiques). Mais, au-delà, le fait de pouvoir analyser l'économie complète d'un génome devrait avoir un impact significatif sur notre vision de la cellule. Cela vaut aussi pour les autres programmes génome, et le fait que l'on annonce le génome humain complet beaucoup plus tôt que prévu va tenir une place grandissante.

Vecteurs de transfert et thérapie génique

Bien que loin d'avoir atteint l'efficacité des vecteurs à base de virus, les vecteurs non viraux sont l'objet de la plus vive attention de la part de la communauté scientifique préoccupée par les problèmes de thérapie génique (cliniciens, responsables de santé publique, industriels du médicament). L'idée de fabriquer des structures capables de "compacter" l'ADN et de le transférer dans le cytoplasme de cellules cibles à la manière des virus (construction de "pseudo-virus") est donc particulièrement intéressante. Elle s'appuie sur des notions de physico-chimie, de biologie cellulaire et de virologie. L'avancée actuelle dans la construction de

vecteurs non viraux est donc le fruit de collaborations entre chercheurs de plusieurs disciplines, parmi lesquels les chimistes occupent une place de choix. Les biologistes cellulaires et les virologues ont également apporté leur contribution, surtout en ce qui concerne l'étude des mécanismes d'interaction entre les complexes lipides/acides nucléiques et les cellules cibles dont la compréhension est indispensable à toute amélioration de l'efficacité du vecteur, et l'élaboration de motifs fusogènes qui augmentent considérablement l'efficacité des vecteurs. À ce jour, on ne peut encore dire si ce type de vecteur pourra relever le défi imposé par les vecteurs viraux, mais les progrès récents en ce domaine laissent espérer de nouvelles avancées qui pourraient à terme concurrencer les vecteurs viraux.

1. 3 ORGANISATION DE LA COMMUNAUTÉ

Jusqu'à une période récente, les communautés scientifiques européennes de biologistes cellulaires ont été peu actives et ont négligé l'organisation de leur discipline et les échanges entre chercheurs ou encore la formation des étudiants. L'importance prise par l'Association Américaine de Biologie Cellulaire, qui en 1996 comprenait plus de vingt mille membres et organise un congrès annuel de près de dix mille participants, est un témoignage du retard pris par les pays européens dans le domaine, puisque l'Organisation Européenne de Biologie Cellulaire, comprenant quatorze mille membres dans dix-sept pays membres, réunit moins de deux mille participants au cours d'un congrès organisé tous les deux ans. Aucun journal européen dans la discipline n'a acquis la réputation et le facteur d'impact de *Journal of Cell Biology*, publié aux États-Unis.

Cette situation est toutefois en train de changer par une prise de conscience de l'importance jouée par la biologie cellulaire et de son rôle dans des disciplines consœurs : immunologie, endocrinologie, neurobiologie, pathogénicité cellulaire (virologie, microbiologie, parasitologie). En Europe, plusieurs pays ont fait l'effort de rassembler des équipes de premier plan dans des instituts ayant atteint une masse critique suffisante pour animer et

représenter cette discipline en pleine évolution et renaissance. La division de biologie cellulaire du Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire (EMBL) à Heidelberg a largement montré la voie dans cette direction et, après avoir formé un grand nombre de chefs de groupes, chercheurs et étudiants dans ce domaine, en a permis l'essaimage et facilité l'organisation à l'échelle européenne de la discipline. C'est ainsi qu'ont vu le jour plusieurs centres de biologie cellulaire importants, en Allemagne d'abord, puis au Royaume-Uni, à Londres, en Suisse qui compte plusieurs centres importants dans la discipline, en Italie, et plus récemment en France, où à l'Institut Curie s'est créé un pôle de biologie cellulaire, rassemblant près de cent cinquante personnes rassemblées dans une structure unique, rattachée au CNRS. L'impact de la discipline se fait sentir par la présence de plus en plus d'équipes européennes qui publient leurs travaux dans les meilleurs journaux internationaux, organisant des ateliers de travail ou participant avec succès aux programmes de l'union européenne ou bien de Human Science Frontier.

1. 4 PERSPECTIVES

Les perspectives pour la discipline et les chercheurs qui l'animent restent fondamentales et en amont des champs d'application et des domaines de développement en matière de recherches biotechnologiques et biomédicales. Cependant, la contribution des biologistes cellulaires s'avère de plus en plus indispensable pour nourrir en aval les programmes de développement en santé publique et agro-alimentaire.

Lorsque le séquençage du génome humain sera achevé, lorsque la plupart, sinon la quasi-totalité des maladies génétiques humaines connues aura été cartographiée, lorsqu'il faudra imaginer et préparer des vecteurs efficaces pour la thérapie génique et cellulaire, les connaissances fondamentales accumulées, ou qui restent à découvrir, pour mieux connaître le fonctionnement et l'organisation des cellules seront encore – et pendant longtemps – le véritable goulet d'étranglement et le facteur limitant pour mettre en application ou exploiter ces avenues importantes. Pouvoir traiter et guérir est

aujourd'hui un légitime objectif qui ne saurait laisser les chercheurs en biologie cellulaire indifférents.

L'étude des gènes et des bases fondamentales du maintien de leurs caractères structuraux et dynamiques n'est qu'une étape indispensable à un projet plus vaste, celui de comprendre le schéma d'organisation globale de la cellule, étape elle-même indispensable pour aborder les niveaux supérieurs de complexité que nous offre l'étude des organismes pluricellulaires. Les recherches en biologie du développement ne sauraient se passer d'une meilleure connaissance des cellules combinée aux méthodes de la génétique.

Le temps des physiologistes est arrivé, promettant un renouveau spectaculaire de cette discipline. Ce renouveau trouvera sa source et sa richesse dans les avancées de la génétique moléculaire qu'auront su intégrer les acteurs d'une recherche en biologie cellulaire moderne : la biologie moléculaire de la cellule.

2 - VIROLOGIE

2. 1 DYNAMIQUE DE LA PRODUCTION DES CONNAISSANCES

Notre analyse se limite aux virus des mammifères et plus particulièrement à ceux de l'homme. Au cours de ces dernières années, la virologie "moléculaire" a continué sur sa lancée et a produit un nombre considérable de résultats concernant les mécanismes de répllication des virus et ceux de leurs interactions avec la cellule hôte. À côté de cette poursuite de l'acquisition des connaissances sur des thèmes déjà bien exploités, que nous ne détaillerons pas, un certain nombre de faits ou de domaines ont émergé.

Les "nouveaux" virus

Il s'agit de l'isolement de virus associés à des pathologies déjà connus depuis longtemps, par exemple les nouveaux virus des hépatites (C, D, E, F, etc.) ou de virus associés à des maladies qui n'avaient pas été jusque là identifiées comme la maladie dite des "four corners". Ces "nouveaux" virus, ainsi bien sûr que le VIH, font toucher du doigt à quel point la liste des virus pathogènes de l'homme est loin d'être close. Il faut noter que plusieurs de ces virus ont été isolés par des méthodes moléculaires (hybridation différentielle en particulier) qui ne font plus appel au pouvoir infectieux. De plus, plusieurs d'entre eux ont été isolés par des compagnies de biotechnologie, et non pas par les organismes de recherche et santé publique traditionnels. Étant donné les enjeux économiques (tests de diagnostic, mise au point de vaccins, chimiothérapie spécifique), ces compagnies tendent à retenir l'information sur ces virus le plus longtemps possible.

Les prions

Leur étude est traditionnellement rattachée à la virologie bien qu'il s'agisse d'un nouveau type d'agents infectieux. Il y a là un recouvrement entre les maladies génétiques et les maladies infectieuses. Bien qu'il reste beaucoup à apprendre, nos connaissances dans ce domaine ont considérablement avancé au cours des dernières années.

Les études de pathogénie menées à l'échelle moléculaire

Ce domaine, pas entièrement nouveau, a cependant considérablement avancé. Ces études se font chez l'animal modèle, mais aussi maintenant chez l'homme, grâce à de nouvelles méthodes de traçage de l'infection virale. L'étude de la sensibilité génétique aux infections virales devient un chapitre important de la virologie. On peut prévoir le passage à l'homme dans les années à venir.

Les études structurales

La virologie a largement bénéficié de l'essor des études structurales, en particulier pour les protéines (diffraction des rayons X, microscopie électronique sur objet en glace amorphe, traitement de l'image, etc.). Ces études ont porté sur la particule virale elle-même, mais aussi sur les interactions du virus avec des composants cellulaires (attachement à la membrane, fusion, etc.). L'étude de l'assemblage des particules virales complexes, en particulier des interactions entre protéines virales, est devenue un domaine très actif, porteur d'espoirs pour la thérapie antivirale.

Les avancées les plus importantes en biologie moléculaire de la réplication des virus

- La reconstitution de clones moléculaires infectieux pour les virus à ARN négatifs. Ces résultats récents ouvrent enfin la voie à la mutagenèse dirigée chez ces virus (grippe, rage, rougeole...). De plus certains de ces virus, en particulier celui de la rougeole, pourraient s'avérer être des vecteurs extrêmement importants pour le développement de nouveaux vaccins.

- La mise en évidence de phénomènes permettant la synthèse de plusieurs protéines sur une même séquence. Citons l'"editing" de l'ARN, le glissement de cadre de lecture au cours de la traduction, l'initiation de la traduction sur des AUG internes. Ces mécanismes découverts chez les virus peuvent aussi exister dans la cellule et jouer un rôle important dans son fonctionnement.

- L'utilisation des virus comme vecteurs (vaccins recombinants, thérapie génique) ou comme traceurs, par exemple pour étudier l'organisation du système nerveux.

Le cas du VIH et du SIDA

En virologie, la décennie écoulée a été celle du SIDA. Il en a résulté un déplacement des moyens de recherches considérable vers ce domaine et donc un appauvrissement très sensible

de la virologie "hors VIH". Ceci est particulièrement prononcé en France, et pose un vrai problème de disparition des compétences.

2. 2 L'INTERDISCIPLINARITÉ

Elle est extrêmement étroite avec des disciplines comme l'immunologie, la biologie cellulaire, la biologie structurale, l'enzymologie, la pharmacologie. On peut prévoir des interactions extrêmement fructueuses avec les grands projets sur les génomes, en particulier le séquençage du génome humain. L'interdisciplinarité se développe ; elle est en fait indispensable aux virologues.

2. 3 ORGANISATION DE LA COMMUNAUTÉ

Il est bon de revenir sur l'importance prise par les firmes de biotechnologie dans l'acquisition des connaissances fondamentales et de noter l'impact en virologie de la création d'agences spécialisées pour la recherche sur le SIDA (ANRS en France).

2. 4 ENJEUX

La compréhension au niveau moléculaire de la pathogénie des infections, en particulier chez l'homme. Ces connaissances sont indispensables à la lutte contre les maladies virales. Dans ce domaine, la chimiothérapie antivirale, en particulier par une approche de "drug design" faisant suite aux études de structure et d'enzymologie, représente un enjeu considérable.

Pour finir, citons les prions et leur rôle dans des maladies dégénératives du système nerveux central.

3. - PARASITOLOGIE

3. 1 DYNAMIQUE DE LA PRODUCTION DES CONNAISSANCES

La parasitologie recouvre classiquement l'étude des eucaryotes (arthropodes, helminthes, protozoaires et champignons) parasites des règnes animal et végétal et leur relation avec leurs hôtes. C'est donc, par définition, une discipline au carrefour d'un grand nombre d'autres disciplines telles que la biochimie, la biologie cellulaire et moléculaire, la génétique, l'immunologie, l'épidémiologie, l'écologie, etc.

Les plus grandes découvertes dans le domaine ont été réalisées au début du siècle avec la découverte des agents infectieux et de leurs vecteurs et le développement de médicaments antiparasitaires et antivectoriels. Après cette période très féconde, la discipline est devenue très descriptive et affaire de spécialistes. L'avènement de la biologie moléculaire a révolutionné la discipline en attirant dans le domaine des chercheurs d'autres formations (principalement aux États-Unis) et a fait naître un grand nombre d'espairs, en particulier pour le développement de vaccins. Ceci a créé une dynamique incontestable même dans le milieu industriel, mais de courte durée car les vaccins se faisaient attendre, montrant la complexité des modèles, et l'épidémie du SIDA a déplacé les priorités, d'où un désintérêt des organismes et du monde industriel pour ces pathologies qui touchent essentiellement les pays en voie de développement dont la plupart sont insolubles. Néanmoins, la richesse et la variété des modèles biologiques que constituent les parasites et leurs cycles biologiques restent un énorme champ d'investigation aussi bien fondamental qu'appliqué, et tous les espoirs de développement d'un vaccin ou d'un nouveau médicament restent permis.

Au cours des quinze dernières années, nos connaissances sur les parasites ont fait d'énormes progrès, et des mécanismes tout à fait inédits ont été découverts, certains uniques au monde des

parasites, d'autres retrouvés chez d'autres organismes. Parmi ces découvertes, il faut citer :

- le phénomène de variation antigénique chez les trypanosomes africains, chez *Giardia* et maintenant chez *P. falciparum*. La variation antigénique des trypanosomes représente l'un des domaines les mieux étudiés de régulation de l'expression de familles multigéniques. Cette expression résulte soit de l'expression différentielle de gènes entiers, soit de la formation par conversion génique de gènes fonctionnels à partir de pseudogènes. Cette diversité antigénique permet aux parasites d'échapper aux défenses immunes de l'hôte. On peut noter que le poulet utilise, pour générer la diversité des anticorps, un mécanisme de conversion génique analogue à celui utilisé par les trypanosomes.

- Les mécanismes d'échappement des parasites à multiplication intracellulaire : inhibition de la fusion endosome-lysosome par *Toxoplasma gondii*, multiplication dans le phagolysosome par leishmanias, sortie du phagolysosome par *Trypanosoma cruzi*. Le phénomène de mimétisme trouvé chez les parasites (*Schistosoma mansoni*) est également d'un grand intérêt pour l'analyse des problèmes d'évolution.

- La découverte chez les kinétoplastidae (trypanosomes, leishmanies) du phénomène "d'editing" de certains pré-mRNA mitochondriaux par addition ou délétion de poly U grâce à des ARN guides codés pour la plupart par les minicercles. Cette maturation peut porter sur plus de la moitié de la séquence codante d'un gène.

- La mise en évidence de facteurs génétiques dans la susceptibilité aux infections parasitaires (*Schistosoma mansoni*, *Plasmodium*).

- L'existence de voies métaboliques spécifiques (métabolisme phospholipidique ou glucidique, système antioxydant, etc.) et de protéines membranaires ayant une fonction vitale pour le parasite (transporteur, molécules d'adhésion, récepteurs). Ces molécules représentent de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou vaccinales.

- L'existence d'une grande plasticité du génome et d'un polymorphisme génétique important, ce qui complique les stratégies vaccinales.

- Sur le terrain, il faut noter les progrès très importants réalisés dans le contrôle de l'onchocercose en Afrique de l'ouest grâce au traitement des malades par l'ivermectine fournie gratuitement par l'industrie pharmaceutique et l'élimination des vecteurs par épandage d'insecticides.

Certaines des découvertes ont eu des retombées importantes pour d'autres domaines. Deux exemples permettent d'illustrer les retombées de l'étude des infections parasitaires en immunologie. Le modèle de l'infection par leishmanie a permis la validation fonctionnelle du rôle des deux sous-populations T auxiliaires, TH2 et TH1, dont l'amplification et l'activation différentielle conduit soit à la protection, soit à l'infection. Ceci met clairement en évidence que l'administration d'une substance immunogène dans le cadre d'une stratégie vaccinale n'est pas anodine et qu'il est nécessaire au préalable d'étudier très précisément les populations cellulaires à cibler. Un autre exemple est apporté par l'étude des helminthiases, qui a permis de montrer l'importance de l'IgE dans la défense antiparasitaire.

Ces deux exemples montrent que les parasites apportent sûrement autant à l'immunologie que l'immunologie apporte à la lutte contre les parasites. En France comme dans d'autres pays européens, on assiste à l'émergence de deux types de parasitologie : celle traitant des parasitoses opportunistes dans les cas d'immunodépression (SIDA, greffe) et celle qui a comme préoccupation les pathologies qui sévissent dans les pays en voie de développement. Cette situation est retrouvée au niveau du développement de nouveaux médicaments antiparasitaires. En effet, l'industrie pharmaceutique se désintéresse totalement des pathologies qui sévissent dans les pays en voie de développement par insuffisance de marché, car la plupart de ces pays sont insolubles. Cette situation est dramatique, car il apparaît de plus en plus de cas de résistances aux quelques médicaments existant sur le marché et, dans le cas du paludisme par exemple, cette chimiorésistance s'est étendue à tous les continents.

Ce désintérêt des industriels pour la discipline et l'absence d'organisme caritatif au niveau national rendent actuellement difficile la programmation

d'une recherche ambitieuse en parasitologie, surtout à une époque de pénurie budgétaire. Le développement, en France, de cette discipline dépend pour l'essentiel des fonds publics, alors que dans d'autres pays européens, en particulier l'Angleterre, des projets ambitieux (génomique) ont pu être financés grâce à des fondations (Wellcome).

3. 2 RESSOURCES TECHNOLOGIQUES ET INTERDISCIPLINARITÉ

La parasitologie bénéficie largement des avancées technologiques des autres disciplines : biologie moléculaire, études structurales, etc. La parasitologie étant un carrefour de disciplines, seule une approche multidisciplinaire comprenant la biochimie, la biologie cellulaire et moléculaire, l'immunologie, la génétique, l'épidémiologie, etc., permettra d'aborder l'étude des parasites et de leur relation avec l'hôte ou le vecteur. Cette approche multidisciplinaire ne doit pas exclure des projets de type génomique, car cette approche va fournir à très court terme de formidables outils d'investigation, vu les connaissances qui nous parviennent d'autres organismes comme la levure, *Caenorhabditis elegans*, ...

L'obstacle majeur à l'interdisciplinarité est l'extrême compartimentation de la société scientifique française. La recherche scientifique française est composée d'un certain nombre de chapelles qui s'ignorent complètement, bien que souvent un certain nombre de problèmes clefs pourraient les rassembler autour d'objectifs communs. La mise en place d'un plus grand nombre de congrès interdisciplinaires sur des thèmes généraux permettrait, au moins partiellement, de pallier cet inconvénient.

3. 3 ENJEUX, OBJECTIFS DU DOMAINE

La recherche en parasitologie comporte deux volets : le premier est celui de la recherche finalisée, dont le but est la mise au point de nouvelles méthodes et techniques d'évaluation, de contrôle, de prévention et de traitement des maladies parasitaires ; le deuxième est celui de la recherche fon-

damentale prenant les parasites et les relations hôtes-parasites comme des modèles pour mieux comprendre ces maladies. Ces deux approches se révèlent de plus en plus complémentaires et sont souvent indissociables.

Sur le plan fondamental, l'objectif est de déterminer d'une part les mécanismes particuliers de fonctionnement cellulaire des parasites, et d'autre part les interactions avec l'hôte ou le vecteur pour comprendre les bases moléculaires de leur pathogénicité. Bien que les parasites partagent beaucoup de voies métaboliques et de signalisations communes aux autres cellules, leurs spécificités apportent un éclairage original aux grands thèmes de la biologie (trafic cellulaire, variabilité génétique, mécanismes de virulence, défense immunitaires, etc., sans compter la notion d'interactions durables développée par C. Combes – section 30 du CN). Sur le plan de la santé publique, l'enjeu est

le contrôle – voire l'éradication – des infections parasitaires en utilisant des stratégies souvent complémentaires comme la vaccination, le médicament antiparasitaire, l'élimination du vecteur. Cet objectif ne pourra être atteint sans recherche fondamentale permettant de définir les cibles thérapeutiques et les limites des stratégies à utiliser. Il faut rappeler que les maladies parasitaires affectent dans le monde plusieurs centaines de millions d'individus et qu'aucune vaccination chez l'homme n'existe à ce jour.

Remerciements

Ce travail a bénéficié de la contribution de collègues que nous tenons à remercier : M. Block, M. Bornens, J. Chevallier, M. Dorée, A. Flamand, B. Guérin, B. Hoflack, D. Louvard, M. M. Portier, M. Rigoulet, M. Satre et J. Velours.